

Biomedica  
2011

CATERINA BERNACCHIONI

# Sfingolipidi bioattivi e loro ruolo nell'azione biologica di fattori di crescita e citochine

P R E M I O T E S I D O T T O R A T O  
FIRENZE UNIVERSITY PRESS – UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI FIRENZE



PREMIO TESI DI DOTTORATO

- 26 -

PREMIO TESI DI DOTTORATO  
Commissione giudicatrice, anno 2011

Luigi Lotti, *Facoltà di Scienze Politiche* (Presidente della Commissione)

Tito Arcchi, *Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali*

Paolo Felli, *Facoltà di Architettura*

Michele Arcangelo Feo, *Facoltà di Lettere e Filosofia*

Roberto Genesisio, *Facoltà di Ingegneria*

Mario Pio Marzocchi, *Facoltà di Farmacia*

Salvo Mastellone, *Facoltà di Scienze della Formazione*

Luciano Mecacci, *Facoltà di Psicologia*

Adolfo Pazzagli, *Facoltà di Medicina e Chirurgia*

Mario Giuseppe Rossi, *Facoltà di Lettere e Filosofia*

Salvatore Ruggieri, *Facoltà di Medicina e Chirurgia*

Piero Tani, *Facoltà di Economia*

Franco Scaramuzzi, *Facoltà di Agraria*

Fiorenzo Cesare Ugolini, *Facoltà di Agraria*

Vincenzo Varano, *Facoltà di Giurisprudenza*

Caterina Bernacchioni

**Sfingolipidi bioattivi e loro ruolo  
nell'azione biologica di fattori di crescita e  
citochine**

Firenze University Press  
2012

Sfingolipidi bioattivi e loro ruolo nell'azione biologica di fattori di crescita e citochine / Caterina Bernacchioni. – Firenze : Firenze University Press, 2012. (Premio Tesi di Dottorato ; 26)

<http://digital.casalini.it/9788866552192>

ISBN 978-88-6655-218-5 (print)

ISBN 978-88-6655-219-2 (online)

Progetto grafico di Alberto Pizarro Fernández, Pagina Maestra snc  
Immagine di copertina:

*Certificazione scientifica delle Opere*

Tutti i volumi pubblicati sono soggetti ad un processo di referaggio esterno di cui sono responsabili il Consiglio editoriale della FUP e i Consigli scientifici delle singole collane. Le opere pubblicate nel catalogo della FUP sono valutate e approvate dal Consiglio editoriale della casa editrice. Per una descrizione più analitica del processo di referaggio si rimanda ai documenti ufficiali pubblicati sul sito-catalogo della casa editrice (<http://www.fupress.com>).

*Consiglio editoriale Firenze University Press*

G. Nigro (Coordinatore), M.T. Bartoli, M. Boddi, F. Cambi, R. Casalbuoni, C. Ciappei, R. Del Punta, A. Dolfi, V. Fargion, S. Ferrone, M. Garzaniti, P. Guarnieri, G. Mari, M. Marini, M. Verga, A. Zorzi.

© 2012 Firenze University Press

Università degli Studi di Firenze

Firenze University Press

Borgo Albizi, 28, 50122 Firenze, Italy

<http://www.fupress.com/>

*Printed in Italy*

# Sommario

## Capitolo 1

<b>Introduction</b>	1
1. Muscolo scheletrico	1
1.1 Linea cellulare C2C12	6
2. Sfingolipidi	7
2.1 Metabolismo degli sfingolipidi	8
3. Sfingosina 1-fosfato (S1P)	13
3.1 Attivazione e localizzazione subcellulare di sfingosina chinasi 1	18
3.2 Attivazione e localizzazione subcellulare di sfingosina chinasi 2	19
3.3 Sfingosina chinasi extracellulare	20
3.4 Modalità di azione di S1P	21
3.5 Recettori per S1P	24
3.6 Funzioni biologiche di S1P	30
4. Ceramide 1-fosfato (C1P)	36
4.1 Funzioni biologiche di C1P	39
5. Sfingolipidi e muscolo scheletrico	44
6. Fattore di crescita trasformante $\beta$ (TGF $\beta$ )	49
6.1 TGF $\beta$ e muscolo scheletrico	54
7. Fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF)	56
7.1 PDGF e muscolo scheletrico	61
8. <i>Cross-talk</i> tra vie di segnalazione di S1P, fattori di crescita e citochine	62

## Capitolo 2

<b>Results</b>	71
1. Paper 1	71
2. Paper 2	72
3. Paper 3	74

## Capitolo 3

<b>Discussion</b>	77
-------------------	----

<b>References</b>	83
-------------------	----

<b>Appendix</b>	105
-----------------	-----



# Capitolo 1

## Introduction

### 1. Muscolo scheletrico

Ogni muscolo scheletrico è composto da fibre muscolari, cellule altamente specializzate per la funzione che devono svolgere. Questa estrema specializzazione funzionale è realizzata attraverso un differenziamento terminale che prevede l'uscita irreversibile dal ciclo cellulare, con conseguente perdita della capacità proliferativa, e lo stabilirsi di uno specifico pattern di espressione genica. Le fibre muscolari sono cellule sinciziali allungate, caratterizzate dalla presenza di numerosi nuclei disposti in posizione periferica e di miofibrille, costituite da unità ripetute, i sarcomeri, formati da filamenti di actina e di miosina. Associate alle fibre muscolari si trovano inoltre cellule mononucleate, indicate come cellule satelliti per la posizione che occupano, tra il plasmalemma delle miofibre e la lamina basale che le circonda (Mauro, 1961). Il numero di cellule satelliti associate a ciascuna cellula muscolare dipende dal tipo di fibra presa in esame, oltre che dalla specie e dall'età dell'organismo. A differenza delle miofibre, le cellule satelliti sono cellule indifferenziate che mantengono la capacità di proliferare e di differenziare, dando origine a nuove cellule muscolari: esse rappresentano perciò il compartimento staminale del tessuto muscolare scheletrico. Le cellule satelliti costituiscono la principale fonte di nuove miofibre nel muscolo post-natale e rivestono pertanto un ruolo fondamentale nell'omeostasi del muscolo, sia nel contesto del normale *turnover* che in risposta a stimoli di crescita o a danni.

Nei mammiferi, il processo di miogenesi scheletrica, cioè lo sviluppo delle cellule muscolari scheletriche durante l'embriogenesi, procede attraverso tre fasi: la determinazione dei precursori delle cellule muscolari, chiamati mioblasti, la moltiplicazione dei mioblasti e il loro successivo differenziamento in cellule muscolari mature (Figura 1). I mioblasti sono cellule commissionate a diventare fibre muscolari, ma non sono ancora differenziati, e pertanto vengono definiti determinati. Le cellule satelliti hanno origine da una sottopopolazione di mioblasti associati alla superficie delle cellule muscolari in via di sviluppo che, durante l'embriogenesi, non differenziano e rimangono quiescenti (Gros, 2005).

Durante la prima fase della miogenesi, i mioblasti si sviluppano da ammassi di cellule mesodermiche situati ai lati del tubo neurale dell'embrione, i somiti, che danno origine ad altri tessuti oltre a quello muscolare. Specifici segnali provenienti dai tessuti circostanti svolgono un ruolo importante nel determinare in



quale porzione dei somiti in via di sviluppo si formeranno i mioblasti: le specifiche molecole segnale extracellulari che inducono la determinazione dei mioblasti vengono espresse solo temporaneamente. Tali segnali innescano l'espressione di numerosi fattori trascrizionali che possono far poi procedere il programma miogenico in assenza dei segnali da cui esso è stato attivato.

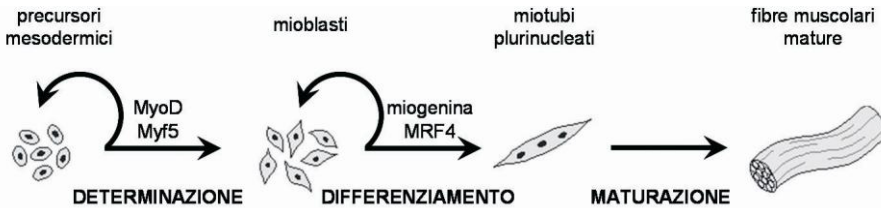


Figura 1. Rappresentazione schematica dello sviluppo del muscolo scheletrico nei mammiferi.

In seguito a un'iniziale fase proliferativa i mioblasti si allineano, smettono di dividersi e si fondono tra loro formando sincizi plurinucleati, denominati miotubi. In concomitanza con la fusione delle cellule aumenta marcatamente l'espressione dei geni necessari per il differenziamento delle fibre muscolari. I miotubi sintetizzano poi le proteine caratteristiche delle fibre muscolari e si differenziano in cellule muscolari mature, contrattili. Sono state caratterizzate quattro proteine che regolano la miogenesi, appartenenti alla famiglia di fattori di trascrizione con un dominio basico elica-ansa-elica (bHLH), identificate per la loro capacità di indurre un differenziamento caratteristico del muscolo scheletrico quando espresse in cellule non muscolari (Davis, 1987): MyoD, Myf5, miogenina e MRF4, collettivamente indicate come MRF (*Myogenic Regulatory Factor*). Sebbene le quattro proteine miogeniche abbiano caratteristiche comuni, esse mostrano un diverso *pattern* di espressione temporale che ne riflette le differenze funzionali (Sassoon, 1993): Myf5 e MyoD, espresse precocemente, sono necessarie per la determinazione delle cellule mesodermiche in mioblasti, mentre miogenina e MRF4, espresse più tardivamente in cellule uscite dal ciclo cellulare, sono necessarie per il differenziamento in miotubi. MRF4 sembra inoltre contribuire al mantenimento della specificità cellulare. Gli MRF controllano la determinazione ed il differenziamento dei mioblasti regolando l'espressione genica mediante il legame a specifiche sequenze di DNA (E-box, CANNTG) presenti a livello dei promotori di geni muscolo-specifici (Berkes, 2005). L'attivazione dell'espressione di questi geni da parte degli MRF dipende dalla loro associazione con altri fattori trascrizionali bHLH, appartenenti alla famiglia E2, e con i fattori di trascrizione MEF2 (*Myocyte Enhancer Factor 2*), appartenenti alla famiglia MADS, che funzionano come co-attivatori trascrizionali delle proteine miogeniche (Black, 1998).

Come precedentemente illustrato, l'induzione del programma miogenico è contraddistinta a livello molecolare dall'espressione di MyoD e Myf5 e dei MEF2. Queste proteine, oltre ad interagire direttamente al fine di attivare l'espressione di altri fattori miogenici che inducono il differenziamento, quali miogenina e

MRF4, regolano in modo positivo la loro reciproca espressione. L'attivazione di questa rete di interazioni intracellulari spiega come il programma miogenico, pur essendo indotto da segnali extracellulari espressi temporaneamente, possa essere mantenuto nel tempo anche in assenza di tali segnali.

Dal momento che l'inizio del differenziamento è associato al blocco della proliferazione cellulare è necessaria la presenza di specifici meccanismi molecolari che mantengano i mioblasti in uno stato determinato in cui possano moltiplicarsi senza iniziare il differenziamento fino al momento opportuno. A questi meccanismi contribuiscono proteine inibitrici, come la Id (*Inhibitor of DNA binding*) che, formando eterodimeri con gli MRF, ne impedisce il legame al DNA bloccando dunque l'attivazione della trascrizione di geni muscolo-specifici e proteine che promuovono la progressione attraverso il ciclo cellulare. Poiché proliferazione e differenziamento sono eventi mutualmente esclusivi, è stato per molto tempo ritenuto che i fattori mitogeni agissero stimolando la proliferazione dei precursori delle cellule muscolari ed inibendone al tempo stesso il differenziamento. Ciò è stato successivamente confermato per molecole quali il fattore di crescita fibroblastico basico (bFGF), tuttavia altre molecole, quali insulina ed i fattori di crescita simili all'insulina I e II (IGF-I e II), sono capaci di stimolare entrambi i processi in cellule muscolari in coltura (Bach, 1995). Inoltre, molecole come la miostatina, appartenente alla famiglia del fattore di crescita trasformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ), agiscono inibendo sia la proliferazione sia il differenziamento di cellule muscolari *in vitro* (Thomas, 2000; Rios, 2002).

Il muscolo scheletrico post-natale possiede notevoli potenzialità rigenerative, strettamente correlate alla capacità delle cellule satelliti di attivarsi in risposta a danno dovuto a differenti cause quali patologie miodegenerative come le distrofie muscolari, traumi o esercizio fisico intenso (Chargé, 2004). Infatti, sebbene in condizioni fisiologiche tali cellule siano mitoticamente quiescenti e ad attività trascrizionale bassa, in risposta ad opportuni stimoli, quali quelli rilasciati in seguito ad un danno, esse vengono indotte ad entrare nel ciclo cellulare e proliferare. Le cellule commissionate da esse derivanti, i mioblasti, vanno incontro a numerosi cicli di divisione, dopodiché smettono di proliferare, vanno incontro a differenziamento terminale e si fondono a miofibre danneggiate preesistenti o tra loro a dare origine a nuove miofibre (Figura 2).

Il danno muscolare causa la necrosi di parte o dell'intera miofibrilla. La necrosi stimola quindi una risposta infiammatoria caratterizzata dall'invasione di linfociti e macrofagi, seguita dall'attivazione di cellule satelliti. La rigenerazione muscolare è caratterizzata da tre fasi sequenziali parzialmente sovrapposte: risposta infiammatoria, caratterizzata dall'invasione dei macrofagi; attivazione, differenziamento e fusione delle cellule satelliti; e maturazione delle nuove miofibre formate e rimodellamento del muscolo rigenerato.

La necrosi delle miofibre danneggiate induce il reclutamento per chemiotassi di leucociti, inizialmente neutrofilo e in seguito macrofagi, principalmente derivanti dai monociti circolanti. Tali fagociti sono stati a lungo considerati come *scavengers* coinvolti nella rimozione dei detriti necrotici, recenti studi hanno tuttavia dimostrato un ruolo attivo dei macrofagi nel promuovere la rigenerazione muscolare. Il muscolo danneggiato è, infatti, invaso sequenzialmente da

due distinte popolazioni di macrofagi (Chazaud, 2009). I macrofagi che invadono precocemente l'area necrotica, caratterizzati dall'espressione del *marker* di superficie CD68 e mancanti del *marker* CD163, raggiungono la massima concentrazione entro 24 ore dal danno e in seguito diminuiscono rapidamente. Tali macrofagi "infiammatori" secernono citochine pro-infiammatorie, quali TNF $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor* $\alpha$ ) e interleuchina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), e sono responsabili della fagocitosi del tessuto necrotico. Una seconda popolazione CD68-/CD163+ di macrofagi "anti-infiammatori", apparentemente derivanti dai macrofagi infiammatori per *switch* fenotipico, raggiunge un picco tra 2 e 4 giorni dal danno e secerne citochine anti-infiammatorie, come interleuchina-10 (IL-10), che contribuiscono a terminare l'infiammazione.

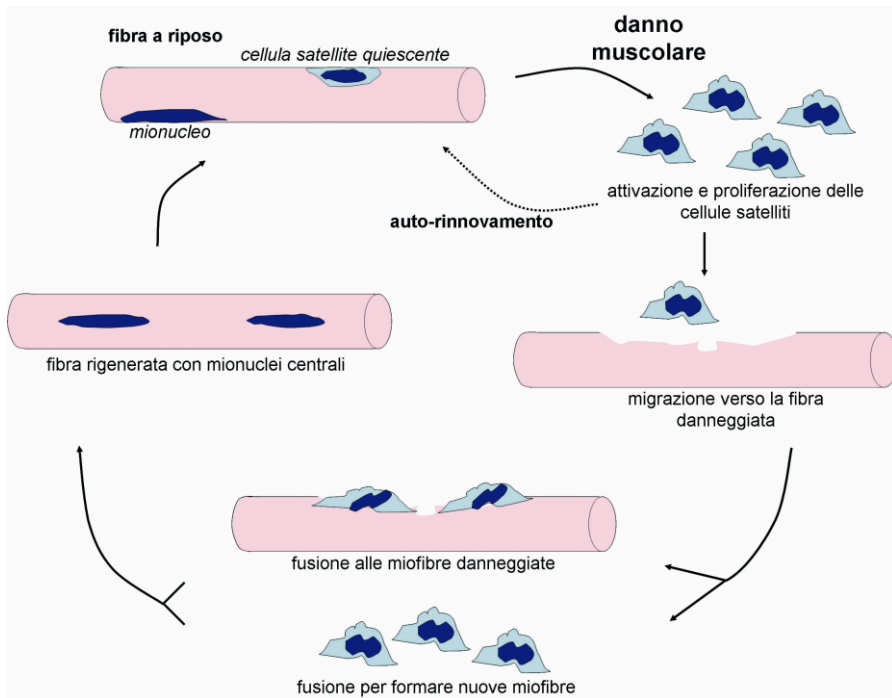


Figura 2. Rappresentazione schematica della rigenerazione muscolare.

I macrofagi hanno dunque un ruolo centrale nella risposta muscolare al danno, non solo per la rimozione del tessuto necrotico ma anche per la promozione della rigenerazione muscolare. Come precedentemente descritto, in seguito a trauma muscolare le cellule satelliti iniziano a proliferare, processo che inizia dal secondo giorno dopo il danno. L'attivazione delle cellule satelliti sembra essere innescata da molteplici segnali; ad oggi sono stati identificati soltanto alcuni di essi, prodotti dalle cellule satelliti stesse o rilasciati nel microambiente circostante da tipi cellulari differenti. La generazione dello sfingolipide bioattivo sfingosina 1-fosfato nel foglietto interno della membrana plasmatica di tali cellule è richiesta per la loro attivazione: quando la sua sintesi è inibita, infatti, le

cellule non entrano nel ciclo cellulare e il processo di rigenerazione è difettivo (Nagata, 2006). La produzione di monossido di azoto (NO), dovuta all'aumentata attività della monossido di azoto sintasi (NOS), è anch'essa importante per l'attivazione delle cellule satelliti. L'azione del NO è probabilmente mediata dall'attivazione delle metalloproteinasi di matrice che inducono il rilascio di HGF (*Hepatocyte Growth Factor*) dalla matrice extracellulare (Tatsumi, 2006). Il successivo legame di HGF con il suo recettore c-met stimola, infatti, l'attivazione delle cellule satelliti (Tatsumi, 1998) inibendone contemporaneamente il differenziamento muscolare (Miller, 2000). Il passaggio delle cellule satelliti dalla proliferazione al differenziamento è controllato dal *signalling* di Wnt e Notch: il *signalling* di Notch prevale nella fase proliferativa (Conboy, 2002), quello di Wnt durante la fase differenziativa (Brack, 2008). La coordinazione di queste due vie di segnalazione è cruciale per la rigenerazione dal momento che l'attivazione precoce del *signalling* di Wnt porta a fusione dei mioblasti e differenziamento prematuri, che avvengono cioè quando il numero dei mioblasti proliferanti non è ancora sufficiente a riparare completamente la lesione (Brack, 2008). La successiva crescita del muscolo rigenerante può variare in relazione a più fattori, inclusi il tipo di danno muscolare, il coinvolgimento di vasi sanguigni e il ristabilirsi di giunzioni neuromuscolari e miotendinee. Un fattore cruciale per una riuscita rigenerazione muscolare è il mantenimento della lamina basale delle fibre muscolari: entro la lamina basale intatta le cellule satelliti e i miotubi possono proliferare e fondere a formare fibre muscolari in breve tempo. Le prime fasi della rigenerazione muscolare, che includono attivazione, proliferazione differenziamento e fusione delle cellule satelliti possono avvenire in assenza del nervo. Le successive crescita e maturazione delle fibre neoformate, tuttavia, richiedono la presenza di una giunzione neuromuscolare: se la connessione neuromuscolare non è ristabilita le miofibre rigeneranti rimangono atrofiche. L'attività nervosa risulta essere il fattore cruciale dal momento che la stimolazione elettrica è in grado di promuovere la crescita muscolare in muscoli rigeneranti denervati (Kahovde, 2005).

Differenti distrofie muscolari umane, inclusa la distrofia muscolare di Duchenne (DMD), e le miopatie infiammatorie, come la dermatomiosite o la polimiosite, sono caratterizzate da cicli ripetuti di necrosi e rigenerazione delle fibre muscolari. Fenomeni simili sono stati osservati in modelli animali di distrofie muscolari, quali topi *mdx*, privi della distrofina, che rappresentano un modello della DMD con fenotipo più lieve rispetto ai DMD. Tali cicli di degenerazione/rigenerazione portano con il tempo all'alterazione della struttura del muscolo con variazioni nelle dimensioni delle miofibre, dovuta a fusione incompleta delle miofibre rigeneranti, all'esaurimento progressivo della capacità rigenerativa delle cellule satelliti e alla sostituzione del tessuto muscolare con tessuto adiposo e fibrotico. Sono state proposte varie ipotesi per giustificare l'incapacità progressiva delle cellule precursori a proliferare e/o differenziare. I mioblasti isolati da pazienti affetti da DMD hanno un ridotto potenziale proliferativo *in vitro* (Blau, 1983; Webster, 1990), probabilmente dovuto a invecchiamento proliferativo. È stato inoltre dimostrato che cellule satelliti derivanti da muscoli distrofici sono caratterizzate da fusione e differenziamento ritardati (Delaporte,

1984). Una possibilità alternativa è rappresentata dal fatto che il microambiente del muscolo distrofico, inclusa la presenza di cellule infiammatorie e immunitarie, possa interferire con la rigenerazione muscolare (Brack, 2007). Citochine come il TGF $\beta$ , noto mediatore della fibrosi aumentato in muscoli distrofici, potrebbero infatti inibire la rigenerazione muscolare come verrà più ampiamente discusso in seguito.

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, 1997).

Le cellule satelliti rivestono un grande interesse per le loro potenzialità applicative. La capacità di queste cellule di rigenerare il tessuto muscolare danneggiato ha portato infatti ad ipotizzare un loro utilizzo in campo terapeutico, nel trattamento di patologie degenerative della muscolatura scheletrica. È stato recentemente dimostrato che cellule staminali individuate in tessuti fra loro non embriologicamente imparentati, quali midollo osseo e cervello, se opportunamente stimolate (Galli, 2000; Ferrari, 1998) sono capaci di differenziare a muscolo scheletrico. Tuttavia non è ancora chiaro se tali cellule contribuiscano fisiologicamente ai processi di rigenerazione del muscolo scheletrico. La dimostrazione che alcuni di questi tipi cellulari sono in grado di espandersi in coltura mantenendo la pluripotenza ha indirizzato la ricerca verso una loro possibile applicazione clinica nella terapia cellulare di miopatie.

### 1.1 Linea cellulare C2C12

La linea cellulare di mioblasti murini C2C12, derivata da cellule satelliti isolate da muscolo rigenerante di topo adulto (Salminen, 1991), rappresenta una delle linee cellulari più utilizzate per lo studio della biologia del muscolo scheletrico *in vitro*. Le cellule muscolari in coltura forniscono infatti un eccellente modello per lo studio del differenziamento miogenico *in vitro* poichè tale processo risulta facilmente inducibile attraverso la composizione del mezzo di coltura e controllabile attraverso il monitoraggio dei parametri legati al differenziamento.

Il processo di differenziamento dei mioblasti C2C12 *in vitro* ricapitola la miogenesi: sostituendo a mioblasti confluenti il siero fetale bovino al 10%, normalmente presente nel terreno di crescita, con siero di cavallo al 2%, a più basso contenuto di mitogeni, tali cellule smettono di proliferare, si allineano e si fondono dando origine a miotubi maturi in 5-6 giorni. La comparsa di un fenotipo progressivamente più differenziato si accompagna, a livello molecolare, all'espressione di proteine specifiche del muscolo, che possono perciò essere impiegate come *marker* del processo. L'espressione dei geni specifici del differenziamento muscolare avviene secondo un *pattern* temporale ben preciso: entro 24 ore dalla deprivazione di siero si ha l'espressione di miogenina, con un picco massimo a 48 ore. A partire da 48 ore dalla privazione di siero si ha l'espressione di proteine che caratterizzano le cellule muscolari mature, i cui livelli aumentano gradualmente durante il differenziamento passando da miobla-

sti a miotubi: la catena pesante della miosina (MHC, *Myosin Heavy Chain*) e la caveolina-3. Quest'ultima è una isoforma della caveolina espressa in maniera specifica in cellule del muscolo scheletrico, liscio e cardiaco. Nel muscolo scheletrico tale proteina costituisce il rivestimento di invaginazioni del plasmalemma simili a microdomini caveolari. La caveolina-3 può essere considerata una delle proteine *marker* del differenziamento: bloccandone l'espressione mediante oligodeossinucleotidi antisenso (ODN-AS) si ha infatti un'alterazione del processo di differenziamento di cellule in coltura, con mancata fusione dei mioblasti (Tang, 1996).

## 2. Sfingolipidi

Gli sfingolipidi sono molecole anfipatiche presenti nelle cellule eucariotiche nelle quali rappresentano una piccola ma vitale frazione (10-20%) dei lipidi di membrana. La regione idrofobica consiste di uno scheletro sfingoide, di solito sfingosina, diidrosfingosina (o sfinganina), o 4-idrossisfinganina (o fitosfingosina) nelle piante e nel lievito, al quale è legato al carbonio in posizione 2, tramite legame carboamidico, un acido grasso. La regione idrofilica può essere rappresentata a seconda dello sfingolipide da un gruppo fosfato legato al C-1 (sfingosina 1-P, ceramide 1-P), da fosforilcolina nella sfingomieline (SM), o da zuccheri nei glicosfingolipidi (GLS). Gli sfingolipidi si distinguono in base al tipo di scheletro carbonioso dell'acido grasso legato al C-2: più di 20 specie di acidi grassi, che differiscono per lunghezza, grado di saturazione e grado di idrossilazione, possono essere legati allo scheletro sfingoide. La complessità degli sfingolipidi risulta aumentata anche dal tipo di carboidrato legato al C-1 nei GLS, sono state infatti descritte circa 500 specie diverse. Sebbene specifiche componenti risultino prevalentemente associate a specifici sfingolipidi, per esempio alcuni acidi grassi si trovano preferenzialmente in certi GLS, il numero delle potenziali combinazioni è estremamente elevato.

Gli sfingolipidi sono distribuiti in maniera asimmetrica nella membrana plasmatica, sia in direzione laterale che verticale. Lateralmente gli sfingolipidi e il colesterolo formano i microdomini di membrana che hanno un ruolo fondamentale nei processi di trasduzione del segnale. Verticalmente sia gli sfingolipidi che i glicosfingolipidi sono distribuiti in modo asimmetrico tra i due foglietti della membrana plasmatica: gli sfingolipidi complessi, quali SM e i GLS, sono confinati nel foglietto esterno. La stabilizzazione meccanica della membrana dipende dal mantenimento di una corretta asimmetria nei lipidi e cambiamenti, locali o globali, nella asimmetria lipidica possono indurre varie risposte cellulari quali apoptosi e coagulazione delle piastrine (Ikeda, 2006).

I lipidi sono stati a lungo considerati molecole con un ruolo fondamentale nel metabolismo cellulare e nella biologia delle membrane, ma nelle ultime due decadi è stato dimostrato che essi hanno anche un ruolo significativo negli eventi di trasduzione del segnale. In questi anni è stato dimostrato che diversi lipidi possono avere un ruolo come molecole di segnalazione, tra queste il diacilglicerolo, l'acido fosfatidico, l'acido lisofosfatidico, i fosfoinositidi e gli sfingolipidi.

L'aminoalcol a lunga catena sfingosina (Sph), che esercita effetti pleiotropici su proteine chinasi ed altri *target*, è stato il primo sfingolipide ad essere identificato come "lipide bioattivo" definendo con tale espressione un lipide i cui cambiamenti di concentrazione determinano conseguenze funzionali.

La sfingosina e le basi sfingoidi ad essa correlate hanno un ruolo nel regolare i processi di endocitosi, il ciclo cellulare e l'apoptosi. Ceramide (Cer) media molte delle risposte cellulari allo stress, incluso il processo apoptotico e la senescenza, mentre la sfingosina 1-fosfato (S1P) ha un ruolo cruciale nella sopravvivenza cellulare, nella migrazione e nel processo infiammatorio (Figura 3). Recentemente nella famiglia degli sfingolipidi bioattivi è stato incluso il ceramide 1-fosfato (C1P) che ha un ruolo nell'infiammazione e nella formazione di vescicole.

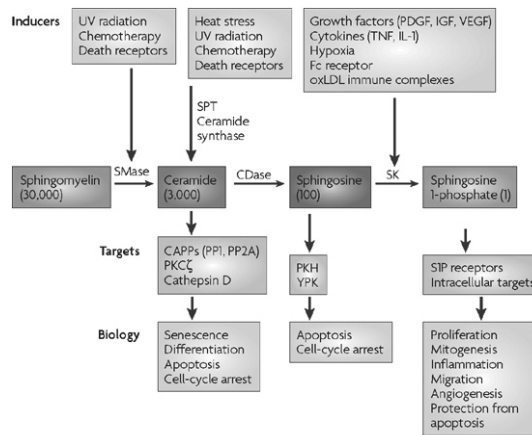


Figura 3. Ruolo degli sfingolipidi nella biologia cellulare.

Oltre all'elevato numero di processi cellulari ai quali gli sfingolipidi sono associati, un ulteriore livello di complessità nel *signalling* di queste molecole è aggiunto dalla interconnessione metabolica dei lipidi bioattivi e dalla natura idrofobica degli enzimi del metabolismo lipidico. Le proprietà biofisiche dei lipidi coinvolti nella trasduzione del segnale, inoltre, introduce complicazioni che riguardano la loro localizzazione sub-cellulare ed il loro meccanismo di azione.

## 2.1 Metabolismo degli sfingolipidi

Come precedentemente illustrato lo scheletro degli sfingolipidi è costituito da un aminoalcol a 18 atomi di carbonio, la sfingosina, che può legare al gruppo amidico presente in posizione C-2 un acido grasso mediante un legame carbonamidico dando origine al ceramide. Sulla base del gruppo legato al C-1 gli sfingolipidi sono classificati come fosfosfingolipidi o glicosfingolipidi. Il fosfosfingolipide sfingomielina (SM) presenta fosforilcolina o fosfoinositolo come gruppo

polare legato in C-1. Nei glicosfingolipidi il gruppo legato al C-1 può contenere differenti monosaccaridi legati tra loro mediante vari tipi di legame glicosidico.

Il *pathway* che costituisce il metabolismo degli sfingolipidi ha un unico punto di entrata rappresentato dalla serina palmitoil transferasi, SPT, che catalizza la prima reazione della sintesi *de novo* e un unico punto di uscita, la sfingosina 1-fosfato liasi (SPL), che idrolizza S1P in molecole non sfingolipidiche. Le tappe metaboliche comprese costituiscono una rete altamente complessa che connette il metabolismo di molti sfingolipidi (Figura 4). In tale *pathway* il ceramide può essere considerato il fulcro metabolico dal momento che occupa una posizione centrale nella biosintesi e nel catabolismo degli sfingolipidi.

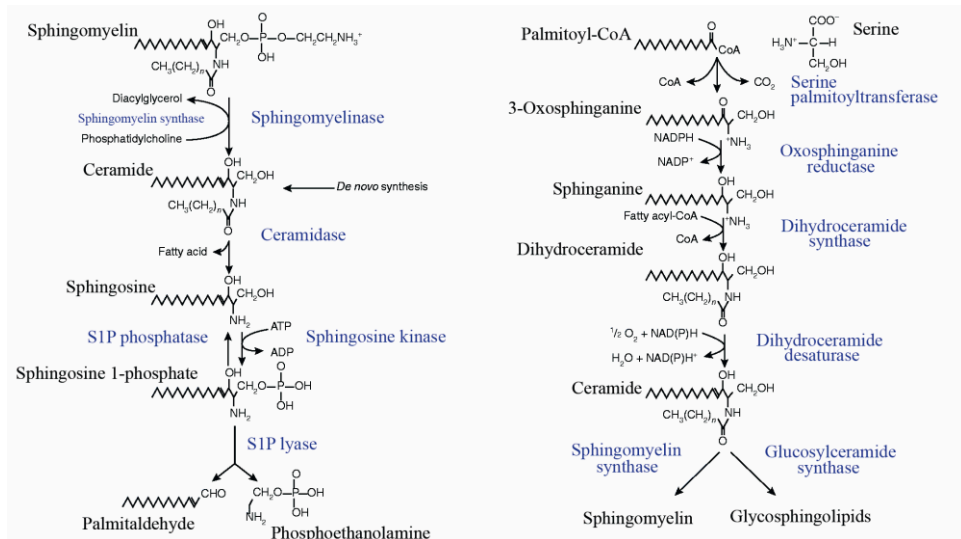


Figura 4. Metabolismo degli sfingolipidi.

La sintesi *de novo* (Figura 4) degli sfingolipidi avviene in organismi eucariotici sia unicellulari che pluricellulari. Nelle cellule di mammifero rappresenta un processo essenziale per la sopravvivenza poichè gli sfingolipidi assunti con la dieta sono rapidamente degradati durante i processi digestivi. La figura 4 mostra che la sintesi *de novo* degli sfingolipidi è un processo che avviene a tappe. Gli enzimi coinvolti sono localizzati sulla membrana del reticolo endoplasmatico (RE) e in membrane associate al reticolo endoplasmatico, quali la membrana perinucleare e le membrane associate ai mitocondri (MAM), e le reazioni catalizzate sul versante luminale (Hannun, 2008). La prima tappa consiste nella condensazione del palmitoil-CoA con l'amminoacido serina a formare 3-chetodihidrosfingosina (anche detta 3-chetosfinganina), l'enzima che catalizza la reazione è la serina-acil-transferasi piridossal 5'-fosfato dipendente, che agisce preferenzialmente su acidi grassi attivati a 16 atomi di carbonio (palmitoil-CoA). Tale enzima è un eterodimero costituito dalle subunità SPTLC1 e SPTLC2, ognuna delle quali è una proteina integrale di membrana del RE. I siti catalitici della transferasi sono localizzati entro le subunità SPTLC2, che sono stabilizzate dalle



subunità SPTLC1. SPT è dunque un enzima di membrana del RE con il sito catalitico rivolto verso il citosol. E' stata recentemente identificata nei mammiferi un'altra serina palmitoil transferasi, SPTLC3 (Hornemann, 2006). L'espressione di quest'ultima isoforma identificata è ristretta a tessuti specifici quali placenta e trofoblasti, al contrario di SPTLC1 e SPTLC2, che sono ubiquitariamente espresse (Hornemann, 2006). La 3-chetodiidrosfingosina è ridotta a D-eritrosfinganina (diidrosfingosina) dall'enzima 3-chetodiidrosfingosina reductasi NADPH-dipendente. La diidrosfingosina è il substrato dell'enzima diidro-Sph-N-aciltransferasi (Cer sintasi), che catalizza il trasferimento di un acido grasso attivato a lunga catena, acil-CoA, sul gruppo amminico libero della sfinganina, producendo N-acilsfinganina (diidroceramide). Gli enzimi Cer sintasi, proteine transmembrana localizzate a livello del RE, sono codificati dai sei geni membri della famiglia *LASS*, *LASS1-6* (Pewzner-Jung, 2006). Le proteine *LASS* hanno profili di espressione tessuto specifici e preferenze per i vari acil-CoA, ad eccezione di *LASS3* che ha un'ampia specificità di substrato. L'iperproduzione di una singola proteina *LASS* risulta nell'aumento di una o più specie di Cer con un acido grasso a catena di lunghezza specifica (*LASS1*, C18; *LASS5* e *LASS6*, C16; *LASS2* e *LASS4*, C22 e C24) (Pewzner-Jung, 2006).

La tappa successiva consiste nella sintesi del Cer, catalizzata dall'enzima  $\Delta 4$ -desaturasi *DES1*, che inserisce un'insaturazione tra gli atomi di carbonio C-4 e C-5 nel diidroceramide dando origine a Cer. Poiché l'enzima  $\Delta 4$ -desaturasi di mammifero non può convertire diidro-sfingosina in Sph, Sph non può essere prodotta dal *pathway* biosintetico *de novo*. Cer formato nel RE è trasportato al Golgi, sito della sintesi di SM e di glucosilceramide (GluCer) il quale, a sua volta, è precursore per la sintesi di glicosfingolipidi complessi (GSLs). Il Cer può essere trasportato al Golgi mediante trasporto vescicolare, in seguito al quale Cer viene convertito in GluCer, o dalla proteina *CERT*, che trasporta Cer specificatamente per la sintesi di SM (Figura 5).

Cer è glicosilato a GluCer a livello del foglietto citosolico delle membrane del cis-Golgi. Successivamente il GluCer deve essere trasportato al compartimento trans del Golgi e traslocato sul foglietto luminale poiché tutte le successive reazioni di glicosilazione che portano alla sintesi di GSLs complessi hanno luogo nel lume di tale compartimento. Il trasferimento di GluCer dal cis- al trans-Golgi è mediato dalla recentemente identificata proteina *FAPP2* (D'Angelo, 2007). Il *flipping* del Cer verso l'interno del Golgi per la sintesi di GSLs complessi è mediato dal trasportatore *ABC*, glicoproteina-P (o *MDR1*).

I glicosfingolipidi vengono poi trasportati, attraverso vescicole, alla membrana plasmatica, dove mediano processi di riconoscimento intercellulare, adesione cellulare e differenziamento (Hannun, 2008). Il Cer trasportato al Golgi dalla proteina *CERT* è substrato della sfingomielina sintasi, che catalizza il trasferimento di una molecola di fosforilcolina dalla fosfatidilcolina all'ossidrile in C-1 del Cer dando origine a SM. Un prodotto della reazione che porta alla formazione della SM è il diacilglicerolo (DAG), un importante secondo messaggero intracellulare in grado di attivare alcune isoforme di *PKC*; il metabolismo di SM è dunque associato a quello dei glicerofosfolipidi (Newton, 1995). Il gruppo idros-

silico in C-1 del Cer può essere fosforilato a dare C1P in una reazione catalizzata dall'enzima ceramide chinasi (CERK).

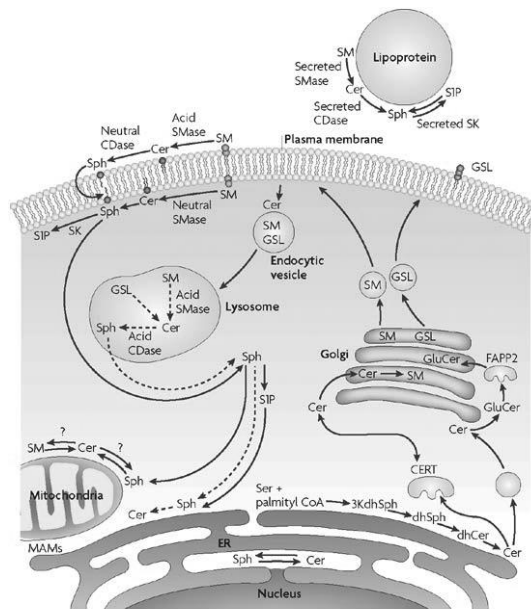


Figura 5. Compartimentalizzazione dei pathways del metabolismo degli sfingolipidi.

Il trasporto di SM e GSLs a livello della membrana plasmatica sembra essere mediato da vescicole. La SM, localizzata a livello della membrana plasmatica, può costituire parte del *pool* dei lipidi di membrana come componente strutturale oppure essere ulteriormente metabolizzata per dare origine a molecole sfingoidi bioattive (Figura 4). In questo processo di degradazione, la SM presente a livello del plasmalemma viene convertita in Cer e fosforilcolina per idrolisi del legame fosfodiesterico. Questa reazione è catalizzata dall'enzima sfingomielinasi (SMasi), che può essere attivato da diversi stimoli intra- ed extracellulari (Levade, 1999) e del quale sono state identificate due isoforme, che differiscono per l'optimum di pH di catalisi, per la localizzazione subcellulare e per il cofattore metallico richiesto (Levade, 1999): una SMasi acida, localizzata a livello del foglietto esterno della membrana e nei lisosomi, ed una SMasi neutra, presente invece a livello del foglietto interno. Il Cer così generato può agire come molecola biologicamente attiva oppure da precursore per la sintesi di altre molecole sfingoidi bioattive. La ceramidasi (CDasi) è l'enzima che catalizza la reazione di deacilazione del Cer in Sph. Esistono diverse forme di CDasi classificate, in funzione del pH di catalisi, in CDasi acida lisosomiale, coinvolta principalmente nella via biodegradativa degli sfingolipidi e CDasi neutra/alcalina. Il metabolismo degli sfingolipidi si estende al sistema circolatorio a livello del quale sono stati

rilevati molti degli enzimi, quali SMasi acida, CDasi neutra e sfingosina chinasi (SK), che sono spesso associati a lipoproteine, ricche in SM.

La Sph che si forma per deacilazione del ceramide catalizzata dall'enzima CDasi oltre ad agire come importante molecola regolatoria di vari processi, può essere riciclata nella via biosintetica degli sfingolipidi mediante la sua conversione a ceramide catalizzata dalla Cer sintasi, oppure può essere fosforilata dalla SK a S1P, lipide bioattivo dalle molteplici funzioni (Figura 4). Questa molecola, che rappresenta il prodotto terminale del metabolismo degli sfingolipidi, può essere degradata attraverso due diverse reazioni, catalizzate da enzimi localizzati a livello del reticolo endoplasmatico (Figura 4). L'enzima sfingosina 1-fosfato fosfatasi (SPP), del quale sono note due isoforme SPP1 e SPP2, catalizza la degradazione reversibile di S1P a Sph, in una reazione di defosforilazione. La defosforilazione di S1P può essere catalizzata anche da fosfatasi non specifiche, appartenenti alla famiglia delle lipide fosfato fosfatasi (Brindley, 2004). La degradazione irreversibile di S1P, unico punto di uscita dal metabolismo degli sfingolipidi, è mediata dall'enzima sfingosina 1-fosfato liasi (SPL) che catalizza un'idrolisi del legame tra gli atomi di carbonio C-2 e C-3 portando alla formazione di fosfoetanolamina ed esadecenale (palmitaldeide), che possono essere riutilizzati per la biosintesi di fosfatidiletanolamina. L'esadecenale può anche essere ossidato a palmitato, e rientrare così nel metabolismo lipidico. Per completare questo già complesso quadro metabolico, occorre ricordare che esiste anche un processo di degradazione lisosomiale degli sfingolipidi, che interessa principalmente i glicosfingolipidi (Mathias, 1998). I frammenti di membrana contenenti queste molecole vengono internalizzati sotto forma di vescicole rivestite e, passando attraverso il compartimento endosomiale, raggiungono i lisosomi. Qui, attraverso l'idrolisi sequenziale dei residui saccaridici, catalizzata da specifiche glicoidrolasi, si forma Cer che, mediante deacilazione per azione della CDasi acida presente a livello dei lisosomi, viene convertito in Sph. Gli intermedi del catabolismo lisosomiale degli sfingolipidi, che comprendono residui saccaridici, acidi grassi e Sph, possono essere ulteriormente degradati o riciclati. La Sph generata nei lisosomi, per esempio, può rientrare nella via biosintetica degli sfingolipidi attraverso quella che viene indicata come "via di recupero" o *salvage pathway* (Tettamanti, 2003).

Riassumendo, esistono due strade per entrare nella via del metabolismo degli sfingolipidi, ed entrambe convergono nella formazione di Cer, molecola chiave nella sintesi degli altri sfingolipidi bioattivi: la via *de novo*, che ha inizio con la condensazione della serina con il palmitoil-CoA, e la via della SMasi, che prevede l'idrolisi della SM di membrana. Esiste invece una sola via di uscita dal metabolismo degli sfingolipidi, che consiste nella conversione di tali molecole a S1P, poi idrolizzata a esadecenale e fosfoetanolamina dalla SPL.

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

La maggior parte degli enzimi coinvolti nel metabolismo degli sfingolipidi mostra una specifica localizzazione subcellulare. Questa caratteristica, unita al fatto che le molecole lipidiche sono idrofobiche e quindi difficilmente diffusibili nel citosol a meno che non intervengano specifici sistemi di trasporto, impone delle restrizioni alla localizzazione subcellulare degli sfingolipidi stessi, e quindi al loro sito di azione, che nella maggior parte dei casi coincide con il compartimento cellulare in cui essi vengono generati. Ciò ha delle importanti conseguenze funzionali: è stato infatti dimostrato che uno stesso sfingolipide può esercitare funzioni differenti a seconda del compartimento cellulare in cui viene prodotto. È stato per esempio osservato che il Cer generato a livello del RE svolge funzioni diverse rispetto a quello generato a livello della membrana plasmatica e che, anche a livello del plasmalemma stesso, tale molecola regola funzioni distinte a seconda che sia prodotta nel foglietto interno o esterno (Marchesini, 2004).

Gli sfingolipidi comprendono tuttavia molecole quali S1P che, per le loro caratteristiche chimico-fisiche, sono sufficientemente solubili in ambiente acquoso e quindi in grado di diffondere nel citosol, la cui azione biologica non è dunque confinata al compartimento subcellulare in cui sono state prodotte.

### 3. Sfingosina 1-fosfato (S1P)

S1P è una molecola segnalatoria coinvolta nella regolazione di importanti processi biologici, sia in condizioni fisiologiche che patologiche, in molti tipi cellulari di vari organismi. Inizialmente identificato come mediatore intracellulare dell'azione mitogenica di fattori di crescita, è ormai evidente che la maggior parte degli effetti mediati da S1P derivano dalla sua interazione con specifici recettori localizzati sulla membrana plasmatica. Sono stati identificati, ad oggi, cinque recettori per S1P recentemente rinominati secondo la nomenclatura proposta dalla *NC-IUPHAR (Nomenclature Committee of the International Union of Pharmacology)* S1PR (*sphingosine 1-phosphate receptors*), S1P<sub>1-5</sub> (Chun, 2002). Si tratta di proteine intrinseche di membrana appartenenti alla famiglia dei recettori associati a proteine G (*G-protein-coupled receptor*, GPCR).

Tra il plasma e i fluidi interstiziali esiste un significativo gradiente di concentrazione di S1P: i livelli di S1P sono generalmente bassi nei tessuti mentre la concentrazione dello sfingolipide nel plasma è alta. I livelli di S1P nel siero (0.4  $\mu\text{mol/L}$ ) sono sempre più alti di quelli nel plasma (0.1  $\mu\text{mol/L}$ ), ciò è dovuto all'abbondanza di S1P nelle piastrine e al suo rilascio in seguito alla stimolazione con trombina, un prodotto della cascata di coagulazione. Per molti anni le piastrine sono state considerate la principale fonte di S1P presente nel plasma dal momento che hanno elevata attività sfingosina chinasi e non esprimono l'enzima SPL, che degrada irreversibilmente S1P (Kim, 2009). Studi recenti suggeriscono tuttavia che le principali fonti cellulari di S1P nel plasma siano rappresentate dagli eritrociti e dalle cellule vascolari endoteliali (Jessup, 2008). Gli eritrociti hanno livelli di attività sfingosina chinasi minori rispetto a quelli osservati nelle piastrine ma mancano di entrambi gli enzimi che degradano S1P,

SPL e SPP, una caratteristica unica di questo tipo cellulare. Hanet e collaboratori hanno suggerito che gli eritrociti siano in grado di incorporare efficacemente S1P, agire come riserve presenti nel plasma e rendere S1P disponibile per futuri rilasci (Hanel, 2007). Anche se le piastrine contengono una maggiore quantità di S1P rispetto agli eritrociti, dal momento che quest'ultimo tipo cellulare è molto più abbondante nel sangue rispetto alle piastrine, l'apporto totale di S1P dagli eritrociti è molto maggiore. Hla e collaboratori hanno recentemente dimostrato che gli eritrociti non sono gli unici responsabili del mantenimento dei livelli di S1P nel plasma: né l'eliminazione di cellule ematopoietiche mediante irradiazione di topi *wild type* e *knock out* per SK, né l'anemia indotta chimicamente, che rimuove più dei due terzi degli eritrociti, ha effetto sui livelli di S1P nel plasma (Venkataraman, 2008). Hanno inoltre dimostrato che *in vivo* il *turnover* di S1P è estremamente rapido con un'emivita dello sfingolipide di circa quindici minuti: i *pathways* sintetici e degradativi del metabolismo di S1P sono dunque estremamente attivi. La fonte principale di S1P nel plasma potrebbe essere rappresentata dall'endotelio dei vasi, soprattutto in condizioni di stress (Venkataraman, 2008).

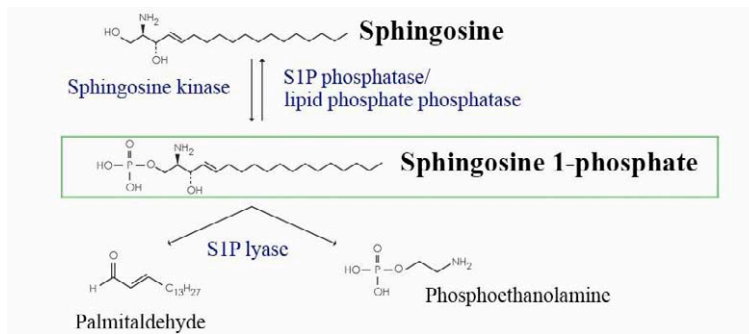


Figura 6. Sphingosina 1-fosfato: struttura, sintesi e degradazione.

La S1P presente nel plasma è strettamente associata all'albumina e alle lipoproteine, in particolar modo alle HDL (*High Density Lipoproteins*). L'interazione di S1P con le lipoproteine riduce la sua attività biologica e la sua concentrazione attiva. Dall'altro lato, è stato dimostrato che l'emivita di S1P associata alle HDL è quattro volte superiore a quella dello sfingolipide associato all'albumina: il legame alle lipoproteine potrebbe dunque proteggere S1P dalla degradazione mediata dagli ectoenzimi, costituendo una riserva stabile dello sfingolipide nel sangue. Numerosi tipi cellulari, comunque, possiedono gli enzimi necessari per la sintesi di S1P e producono il lipide bioattivo in risposta a stimoli extracellulari, quali fattori di crescita e citochine.

Come per altre molecole segnalatorie, i livelli di S1P all'interno della cellula vengono mantenuti bassi e devono essere finemente modulati: ciò viene realizzato attraverso la regolazione degli enzimi della via biosintetica e di quelli della via degradativa. In tal modo la cellula mantiene la concentrazione del lipide bio-

attivo a livelli ottimali ed è in grado di generarne variazioni spazio-temporali in risposta ad opportuni stimoli. I livelli di S1P possono quindi essere potenzialmente alterati da tutti gli stimoli in grado di influenzare l'attività o l'espressione degli enzimi responsabili della sintesi e della degradazione di questa molecola. La modulazione del metabolismo, e quindi dei livelli intracellulari, di S1P da parte di agenti extracellulari viene realizzata principalmente attraverso la regolazione dell'attivazione e/o dell'espressione dell'enzima responsabile della sintesi dello sfingolipide, la sfingosina chinasi (SK).

La SK è una chinasi lipidica della quale sono note due isoforme, SK1 e SK2, che catalizza la fosforilazione del gruppo idrossilico sul carbonio C-1 della Sph, in una reazione che richiede ATP ed un catione divalente e che determina la formazione di S1P e la concomitante riduzione del contenuto cellulare di Cer. L'enzima SK1 è stato per la prima volta identificato, purificato e caratterizzato in una linea di cellule renali di ratto (Olivera, 1998). Successivamente sono state clonate due isoforme della SK1 murina, mSK1a e mSK1b, che differiscono per pochi aminoacidi all'estremità N-terminale come risultato di *splicing* alternativo. Sulla base dell'omologia di sequenza è stata successivamente clonata una seconda isoforma della SK, la SK2 (Liu, 2000). L'enzima SK è stato identificato in *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Arabidopsis thaliana* e *Dictyostelium discoideum* (Taha, 2006).

Analisi effettuate tramite Northern Blot hanno dimostrato che nei mammiferi le due isoforme dell'enzima SK differiscono nella distribuzione spaziale e nel momento della comparsa durante il differenziamento: il trascritto della SK1, infatti, appare prima rispetto a quello della SK2 (Liu, 2000). L'mRNA della SK1 è maggiormente presente nel cervello, nel cuore, nel timo, nella milza, nel rene e nel polmone mentre la SK2 è maggiormente espressa nel rene e nel fegato (Liu, 2000). Analisi del *plot* di idropatia predicono quattro domini transmembrana nella proteina SK2 e nessuno nella proteina SK1 (Pitson, 2010). Recentemente sono state descritte varianti delle due isoforme dell'enzima umano (Pitson, 2010) che differiscono nella loro porzione ammino terminale come risultato di *splicing* alternativo: le tre proteine SK1 consistono di 384, 398 e 470 amminoacidi mentre le due varianti dell'enzima SK2 sono costituite da 618 e 654 amminoacidi (Figura 7). I geni che codificano gli enzimi SK1 e SK2 sono localizzati nell'uomo sul cromosoma 17 e 19, rispettivamente.

L'analisi della sequenza della SK1 ha rivelato la presenza di due possibili motivi di legame per il complesso calcio/calmodulina, alcuni siti putativi di fosforilazione da parte della PKC e un sito di fosforilazione della caseina chinasi II. Recentemente è stato dimostrato che la serina in posizione 225 può essere direttamente fosforilata da ERK1/2 (*Extracellular signal-Regulated Kinase 1/2*). La sequenza della SK1 presenta inoltre un motivo che media l'interazione con TRAF2. Sono stati trovati inoltre siti putativi di modificazione covalente stabile nella sequenza della SK1, come siti di N-miristilazione e di N-glicosilazione (Taha, 2006).

La SK2, come la SK1, possiede alcuni siti di modificazione post-traduzionale: siti di fosforilazione della PKC, siti di miristilazione, un sito di fosforilazione tirosinico, siti di fosforilazione per la caseina chinasi II, un sito di amidazione, un

sito di fosforilazione per la proteina chinasi dipendente da cAMP e cGMP, un sito di solfatazione tirosinica e un sito di N-glicosilazione. Tali modificazioni possono servire per regolare in modo differenziale la SK1 e la SK2.

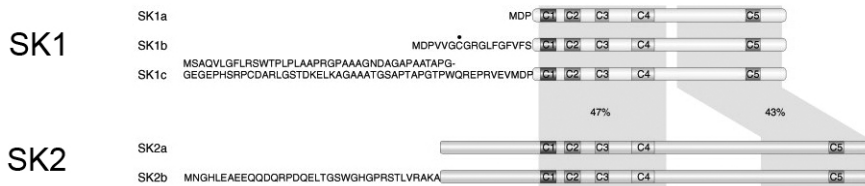


Figura 7. Isoforme dell'enzima sfingosina chinasi umano.

Le due isoforme dell'enzima SK hanno cinque domini di omologia detti C1-C5 (Figura 7). I domini C1-C3 si trovano all'interno del dominio catalitico che mostra omologia con quello della diacilglicerolo chinasi (DGK) e della ceramide chinasi (CERK) (Sugiura, 2002). E' stato recentemente dimostrato che il dominio di legame per l'ATP risiede nel dominio C2 dell'enzima, all'interno delle sequenze consenso  $SGDGx_{17-21}K$ , mentre il sito di legame per la Sph coinvolge un residuo conservato di acido aspartico nel dominio C4 (Taha, 2006). Sono stati inoltre identificati aminoacidi che sembrano avere funzioni cruciali in entrambe le sequenze delle due isoforme dell'enzima. La SK1 ha un dominio ricco di prolina e possiede due sequenze di esporto nucleare (NES) (Taha, 2006). Anche la SK2 possiede un dominio ricco di prolina, costituito da un numero maggiore di residui rispetto a quello della SK1. Nell'enzima SK2 è stata individuata, all'estremità N-terminale, una sequenza di localizzazione nucleare (NLS): recenti esperimenti di immunofluorescenza dimostrano, infatti, che tale enzima è presente sia nel citoplasma che nel nucleo (Igarashi, 2003). Tale isoforma contiene inoltre un dominio di 9 aminoacidi simile a quello presente nelle proteine pro-apoptotiche *Bcl2-homology domain 3 (BH3)-only* (Liu, 2003).

Sebbene SK1 e SK2 differiscano sostanzialmente nelle dimensioni, esse condividono un alto livello di similarità nella sequenza, con quasi tutta la sequenza peptidica di SK1 che si allinea con regioni della più grande SK2. Le due proteine, tuttavia, differiscono a livello della porzione N-terminale, inoltre, SK2 possiede un inserto peptidico ricco in prolina nella regione centrale della sua sequenza che è distinta da SK1 e da ogni altra proteina conosciuta (Figura 7).

Come precedentemente illustrato SK1 e SK2 differiscono tra loro per struttura, proprietà cinetiche, meccanismi di regolazione, localizzazione subcellulare, distribuzione tissutale e *pattern* di espressione temporale durante lo sviluppo embrionale (Wattenberg, 2006), suggerendo che questi due enzimi possano avere distinte funzioni fisiologiche. Ciò è supportato da evidenze sperimentali che dimostrano che SK1 e SK2 possono esercitare ruoli contrastanti in condizioni fisiologiche e patologiche. Le due SK sembrano ad esempio avere ruoli differenti nella regolazione dei mastociti umani: solo SK1 sembra essere importante per la migrazione e la degranolazione indotta dall'antigene (immunoglobulina-

E); tuttavia, entrambe le isoforme sono richieste per una efficiente secrezione di citochine da parte di queste cellule (Okada, 2005).

SK1 quasi universalmente promuove proliferazione e sopravvivenza cellulare mentre la funzione di SK2 sembra essere più complessa. I primi studi effettuati sulla SK2 dimostrano che l'iperespressione dell'enzima inibisce la crescita cellulare e promuove l'apoptosi (Okada, 2005; Maceyka, 2005) suggerendo che, sebbene i due enzimi utilizzino lo stesso substrato e generino lo stesso prodotto, SK2 potrebbe avere un ruolo opposto a SK1. Tale effetto pro-apoptotico di SK2 è confermato da studi più recenti nei quali viene dimostrato che cellule mesangiali provenienti da topi *SK2<sup>-/-</sup>* sono più resistenti all'apoptosi indotta da staurosporina rispetto alle cellule *wild type* o *SK1<sup>-/-</sup>* (Hofmann, 2008). Inoltre, l'inibizione dell'espressione di SK2 in cellule HEK293 blocca l'apoptosi indotta da TNF- $\alpha$  o dalla rimozione di siero (Okada, 2005). Tuttavia SK2 può avere anche un ruolo anti-apoptotico: in molti tipi di cellule neoplastiche l'inibizione dell'espressione di SK2, o della sua attività mediante inibitori specifici, induce apoptosi e aumenta la sensibilità ai chemioterapici (Pitman, 2010). È molto interessante notare che mentre topi *knock out* per *SK1* o *SK2* sono vitali, fertili e non hanno anomalie, la delezione di entrambi i geni da origine a topi che muoiono in utero a causa di gravi difetti nella neurogenesi e nell'angiogenesi (Mizugishi, 2005). Tali risultati suggeriscono che SK1 e SK2 siano, almeno in parte, funzionalmente ridondanti. Sembra che SK2 abbia ruoli diversi in situazioni differenti: la localizzazione subcellulare di SK1 e SK2 ha un ruolo cruciale nel determinarne la funzione (Wattenberg, 2006).

Alla modulazione dei livelli intracellulari di S1P contribuiscono anche gli enzimi responsabili della sua degradazione: SPL, SPP e, più generalmente, enzimi appartenenti alla famiglia delle lipide fosfato fosfatasi (LPP). L'enzima SPP appartiene alla famiglia degli enzimi LPP, proteine integrali di membrana in grado di idrolizzare il gruppo fosfato che agiscono sia a livello intra- che extracellulare (Brindley, 2002). SPP defosforila S1P generando Sph che può essere, dunque, riciclata: può essere avviata alle reazioni biosintetiche degli sfingolipidi o venire nuovamente fosforilata dall'enzima SK a formare S1P. La regolazione dell'espressione genica dell'enzima SPP in risposta a segnali extracellulari, riducendo i livelli dello sfingolipide bioattivo, modula gli effetti biologici di S1P.

L'enzima SPL, che catalizza la degradazione irreversibile di S1P, è presente in tutte le cellule dei tessuti di mammifero con le importanti eccezioni rappresentate da piastrine e eritrociti, nei quali è stata documentata un'elevata concentrazione di S1P. In cellule di carcinoma embrionale murine mancanti del gene *SPL* è stata osservata un'accelerazione nel differenziamento. Tale effetto sembra mediato dall'accumulo di S1P dato che la somministrazione di N,N-dimetilsfingosina (DMS), un inibitore delle SK, ha effetto inibitorio sul processo. L'ipotesi di un ruolo chiave della SPL nella regolazione dei livelli intracellulari di S1P durante il differenziamento è supportato dal dato che cellule esprimenti stabilmente SK mostrano la stessa accelerazione nel processo differenziativo (Kihara, 2003). Mutanti di *D. melanogaster knock out* per il gene *Sply*, codificante la SPL, presentano gravi alterazioni nello sviluppo e nell'integrità muscolare, la-





La localizzazione subcellulare degli sfingolipidi e degli enzimi del loro metabolismo ha un ruolo cruciale per il loro destino e le loro funzioni di trasduzione del segnale. La SK1 ha normalmente una localizzazione citoplasmatica, tuttavia la fosforilazione sulla Ser225, oltre ad aumentare l'attività catalitica dell'enzima, è essenziale per la sua traslocazione a livello della membrana plasmatica (Pitson, 2003). Tale localizzazione sembra avere un ruolo cruciale per molti dei ruoli di segnalazione della SK probabilmente per la produzione di S1P in siti che ne abilitano il rilascio o l'associazione a proteine effettrici. La fosforilazione sulla Ser225 rende infatti l'enzima capace di associarsi con la fosfatidilserina, normalmente localizzata nel foglietto interno della membrana plasmatica, favorendo dunque la rilocalizzazione fosforilazione-dipendente dell'enzima (Stahelin, 2005). Interazioni con acido fosfatidico e filamina A sono state inoltre implicate nella localizzazione di SK1 a livello della membrana plasmatica. Studi più recenti hanno chiarificato il meccanismo mediante il quale differenti agonisti inducono la traslocazione di SK1 dimostrando un ruolo chiave per CIB1 (*Calcium- and Integrin-binding Protein 1*) in questo processo (Jarman, 2010). CIB1 interagisce con SK1 in maniera calcio-dipendente a livello del sito di legame della calmodulina presente nella SK1, essenziale per la sua traslocazione. CIB1 trasloca a livello della membrana plasmatica in un processo dipendente da una miristoilazione e dal legame al calcio, fornendo un meccanismo attivo per la traslocazione di SK1 in questo compartimento: l'inibizione dell'espressione di CIB1 mediante silenziamento previene la traslocazione di SK1 indotta da agonista (Jarman, 2010). Tali recenti evidenze suggeriscono che CIB1 favorisca attivamente la traslocazione di SK1 a livello della membrana plasmatica, il mantenimento dell'enzima in tale compartimento potrebbe essere mediato dalla conseguente associazione con fosfolipidi acidi e proteine (Figura 8).

### 3.2 Attivazione e localizzazione subcellulare di sfingosina chinasi 2 (SK2)

È stato dimostrato che l'attività di SK2, come quella di SK1, aumenta rapidamente in seguito al trattamento con differenti agonisti. Sebbene SK2 condivida gran parte della sequenza con SK1, la regione contenente il sito di fosforilazione Ser225, responsabile dell'attivazione di SK1, non è conservato in SK2. L'attivazione di SK2, come quella di SK1, sembra essere dovuta a fosforilazione mediata da ERK1/2 su uno o entrambi i residui Ser351 e Thr578 (Hait, 2007) (Figura 9).

SK2 è localizzata principalmente a livello del nucleo, per la presenza di una sequenza di localizzazione nucleare, e del citoplasma. In differenti condizioni, tuttavia, la localizzazione di tale enzima cambia: il contenuto di SK2 aumenta nel reticolo endoplasmatico (RE) in seguito a deprivazione di siero e diminuisce nel nucleo in seguito ad attivazione della PKC (Maceyka, 2005; Ding, 2007). La localizzazione della SK2 a livello del reticolo endoplasmatico potrebbe spiegare la sua azione pro-apoptotica: in tale compartimento sono infatti presenti gli enzimi S1P fosfatasi e ceramide sintasi, che potrebbero essere responsabili della conversione della S1P prodotta dalla SK2 a Sph e quindi a Cer, metabolita pro-apoptotico. Rimane tuttavia ancora da capire se gli effetti anti-mitogenici e pro-

apoptotici di SK2 siano da ascrivere alla produzione di S1P o all'attività dell'enzima stesso, che potrebbe essere direttamente coinvolto nell'inibizione della sintesi di DNA e nell'attivazione della via mitocondriale dell'apoptosi. A questo proposito è stato dimostrato che la localizzazione nucleare della SK2 è associata all'arresto del ciclo cellulare in fase G1/S (Igarashi, 2003) e che tale isoforma contiene una sequenza di 9 aminoacidi simile a quella presente nelle proteine pro-apoptotiche *Bcl2-homology domain 3 (BH3)-only* (Liu, 2003).

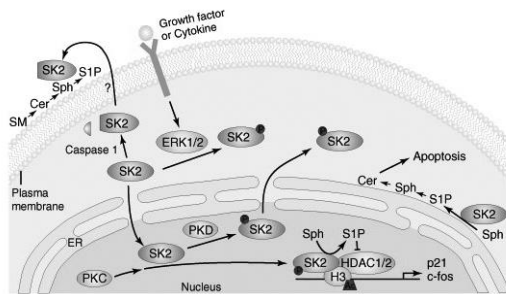


Figura 9. Regolazione e segnalazione di SK2.

La presenza di SK2 nel nucleo è regolata da segnali di localizzazione e di esporto nucleari. In particolare il segnale di esporto nucleare viene attivato dalla fosforilazione di Ser383 o Ser385 catalizzato dalla proteina chinasi D (PKD) (Ding, 2007) (Figura 9). Hait e collaboratori hanno recentemente dimostrato che a livello del nucleo la SK2 si associa con il complesso istone H3-istone deacetilasi (HDAC) 1/2 (Hait, 2009). HADAC1 e HADAC2 sono *target* intracellulari di S1P: la loro inibizione mediata dallo sfingolipide bioattivo previene la deacetilazione degli istoni e induce l'espressione dei geni che codificano p21, inibitore delle chinasi ciclina-dipendenti, e il regolatore trascrizionale *c-fos* (Figura 9).

Tali effetti dipendenti da SK2 sono amplificati in seguito all'attivazione dell'enzima con esteri del forbolo, tale attivazione porta ad una maggiore concentrazione di S1P nel nucleo e potenzia l'associazione di SK2 con il complesso istone-HDAC1/2, probabilmente mediante un evento di fosforilazione (Figura 9).

### 3.3 Sfingosina chinasi extracellulare

La distribuzione intracellulare delle isoforme di SK ha un ruolo fondamentale nelle loro funzioni, crescenti evidenze dimostrano tuttavia che SK può anche essere rilasciata nell'ambiente extracellulare e generare S1P in tale sede. Il rilascio di SK1, dimostrato in molti tipi cellulari, avviene attraverso un *pathway* secretorio non classico e sembra essere un evento costitutivo, indipendente da stimoli extracellulari (Waters, 2003). Studi successivi hanno dimostrato che tale enzima può essere rilasciato come componente del complesso di rilascio di FGF1 dai fibroblasti in risposta allo stress cellulare (Soldi, 2007), o dai mac-

rofagi in risposta a immunocomplessi di LDL ossidate (Hammad, 2006). È stato recentemente dimostrato che una forma attiva di SK2 può essere rilasciata nell'ambiente extracellulare da vari tipi cellulari (Weigert, 2010). Tale evento avviene in cellule che vanno incontro al processo apoptotico ed è dipendente dal taglio proteolitico di 138 aminoacidi all'estremità N-terminale della SK2, catalizzato dalla caspasi-1 (Figura 9). Il rilascio di SK2 è accoppiato all'esposizione della fosfatidilserina, evento caratteristico dell'apoptosi e segnale cruciale per l'interazione cellulare cellula apoptotica/fagocita. La produzione di S1P mediata da SK2 potrebbe dunque avere il ruolo di amplificare l'attivazione e la migrazione di cellule fagocitiche (Weigert, 2010).

Una volta rilasciate, le isoforme di SK possono generare S1P nell'ambiente extracellulare utilizzando la Sph derivante dalla degradazione della SM presente nel foglietto esterno della membrana plasmatica, e l'ATP rilasciata dalle cellule. È interessante notare che la sintesi di S1P in tale sede limita la degradazione dello sfingolipide catalizzata da SPP e SPL. Rigogliuso e collaboratori hanno recentemente dimostrato che SK1 cataliticamente attiva e Sph sono presenti nelle vescicole rilasciate da cellule tumorali umane, suggerendo che tali vescicole possano rappresentare una piattaforma per la generazione extracellulare di S1P e la conseguente attivazione dei recettori di S1P presenti sulle membrane cellulari (Rigogliuso, 2010).

### 3.4 Modalità di azione di S1P

S1P, prodotta all'interno della cellula in risposta a vari stimoli, può agire come secondo messaggero, modulando l'attività di specifici bersagli intracellulari (Spiegel, 1996), oppure può funzionare come agonista extracellulare, mediante l'interazione con specifici recettori localizzati sulla membrana plasmatica della stessa cellula da cui è stato prodotto o delle cellule vicine, con modalità autocrina o paracrina (Lee, 1998) (Figura 10).

L'azione di S1P come agonista di recettori di membrana richiede che tale molecola venga rilasciata nell'ambiente extracellulare: data la natura polare della testa di questo sfingolipide, esso non è in grado di attraversare la membrana plasmatica idrofobica delle cellule. Sebbene il meccanismo di rilascio di S1P dalle cellule non sia completamente chiarito, recenti lavori dimostrano il coinvolgimento di trasportatori appartenenti alla famiglia ABC (*ATP-Binding Cassette*) in questo processo (Kim, 2009). Studi correlati alla resistenza multipla ai farmaci in cellule neoplastiche e lieviti hanno dimostrato che, oltre a catalizzare il trasporto di farmaci anfifilici, alcuni trasportatori ABC possono trasportare lipidi dal foglietto interno a quello esterno della membrana plasmatica (Van Meer, 2002). Tali trasportatori sono costituiti da due domini transmembrana con sei  $\alpha$ -eliche, che formano un canale per il trasporto del substrato attraverso la membrana, e due domini citosolici che legano ATP, *ATP-binding cassette*. In base ad analisi filogenetiche e di sequenza i 49 geni umani che codificano per i trasportatori ABC possono essere raggruppati in sette sottofamiglie, *ABCA-G*. Mitra e collaboratori hanno dimostrato per la prima volta che S1P può essere esportata da mastociti indipendentemente dalla loro degranulazione e che tale effetto è

mediato da un trasportatore ABC. In particolare il rilascio di S1P è inibito dall'inibitore specifico o dal silenziamento dell'espressione del trasportatore ABCC1, dimostrando un ruolo chiave per tale trasportatore in questo processo (Mitra, 2006). Studi successivi hanno dimostrato che il rilascio di S1P accumulata nel foglietto interno delle piastrine, stimolato dalla trombina, è mediato specificatamente dal trasportatore ABCA1 (Kim, 2009). Lee e collaboratori hanno inoltre dimostrato che cellule endoteliali sintetizzano e rilasciano S1P molto più efficientemente rispetto a fibroblasti e cellule tumorali di colon, suggerendo una specificità cellulare per il rilascio di S1P. Utilizzando vari inibitori dei trasportatori ABC hanno dimostrato che i trasportatori coinvolti nel rilascio di S1P da cellule endoteliali sono ABCA1 e ABCC1 (Lee, 2007). S1P viene inoltre rilasciata dagli astrociti in maniera altamente dipendente dal trasportatore ABCA1, tale rilascio è accoppiato alla formazione di HDL. Inoltre, SK1 e la stessa S1P inducono l'espressione e l'attività del trasportatore ABCB1 in cellule endoteliali derivanti da capillari di cervello, suggerendo che S1P possa regolare la sua stessa secrezione (Kim, 2009). Complessivamente tali studi dimostrano dunque un ruolo chiave per i membri della grande famiglia dei trasportatori ABC nell'esportare S1P all'esterno delle cellule in cui viene sintetizzata. Occorre poi ricordare che S1P può anche essere prodotta direttamente nell'ambiente extracellulare: è stato infatti dimostrato che almeno alcuni tipi cellulari possono secernere SK (Ancellin, 2002), sfingomielinasi e ceramidasi (Romiti, 2000; Hla, 2001) in forma cataliticamente attiva. È stata inoltre ipotizzata l'esistenza di un'isoforma di SK integrata nella membrana plasmatica con il sito catalitico rivolto verso l'ambiente esterno, capace quindi di agire come ectoenzima, anch'essa responsabile della produzione di S1P direttamente nel mezzo extracellulare (Meacci, 2004).

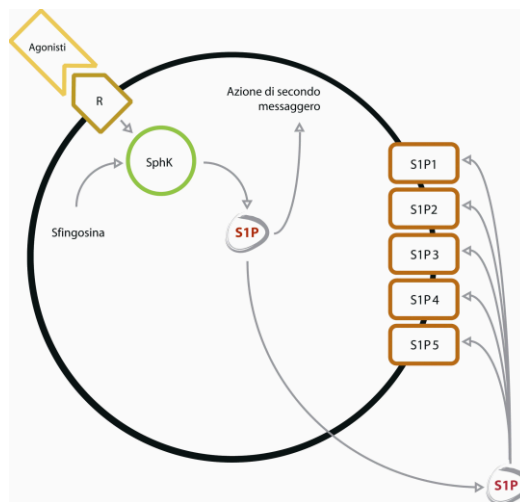


Figura 10. Azione intracellulare ed extracellulare di S1P.

La maggior parte delle funzioni biologiche documentate per S1P sono legate all'attivazione degli specifici recettori di membrana, è stato tuttavia dimostrato che lo sfingolipide è in grado di mediare diversi processi cellulari in maniera indipendente da tali 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 trifosfato (IP3) (Mattie, 1994), la proliferazione cellulare e l'inibizione dell'apoptosi (Spiegel, 2003). I dati relativi ai meccanismi attraverso i quali lo sfingolipide regola la proliferazione e la sopravvivenza cellulare sono contrastanti: esistono sia prove a favore di un'azione intracellulare di S1P, sia prove che indicano il coinvolgimento dei suoi recettori. Ciò suggerisce 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.

La capacità di S1P di agire come secondo messaggero è supportata da diverse evidenze sperimentali: è stato dimostrato che in alcuni tipi cellulari l'introduzione di S1P direttamente all'interno del citosol ha gli stessi effetti biologici, in termini di proliferazione e sopravvivenza cellulare, della molecola aggiunta all'esterno (Van Brocklyn, 1998) e che la diidrosfingosina 1-fosfato, capace di attivare i recettori per S1P, non è in grado di riprodurre tutti gli effetti evocati da S1P (Lee, 1996). Inoltre alcuni effetti dello sfingolipide sono ottenuti solo con concentrazioni micromolari della molecola, molto più alte rispetto alla  $K_d$  dei recettori di membrana per S1P. Ancora, i lieviti e le piante, pur essendo privi dei recettori per S1P, possiedono gli enzimi per il metabolismo dello sfingolipide e sono responsivi a tale molecola (Ng, 2001). La prova definitiva della capacità di S1P di agire come secondo messaggero è stata ottenuta soltanto in studi recenti che hanno dimostrato la capacità dello sfingolipide di modulare direttamente l'attività di bersagli molecolari intracellulari: le istone deacetilasi (HDAC) (Hait, 2009), la chinasi 1 attivata da p21 (PAK1) (Maceyka, 2008), e il fattore 2 associato al recettore del fattore di necrosi tumorale (TRAF2) (Alvarez, 2010). Come precedentemente accennato Hait e collaboratori hanno dimostrato che SK2 si associa all'istone H3, la conseguente produzione di S1P regola l'acetilazione degli istoni: lo sfingolipide lega specificatamente le HDAC1 e HDAC2 e inibisce la loro attività enzimatica, prevenendo la rimozione dei gruppi acetilici dai residui di lisina presenti nelle code degli istoni. SK2 si associa inoltre a HDAC1 e HDAC2 reprimendone l'attività: è selettivamente presente in notevoli quantità a livello dei promotori dei geni che codificano l'inibitore delle chinasi ciclina dipendenti, p21, e il regolatore trascrizionale *c-fos*, promuovendo l'acetilazione locale dell'istone H3 e la trascrizione di tali geni. Questo studio dimostra dunque che S1P intracellulare può agire direttamente su *target* molecolari nel nucleo, a livello del quale partecipa alla regolazione epigenetica dell'espressione genica, e suggerisce la possibilità che l'asse SK2/S1P possa fornire un meccanismo per aumentare l'espressione di p21, e dunque promuovere l'apoptosi, in cellule neoplastiche mancanti di p53 (Hait, 2009).

Maceyka e collaboratori hanno inoltre dimostrato che SK1 è richiesta per la migrazione indotta da eregulina in cellule di melanoma: S1P prodotta da SK1

stimola direttamente l'attività chinasi di PAK1, suo *target* intracellulare, essenziale per la formazione dei lamellipodi e il movimento cellulare (Maceyka, 2008).

TRAF2 è un componente chiave della via di segnalazione di TNF- $\alpha$  che porta all'attivazione del fattore trascrizionale nucleare NF- $\kappa$ B (*Nuclear Factor- $\kappa$ B*). Tale fattore è necessario per la poliubiquitinazione di RIP1 (*Receptor Interacting Protein 1*) che serve come piattaforma per il reclutamento e l'attivazione della chinasi I $\kappa$ B, a sua volta responsabile dell'attivazione del fattore trascrizionale NF- $\kappa$ B. Alvarez e collaboratori hanno dimostrato che TRAF2 lega SK1 e che l'enzima e il suo prodotto, S1P, sono necessari per la poliubiquitinazione di RIP1, la fosforilazione della chinasi I $\kappa$ B e la conseguente attivazione di NF- $\kappa$ B. Tali risposte sono indotte da S1P generata all'interno della cellula, indipendentemente dagli S1PR di membrana: S1P lega specificatamente TRAF2 e ne induce un aumento dell'attività E3 ubiquitina ligasi. Tali risultati dimostrano dunque che TRAF2 è un nuovo *target* intracellulare di S1P e mettono in evidenza il ruolo chiave di S1P nella trasduzione del segnale di TNF- $\alpha$  e nell'attivazione del *pathway* di NF- $\kappa$ B, importante nei processi infiammatori, antiapoptotici e immunitari (Alvarez, 2010).

Attraverso l'attivazione degli specifici recettori di membrana, S1P regola processi quali il riarrangiamento del citoscheletro (Donati, 2006), la migrazione cellulare (Cyster, 2005), l'assemblaggio delle giunzioni cellulari (McVerry, 2005), lo sviluppo embrionale (Spiegel, 2003), l'angiogenesi (Waeber, 2004), la rigenerazione muscolare (Nagata, 2006) e la risposta immunitaria (Rosen, 2005). È importante sottolineare che la distinzione tra i processi mediati da S1P come secondo messaggero e quelli indotti dall'attivazione dei propri recettori non è netta in quanto la regolazione di alcuni processi potrebbe coinvolgere entrambe le modalità di azione dello sfingolipide, a seconda del tipo cellulare considerato. È inoltre importante evidenziare che S1P esercita effetti diversi, talvolta opposti, a seconda dei sottotipi recettoriali espressi dalla cellula su cui lo sfingolipide agisce.

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

### 3.5 Recettori per S1P

La maggior parte degli effetti mediati da S1P sono dovuti alla sua interazione con specifici recettori localizzati sulla membrana plasmatica. Nelle cellule di mammifero sono stati ad oggi identificati cinque recettori in grado di legare S1P con alta affinità ( $K_d = 2-63$  nM) denominati S1P<sub>1-5</sub> (Chun, 2002). Si tratta di recettori accoppiati a proteine G, con una struttura che consiste di una porzione N-terminale extracellulare, molto probabilmente glicosilata, sette domini idrofobici transmembranari ed una porzione C-terminale citoplasmatica, importante per l'accoppiamento con le proteine G, che funzionano da trasduttori intracellu-

lari del segnale (Neves, 2002). Ogni sottotipo recettoriale è associato a specifiche proteine G, per cui l'interazione di S1P con ciascun recettore porta all'attivazione o all'inibizione di vie di segnalazione distinte (Figura 11), ed evoca quindi risposte cellulari differenti. In tal modo lo sfingolipide è in grado di indurre processi biologici diversi: la risposta funzionale di ciascuna cellula a S1P dipende dal recettore con cui lo sfingolipide bioattivo interagisce, e quindi dai livelli relativi dei diversi sottotipi recettoriali espressi dalla cellula stessa. I recettori per S1P mostrano una grande variabilità di espressione nei vari tipi cellulari. Il *pattern* di espressione dei recettori per S1P può inoltre variare, all'interno di uno stesso tipo cellulare, in relazione al grado di differenziamento. In mioblasti C2C12, esprimenti i recettori S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub> e S1P<sub>3</sub>, si osserva ad esempio un aumento dei livelli di S1P<sub>3</sub> ed una diminuzione dei livelli di S1P<sub>2</sub> durante il processo di differenziamento a miotubi multinucleati (Meacci, 2003).

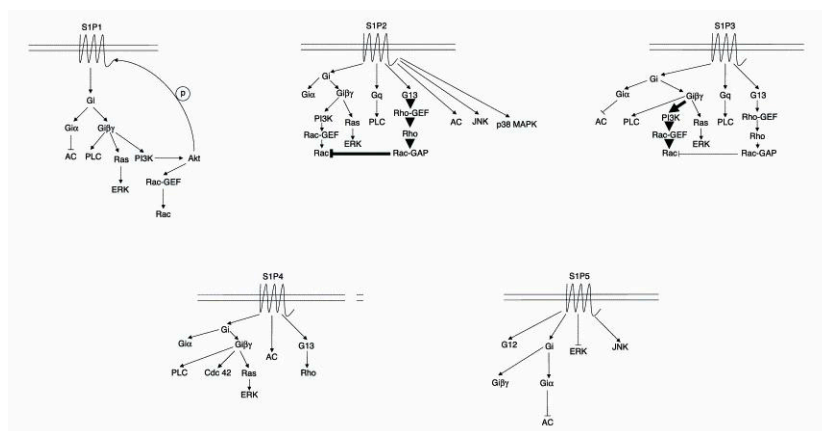


Figura 11. Vie di segnalazione attivate da S1P attraverso i suoi recettori.

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

Lo spegnimento del segnale recettoriale può realizzarsi mediante diversi meccanismi: la degradazione di S1P catalizzata da fosfatasi di membrana aventi il dominio catalitico rivolto verso l'ambiente extracellulare, che riducono i livelli extracellulari dello sfingolipide limitandone così la disponibilità per il legame ai recettori; la conversione delle proteine G nella forma inattiva per idrolisi del



GTP a GDP; la desensitizzazione dei recettori, che ne riduce la responsività al ligando per disaccoppiamento dalle proteine G in conseguenza della fosforilazione reversibile, catalizzata da specifiche chinasi, di determinati residui aminoacidici a livello della porzione citosolica del recettore; la internalizzazione, per endocitosi, dei recettori fosforilati.

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

### S1P<sub>1</sub>

S1P<sub>1</sub> è stato il primo recettore identificato in cellule endoteliali umane (HUVEC) come prodotto di un gene la cui espressione compariva molto precocemente durante il differenziamento indotto da esteri del forbolo. Per questo motivo fu suggerito che tale recettore prendesse parte al differenziamento morfogenetico delle cellule endoteliali dei vasi e all'angiogenesi (Hla, 1990). Studi successivi hanno rivelato che S1P è un ligando ad alta affinità per questo recettore ( $K_d = 8$  nM), mentre lipidi strutturalmente simili come C1P, LPA e sfingosilfosforilcolina (SPC) mostrano bassa affinità nei confronti dello stesso (Van Brocklyn, 1999).

S1P<sub>1</sub> è rappresentato ampiamente in vari tipi cellulari e la sua espressione risulta regolata nel corso dello sviluppo embrionale (Liu, 1997) suggerendo numerosi ruoli fisiologici per questo recettore.

S1P<sub>1</sub> è accoppiato unicamente alla proteina G<sub>i</sub> (Windh, 1999), per cui tutti gli effetti da esso mediati risultano sensibili alla tossina della pertosse (PTx). La segnalazione attraverso G<sub>i</sub> ha vari effetti (Figura 11): l'attivazione della fosfolipasi C (PLC), con conseguente aumento dei livelli intracellulari di Ca<sup>2+</sup>, mediatore di vari processi cellulari; l'attivazione di Ras, seguita dall'attivazione di ERK1/2, associata alla promozione della proliferazione cellulare; l'attivazione della fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI3K) e di Akt, che promuovono la sopravvivenza cellulare attraverso l'inibizione dell'apoptosi. Questi effetti sono mediati dalla subunità βγ di G<sub>i</sub>, mentre la subunità α è responsabile dell'inibizione della adenilato ciclasi (AC) (Igarashi, 2001), con conseguente riduzione dei livelli intracellulari di cAMP.

È stato dimostrato che Akt, una volta attivata da PI3K, fosforila S1P<sub>1</sub>, tale evento risulta necessario per l'attivazione della proteina G monomeric Rac mediata dal recettore (Lee, 1999).

Attivando tali vie di trasduzione del segnale il recettore S1P<sub>1</sub> media dunque eventi di proliferazione e sopravvivenza cellulare, riorganizzazione citoscheletrica, migrazione e morfogenesi in risposta a S1P in molteplici sistemi cellulari.

È interessante notare che in vari tipi cellulari S1P<sub>1</sub> è coinvolto nella motilità cellulare indotta non soltanto da S1P, ma anche da altri chemioattrattanti, quali PDGF. È stato infatti dimostrato che la migrazione cellulare in risposta a PDGF coinvolge la transattivazione di S1P<sub>1</sub> da parte di tale fattore di crescita (Hobson, 2001).

L'importanza fisiologica di S1P<sub>1</sub> è stata confermata da studi *in vivo* su topi *knock out*: topi mancanti del gene *s1p1* muoiono tra il tredicesimo ed il quattordicesimo giorno dello sviluppo embrionale per emorragia dovuta ad una incompleta maturazione del sistema vascolare, causata da anomalie nella migrazione delle cellule della muscolatura liscia dei vasi e dei periciti intorno all'endotelio dei vasi nascenti (Liu, 2000). Questi dati dimostrano quindi un ruolo cruciale di S1P<sub>1</sub> nei processi di sviluppo vascolare e di angiogenesi. È stato inoltre dimostrato che questo recettore, mediando la risposta chemiotattica verso S1P, risulta essenziale per l'uscita dei linfociti dal timo e dagli organi linfoidi secondari, ed è perciò coinvolto nella risposta immunitaria (Matloubian, 2004).

### S1P<sub>2</sub>

Il recettore S1P<sub>2</sub> è stato originariamente clonato da librerie di cDNA di tessuto nervoso ed in cellule VSMC (*Vascular Smooth Muscle Cells*) di ratto. S1P è un ligando ad alta affinità per tale recettore ( $K_d = 20-27$  nM), che si trova espresso in molti tipi cellulari.

S1P<sub>2</sub> appare differire da S1P<sub>1</sub> nella regolazione degli eventi di proliferazione/sopravvivenza. È stato infatti osservato che S1P<sub>2</sub> è in grado di regolare positivamente oppure negativamente i fenomeni di proliferazione e sopravvivenza cellulare a seconda del tipo cellulare considerato: quando S1P<sub>2</sub> è superespresso in cellule renali di embrione umano (HEK293) promuove cambiamenti nella morfologia e fenomeni di apoptosi (Van Brocklyn, 1999); al contrario, in cellule di epatoma HTC4 stabilmente trasfettate con S1P<sub>2</sub> è stato osservato un potenziamento degli eventi di proliferazione e sopravvivenza (An, 2000). Il motivo di questa discrepanza non è noto, ma potrebbe dipendere da un diverso *pattern* di segnalazione a valle del recettore.

È stato provato da tempo che S1P<sub>2</sub> è associato a diverse proteine G eterotrimeriche (Figura 11): G<sub>i</sub>, G<sub>q</sub> e G<sub>13</sub> (Taha, 2004). L'attivazione di questo recettore è dunque capace di regolare vie di segnalazione diverse in relazione alla proteina G coinvolta. Attraverso la subunità  $\beta\gamma$  di G<sub>i</sub>, S1P<sub>2</sub> attiva ERK1/2, mentre attraverso la subunità  $\alpha$  di G<sub>q</sub> attiva la PLC. Anche se S1P<sub>2</sub> risulta un più efficiente modulatore dell'attivazione della via di segnalazione PLC/IP<sub>3</sub>/Ca<sup>2+</sup> rispetto a S1P<sub>1</sub>, lo è in misura minore se confrontato con l'isoforma S1P<sub>3</sub>.

Mediante un meccanismo non noto, insensibile a PTx e che quindi non coinvolge G<sub>i</sub>, questo recettore è inoltre in grado di attivare la AC e due chinasi attivate da mitogeni, JNK (*c-Jun N-Terminal Kinase*) e p38 (Taha, 2004). Poiché S1P<sub>2</sub> non è accoppiato alla proteina G<sub>s</sub>, l'attivazione della AC potrebbe dipendere da un evento indiretto di fosforilazione (Taha, 2004). Questo recettore regola inoltre l'attività di Rho e di Rac, due proteine G monomeriche con ruoli importanti nel riarrangiamento del citoscheletro e nel movimento cellulare, e quindi nella risposta migratoria delle cellule a S1P: mentre Rho viene attivata dal legame di S1P a S1P<sub>2</sub>, l'attività di Rac ne risulta inibita (Okamoto, 2000), con conseguente promozione della formazione delle fibre da stress e inibizione della migrazione cellulare. S1P<sub>2</sub> ha quindi un ruolo opposto rispetto a S1P<sub>1</sub> nella regolazione di questo processo: mentre S1P<sub>1</sub>, attraverso l'attivazione di Rac, regola positivamente la migrazione cellulare in risposta ad S1P e ad altri chemioattrattanti, la

superespressione di S1P<sub>2</sub> in cellule CHO (*Chinese Hamster Ovary cells*) non solo riduce la migrazione in risposta a S1P, ma inibisce anche la migrazione indotta da IGF-1, un potente chemioattrattante (Okamoto, 2000).

Topi *knock out* per il gene *s1p2* non mostrano anomalie anatomiche né fisiologiche, ad eccezione di un'aumentata eccitabilità neuronale, che fa ipotizzare il coinvolgimento di S1P<sub>2</sub> nella regolazione di tale processo (Mac Lennan, 2001)

### S1P<sub>3</sub>

S1P<sub>3</sub> è stato inizialmente clonato da una libreria genomica umana, durante una ricerca di recettori per cannabinoidi, utilizzando inneschi degenerati per PCR (Yamaguchi, 1996). La sequenza aminoacidica possiede, infatti, il 30% di omologia per il recettore umano per cannabinoidi di tipo 1 (CB1). S1P<sub>3</sub> risulta essere ampiamente espresso in vari tipi cellulari ed è associato alle proteine G<sub>i</sub>, G<sub>q</sub> e G<sub>12/13</sub>, per cui, in seguito all'interazione con S1P, attiva varie vie di segnalazione (Figura 11). L'accoppiamento di S1P<sub>3</sub> a G<sub>i</sub> è responsabile dell'attivazione di Ras, che a sua volta attiva ERK1/2, e di PI3K, che attiva Rac (Okamoto, 1999), oltre che dell'inibizione della AC. In numerosi sistemi cellulari S1P<sub>3</sub> risulta più efficace, rispetto ad S1P<sub>1</sub>, nella modulazione della via di segnalazione di PLC/IP<sub>3</sub>/Ca<sup>2+</sup> (Okamoto, 2000). Tale via è attivata da S1P<sub>3</sub> mediante la proteina G<sub>q</sub> anche se l'attivazione risulta parzialmente bloccata da PTx, suggerendo un coinvolgimento anche di G<sub>i</sub> (Okamoto, 1999). Attraverso l'associazione con G<sub>12/13</sub>, S1P<sub>3</sub> determina inoltre l'attivazione di Rho. La stimolazione di S1P<sub>3</sub> dovuta al legame di S1P promuove la migrazione in vari tipi cellulari, attraverso l'attivazione di Rac (Lee, 1999; Liu, 2000). È interessante notare che S1P<sub>2</sub> ed S1P<sub>3</sub>, pur essendo accoppiati alle stesse proteine G, hanno effetti opposti sull'attivazione di Rac e quindi sulla migrazione cellulare. Questo può essere spiegato assumendo che i due recettori mostrino "preferenze" diverse per le proteine G a cui sono associati, e che perciò attivino preferenzialmente vie di segnalazione differenti. S1P<sub>3</sub> regola inoltre la riorganizzazione del citoscheletro, l'assemblaggio delle giunzioni aderenti ed il differenziamento morfogenetico (Cheresh, 1999). Sono invece scarsi i dati riguardanti l'effetto della segnalazione di questo recettore sugli eventi di proliferazione e sopravvivenza indotti da S1P.

Topi *knock out* per il gene *s1p3* non presentano alcuna anomalia fenotipica, in analogia con ciò che è stato osservato per S1P<sub>2</sub> (Taha, 2004). È comunque interessante ricordare che topi omozigoti mancanti di entrambi i recettori, S1P<sub>2</sub> ed S1P<sub>3</sub>, sono caratterizzati da una marcata mortalità post-natale che sopraggiunge entro la terza settimana (Taha, 2004). Quest'ultimo risultato dimostra chiaramente che entrambi i recettori sono coinvolti nello sviluppo embrionale e che la segnalazione combinata tra i due gioca un ruolo essenziale nel corretto sviluppo dell'embrione. L'espressione temporale dei distinti S1PR nel topo risulta essere diversa: S1P<sub>1</sub> viene espresso al giorno E8.5 mentre S1P<sub>3</sub> ed S1P<sub>2</sub> raggiungono la loro massima espressione rispettivamente al giorno E18 e poco prima della nascita. Ciò potrebbe spiegare l'effetto non letale della delezione del gene codificante S1P<sub>2</sub> o S1P<sub>3</sub> e l'incapacità di tali recettori di compensare i *knock out* per S1P<sub>1</sub>.

### S1P<sub>4</sub>

A differenza dei primi tre recettori, ampiamente distribuiti in vari tessuti e linee cellulari, S1P<sub>4</sub> e S1P<sub>5</sub> hanno un *pattern* di espressione molto ristretto (Taha, 2004). L'espressione di S1P<sub>4</sub> risulta limitata essenzialmente ai tessuti e alle cellule del sistema ematopoietico (Taha, 2004). Questa osservazione ha suggerito un suo coinvolgimento nella regolazione della risposta immunitaria. Studi condotti *in vitro* hanno in effetti dimostrato che, attraverso l'attivazione di questo recettore, S1P promuove la sopravvivenza dei linfociti T e B (Rosen, 2005). Ulteriori studi effettuati sui linfociti T hanno inoltre dimostrato che S1P<sub>4</sub> inibisce la proliferazione di queste cellule e la produzione di citochine immunostimolanti, mediando così effetti immunosoppressivi, anche mediante la promozione della produzione di citochine immunosoppressive (Wang, 2005). È stato inoltre dimostrato che S1P promuove la migrazione cellulare in cellule CHO supere-sprimenti il recettore S1P<sub>4</sub> attraverso un meccanismo dipendente dall'attivazione di Cdc42, una GTPasi monomeriche che, insieme a Rho e Rac, ha un ruolo importante nella migrazione (Taha, 2004). I dati relativi al coinvolgimento di S1P<sub>4</sub> nella risposta migratoria dei linfociti T sono invece contrastanti. Matsuyuki e collaboratori, in accordo con quanto dimostrato nelle cellule CHO, sostengono che tale recettore, insieme a S1P<sub>1</sub>, abbia un ruolo importante nel mediare la risposta migratoria dei linfociti T verso S1P (Matsuyuki, 2006). Al contrario, Wang e colleghi hanno dimostrato che S1P<sub>4</sub> non influenza la migrazione dei linfociti T in risposta né a S1P né alle chemochine (Wang, 2005). È plausibile che questa discrepanza sia dovuta al fatto che nel secondo caso sono stati utilizzati modelli cellulari in cui l'unico recettore per S1P ad essere presente o funzionalmente rilevante era S1P<sub>4</sub>; Matsuyuki e collaboratori hanno invece proposto che l'interazione fisica tra questo recettore e S1P<sub>1</sub> sia alla base della loro capacità di mediare la risposta migratoria dei linfociti T. In effetti è stato dimostrato che i recettori per S1P, analogamente a quanto osservato per altri recettori accoppiati a proteine G, sono in grado di associarsi tra loro a formare omo- o eterodimeri, sebbene le proprietà funzionali di questi complessi molecolari rimangono al momento ignote (Van Brocklyn, 2002).

Il ruolo di S1P<sub>4</sub> nel sistema immunitario *in vivo* non è noto, ad oggi tale recettore risulta infatti scarsamente caratterizzato da un punto di vista funzionale.

S1P<sub>4</sub> è associato con le proteine G<sub>i</sub> e G<sub>12/13</sub> (Taha, 2004) (Figura 11). Questo recettore, attraverso una via mediata dalla subunità βγ di G<sub>i</sub>, stimola l'attivazione di Cdc42, della PLC e di ERK1/2 (Taha, 2004). Mediante la proteina G<sub>12/13</sub>, S1P<sub>4</sub> attiva Rho, stimolando così il riarrangiamento del citoscheletro e regolando quindi la forma e la motilità cellulare (Taha, 2004). Infine, S1P<sub>4</sub>, pur non essendo accoppiato alla proteina G<sub>s</sub>, attiva la AC (Ishii, 2001).

### S1P<sub>5</sub>

L'espressione di S1P<sub>5</sub> è limitata essenzialmente al sistema nervoso centrale, ed in particolare agli oligodendrociti e agli astrociti (Ishii, 2001). Tale recettore è accoppiato a G<sub>i</sub> e a G<sub>12/13</sub> (Taha, 2004) (Figura 11): attraverso la subunità α di G<sub>i</sub>, questo recettore inibisce la AC. Inoltre, S1P<sub>5</sub> è l'unico, tra i recettori per S1P, ad inibire ERK1/2 (Taha, 2004). In cellule CHO, infatti, l'attivazione di questo

sottotipo recettoriale da parte dello specifico ligando inibisce l'attivazione di ERK1/2 e quindi la proliferazione indotta da siero, molto probabilmente attraverso un meccanismo che coinvolge una tirosina fosfatasi (Malek, 2001). 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. I ruoli fisiologici di questo recettore risultano ancora sconosciuti.

Com'è chiaramente emerso, i recettori di S1P modulano l'attività dei secondi messaggeri con "forza" diversa in seguito al legame con il ligando. Alcuni di questi messaggeri cooperano in maniera sinergica per produrre un effetto, mentre altri ne generano di opposti. L'effetto finale dell'esposizione delle cellule a S1P è dunque il risultato netto tra le "forze" che agiscono insieme in un dato momento (Taha, 2004). In alcuni casi si possono verificare effetti di ridondanza di funzione a carico dei recettori per cui l'assenza di uno di essi può essere compensata dalla presenza degli altri, non si tratta tuttavia di recettori con funzione completamente sovrapponibile (Ishii, 2001).

### 3.6 Funzioni biologiche di S1P

SM e le molecole che hanno origine dal suo metabolismo sono importanti mediatori che possono esercitare effetti molto diversi a livello cellulare. S1P svolge funzioni fondamentali nelle cellule a partire dagli Eucarioti inferiori. Nei lieviti, la delezione dei geni *Lcb4* e *Lcb5*, che codificano per SK, provoca una diminuzione dei livelli di S1P ed un aumento di fitosfingosina che si associa ad una più bassa sopravvivenza del lievito in seguito a stress termico. In *D. discoideum* la delezione del gene che codifica per SPL ha drammatici effetti sulle interazioni cellula-cellula e sul differenziamento di strutture cellulari. È rilevante sottolineare che negli Eucarioti inferiori la via di segnalazione SK/S1P/SPL è importante per la sintesi di lipidi di membrana fra i quali la fosfatidiletanolamina (PE) a partire da fosfoetanoloamina. In *D. melanogaster* l'inibizione della SK si traduce in una diminuzione dei livelli di PE che a sua volta attiva il fattore di trascrizione SREBP (*Sterol Response Element Binding Protein*) e regola l'espressione degli enzimi per la sintesi dei lipidi (Dobrosotskaya, 2002).

S1P agisce come mitogeno in molti tipi cellulari, inducendo la sintesi di DNA e la proliferazione cellulare (Taha, 2004). Come accennato in precedenza, non è ancora chiaro se S1P eserciti questa funzione agendo come secondo messaggero oppure attraverso l'attivazione dei recettori di membrana, poiché i dati ottenuti al riguardo sono contrastanti. È stato infatti osservato che, in molti casi, la proliferazione cellulare indotta da S1P risulta bloccata da inibitori della proteina G<sub>i</sub>, come PTx (Hla, 2001), suggerendo il coinvolgimento di recettori di membrana. Viceversa, in altri sistemi cellulari S1P stimola la sintesi di DNA quando viene iniettata direttamente all'interno della cellula (Van Brocklyn, 1998), suggerendo che il lipide bioattivo induca tale effetto biologico agendo come secondo messaggero. Nonostante la ben documentata azione di stimolazione della proliferazione da parte di S1P, è stato dimostrato che in alcuni sistemi cellulari, tra cui miofibroblasti epatici umani ed epatociti di ratto, il lipide bioattivo ha un effetto anti-proliferativo (Davaille, 2000; Ikeda, 2003).

Uno degli effetti principali di S1P è rappresentato dalla promozione della sopravvivenza cellulare e dall'inibizione dell'apoptosi. Gli sfingolipidi Cer, Sph e S1P svolgono, infatti, un importante ruolo nel regolare la proliferazione, la sopravvivenza e la morte cellulare. Cellule in condizioni fisiologiche hanno tipicamente livelli molto bassi dei tre metaboliti sfingolipidici. Il metabolismo e la via di segnalazione sono iniziati da forme differenti di SMasi, enzimi che trasformano il lipide di membrana SM in Cer e fosfocolina. In molti tipi cellulari elevati livelli di Cer portano all'arresto della crescita cellulare e all'induzione dell'apoptosi (Hannun, 2008). Le radiazioni UV, i farmaci antineoplastici e le citochine attivano le SMasi, aumentano i livelli di Cer endogeno e inducono l'apoptosi (Hannun, 2008). L'aumento del Cer è spesso necessario per l'apoptosi come dimostrato dal fatto che cellule mancanti dell'attività sfingomielinasi sono protette dall'apoptosi e, coerentemente, risensibilizzate all'apoptosi mediante aggiunta di Cer (Maceyka, 2002). È ormai ben stabilito che Cer ha *target* intracellulari che mediano la sua azione pro-apoptotica quali le proteine fosfatasi PP1 e PP2A, la catepsina D, JNK e la PKC $\zeta$  (Hannun, 2008). L'attivazione della SMasi acida genera Cer a livello del lisosoma o della membrana plasmatica, localizzazioni subcellulari dell'enzima (Hannun, 2008). È stato dimostrato che nel lisosoma Cer interagisce direttamente ed attiva la proteasi catepsina D, che, a sua volta, catalizza il taglio della proteina pro-apoptotica BID e l'induzione dell'apoptosi (Figura 12). La SMasi acida può traslocare a livello della membrana plasmatica dove agisce sulla SM presente nel foglietto esterno generando Cer. Cer può indurre la formazione di microdomini di membrana e/o di *cluster* microscopici di recettori (*capping*) o attivare vie di segnalazione mediate da fosfatasi, quali PP1e PP2A, e chinasi quali PKC $\zeta$  (Hannun, 2008) (Figura 12).

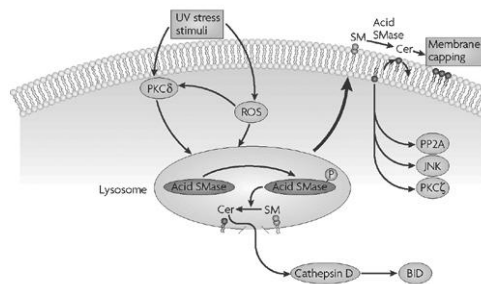


Figura 12. Ruolo della generazione di Cer nella risposta da stress.

La Sph, la cui unica via di formazione è la deacilazione del Cer, agisce come inibitore della PKC (Hannun, 2008). Aumentati livelli di tale sfingolipide inibiscono inoltre la crescita cellulare e inducono l'apoptosi: in cellule Jurkat l'apoptosi mediata da Fas è dovuta all'aumentata attività della CDasi e al conseguente aumento dei livelli di Sph (Cuvillier, 2000). È stato recentemente dimostrato, inoltre, che proteasi simili alla caspasi-3 sono attivate durante l'apoptosi indotta da Sph in cellule di epatoma (Hung, 1999). Tuttavia non è stato ancora chiarito se un aumento dei livelli di Sph sia sufficiente ad indurre apoptosi.

Al contrario di Cer e Sph, lo sfingolipide S1P promuove la crescita cellulare e inibisce l'apoptosi (Hannun, 2008). Molti stimoli esterni, soprattutto fattori di crescita e di sopravvivenza, attivano l'enzima SK portando ad un aumento nei livelli di S1P e ad una concomitante diminuzione nei livelli di Cer. Gli effetti opposti di questi metaboliti sono dunque regolati dagli enzimi che interconvertono Cer, Sph e S1P. La conversione di Cer e Sph a S1P rimuove segnali pro-apoptotici e crea simultaneamente un segnale di sopravvivenza, e viceversa (Figura 13).

E' stato dunque proposto che il "reostato degli sfingolipidi" sia un fattore critico nel determinare il destino della cellula (Cuvillier, 1996). In accordo con questa ipotesi il destino della cellula è determinato non dai livelli assoluti ma dalle quantità relative di questi metaboliti antagonisti (Figura 13). In questo contesto è stato dimostrato che l'aumento di S1P protegge dall'apoptosi indotta da Cer, mentre la diminuzione di S1P favorisce l'apoptosi indotta da Cer (Cuvillier, 1996).

Il ruolo della SK1 e di S1P nella protezione dall'apoptosi è stato confermato da diversi studi che mostrano come tali molecole siano in grado di attenuare gli effetti di inibizione della crescita e di induzione dell'apoptosi esercitati da vari stimoli (Cuvillier, 1996). Gli effetti pro-apoptotici di diversi agenti che promuovono la formazione di Cer nella cellula risultano infatti significativamente attenuati quando la SK è superespressa o attivata da un agonista. Cellule superesprimenti la SK1 mostrano una velocità di proliferazione più elevata e risultano inoltre protette dall'apoptosi indotta dalla deprivazione di siero, dal TNF- $\alpha$  o dalla somministrazione di Cer nel mezzo extracellulare (Edsall, 2001; Xia, 2000). Viceversa, l'inibizione della SK1 provoca l'accumulo di Cer all'interno della cellula e la morte cellulare per apoptosi (Taha, 2006 b).

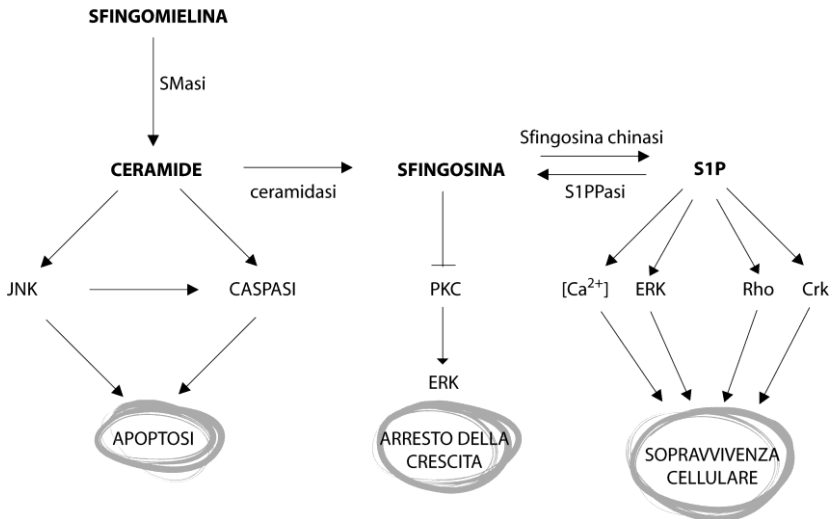


Figura 13. Modello del "reostato".

Coerentemente, la superespressione della S1P fosfatasi è associata ad aumentati livelli di Sph e Cer e ad un effetto pro-apoptotico (Le Stunff, 2002). La capacità della SK1 di inibire la morte cellulare indotta da vari stimoli che provocano un aumento dei livelli intracellulari di Cer non è dovuta semplicemente al fatto che questo enzima riduce i livelli cellulari di una molecola pro-apoptotica: il trattamento con S1P mima infatti l'effetto della superespressione dell'enzima, dimostrando che lo sfingolipide ha un ruolo attivo nella regolazione del processo apoptotico (Edsall, 1997).

I meccanismi molecolari alla base dell'azione anti-apoptotica della SK1 e di S1P coinvolgono diverse molecole chiave delle vie di sopravvivenza e morte cellulare. Uno dei meccanismi attraverso cui S1P promuove la sopravvivenza è la modulazione dell'attività di MAPK aventi effetti opposti sulla regolazione della morte cellulare: è stato dimostrato che lo sfingolipide inibisce MAPK pro-apoptotiche, come JNK, e attiva MAPK anti-apoptotiche, quali ERK1/2 (Xia, 1995). ERK1/2 può infatti interferire con la via intrinseca di induzione dell'apoptosi sia a monte del rilascio di citocromo c dai mitocondri, attraverso l'inattivazione di Bad, membro pro-apoptotico della famiglia di Bcl-2; sia a valle del rilascio di citocromo c, inibendo l'attivazione delle caspasi (Cross, 2000). Cer e Sph modulano l'attività delle MAPK coinvolte nella regolazione della morte cellulare in maniera opposta rispetto a S1P, attivando JNK ed inibendo ERK1/2. Ciò spiega in parte gli effetti antagonisti esercitati da questi sfingolipidi nella regolazione dell'apoptosi (Maceyka, 2002). S1P esercita un effetto in favore della sopravvivenza anche attraverso l'attivazione di fattori di trascrizione coinvolti nella regolazione della crescita cellulare e nella protezione dall'apoptosi, quali AP-1 e NF- $\kappa$ B, e di Akt (Osawa, 2001), che inibisce l'apoptosi bloccando il rilascio del citocromo c dai mitocondri indotto da Bad. Varie evidenze sperimentali hanno suggerito che S1P possa inibire, direttamente o indirettamente, la SPT o la Cer sintasi, enzimi chiave nella biosintesi del Cer (Van Echten-Deckert, 1997; Maceyka, 2005). Tale ipotesi è rafforzata dalla recente dimostrazione che S1P è in grado di interagire con la ceramide sintasi e di inibirne l'attività enzimatica *in vitro* (Laviad, 2008). La regolazione negativa della biosintesi del Cer potrebbe rappresentare dunque un altro meccanismo attraverso il quale S1P promuove la sopravvivenza ed inibisce l'apoptosi.

Dato il ruolo del "reostato degli sfingolipidi" nella regolazione della crescita cellulare e dell'apoptosi non è sorprendente che il metabolismo degli sfingolipidi sia spesso deregolato nel cancro, una patologia caratterizzata dall'aumento della proliferazione cellulare e/o dalla diminuzione dell'apoptosi. A questo proposito, è interessante osservare che la SK1 è frequentemente superespressa in diversi tumori solidi, a sostegno di un importante ruolo della biosintesi di S1P, e di un alterato metabolismo degli sfingolipidi in generale, nella tumorigenesi (French, 2003). Oltre a proteggere le cellule tumorali dall'apoptosi e a stimolarne la proliferazione, S1P esercita un ruolo importante nella progressione tumorale anche mediante la sua capacità di promuovere l'angiogenesi (Maceyka, 2002). In tal modo, infatti, S1P favorisce la vascolarizzazione della massa tumorale, evento necessario sia per l'accrescimento dei tumori solidi, in quanto garantisce loro l'apporto di ossigeno e nutrienti, sia per la loro capacità di dare



metastasi, offrendo alle cellule tumorali la possibilità di invadere il circolo sanguigno. Il ruolo di S1P nella tumorigenesi è stato studiato da Visentin e collaboratori (Visentin, 2006) che hanno dimostrato come il trattamento con un anticorpo specifico per tale molecola sia in grado di ridurre la progressione tumorale e, in alcuni casi, di eliminare il tumore in modelli murini. L'inibizione della crescita tumorale è stata attribuita alla capacità dell'anticorpo di neutralizzare l'azione pro-angiogenica, anti-apoptotica e mitogenica di S1P. Tali risultati mostrano dunque che l'utilizzo di un anticorpo specifico per S1P potrebbe rappresentare un approccio promettente nella terapia del cancro.

S1P è un importante regolatore della migrazione cellulare, processo chiave in vari contesti sia fisiologici che patologici quali lo sviluppo embrionale, l'organogenesi, l'angiogenesi, la riparazione delle ferite e la risposta immunitaria. La migrazione cellulare è un processo estremamente complesso che richiede la riorganizzazione del citoscheletro, l'estensione dei lamellipodi, il rimodellamento della membrana e la formazione delle fibre da stress. Tutti questi eventi sono in gran parte controllati da proteine appartenenti alla famiglia delle Rho GTPasi: Rac, Rho e Cdc42. Rac e Cdc42 regolano il rimodellamento della membrana e la formazione dei lamellipodi, mentre Rho regola soprattutto i riarrangiamenti del citoscheletro. Attraverso l'attivazione delle vie di segnalazione a valle dei propri recettori, S1P è in grado di modulare l'attività di queste molecole, e di regolare quindi il processo di migrazione. S1P regola la migrazione cellulare *in vitro* in modo contraddittorio tanto che la regolazione di tale processo può essere presa ad esempio per la specificità delle risposte biologiche evocate da ogni singolo recettore. Come precedentemente descritto, l'effetto di S1P dipende dalle isoforme recettoriali espresse nel tipo cellulare analizzato e dal loro rapporto reciproco. La maggior parte dei dati in letteratura a questo proposito riguarda cellule della linea CHO superesprimenti i diversi sottotipi recettoriali. Tali dati dimostrano che i recettori S1P<sub>1</sub> e S1P<sub>3</sub> sono responsabili di un'aumentata migrazione cellulare, a differenza del recettore S1P<sub>2</sub> che inibisce la chemiotassi verso lo sfingolipide. Risultati analoghi sono stati ottenuti in cellule non trasfettate: in cellule endoteliali, che esprimono più alti livelli di S1P<sub>1</sub> e S1P<sub>3</sub> rispetto ad S1P<sub>2</sub>, S1P stimola la migrazione; al contrario, in cellule della muscolatura liscia e di melanoma, nelle quali predomina l'espressione di S1P<sub>2</sub>, lo sfingolipide ha un'azione inibitoria sulla chemiotassi. S1P regola negativamente la migrazione cellulare anche in cellule di carcinoma mammario, secondo un meccanismo d'azione indipendente dai recettori (Taha, 2004).

S1P svolge inoltre numerose e importanti funzioni nel sistema cardiovascolare. Dato il suo ruolo nella regolazione di sopravvivenza, proliferazione e migrazione delle cellule endoteliali e delle cellule della muscolatura liscia dei vasi, S1P promuove i processi di vasculogenesi e di angiogenesi sia in stati fisiologici, quali lo sviluppo embrionale e la riparazione delle ferite, che patologici, come la vascolarizzazione della massa tumorale (Taha, 2006 b). S1P è coinvolta nel controllo del tono vascolare, inducendo vasocostrizione oppure vasodilatazione a seconda che essa agisca sulle cellule della muscolatura liscia dei vasi oppure sulle cellule endoteliali: lo sfingolipide induce la contrazione delle cellule della muscolatura liscia (Ohmori, 2003), mentre nelle cellule endoteliali determina

l'attivazione dell'enzima monossido di azoto sintasi con conseguente produzione e rilascio in circolo di monossido di azoto, responsabile della vasodilatazione (Igarashi, 2000; Morales-Ruiz, 2001). S1P modula inoltre la permeabilità dei vasi attraverso la sua capacità di regolare l'assemblaggio delle giunzioni aderenti tra le cellule endoteliali (Lee, 1999). Infine, S1P influenza fortemente lo sviluppo (Kupperman, 2000) ed il funzionamento (Nakajima, 2000) del cuore, oltre ad avere un'azione protettiva nei cardiomiociti nel danno da ischemia o da riperfusione (Lecour, 2002).

Un'altra importante funzione di S1P è quella di modulatore della risposta immunitaria, evocando numerose risposte biologiche nelle cellule del sistema immunitario. Gli effetti indotti da S1P su queste cellule dipendono dalla concentrazione dello sfingolipide oltre che dal *pattern* di espressione dei suoi recettori (Goetzl, 2004). I livelli di espressione dei recettori per S1P nelle cellule del sistema immunitario possono inoltre variare a seconda dello stato di attivazione immunologica, con conseguente variazione dell'effetto dello sfingolipide (Galer, 2002). S1P controlla il traffico dei linfociti nel sistema linfoide e la loro distribuzione nei tessuti, eventi centrali nella risposta immunitaria specifica, regolandone la migrazione (Chi, 2005). Somministrando il farmaco immunomodulatore FTY720 si riscontra un ritorno dei linfociti T nei tessuti linfoidi secondari, con conseguente riduzione nella disponibilità delle cellule immunitarie, responsabile dell'effetto immunosoppressivo del composto. FTY720 è un derivato della miriocina (ISP-1), metabolita del fungo *Isaria Sinclairii*, inizialmente utilizzato allo scopo di inibire la SPT si è successivamente dimostrato agire come un analogo di Sph, suscettibile alla fosforilazione e capace quindi di agire come potente agonista di tutti i recettori per S1P ad eccezione di S1P<sub>2</sub> (Mandala, 2002). Il composto viene fosforilato da entrambe le isoforme della SK, la SK2 è tuttavia 30 volte più affine al farmaco della SK1. FTY720 non induce apoptosi ed è al momento in fase di *trial* clinici per il trattamento dei rigetti nei trapianti d'organo. Mentre l'effetto di FTY720-P sull'*homing* è da imputare all'azione del farmaco sui linfociti, è plausibile che l'inibizione dell'uscita di tali cellule dai linfonodi sia dovuta agli effetti di tale composto sui S1PR espressi nelle cellule endoteliali. Dati recenti evidenziano, infatti, che S1P rinforza la barriera endoteliale e FTY720-P promuove la formazione di giunzioni aderenti in cellule endoteliali, revertendo la permeabilità causata da VEGF con una modalità sensibile al trattamento con PTx (Sanchez, 2003). È stato anche proposto che il traffico dei linfociti sia controllato da S1P mediante la sua capacità di modulare la permeabilità della barriera endoteliale, regolando l'assemblaggio delle giunzioni cellula-cellula (Rosen, 2005). S1P regola inoltre il differenziamento dei timociti e la loro uscita dal timo (Matloubian, 2004) e la risposta chemiotattica dei linfociti alle chemochine e ad altre citochine (Graeler, 2002). S1P risulta anche necessaria per il differenziamento dei vari sottotipi di linfociti T e per la loro funzione, regolando vari processi tra cui la loro interazione con le cellule dendritiche e con i linfociti B e la modulazione della produzione di citochine (Dorsam, 2003).

Un'altra funzione ben caratterizzata di S1P nel sistema immunitario riguarda la sua azione sui mastociti. Nei linfociti lo sfingolipide promuove la produzione di immunoglobuline di classe E (IgE), responsabili dell'attivazione dei masto-

citi. In risposta alla stimolazione da parte delle IgE nei mastociti si osserva attivazione della SK con conseguente produzione di S1P, la quale, agendo con modalità autocrina, regola la chemiotassi dei mastociti e la loro degranolazione, con rilascio dei mediatori responsabili della reazione allergica (Jolly, 2004).

Oltre che nella risposta immunitaria specifica, S1P è coinvolta nella flogosi. È stato infatti dimostrato che differenti citochine pro-infiammatorie attivano la SK e quindi la produzione di S1P la quale, a sua volta, induce la produzione di numerosi mediatori dell'infiammazione, mediando l'azione di tali citochine (Chalfant, 2005).

In aggiunta ai suoi effetti sul sistema cardiovascolare ed immunitario, S1P esercita azioni importanti anche su cellule del sistema riproduttivo, del fegato, del sistema nervoso. In particolare nel laboratorio di Chun (Chun, 1999) è stato dimostrato che S1P aumenta significativamente la sopravvivenza di cellule di Schwann attraverso la via di segnalazione che prevede l'attivazione di Akt.

S1P è inoltre coinvolta nella regolazione dell'omeostasi del calcio mediante differenti meccanismi. Agendo come secondo messaggero, lo sfingolipide provoca la mobilitazione del calcio dalle riserve intracellulari in maniera indipendente dalla formazione di IP3 (Mattie, 1994). È stato ad esempio osservato che vari stimoli esterni, tra cui l'EGF, noti per regolare l'omeostasi del calcio senza attivare la PLC, agiscono stimolando la SK (Meyer zu Heringdorf, 1999). S1P regola l'omeostasi del calcio intracellulare anche in maniera dipendente dall'attivazione dei propri recettori di membrana: alcuni di essi mediano infatti l'attivazione della PLC, con conseguente rilascio di calcio dalle riserve intracellulari mediato da IP3.

#### 4. Ceramide 1-fosfato (C1P)

Sebbene il ceramide 1-fosfato (C1P) sia stato descritto più di 20 anni fa, la sua attività biologica è stata dimostrata solo da qualche anno. Ultimo in ordine di identificazione tra gli sfingolipidi bioattivi C1P è stato recentemente implicato nella regolazione di molti processi biologici quali proliferazione, apoptosi, fagocitosi e processi infiammatori.

La fosforilazione di Cer sembra essere il principale meccanismo di generazione di C1P. L'enzima ceramide chinasi (CERK), che catalizza la fosforilazione di Cer sul C-1, è l'unico enzima ad oggi identificato coinvolto nella biosintesi di C1P. Tale enzima fu inizialmente identificato in vescicole sinaptiche (Bajjalieh, 1989), e in seguito ritrovato in monociti leucemici umani HL-60 (Hanada, 2003). È stato dimostrato che CERK è presente sia nella frazione citosolica che nella frazione delle membrane microsomiali (Boath, 2008). C1P viene trasportato mediante la *pathway* secretorio dall'apparato del Golgi alla membrana plasmatica e quindi rilasciato nell'ambiente extracellulare dove può legarsi a proteine accettrici, quali albumina, o a lipoproteine (Boath, 2008). Chalfant e collaboratori hanno recentemente dimostrato che l'enzima CERK utilizza specificatamente il Cer trasportato a livello del Golgi dalla proteina CERT. L'inibizione dell'espressione di tale proteina mediante interferenza a RNA, infatti, provoca

una drastica riduzione nella sintesi di C1P, suggerendo che CERT abbia un ruolo critico nella formazione dello sfingolipide (Lamour, 2007). In contrasto, Boath e collaboratori hanno recentemente dimostrato che il trasporto di Cer in prossimità della CERK è indipendente da CERT (Boath, 2008). La ragione di tale discrepanza è attualmente ignota ma potrebbe essere spiegata ammettendo che la localizzazione subcellulare e i livelli di espressione di CERK varino a seconda del tipo cellulare.

La CERK è in grado di catalizzare la reazione di fosforilazione su molecole di Cer che abbiano un acido grasso la cui catena sia costituita da almeno dodici atomi di carbonio (Wijesinghe, 2005). Studi successivi effettuati da Lamour e collaboratori (Lamour, 2007) utilizzando la spettrometria di massa in vari tipi cellulari hanno dimostrato che la CERK utilizza come substrato le specie più abbondanti di Cer quali C16:0-Cer e C18:0-Cer. Utilizzando Cer naturali l'enzima ha un optimum di pH compreso tra 6.0 e 7.5 e mostra una cinetica di Michaelis-Menten, con valori di  $K_m$  di 187  $\mu\text{M}$  e 32  $\mu\text{M}$  per Cer e ATP, rispettivamente (Sugiura, 2002). È importante sottolineare che l'enzima CERK non esercita alcuna attività sulla sfingosina o sulla sfinganina, ciò dimostra la necessità dell'acilazione del gruppo aminico in posizione 2 del substrato per il suo funzionamento. L'enzima non è capace di fosforilare neanche il precursore inattivo del Cer, il diidrocераmide, né altri lipidi.

Sulla base dell'omologia di sequenza con la SK1 Sugiura e collaboratori hanno recentemente clonato la CERK umana (Sugiura, 2002). Il gene *hCERK* codifica una proteina di 537 aminoacidi la cui regione catalitica ha un'alta analogia con il dominio catalitico della diacilglicerolo chinasi (DGK) (Figura 14).

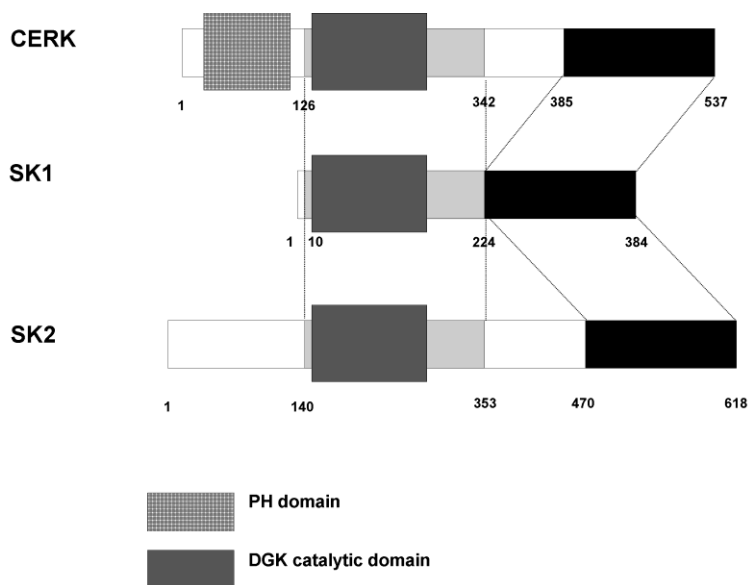


Figura 14. Rappresentazione schematica delle regioni conservate di CERK, SK1 e SK2.

La CERK presenta i 5 domini conservati nelle chinasi lipidiche (C1-C5) precedentemente identificati nelle due isoforme della SK. Tuttavia, CERK ha regioni conservate addizionali non omologhe alla SK. L'enzima presenta inoltre variabilità anche all'interno delle regioni omologhe alla SK. La sequenza della CERK umana è molto più simile a quella della hSK2 piuttosto che a hSK1. La sua sequenza differisce INFATTI notevolmente da hSK1 nella parte centrale e all'N-terminale. Tuttavia, a valle dell'aminoacido 126 della hCERK, le sequenze delle tre chinasi mostrano un alto grado di omologia (Figura 14). All'N-terminale la CERK presenta un sito putativo di miristoilazione e un dominio PH (*Pleckstrin Homology*) costituito da 120 aminoacidi, e al C-terminale un dominio di legame  $Ca^{2+}$ /calmodulina. Mediante mutagenesi sito specifica, Kim e collaboratori hanno dimostrato che il residuo di leucina presente nel dominio PH in posizione 10 è essenziale per l'attività catalitica di CERK (Kim, 2005). Lo stesso gruppo ha recentemente dimostrato che l'interazione tra il dominio PH della CERK e il fosfatidilinositolo 4,5-bisfosfato regola la localizzazione dell'enzima a livello della membrana plasmatica e, conseguentemente, i livelli di C1P (Kim, 2006). Nella sequenza della CERK è stata recentemente dimostrata l'esistenza di un motivo conservato ricco in Cys essenziale per la sua funzione. La CERK sembra essere regolata anche mediante processi di fosforilazione/defosforilazione (Bornancin, 2005). L'enzima presenta nella sua sequenza due regioni di fosforilazione conservate in specie diverse: il residuo di Ser340 per la caseina chinasi II e la Ser424 per la fosforilazione dipendente da AMP ciclico. Esistono inoltre sei residui putativi per la fosforilazione da PKC (Ser72, Thr118, Thr127, Ser230, Ser300, conservata anche nella SK, e Ser340) (Sugiura, 2002).

Sebbene la CERK sia l'unico enzima descritto fino ad oggi per la generazione di C1P in cellule di mammifero, macrofagi derivati da midollo osseo (BMDM, *Bone Marrow-Derived Macrophages*) di topi *knock out* per il gene *CERK* (*CERK*<sup>-/-</sup>) continuano a produrre livelli significativi di C1P, suggerendo l'esistenza di un *pathway* metabolico alternativo a quello Cer/CERK, per la produzione di C1P (Boath, 2008). In particolare, la formazione di C16-C1P, principale rappresentante di C1P nelle cellule, non è abolita in cellule BMDM *CERK*<sup>-/-</sup>. La presenza di C1P in tali cellule potrebbe essere spiegata ipotizzando la sintesi di C1P per trasferimento di un acil-CoA al gruppo aminico in posizione 2 di S1P mediata da una putativa acil-transferasi: vari gruppi di ricerca hanno tuttavia escluso che tale reazione possa avvenire in cellule di mammifero (Gómez-Muñoz, 2006).

C1P può essere inoltre generato dal riciclaggio della Sph prodotta nel catabolismo dei gangliosidi in cellule di cervello (Riboni, 2002) o intracellularmente in neutrofili umani attivati da N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (Hinkovska-Galcheva, 1998).

La SM può essere convertita direttamente in C1P per azione della SMasi D. Gli effetti tossici del C1P sono infatti noti dal momento in cui la SMasi D fu identificata come principio attivo del veleno di un aracnide, *Loxosceles reclusa*. Tale enzima è espresso anche da alcuni batteri quali *Vibrio damsela* e *Corynebacterium pseudotuberculosis* anche se non esistono evidenze della sua espressione in alcun mammifero.

L'identificazione di una C1P fosfatasi nel cervello di ratto e negli epatociti, unita all'esistenza della CERK, ha suggerito che Cer e C1P siano interconvertibili nelle cellule. La C1P fosfatasi è presente in notevoli quantità nei sinaptosomi cerebrali e nella membrana plasmatica del fegato e sembra essere un enzima diverso dalla fosfatasi che idrolizza acido fosfatidico (PA), la PA fosfoidrolasi (Gómez-Muñoz, 2006). C1P può in ogni caso essere convertito in Cer anche dall'azione della PA fosfoidrolasi, localizzata specificatamente a livello della membrana plasmatica delle cellule (Waggoner, 1996). Un'altra possibile via per la degradazione di C1P potrebbe essere la sua deacilazione a S1P, in seguito degradata irreversibilmente dalla SPL. Tuttavia non è stata ancora identificato un enzima C1P deacilasi in cellule di mammifero.

La regolazione dei livelli di Cer e C1P, mediante l'azione coordinata di CERK e C1P fosfatasi, può essere di importanza cruciale per i *pathways* metabolici o di segnalazione regolati da questi due sfingolipidi bioattivi.

#### 4.1 Funzioni biologiche di C1P

Negli ultimi anni stanno aumentando le evidenze di un ruolo fondamentale di C1P nel regolare la proliferazione cellulare e l'apoptosi (Gómez-Muñoz, 2004). Chalfant e collaboratori hanno inoltre elegantemente dimostrato che C1P è un potente agente pro-infiammatorio (Lamour, 2005). Oltre a ciò C1P ha un ruolo importante nella fagocitosi (Hinkovska-Galcheva, 2005) e nella regolazione della chemiotassi dei macrofagi (Granado, 2009).

L'identificazione di CERK in vescicole sinaptiche cerebrali ha suggerito un ruolo per il suo prodotto, C1P, nella regolazione della secrezione dei neurotrasmettitori mediante un aumento nella fusibilità delle membrane delle vescicole (Bajjalieh, 1989). Durante la fagocitosi di eritrociti rivestiti di anticorpi da parte di leucociti polimorfonucleati viene generato Cer per attivazione della SMasi. È stato recentemente dimostrato che il Cer che si forma in questo contesto può essere convertito a C1P mediante l'attivazione della CERK, suggerendo che C1P promuova la formazione di fagolisosomi (Hinkovska-Galcheva, 1998).

La prima evidenza del fatto che C1P è una molecola bioattiva è rappresentata da uno studio in cui Gómez-Muñoz e collaboratori hanno dimostrato che lo sfingolipide stimola la sintesi e la divisione cellulare in fibroblasti di ratto. In tale studio, condotto utilizzando C1P sintetici a catena corta (C2-C1P e C8-C1P), è stato inoltre osservato che lo sfingolipide reverte parzialmente i cambiamenti morfologici indotti nei fibroblasti di ratto dalla deprivazione prolungata di siero, condizione che induce apoptosi in tali cellule (Gómez-Muñoz, 1998). Analogamente a quanto osservato per C1P a catena corta, una miscela di C1P naturali, a catena lunga, ottenuti da cervello bovino, è in grado di stimolare efficacemente la sintesi di DNA. Tale azione è accompagnata da un aumento nei livelli di PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*), marker di sintesi attiva di DNA (Gómez-Muñoz, 1997). L'effetto mitogenico di C1P è stato recentemente confermato in BMDM: in tali cellule, infatti, lo sfingolipide induce sintesi del DNA e divisione cellulare. Il meccanismo molecolare mediante il quale C1P esercita tale effetto biologico coinvolge la stimolazione di ERK1/2, JNK e della via di segnalazione

PI3K/Akt (Figura 15). L'inibizione dell'enzima glicogeno sintasi chinasi-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ), indotta per fosforilazione mediata da Akt, provoca un aumento nell'espressione di ciclina D1 e c-Myc, importanti regolatori della proliferazione cellulare. C1P stimola inoltre l'attività di NF- $\kappa$ B in BMDM ed il trattamento con inibitori di questo fattore di trascrizione aboliscono completamente la proliferazione dei macrofagi indotta dallo sfingolipide (Gangoiti, 2008) (Figura 15). L'effetto proliferativo di C1P in BMDM dipende inoltre dall'attivazione dell'enzima PKC- $\alpha$ . L'attivazione di tale enzima è indipendente dall'attività della PLC ma richiede l'attivazione della sintesi di SM catalizzata dalla sfingomielina sintasi. L'inibizione dell'attivazione della PKC- $\alpha$  blocca la proliferazione dei macrofagi indotta da C1P indicando che tale enzima è essenziale per l'effetto mitogenico dello sfingolipide (Gangoiti, 2010).

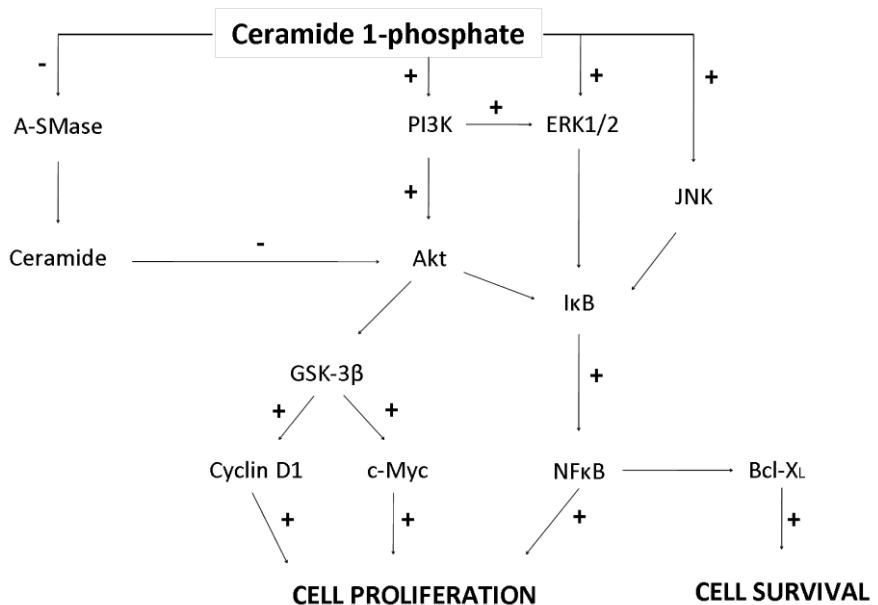


Figura 15. Vie di segnalazione coinvolte negli effetti mitogenici e anti-apoptotici di C1P in BMDM.

Oltre ad avere un effetto mitogenico C1P è anche un potente inibitore dell'apoptosi. L'inibizione dell'espressione di CERK riduce la crescita e promuove l'apoptosi in cellule epiteliali di polmone (Mitra, 2007). Tuttavia, Graf e collaboratori hanno dimostrato che il trattamento di cellule superesprimenti la CERK con C2-Cer, permeabile nelle cellule, porta alla formazione di C2-C1P e all'induzione del processo apoptotico (Graf, 2007). Tali osservazioni contraddittorie possono essere spiegate dal fatto che la superespressione di CERK in pre-

senza di alte concentrazioni di Cer, aggiunto dall'esterno, causa un enorme aumento nei livelli intracellulari di C1P che, probabilmente, raggiunge concentrazioni tossiche per le cellule.

In effetti Gómez-Muñoz e collaboratori hanno dimostrato che C1P stimola la crescita cellulare e inibisce l'apoptosi a basse concentrazioni; al contrario, elevate concentrazioni di C1P sono tossiche e possono indurre morte cellulare (Gómez-Muñoz, 1995; Gómez-Muñoz, 2004). C1P blocca la morte cellulare programmata in BMDM coltivate in assenza di M-CSF (*Macrophage-Colony Stimulating Factor*), una condizione che induce apoptosi in queste cellule: il trattamento con C1P blocca sia la frammentazione del DNA che l'attivazione di caspasi-9 e caspasi-3, suggerendo che l'effetto a favore della sopravvivenza di C1P sia dovuto all'inibizione dell'apoptosi (Gómez-Muñoz, 2004). I macrofagi apoptotici sono caratterizzati da elevati livelli di attività della SMasi acida, e conseguentemente di Cer. Il meccanismo molecolare mediante il quale C1P esercita il suo effetto anti-apoptotico prevede la completa inibizione della SMasi acida e dell'accumulo di Cer (Figura 15). È stato inoltre osservato che lo sfingolipide è in grado di bloccare l'attività della SMasi acida in omogenati cellulari, suggerendo che l'inibizione dell'enzima sia dovuta a interazione fisica diretta con C1P. In conclusione C1P esercita il suo effetto in favore della sopravvivenza principalmente inibendo l'enzima SMasi acida del quale è un inibitore naturale e selettivo (Gómez-Muñoz, 2004). La SMasi acida è inibita anche da S1P nei macrofagi tuttavia, contrariamente a quanto osservato per C1P, l'effetto inibitorio di quest'ultimo sfingolipide non dipende da interazione diretta con l'enzima. È stato recentemente dimostrato che anche macrofagi alveolari NR8383 apoptotici hanno livelli di Cer significativamente aumentati. Tuttavia, contrariamente ai BMDM, l'attivazione di SMasi acida e SMasi neutra ha una piccola entità in queste cellule, suggerendo che Cer sia generato mediante un *pathway* differente. In effetti l'attivazione di SPT, enzima chiave nella sintesi *de novo* degli sfingolipidi, rappresenta il fattore principale in questo processo. Come osservato per le SMasi in BMDM, il trattamento con C1P inibisce l'attivazione di SPT e riduce significativamente i livelli di Cer in macrofagi NR8383, prevenendo l'entrata di tali cellule in apoptosi (Granado, 2009). C1P promuove dunque la sopravvivenza dei macrofagi bloccando l'accumulo di Cer mediante l'inibizione di SMasi o SPT in dipendenza dal tipo cellulare. La rilevanza fisiologica dell'effetto anti-apoptotico di C1P è evidenziata dalla dimostrazione che i livelli intracellulari di tale sfingolipide sono significativamente ridotti in macrofagi apoptotici. Può dunque essere ipotizzato che la riduzione della concentrazione intracellulare di C1P in condizioni apoptotiche risulti nella rimozione dell'inibizione di SMasi o SPT con conseguente aumento di Cer.

Il meccanismo molecolare mediante il quale C1P inibisce l'apoptosi prevede l'attivazione della via di segnalazione della PI3K/Akt. È interessante notare che il fosfatidilinositolo (3,4,5) trifosfato (PIP3), prodotto di catalisi della PI3K, inibisce direttamente l'attività della SMasi acida (Testai, 2004). L'attivazione di PI3K indotta da C1P potrebbe dunque potenziare il suo effetto inibitorio sulla SMasi acida mediante produzione di PIP3. In colture primarie di macrofagi murini C1P induce la fosforilazione di I $\kappa$ B e aumenta la capacità di legame al DNA di



NF- $\kappa$ B e, conseguentemente, l'espressione del gene anti-apoptotico *Bcl-XL*, *target* del fattore di trascrizione (Gómez-Muñoz, 2005) (Figura 15).

L'attività degli enzimi coinvolti nel metabolismo di Cer e C1P deve essere regolata in modo estremamente fine in modo che le cellule possano avere i livelli appropriati di metaboliti pro- e anti-apoptotici. In questo contesto, dato che Cer e C1P hanno ruoli opposti nel regolare proliferazione e apoptosi è stata proposta un'estensione del concetto di "reostato degli sfingolipidi" in cui ha un ruolo centrale l'enzima CERK che, regolando il critico equilibrio tra questi due sfingolipidi bioattivi, può determinare il destino della cellula.

È stato inoltre recentemente dimostrato che C1P ha un ruolo pro-infiammatorio che può avere effetti benefici per l'organismo, proteggendolo da infezioni o danni. I mediatori della flogosi sono costituiti da chemochine, citochine, amine vasoattive, prodotti delle cascate proteolitiche, fosfolipasi, differenti eicoisanoidi e alcuni sfingolipidi. La generazione di metaboliti pro-infiammatori, tuttavia, deve essere bloccata, o almeno significativamente ridotta, quando la flogosi diventa un processo non più controllato, in modo da proteggere l'organismo da ulteriori danni. Per quanto concerne le fosfolipasi, un mediatore chiave del processo infiammatorio è rappresentato dalla fosfolipasi A2 citosolica (cPLA2), un enzima coinvolto nel rilascio recettore-dipendente o indipendente di acido arachidonico (AA) e nella conseguente produzione di eicoisanoidi. Anche alcuni sfingolipidi sono importanti mediatori della flogosi. Cer è stato ad esempio inizialmente descritto come una molecola pro-infiammatoria per differenti tipi cellulari e, più recentemente, implicato nello sviluppo della risposta allergica asmatica e nell'infiammazione respiratoria (Arana, 2010). Inoltre, il trattamento di astrociti con il Cer permeabile a corta catena C2-Cer aumenta l'espressione della 12-lipossigenasi portando alla generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e all'avvio della risposta infiammatoria. Cer generato dalla SMasi acida è stato inoltre implicato nell'edema polmonare PAF-mediato (Arana, 2010). È stato in seguito proposto che almeno alcuni degli effetti pro-infiammatori inizialmente implicati a Cer siano in effetti dovuti alla sua conversione a C1P. In effetti, Chalfant e collaboratori hanno dimostrato che C1P regola potentemente e specificatamente il rilascio di AA in cellule di adenocarcinoma di polmone A549. Nello stesso studio hanno inoltre dimostrato che C1P può essere generato intracellularmente in seguito alla stimolazione della CERK indotta da IL1- $\beta$  (Pettus, 2003). È stato successivamente dimostrato che C1P stimola il rilascio di AA mediante interazione diretta con la cPLA2 (Pettus, 2004). In effetti Subramanian e collaboratori hanno provato che C1P è un attivatore allosterico positivo del gruppo IV della cPLA2 e che lo sfingolipide favorisce l'interazione dell'enzima con la fosfatidilcolina (Subramanian, 2005). C1P favorisce dunque il reclutamento della cPLA2 $\alpha$  a livello delle membrane intracellulari e aumenta l'attività catalitica dell'enzima associato alle membrane. L'attivazione del gruppo IV della cPLA2 indotta da C1P è dipendente dalla lunghezza della catena acilica: C1P con catene aciliche con sei o più carboni sono capaci di attivare efficientemente la cPLA2 *in vitro*, mentre C1P con catene aciliche più corte, in particolare C2-Cer, sono incapaci di attivare tale enzima (Subramanian, 2005). È interessante notare che S1P è coinvolta nell'induzione della

ciclo ossigenasi-2. Dal momento che C1P è richiesto per l'attivazione e la traslocazione di cPLA2 è stato suggerito che i due sfingolipidi agiscano in maniera concertata nel regolare la produzione degli eicosanoidi, importanti mediatori della flogosi (Chalfant, 2005).

C1P è coinvolto anche nella regolazione di altri processi infiammatori quali la stimolazione della fagocitosi in neutrofilo, l'attivazione della degranolazione in mastociti (Arana, 2010) e la stimolazione della migrazione dei macrofagi (Granado, 2009). Nonostante la sua ben documentata azione pro-infiammatoria, C1P può agire come molecola anti-infiammatoria in specifiche condizioni. È stato dimostrato che l'attivazione della SMasi acida ha un ruolo fondamentale nelle infezioni polmonari dal momento che favorisce l'internalizzazione di batteri nelle cellule epiteliali di polmone (Lankalapalli, 2009). Le recenti evidenze che dimostrano un potente effetto inibitorio di C1P sull'attività della SMasi acida suggeriscono che tale sfingolipide potrebbe essere impiegato per ridurre o prevenire le infezioni del polmone.

I macrofagi sono coinvolti in numerose patologie caratterizzate da infiammazione cronica quali malattie autoimmuni, aterosclerosi e sclerosi multipla, oltre che nella progressione tumorale e nel processo di metastatizzazione (Arana, 2010). Recentemente è stato dimostrato che C1P stimola fortemente la migrazione di macrofagi Raw 264.7 (Granado, 2009). Tale azione può essere osservata solo quando le cellule sono trattate con C1P esogeno, non se lo sfingolipide viene generato intracellularmente: l'aumento dei livelli intracellulari di C1P, ottenuto mediante differenti approcci sperimentali, non è in grado di riprodurre l'effetto migratorio indotto da C1P esogeno in macrofagi. Tali osservazioni hanno portato all'identificazione uno specifico recettore di membrana che trasduce l'effetto pro-migratorio dello sfingolipide. Tale recettore mostra bassa affinità per C1P, con una  $K_d$  approssimativamente di 7.8  $\mu$ M. Inoltre, studi effettuati utilizzando GTP $\gamma$ S e PTx hanno dimostrato che il recettore di C1P è accoppiato a una proteina  $G_i$ . Il legame di C1P al recettore specifico provoca una potente fosforilazione di ERK1/2 e di Akt, suggerendo che tali chinasi siano a valle dell'attivazione del recettore. L'inibizione di questi *pathways* con inibitori specifici della MEK, l'enzima che fosforila ERK1/2, o inibitori selettivi di PI3K, abroga completamente la migrazione dei macrofagi indotta da C1P. Mediante l'attivazione di queste due vie di segnalazione C1P stimola inoltre la capacità di NF- $\kappa$ B di legarsi al DNA; l'attivazione di questo fattore di trascrizione è cruciale per l'effetto pro-migratorio di C1P in macrofagi. La via di segnalazione a valle del recettore accoppiato a  $G_i$  mediante la quale C1P stimola la migrazione in macrofagi ha dunque come componenti cruciali MEK/ERK1/2 PI3K/Akt e NF- $\kappa$ B.

Il recettore recentemente identificato, così come gli enzimi responsabili della sintesi di C1P, potrebbero rappresentare *target* importanti per il trattamento di patologie associate all'infiammazione e alla migrazione cellulare, quali aterosclerosi e cancro. In questo contesto, sono stati recentemente identificati due inibitori dell'enzima CERK. Uno di questi inibitori, F-12509A (Kim, 2005) inibisce la CERK a concentrazioni micromolari senza alterare l'attività di SK o della diacilglicerolo chinasi. Il secondo inibitore, NVP-231 (Graf, 2008), inibisce la CERK a concentrazioni nanomolari in modo competitivo e reversibile. È interes-

sante notare che quando NVP-231 è usato contemporaneamente a tamoxifen, farmaco usato comunemente nel trattamento del cancro al seno, è in grado di aumentare in maniera sinergica i livelli di Cer e bloccare la crescita cellulare (Graf, 2008).

Zor e collaboratori hanno recentemente prodotto un analogo del C1P chiamato PCERA-1 (*PhosphoCERamide Analogue-1*) che ha potenti proprietà anti-infiammatorie (Levi, 2010). L'attività di PCERA-1 sembra essere mediata da un recettore di membrana distinto da quello descritto per l'effetto pro-migratorio di C1P in macrofagi. PCERA-1, e forse altri composti eventualmente derivati per modificazione della sua struttura originale, potrebbero essere utili strumenti per sviluppare strategie alternative per il trattamento di patologie infiammatorie.

## 5. Sfingolipidi e muscolo scheletrico

Negli ultimi anni sono cresciute le evidenze che dimostrano un ruolo chiave degli sfingolipidi nella regolazione di vari processi biologici nel muscolo scheletrico. Tale tessuto ha una notevole capacità di rigenerazione in seguito a danno dovuto a patologie, trauma o esercizio fisico intenso. La rigenerazione del muscolo scheletrico dipende quasi esclusivamente dalle cellule satelliti che, quiescenti in condizioni fisiologiche, si attivano in seguito a danno dando origine a precursori miogenici proliferanti, i mioblasti, i quali in seguito differenziano e si fondono, dando origine a miotubi multinucleati. Gli eventi molecolari che avvengono in seguito all'attivazione delle cellule satelliti sono estremamente complessi e non ancora delucidati. Gli sfingolipidi sembrano avere un ruolo complesso in tali eventi essendo implicati nell'attivazione delle cellule satelliti e nella regolazione di proliferazione e differenziamento dei mioblasti. Tali molecole sono inoltre implicate nella regolazione delle proprietà contrattili, nella reattività muscolare all'insulina e nel trofismo delle fibre muscolari.

Dati recenti dimostrano un ruolo chiave del metabolismo della SM e di S1P nell'attivazione delle cellule satelliti. Utilizzando la lisenina, una proteina che lega specificatamente la SM, Nagata e collaboratori (Nagata, 2006) hanno dimostrato che in cellule C2C12 reserve, che rappresentano un buon modello di quiescenza miogenica (Yoshida, 1998), e in cellule satelliti i livelli di SM nella membrana plasmatica di cellule quiescenti sono molto elevati, mentre vengono drasticamente ridotti quando sono attivate. La SM di membrana è un componente di *caveolae* e *lipid rafts* per cui una diminuzione nei livelli di SM suggerisce profondi cambiamenti nell'organizzazione sopramolecolare della membrana plasmatica delle cellule satelliti, strettamente associata alla generazione di segnali che portano allo stato attivato. Tale ipotesi è confermata dall'osservazione che i livelli di espressione della proteina strutturale delle *caveolae*, caveolina-1, sono ridotti nelle cellule satelliti durante la rigenerazione muscolare (Volonte, 2005). Il meccanismo responsabile della riorganizzazione dei domini di membrana durante la transizione tra la condizione quiescente e quella proliferativa rimane tuttavia da chiarire. Uno studio successivo (Nagata, 2006 b) ha dimostrato che,

sebbene la maggior parte della SM sia localizzata nel foglietto esterno della membrana plasmatica, un piccolo *pool* di SM localizzato nel foglietto interno è implicato nel *signalling* delle cellule satelliti dal momento che i livelli di SM sono mantenuti alti quando l'attivazione delle cellule satelliti avviene in presenza di un inibitore della SMasi neutra, GW4869. Poiché nello stesso studio è stato dimostrato che S1P media l'entrata delle cellule satelliti nel ciclo cellulare, gli autori concludono che il catabolismo della SM che avviene nel foglietto interno del plasmalemma in seguito all'attivazione è funzionale alla sintesi di S1P (Nagata, 2006 b). Il ruolo chiave di S1P nella rigenerazione del muscolo scheletrico è stato ulteriormente dimostrato nello stesso studio poiché l'inibizione dell'enzima SK, che ne catalizza la sintesi, compromette gravemente la rigenerazione di muscoli scheletrici danneggiati con cardiottossina. Il coinvolgimento di S1P nella rigenerazione muscolare è stato confermato da studi *in vivo* condotti su topi e ratti in cui il danno muscolare veniva ottenuto mediante trattamento con bupivacaína. Una singola iniezione dello sfingolipide al momento del danno risultava in un significativo effetto trofico nelle fibre rigeneranti di soleo di topo e ratto. Al contrario, la riduzione dei livelli di S1P circolanti, ottenuta mediante trattamento con un anticorpo specifico per lo sfingolipide, produceva un effetto opposto dimostrando che il *signalling* di S1P partecipa al processo rigenerativo del muscolo scheletrico (Danieli-Betto, 2010).

Studi condotti su mioblasti C2C12, che esprimono tre dei cinque sottotipi recettoriali per S1P, S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub> and S1P<sub>3</sub> (Meacci, 1999), dimostrano che la stimolazione con lo sfingolipide bioattivo innesca numerose vie di segnalazione attivando la fosfolipasi D (Meacci, 1999), la GTPasi monomeric RhoA (Meacci, 2000) e aumentando la concentrazione citosolica di calcio (Meacci, 2002). È interessante notare che l'espressione di S1P<sub>2</sub>, che è responsabile dell'attivazione della PLD, è drasticamente ridotta durante il processo di differenziamento e sostanzialmente abolita nei miotubi, suggerendo un ruolo chiave del *signalling* di S1P mediato da S1P<sub>2</sub> negli eventi molecolari richiesti per completare il differenziamento muscolare (Meacci, 2003). Studi successivi hanno identificato in S1P un regolatore negativo della proliferazione indotta da siero e un potente attivatore del differenziamento miogenico di mioblasti C2C12 (Donati, 2005). Nonostante il fatto che i mioblasti esprimano anche S1P<sub>1</sub> e S1P<sub>3</sub>, S1P<sub>2</sub> è stato identificato come l'unico recettore che media l'azione biologica di S1P. Il ruolo chiave di tale sottotipo recettoriale nel differenziamento miogenico è stato ulteriormente consolidato dall'osservazione della comparsa precoce di un fenotipo differenziato in seguito alla superespressione di S1P<sub>2</sub>. In uno studio successivo la regolazione della proteina delle *gap junction* connessina-43 mediata da S1P è stata identificata come evento implicato nell'effetto pro-miogenico dello sfingolipide (Squecco, 2006). Il meccanismo mediante il quale l'induzione dell'espressione della connessina-43 promuove la miogenesi implica, oltre allo scambio di molecole attraverso *gap junction* funzionali, l'interazione specifica della proteina con il citoscheletro. Il rimodellamento dell'actina e la formazione di fibre da stress in risposta a S1P genera una tensione meccanica della membrana plasmatica che porta all'attivazione dei canali attivati da stiramento, innescando segnali dipendenti dal calcio che influenzano dunque la maturazione fenotipica dei mioblasti

(Formigli, 2007). Recenti evidenze hanno dimostrato un ruolo fisiologico dell'enzima SK1 nella regolazione della proliferazione e del differenziamento di mioblasti. Il contenuto proteico di SK1 e la formazione di S1P sono infatti aumentati in mioblasti che diventano confluenti e in cellule che stanno differenziando (Meacci, 2008). L'espressione ectopica di SK1 riduce inoltre la velocità di proliferazione dei mioblasti e induce l'espressione dei *marker* di differenziamento miogenico, anticipando la comparsa di un fenotipo muscolare differenziato. Al contrario, la riduzione di espressione di SK1, ottenuta mediante silenziamento specifico o superespressione della forma cataliticamente inattiva di SK1, aumenta significativamente la crescita cellulare e ritarda l'inizio della miogenesi. Il ruolo biologico di SK1 in mioblasti si distingue dunque da quello riportato nella maggior parte dei tipi cellulari nei quali l'enzima ha un ruolo chiave nella promozione della proliferazione (Olivera, 1999). La stimolazione della miogenesi in cellule superesprimenti SK1 è abrogata quando S1P<sub>2</sub> è silenziato (Meacci, 2008), rinforzando l'idea di un ruolo cruciale di questo recettore negli effetti mediati da S1P in mioblasti. In linea con tale concetto, Donati e collaboratori (Donati, 2007) hanno recentemente dimostrato che l'effetto pro-miogenico esercitato da basse concentrazioni di TNF- $\alpha$  richiede l'attivazione della SK1 e il successivo reclutamento di S1P<sub>2</sub>, dimostrando che l'asse SK1/S1P<sub>2</sub> è parte di un meccanismo molecolare che regola la miogenesi dipendente da agonista.

È importante sottolineare l'effetto differenziale di S1P in cellule satelliti e mioblasti: lo sfingolipide promuove infatti la proliferazione in cellule satelliti (Nagata, 2006 b) e il differenziamento nei mioblasti (Kim, 2007) supportando il concetto che l'asse SK/S1P abbia un ruolo unico nella rigenerazione del muscolo scheletrico essendo richiesto in molteplici tappe e portando le cellule satelliti residenti a riparare il tessuto danneggiato (Figura 16). Tale azione pleiotropica di S1P implica probabilmente profondi cambiamenti nelle vie di segnalazione a valle degli S1PR, le cui basi molecolari sono ad oggi sconosciute. I livelli di espressione degli S1PR non differiscono significativamente tra cellule satelliti e mioblasti, almeno a livello di mRNA (Rapizzi, 2008). Tuttavia, sebbene S1P<sub>1</sub> sia il recettore maggiormente espresso in entrambi i tipi cellulari, è stato dimostrato che tale recettore è principalmente implicato nella regolazione della proliferazione indotta da S1P in cellule reserve, mentre è disaccoppiato dalla sintesi di DNA in mioblasti (Rapizzi, 2008). Ciò conferma l'idea che durante il commissio-namento di cellule satelliti verso il differenziamento miogenico si verifichino eventi molecolari critici che direzionano il *signalling* mediato da S1P attraverso i suoi recettori in modo che lo sfingolipide abbia azioni biologiche distinte (Figura 16).

Il contributo positivo di S1P alla rigenerazione muscolare è stato recentemente ampliato dalla dimostrazione che lo sfingolipide agisce come potente stimolatore della proliferazione di mesoangioblasti (Donati, 2007 b), cellule staminali mesodermiche capaci di rigenerare il muscolo scheletrico in seguito a iniezione sistemica in modelli animali di distrofia muscolare (Sampaolesi, 2003; Sampaolesi, 2006). Oltre ad avere un effetto mitogenico S1P è in grado di proteggere i mesoangioblasti dall'apoptosi indotta da vari stimoli. Inoltre, il trattamento *ex vivo* di mesoangioblasti con lo sfingolipide bioattivo aumenta la loro

sopravvivenza in seguito all'iniezione nel muscolo tibiale anteriore di topi mancanti del gene che codifica il sarcoglicano, suggerendo che il trattamento con S1P potrebbe aumentare il successo della terapia cellulare volta alla rigenerazione del muscolo scheletrico.

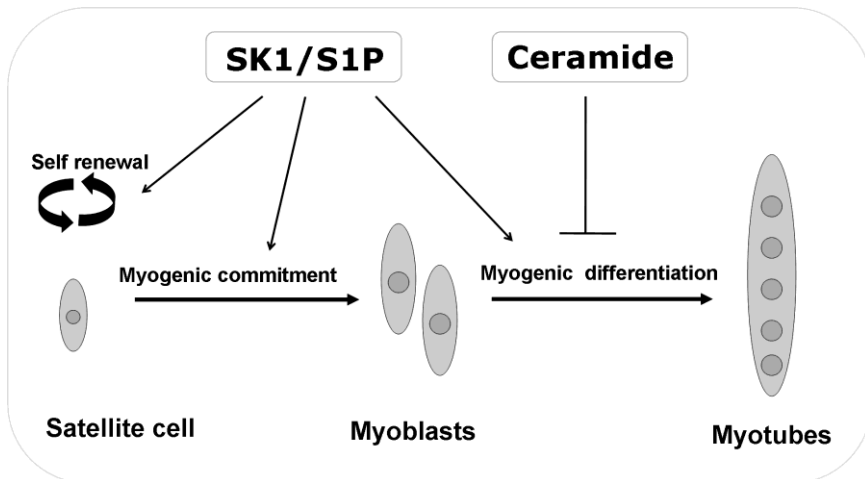


Figura 16. Ruolo degli sfingolipidi nell'attivazione delle cellule satelliti e nel differenziamento dei mioblasti.

La miogenesi è profondamente influenzata dalla motilità cellulare: in seguito a danno le cellule satelliti presenti nei muscoli intatti adiacenti a quello danneggiato devono essere altamente motili in modo da poter essere reclutate a livello della lesione. Tuttavia, la loro motilità deve essere successivamente regolata negativamente in modo che possano stabilire i contatti cellula-cellula corretti e fondere con le fibre preesistenti. Un recente studio dimostra che, oltre ad un effetto pro-miogenico, S1P ha azione anti-migratoria in mioblasti C2C12 (Beccioli, 2006). Il lipide riduce la motilità cellulare direzionata e abroga completamente la risposta chemiotattica all'IGF-1. Dato il ruolo di principale induttore della motilità delle cellule satelliti esercitato da IGF-1 (Suzuki, 2000), la dimostrazione che S1P sia capace di contrastare completamente la sua azione potrebbe avere implicazioni importanti nella regolazione dell'esatto posizionamento delle cellule satelliti *in vivo* in modo da garantire un processo di fusione cellulare efficiente. La regolazione negativa della migrazione mediata da S1P richiede la sua interazione con S1P<sub>2</sub> e la successiva attivazione di RhoA (Beccioli, 2006).

Anche lo sfingolipide bioattivo Cer sembra implicato nella regolazione del differenziamento miogenico (Figura 16). In mioblasti C2C12 il trattamento con Cer a corta catena, permeabili nelle cellule, abolisce il differenziamento miogenico, monitorato misurando l'attività dell'enzima specifico del muscolo creatina chinasi e la produzione di IGF-2 (Meadows, 2000). Analogamente, l'induzione del differenziamento di cellule della linea cellulare miogenica di ratto L6 mediante trattamento con arg8-vasopressina è inibita dal trattamento con Cer a

media catena (Mebarek, 2007). Inoltre, durante il processo di differenziamento miogenico, il contenuto cellulare di Cer subisce una diminuzione precoce, compatibile con la formazione di sfingolipidi a valle, seguita da un marcato e sostenuto aumento. L'inibizione della sintesi *de novo* di Cer, mediante trattamento con fumosina B1 o miriocina, riduce i livelli cellulari di Cer e favorisce la comparsa di un fenotipo differenziato (Mebarek, 2007). Nello stesso studio è stato proposto che gli effetti positivi sulla miogenesi dovuti all'inibizione della sintesi di Cer dipendano dalla rimozione della regolazione negativa che il Cer esercita sulla PLD, dal momento che la via di segnalazione dell'acido fosfatidico è richiesta per la miogenesi. Il ruolo negativo di Cer nella regolazione della miogenesi è stato confermato dalla dimostrazione che le citochine pro-infiammatorie TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  inibiscono la sintesi proteica indotta da IGF-1 stimolando la sintesi *de novo* di Cer e accelerando il catabolismo della SM con conseguente accumulo di Cer (Strle, 2004). Tali dati sono in linea con l'inibizione di regolatori della traduzione indotta da Cer in mioblasti di ratto L6 (Hyde, 2005).

In conclusione, i risultati ottenuti fino ad oggi suggeriscono che in cellule progenitori muscolari i livelli relativi dei componenti del "reostato degli sfingolipidi", Cer e S1P, regolino il commissionamento verso il differenziamento miogenico piuttosto che la sopravvivenza cellulare come accade in differenti tipi cellulari (Hait, 2006).

Il ruolo dei glicosfingolipidi nella miogenesi è, ad oggi, poco chiaro. Studi pionieri hanno mostrato che il differenziamento di mioblasti è accompagnato da un'aumentata biosintesi di lattosilceramide e del ganglioside GM3 (Leskawa, 1990; Cambron, 1994). Più recentemente è stato dimostrato che l'espressione della sialidasi citosolica Neu2 è aumentata durante il processo di differenziamento di mioblasti C2C12 e che la sua superespressione favorisce la miogenesi (Fanzani, 2003). Anche se il principale substrato di questo enzima è rappresentato dal ganglioside GM3, rimane da chiarire se l'effetto pro-miogenico della sialidasi Neu2 dipenda dalla variazione dei livelli di GM3 o di lattosilceramide.

Gli sfingolipidi sono anche in grado di regolare la fisiologia del muscolo scheletrico influenzandone la capacità contrattile mediante la modulazione dell'accoppiamento eccitazione-contrazione. Tale processo si basa sulla modificazione conformazionale dei recettori diidropiridinici indotta dalla depolarizzazione della membrana plasmatica che porta, per interazione fisica, all'apertura dei canali del calcio rianodinici provocando un efflusso di calcio dalle riserve del reticolo sarcoplasmico e conseguente attivazione dei meccanismi contrattili. La Sph, agendo direttamente sul recettore rianodinico, è un regolatore negativo del rilascio di calcio dal reticolo sarcoplasmico (Betto, 1992). Uno studio effettuato su fibre isolate di *extensor digitorum longus* (EDL) di topo dimostra che anche S1P può influenzare l'accoppiamento eccitazione-contrazione (Bencini, 2003). Concentrazioni sub-micromolari dello sfingolipide bioattivo modulano infatti i movimenti di carica spostando il voltaggio della soglia e la corrente di calcio in entrata attraverso i recettori diidropiridinici. Tale azione di S1P, abolita dal pretrattamento con suramina, sembra essere mediata dal recettore S1P<sub>3</sub>, identificata nell'EDL tramite RT-PCR.

Muscoli sottoposti a esercizio intenso mostrano un progressivo declino nella *performance*, ampiamente recuperato dopo un periodo di riposo: tale fenomeno reversibile è denominato fatica muscolare. Nell'insorgenza della fatica muscolare sono coinvolti numerosi fattori la cui importanza relativa dipende dal tipo di fibra del muscolo che si contrae e da intensità, tipo e durata dell'attività contrattile. Le cause della fatica muscolare sembrano essere principalmente l'alterazione della superficie di membrana e dell'accoppiamento eccitazione-contrazione. È stato recentemente dimostrato che Sph e S1P, modulatori dell'accoppiamento eccitazione-contrazione come precedentemente illustrato (Sabbadini, 1993; Bencini, 2003), sono capaci di ridurre significativamente il declino di tensione durante la fatica dell'EDL (Danieli-Betto, 2005). La riduzione della fatica indotto da Sph è completamente abolito in presenza dell'inibitore della SK dimetilsfingosina, suggerendo che il suo meccanismo di azione richieda la trasformazione a S1P. È stato inoltre recentemente verificato che Sph mima l'azione trofica di S1P nel muscolo soleo denervato (Zanin, 2008). Sembra dunque che Sph e S1P, che hanno ruoli opposti in molti altri sistemi cellulari, medino effetti biologici simili nel muscolo scheletrico, probabilmente a causa di un'attività basale di SK sufficientemente elevata, come è stato osservato in mioblasti (Meacci, 2004), o per la regolazione dell'attività di SK da molteplici segnali, come osservato in muscoli affaticati (Danieli-Betto, 2005).

Il muscolo scheletrico è caratterizzato da un alto grado di plasticità. Il disuso per un periodo di tempo lungo porta ad atrofia, condizione nella quale la velocità di degradazione delle proteine contrattili è maggiore di quella di sintesi. Al contrario, l'esercizio fisico e la nutrizione favoriscono l'ipertrofia, in cui l'effetto netto è in favore della sintesi di proteine contrattili e porta all'accrescimento delle fibre esistenti. Tali proprietà uniche del muscolo scheletrico permettono a questo tessuto di adattarsi a necessità metaboliche e fisiologiche distinte. In un recente lavoro è stato dimostrato che l'applicazione esogena di S1P contrasta la riduzione della massa muscolare causata da denervazione, mentre la neutralizzazione dello sfingolipide presente nell'ambiente extracellulare con un anticorpo anti-S1P specifico accelera l'atrofia causata da denervazione (Zanin, 2008). Nonostante il suo effetto protettivo sulla progressione dell'atrofia, S1P non ha effetto sull'apoptosi indotta da denervazione nel muscolo scheletrico, indicando un'azione trofica specifica dello sfingolipide, distinta da un generico effetto in favore della sopravvivenza.

In conclusione gli sfingolipidi bioattivi hanno un ruolo complesso nella regolazione di processi chiave nel muscolo scheletrico che vanno dalla rigenerazione muscolare, alla plasticità del muscolo, alle proprietà contrattili.

## 6. Fattore di crescita trasformante $\beta$ (TGF $\beta$ )

Il TGF $\beta$  è un membro di una famiglia di proteine multifunzionali strutturalmente correlate, la famiglia del TGF $\beta$ , coinvolte nella regolazione dello sviluppo e di importanti processi cellulari, quali proliferazione, differenziamento, adesione, migrazione ed apoptosi (Massagué, 2000). Questa famiglia comprende oltre cin-



quanta membri, identificati in organismi diversi quali *C. elegans*, *D. melanogaster* e l'uomo, alcuni dei quali sono prodotti da numerosi tipi cellulari, mentre altri mostrano un pattern di espressione più ristretto.

Il TGF $\beta$  è prodotto da numerosi tipi cellulari e regola una vasta gamma di processi biologici, in numerosi tessuti (Massagué, 2006). Una caratteristica che contraddistingue questa citochina è la sua azione cellula-specifica, cioè la sua capacità di esercitare effetti diversi a seconda del tipo cellulare su cui agisce (Barnard, 1990; Massagué, 1992): Il TGF $\beta$  provoca un aumento della proliferazione nei fibroblasti (Roberts, 2003) mentre inibisce la proliferazione delle cellule epiteliali (Massagué, 2006), promuove il differenziamento delle cellule neuronali mentre blocca il differenziamento di varie cellule di origine mesenchimale, e, ancora, ha un effetto pro-apoptotico in cellule dell'epitelio prostatico e anti-apoptotico in cellule dell'epitelio mammario (Sanchez-Capelo, 2005). La risposta cellulare al TGF $\beta$  dipende da quali vie di segnalazione sono attive nella cellula bersaglio e dalla loro interazione con la via di trasduzione del segnale della citochina.

Nei mammiferi la famiglia del TGF $\beta$  può essere suddivisa, sulla base dell'omologia di sequenza, in varie sottofamiglie, che comprendono le proteine morfogenetiche dell'osso (BMP, *Bone Morphogenetic Protein*), l'attivina ed il TGF $\beta$ . I membri della superfamiglia del TGF $\beta$  sono omo- o eterodimeri, i cui monomeri sono legati da ponti disolfuro, che si formano per maturazione proteolitica di precursori inattivi secreti in forma monomerica nel mezzo extracellulare. I membri della famiglia del TGF $\beta$  funzionano come molecole segnale extracellulari che trasducono il segnale mediante l'interazione con specifici recettori di membrana. Tali recettori possiedono un unico segmento transmembrana, sono caratterizzati da un dominio extracellulare ricco in cisteina e da un dominio intracellulare chinasi, situato nel frammento C-terminale, con specificità verso i residui di serina e treonina. Sulla base dell'analisi della sequenza amminoacidica e della caratterizzazione delle proprietà funzionali tali recettori sono stati suddivisi in due sottofamiglie, i recettori di tipo I (T $\beta$ RI) e i recettori di tipo II (T $\beta$ RII). Entrambi i tipi di recettore sono glicoproteine ed hanno un peso molecolare rispettivamente di 55 kDa e 70 kDa.

La caratteristica distintiva del recettore di tipo I è rappresentata dalla presenza, immediatamente a monte del dominio catalitico, di una regione altamente conservata costituita da trenta amminoacidi e contenente la sequenza TTSGSGSGLP. In seguito al legame del TGF $\beta$  questa regione, chiamata dominio GS, viene fosforilata ed ha un ruolo cruciale nell'attivazione del T $\beta$ RI. Il recettore di tipo II manca del dominio GS ed è caratterizzato dalla presenza di una regione ricca di residui treonina e serina al C-terminale. Dal punto di vista funzionale T $\beta$ RII è caratterizzato dall'attività costitutiva del suo dominio catalitico chinasi.

La via di trasduzione del segnale del TGF $\beta$  richiede sia i recettori di tipo I che di tipo II. Alcuni studi con recettori chimerici hanno infatti dimostrato che complessi omodimerici, costituiti da recettori di tipo I oppure di tipo II, sono incapaci di generare una risposta cellulare, mentre complessi contenenti i domini citoplasmatici di entrambi i tipi di recettore sono capaci di mediare la segnala-

zione del TGF $\beta$  (Okadome, 1995; Feng, 1995; Vivien, 1995). Il genoma umano codifica sette recettori di tipo I e cinque recettori di tipo II, che si appaiano in combinazioni differenti a formare complessi recettoriali per i vari membri della famiglia del TGF $\beta$ .

La ricerca, a livello della membrana cellulare, di molecole capaci di legare il TGF $\beta$  ha rivelato la presenza di un terzo tipo di recettori, indicati appunto come recettori di tipo III. Tali recettori, a differenza di quelli di tipo I e di tipo II, hanno un dominio intracellulare privo di qualsiasi sequenza che possa essere coinvolta nella trasduzione del segnale. Sembra che la loro funzione sia quella di legare il TGF $\beta$  e presentarlo ai recettori di tipo I e II, coinvolti invece nella trasduzione del segnale (Massagué, 2000).

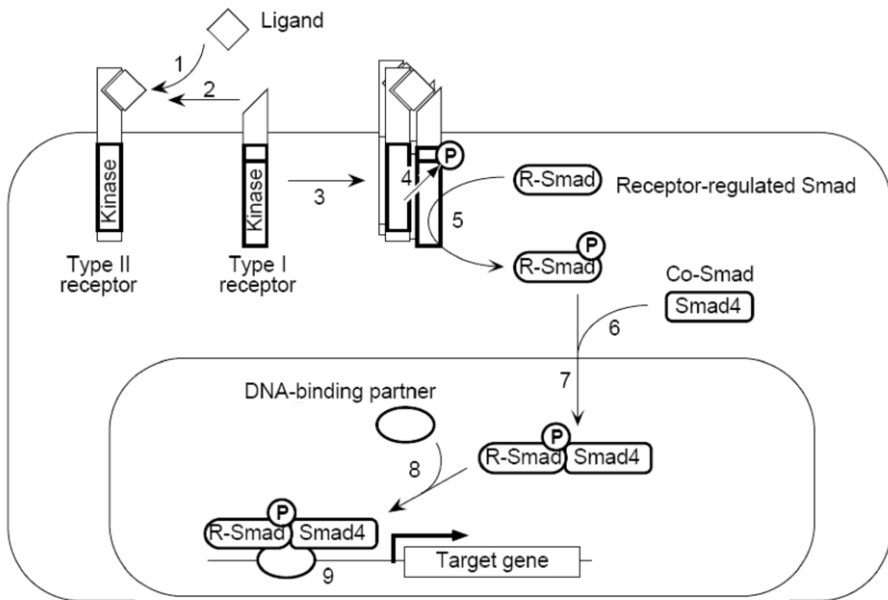


Figura 17. La via di trasduzione del segnale del TGF $\beta$ .

La via di segnalazione del TGF $\beta$  (Figura 17) prevede che la citochina si leghi inizialmente a T $\beta$ RII. Questo legame provoca una variazione conformazionale del recettore che ne permette il riconoscimento da parte di T $\beta$ RI. In presenza del ligando i due tipi di recettori vengono quindi a trovarsi in stretta prossimità formando un complesso recettoriale eterodimerico. Essendo il ligando un dimerico, attorno a ciascuna molecola si possono formare due complessi recettoriali che danno origine quindi ad un complesso eterotetramericico per ciascuna molecola di TGF $\beta$ . In seguito alla oligomerizzazione dei recettori, T $\beta$ RII, costitutivamente attivo, fosforila tre residui di serina e due di treonina nel dominio GS di T $\beta$ RI, con conseguente attivazione del dominio ad attività serina/treonina chinasi di T $\beta$ RI. Tale fosforilazione riduce inoltre l'affinità di T $\beta$ RI per la proteina FKBP12, che agisce come regolatore negativo della via di segnalazione mediata

da tale recettore (Wang, 1996). Al tempo stesso, la fosforilazione del recettore ne aumenta l'affinità (Huse, 2001) per gli effettori intracellulari della via di trasduzione del segnale del TGF $\beta$ , le proteine Smad, la cui attivazione dipende dalla fosforilazione da parte di T $\beta$ RI ed ha come risultato la regolazione dell'espressione di un numero elevato di geni (Figura 17).

Le proteine Smad, il cui nome deriva dai geni omologhi *Sma* (*Small*) e *MAD* (*Mother Against Dpp*) presenti rispettivamente in *C. elegans* e in *D. melanogaster* (Derynck, 1996), rappresentano una famiglia di fattori trascrizionali comprendente otto membri con funzioni differenti tra loro, in grado cioè di regolare l'espressione di geni distinti e mediare risposte cellulari diverse in relazione a interazioni selettive con i recettori del TGF $\beta$ , con altre proteine Smad e con co-fattori trascrizionali (Kretzschmar, 1998).

Le proteine Smad consistono di due domini globulari, indicati come MH1 e MH2 (*Mad Homology 1 e 2*), rispettivamente all'N-terminale e al C-terminale, collegati da una regione flessibile (Figura 18). Il dominio MH1 è responsabile del legame al DNA (Shi, 1998), mentre il dominio MH2 media l'interazione con varie proteine coinvolte nel funzionamento delle Smad (Huse, 2001; Wu, 2001).

Le proteine Smad sono suddivise in tre gruppi sulla base delle loro caratteristiche strutturali e funzionali: cinque Smad regolate da recettore (R-Smad), una Smad mediatrice comune (Co-Smad) e due Smad inibitorie (I-Smad) (Figura 18).

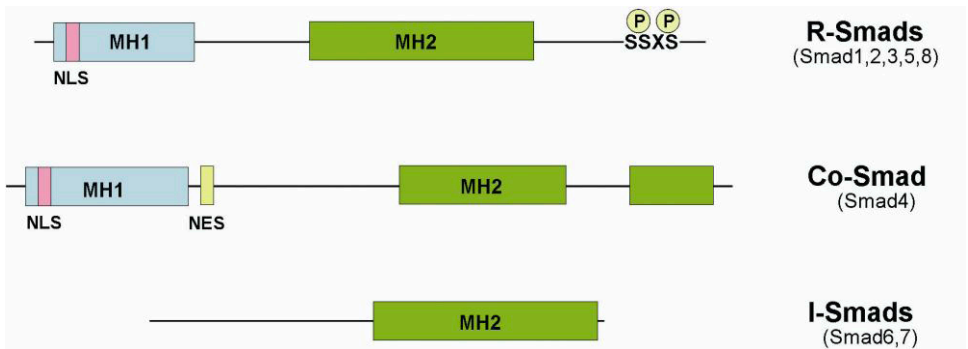


Figura 18. Classificazione delle proteine Smad sulla base della struttura e della funzione.

Le R-Smad comprendono le proteine Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 e Smad8. La loro attivazione richiede che esse vengano fosforilate su due residui di serina, nella sequenza SSXS del dominio C-terminale MH2, dall'attività proteina chinasi del recettore T $\beta$ RI attivato. Tale modificazione covalente causa un'alterazione strutturale delle R-Smad, abilitandole a formare complessi eterodimerici con Smad4 (Wu, 2001), appartenente alle proteine Co-Smad, prive della sequenza SSXS e dunque non fosforilabili da alcun recettore ma indispensabili per la formazione di complessi trascrizionali funzionali (Shi, 2003).

I recettori di tipo I per il TGF $\beta$  e l'attivina fosforilano Smad2 e Smad3, mentre i T $\beta$ RI per le BMP fosforilano Smad1, Smad5 e Smad8. I diversi membri della famiglia del TGF $\beta$ , quindi, in seguito al legame ai loro specifici recettori, trasducono il segnale attraverso R-Smad distinte, inducendo così risposte cellulari dif-

ferenti mediante l'attivazione di specifiche risposte trascrizionali. Piccoli elementi strutturali presenti nei recettori di tipo I e nelle R-Smads sono responsabili di questa specificità d'interazione, come dimostrato dal fatto che la variazione di residui amminoacidici in questi domini è sufficiente a cambiare la specificità della via di trasduzione del segnale (Chen, 1998).

Infine, le proteine Smad Inibitorie (I-Smads), comprendenti le proteine Smad6 e Smad7, differiscono dal punto di vista strutturale dagli altri componenti della famiglia mancando del sito di fosforilazione C-terminale SSXS e possedendo un dominio correlato solo alla lontana ad MH1 (Figura 18). Esse agiscono in opposizione alle R-Smads e alle Co-Smads formando associazioni stabili con i recettori di tipo I attivati e prevenendo, in tal modo, la fosforilazione delle R-Smads da parte di tali recettori. La proteina Smad7 è indotta dalla via di segnalazione del TGF $\beta$  e fa quindi parte di un meccanismo di regolazione negativo dipendente dal TGF $\beta$  stesso (Nakao, 1997). La proteina Smad6 è traslocata dal nucleo al citoplasma dalla via di segnalazione del TGF $\beta$  e funziona anch'essa come regolatore negativo di tale via (Hata, 1997).

Le R-Smad, in particolare Smad2 e Smad3, nel loro stato non fosforilato sono ancorate ai recettori del TGF $\beta$  attraverso una proteina di membrana, SARA (*Smad Anchor for Receptor Activation*) (Wu, 2000). La presenza di questa proteina di ancoraggio risulta necessaria per la localizzazione delle proteine Smad in vicinanza dei recettori e quindi per la loro attivazione. Mutazioni nella proteina di ancoraggio SARA prevengono infatti l'associazione di Smad2 con il recettore inibendo le risposte indotte da TGF $\beta$ . Le Smad sono in grado di legarsi al recettore di tipo I attraverso il *loop* L3 presente nel loro dominio MH2. La presenza di SARA aumenta sia l'efficienza che la selettività della via di segnalazione del recettore favorendo la fosforilazione di Smad2 o Smad3 (Tsukazaki, 1998). In seguito alla fosforilazione da parte di T $\beta$ RI, attivato da TGF $\beta$ , le R-Smad si dissociano da SARA e formano complessi con Smad4. Gli eterodimeri R-Smad/Smad4 traslocano dal citosol al nucleo attraverso l'interazione con le proteine del complesso del poro nucleare (Chen, 2005), a livello del nucleo agiscono quindi come fattori trascrizionali, regolando l'espressione di specifici geni bersaglio. Tali complessi eterodimerici possono legare direttamente il DNA a livello della sequenza CAGAC presente nell'elemento di legame delle Smad, SBE (*Smad Binding Element*) (Denissova, 2000). Nella maggior parte dei casi, tuttavia, la regolazione dell'espressione genica da parte delle Smad dipende dalla loro associazione in complessi trascrizionali con altri fattori di trascrizione e co-fattori (Massagué, 2000). In relazione ai "*partner* trascrizionali" con cui le Smad interagiscono, esse riconoscono sequenze regolatrici differenti e modulano quindi l'espressione di geni diversi. I diversi membri della famiglia del TGF $\beta$  inducono risposte cellulari distinte attraverso il reclutamento di differenti combinazioni di Smad e co-fattori trascrizionali. Inoltre, poiché la disponibilità di tali fattori può variare a seconda del tipo cellulare e del contesto, queste interazioni possono spiegare la diversità e la specificità delle risposte cellulari al TGF $\beta$  in tipi cellulari e contesti differenti. Infine, vari segnali extracellulari possono modulare la via di segnalazione del TGF $\beta$  (Massagué, 2000), ad esempio mediante l'attivazione di fattori di trascrizione in grado di cooperare con le proteine Smad nella regolazione

dell'espressione genica. La specificità della via di trasduzione del segnale è perciò determinata dall'integrazione di segnali diversi a livello dell'attivazione di fattori trascrizionali.

La terminazione del segnale avviene mediante defosforilazione, e conseguente inattivazione, o mediante ubiquitinazione seguita da degradazione proteasoma-dipendente, delle proteine Smad fosforilate, substrato di fosfatasi e ubiquitina-ligasi rispettivamente.

Per concludere, è stato dimostrato che, sebbene la maggior parte delle risposte al TGF $\beta$  siano mediate dalle proteine Smad, alcune vie di segnalazione attivate dalla citochina sono indipendenti da tali effettori (Derynck, 2003). Tra le molecole attivate dal TGF $\beta$  in maniera indipendente dalle Smad ci sono ERK1/2, p38 MAPK, JNK e PI3K. I meccanismi molecolari attraverso i quali la citochina, legandosi ai propri recettori di membrana, attiva queste vie di segnalazione indipendentemente dal coinvolgimento delle Smad, risultano ancora sconosciuti.

## 6.1 TGF $\beta$ e muscolo scheletrico

Il muscolo scheletrico è fortemente influenzato dalle molecole appartenenti alla famiglia del TGF $\beta$ , in particolare TGF $\beta$  e miostatina, che hanno effetti importanti sia sulla miogenesi che sulla fisiologia del muscolo post-natale, oltre ad essere coinvolte in varie condizioni patologiche associate alla perdita di massa muscolare.

Il ruolo del TGF $\beta$  nel muscolo scheletrico *in vivo* ha iniziato soltanto recentemente ad essere delucidato. I numerosi studi condotti *in vitro* hanno invece permesso di dimostrare che il TGF $\beta$  inibisce la miogenesi: in mioblasti in coltura il trattamento con la citochina inibisce fortemente il programma di espressione genica alla base del differenziamento miogenico, e di conseguenza il differenziamento terminale dei mioblasti e la formazione dei miotubi (Massagué, 1986; Olson, 1986). I meccanismi molecolari attraverso i quali il TGF $\beta$  inibisce il differenziamento dei mioblasti non sono stati ancora completamente delucidati. L'effetto di inibizione della miogenesi indotto dal TGF $\beta$  è almeno in parte dovuto ad una riduzione sia dei livelli di espressione che dell'attività dei fattori di trascrizione miogenici MRF e dei MEF2 ed è mediato dalla via di segnalazione delle Smad. In particolare, è stato dimostrato che Smad3 interagisce fisicamente con i MRF (Liu, 2001) e con i MEF2 (Liu, 2004), alterandone così la capacità di attivare l'espressione genica e mediando in questo modo l'azione anti-differenziante del TGF $\beta$ . Altri esperimenti suggeriscono che non solo Smad3, ma anche Smad2 sia un effettore importante dell'azione anti-miogenica del TGF $\beta$ , sebbene non siano ancora noti con precisione i meccanismi molecolari coinvolti (Potthoff, 2007). Sembra inoltre che la citochina possa inibire i MEF2 a livello funzionale inducendone la traslocazione dal nucleo al citoplasma ed impedendo quindi al fattore trascrizionale di partecipare alla formazione di complessi trascrizionalmente attivi (De Angelis, 1998). Dal momento che i fattori di trascrizione miogenici, oltre a stimolare l'espressione di geni muscolo-specifici, regolano in modo positivo anche la loro reciproca espressione (Thayer, 1989), la riduzione dei

livelli di tali fattori di trascrizione che si osserva in presenza del TGF $\beta$  potrebbe essere dovuta alla riduzione della loro capacità di regolare l'espressione genica indotta dalla citochina. Infine, è stato recentemente dimostrato che anche i microRNA, molecole coinvolte nella regolazione di numerosi processi biologici, partecipano all'inibizione della miogenesi indotta dal TGF $\beta$  (Sun, 2008).

Durante l'embriogenesi, il TGF $\beta$  è espresso a livello dei somiti prima ancora dello sviluppo delle cellule muscolari. Questa osservazione ha portato ad ipotizzare che la citochina, attraverso i meccanismi sopra descritti, possa inibire l'azione dei fattori miogenici a questo stadio dell'embriogenesi, ritardando l'induzione dell'espressione dei geni muscolo-specifici e permettendo alla popolazione di precursori miogenici commissionati di essere amplificata prima di andare incontro a differenziamento terminale (Heine, 1987).

La capacità del TGF $\beta$  di inibire la miogenesi ha un ruolo importante, oltre che durante l'embriogenesi, anche nel processo di rigenerazione del muscolo in seguito a danno. È stato inoltre dimostrato che la citochina ha un impatto negativo sulla rigenerazione muscolare non solo per la sua azione anti-differenziante sui mioblasti, ma anche a causa della sua capacità di promuovere la fibrosi, un processo caratterizzato dall'accumulo di tessuto connettivo che ha come conseguenza un'alterazione permanente della struttura e della funzione del muscolo. La formazione di tessuto fibrotico nell'area lesionata compromette dunque il processo di riparazione del danno ed ha come conseguenza un incompleto recupero funzionale del muscolo. In seguito ad un danno nell'area lesionata del muscolo si ha l'infiltrazione di linfociti che rilasciano numerosi mediatori dell'infiammazione, citochine e chemochine, che stimolano l'attivazione delle cellule satelliti e quindi la rigenerazione muscolare (Ciciliot, 2010). Alcuni di questi fattori, tuttavia, sono responsabili dell'insorgere del processo di fibrosi (Ciciliot, 2010), ed influenzano quindi negativamente la rigenerazione muscolare. Uno di essi è il TGF $\beta$ , le cui proprietà fibrogeniche sono state dimostrate in vari tessuti danneggiati oltre che nel muscolo scheletrico (Branton, 1999). È stato dimostrato che gli elevati livelli di TGF $\beta$  presenti nel muscolo lesionato sono attribuibili non solo all'infiltrato linfocitario, ma anche ai mioblasti e alle fibre muscolari in rigenerazione. La citochina, infatti, stimola la propria espressione nei mioblasti mediante un meccanismo le cui basi molecolari non sono ancora note (Li, 2004). È stato pertanto ipotizzato che il TGF $\beta$  rilasciato da linfociti infiltranti in seguito a danno muscolare induca la propria espressione in mioblasti e miofibre rigeneranti, innescando un *feedback* positivo responsabile degli elevati livelli della citochina che inibiscono la rigenerazione del muscolo e promuovono invece la fibrosi nella sede della lesione. L'azione pro-fibrotica del TGF $\beta$  è mediata a livello molecolare dall'induzione della sintesi di numerose proteine della matrice extracellulare e al tempo stesso dall'inibizione dell'attivazione delle proteasi responsabili della loro degradazione, con conseguente sovrapproduzione di matrice extracellulare (Kovacs, 1994). Il TGF $\beta$  stimola inoltre la proliferazione dei fibroblasti, contribuendo anche in questo modo alla formazione di tessuto connettivo (Kovacs, 1994). Più recentemente è stato osservato che in risposta ad un danno muscolare il TGF $\beta$  promuove la fibrosi anche mediante la sua capacità, dimostrata sia *in vitro* che *in vivo*, di indurre il transdifferenziamento delle

cellule miogeniche in cellule fibrotiche, i miofibroblasti, che esprimono proteine *marker* dei fibroblasti (vimentina e fibronectina) e delle cellule muscolari lisce (isoforma  $\alpha$  dell'actina del muscolo liscio:  $\alpha$ -SMA) (Li, 2004). Oltre a promuovere il differenziamento, il TGF $\beta$  stimola anche la proliferazione dei miofibroblasti (Branton, 1999).

L'importanza del TGF $\beta$  nella patogenesi del processo di fibrosi nel muscolo scheletrico lesionato è confermata dal fatto che il trattamento con decorina, una molecola che legandosi alla citochina ne impedisce l'interazione con i suoi recettori e quindi l'attivazione della via di segnalazione, blocca la formazione di tessuto fibrotico e permette una efficiente riparazione del danno muscolare (Fukushima, 2001). È stato recentemente suggerito che il *signalling* del TGF $\beta$  contribuisca alla patogenesi di modelli di miopatie non correlate caratterizzate da incapacità nella rigenerazione muscolare: in modelli murini di sindrome di Marfan, causata da mutazioni della fibrillina-1 extracellulare, o in modelli murini di distrofia muscolare di Duchenne, dovuta a mutazioni della distrofina, si osserva infatti un eccessivo *signalling* della citochina. Antagonizzando a livello sistemico il *signalling* del TGF $\beta$  mediante l'utilizzo di un anticorpo specifico o del Losartan, inibitore del recettore di tipo 1 dell'angiotensina II che mediante la trombospondina porta a liberazione del TGF $\beta$  dal TGF $\beta$  latente, si osserva una normalizzazione dell'architettura, dei processi di riparazione e della funzione del muscolo scheletrico (Cohn, 2007). Questi dati suggeriscono dunque che l'inibizione della rigenerazione muscolare e l'induzione della fibrosi mediate da TGF $\beta$  siano un tema comune che influenza la progressione di molteplici miopatie.

## 7. Fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF)

Il PDGF è stato per la prima volta identificato come componente del siero responsabile della proliferazione di cellule della muscolatura liscia (Shih, 2006). I PDGF sono dimeri di catene polipeptidiche legati da ponti disolfuro la cui segnalazione è mediata da specifici recettori tirosina chinasi, i PDGFR. Nei mammiferi sono stati identificati nove geni codificanti quattro differenti catene di PDGF: PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C e PDGF-D. È stata dimostrata la presenza di un eterodimero PDGF-AB nelle piastrine umane. Sebbene l'eterodimero PDGF-AB abbia qualche differenza nelle proprietà di segnalazione rispetto agli omodimeri, la sua importanza fisiologica resta da chiarire. Inoltre, dato che i pattern di espressione di PDGF-A e PDGF-B sono generalmente non sovrapponibili gli eterodimeri sono probabilmente poco presenti in vivo. I PDGF hanno ruoli cruciali durante lo sviluppo, anche se stanno aumentando le evidenze di funzioni fisiologiche di tali fattori di crescita anche nell'adulto. In generale i PDGF esercitano un effetto mitogenico e anti-apoptotico oltre a promuovere la migrazione cellulare. Tali fattori di crescita risultano perciò in grado di regolare molti processi cellulari sia fisiologici che patologici: svolgono un ruolo importante durante lo sviluppo di alcuni tessuti e organi, durante il processo di riparazione tissutale, ma anche nella progressione tumorale e nel processo di metas-

tatizzazione (Andrae, 2008). Un aumentato *signalling* del PDGF è stato correlato a differenti malattie e condizioni patologiche suggerendo che antagonisti del fattore di crescita possano essere utilizzati nella terapia di tali patologie. In effetti, molecole che inibiscono il recettore del PDGF sono largamente utilizzate in modelli pre-clinici e in trials clinici nell'uomo. Il PDGF-BB ricombinante è stato inoltre introdotto in clinica per la terapie della riparazione delle ferite (Andrae, 2008).

I PDGF agiscono principalmente come fattori di crescita paracrini oltre a poter essere utilizzati nel *loop* autocrino dei tumori: sono infatti generalmente prodotti da popolazioni discrete di cellule e agiscono localmente inducendo risposte cellulari differenti (Betsholtz, 2004). I *pattern* di espressione di PDGF e PDGFR sono regolati spazio-temporalmente durante lo sviluppo e in alcune risposte fisiologiche ipertrofiche. L'espressione di PDGF in cellule in coltura è dinamica e responsiva a una moltitudine di stimoli, compreso il PDGF stesso. L'espressione di PDGFR è anch'essa dinamica: è generalmente bassa in cellule mesenchimali *in vivo* ma aumenta drammaticamente durante i processi infiammatori. I geni *PDGF* e *PDGFR* si trovano su cromosomi differenti nei mammiferi e la loro regolazione trascrizionale sembra per la maggior parte indipendente.

I PDGF di mammifero possono essere separati in due classi di proteine che si distinguono per la presenza del "motivo di ritenzione" basico (A e B) o del dominio CUB (C e D) (Figura 19). Tutti i membri hanno un dominio "core", contenente un insieme conservato di residui di cisteina, necessario e sufficiente per il legame e l'attivazione del recettore.

## Mammalian PDGFs

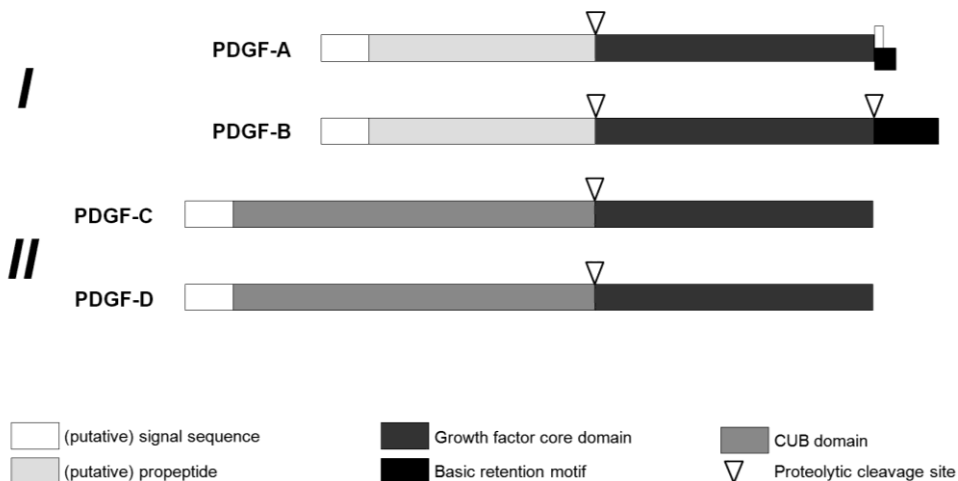


Figura 19. Classificazione dei PDGF nelle classi I e II sulla base della presenza del "motivo di ritenzione" basico (A e B) o del dominio CUB (C e D).



La biosintesi e il processamento dei PDGF sono controllati a più livelli e differiscono per i diversi PDGF. Non sono presenti in letteratura dati riguardanti una secrezione regolata dei PDGF, che sembrano essere rilasciati costitutivamente (Fruttiger, 2000). PDGF-A e PDGF-B contengono un pro-dominio N-terminale che viene rimosso intracellularmente da furina o proteine convertasi correlate per rendere attivo il fattore di crescita (Fredriksson, 2004). Al contrario di PDGF-A e PDGF-B, che vengono dunque secreti come ligandi attivi, PDGF-C e PDGF-D non vengono processati intracellularmente ma sono secreti come ligandi latenti, condizionalmente inattivi. L'attivazione nello spazio extracellulare richiede la dissociazione del dominio del fattore di crescita dal dominio CUB. Le proteasi responsabili *in vivo* dell'attivazione dei ligandi C e D non sono state definitivamente identificate anche se è stato dimostrato che l'attivatore tissutale del plasminogeno (tPA) attiva i dimeri PDGF-CC *in vitro* (Andrae, 2008).

Una distribuzione spaziale discontinua di fattori di crescita e citochine definisce la loro attività biologica e il loro *range* di azione. La diffusione del PDGF nell'interstizio dei tessuti è regolata dal legame alle componenti della matrice extracellulare. Per i PDGF-A e PDGF-B tale legame è compiuto dal motivo C-terminale detto "motivo di ritenzione" contenente un'alta proporzione di aminoacidi basici e dunque carico positivamente (Figura 19). Sebbene dunque non necessitino di attivazione proteolitica, il processamento dei ligandi PDGF-A e PDGF-B al loro C-terminale porta alla rimozione del "motivo di ritenzione" che limita il loro campo di azione mediante il legame a proteoglicani. PDGF-C e PDGF-D sono privi del motivo di ritenzione ma i domini CUB sono implicati nelle interazioni proteina-proteina e proteina-carboidrati e regolano, quindi, la distribuzione extracellulare di tali ligandi.

I PDGF inducono effetti biologici mediante interazione con due recettori tirosina chinasi, PDGFR- $\alpha$  and PDGFR- $\beta$ , che condividono la struttura, costituita da cinque *loops* immunoglobulinici (Ig) extracellulari e un dominio tirosina chinasi intracellulare (TK). Il legame del ligando promuove la dimerizzazione del recettore che inizia la via di segnalazione. In relazione alla configurazione del ligando e al *pattern* di espressione dei recettori si possono formare dimeri di recettore differenti (Heldin, 1999). Esperimenti condotti in colture cellulari suggeriscono che le interazioni PDGF-PDGFR possibili siano molte e complesse e includano la formazione di recettori eterodimeri (Figura 20). Esistono tuttavia evidenze funzionali *in vivo* solo per poche interazioni: PDGF-AA e PDGF-CC sembrano trasdurre il segnale via PDGFR- $\alpha$  e PDGF-BB via PDGFR- $\beta$  (Figura 20). È probabile che anche PDGF-DD agisca mediante PDGFR- $\beta$  *in vivo*, ma ad oggi mancano evidenze per tale interazione. La formazione di eterodimeri di recettori del PDGF avviene *in vivo* come dimostrato dall'incrocio di topi mutanti per PDGFR- $\alpha$  e PDGFR- $\beta$  (Klinghoffer, 2002). La dimerizzazione del recettore causata dal legame del PDGF rappresenta l'evento chiave nell'attivazione del PDGFR. Ognuna delle due subunità del dimero possiede infatti un dominio citoplasmatico tirosina chinasi e, nella forma dimerica, ogni subunità è in grado di autofosforilare alcuni residui di tirosina presenti nel dominio intracellulare del recettore.

L'autofosforilazione attiva quindi l'attività tirosina chinasi del recettore e fornisce punti di ancoraggio per le molecole coinvolte nel *signalling* a valle. L'ancoraggio di substrati del recettore e la successiva propagazione del segnale è dovuta a interazione proteina-proteina mediante domini specifici: la maggior parte degli effettori del PDGFR si lega a siti specifici del recettore fosforilato mediante domini SH2 (*Src Homology 2*). Sia PDGFR- $\alpha$  che PDGFR- $\beta$  reclutano vie di segnalazione ben caratterizzate quali Ras-MAPK, PI3K e PLC- $\gamma$ , coinvolte in molte risposte cellulari (Figura 21).

I recettori del PDGF attivano la via di segnalazione Ras-MAPK principalmente attraverso le proteine adattatrici Grb2 e Shc, che si legano al recettore attivato mediante i domini SH2 e SH3, rispettivamente. Il *signalling* della MAPK attiva la trascrizione genica inducendo stimolazione di crescita cellulare, differenziamento e migrazione (Seger, 1995). L'attivazione della via di segnalazione PI3K/Akt indotta da PDGF promuove la riorganizzazione dell'actina, i movimenti cellulari direzionati, la stimolazione della crescita e l'inibizione dell'apoptosi (Hu, 1995). PDGF attiva inoltre la PLC- $\gamma$  mediante fosforilazione diretta della proteina catalizzata dal PDGFR. L'attivazione di tale enzima stimola la crescita cellulare e la motilità (Kundra, 1994).

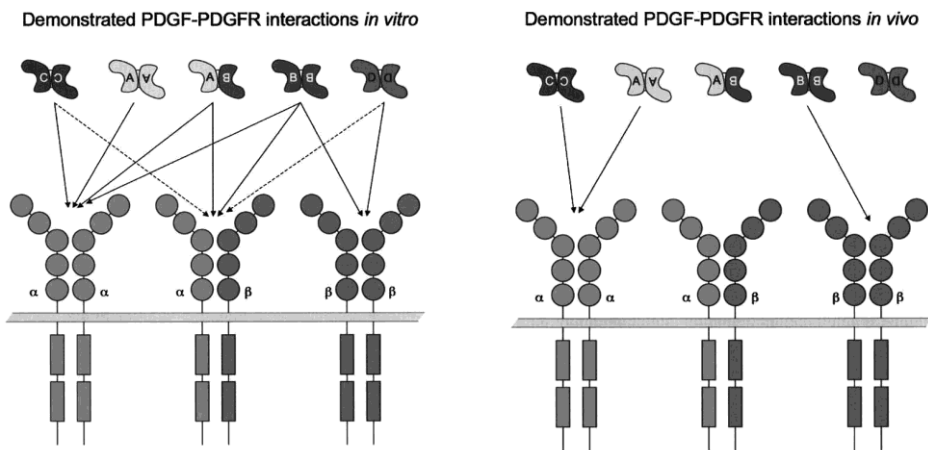


Figura 20. Interazioni PDGF-PDGFR. Ognuna delle catene polipeptidiche del dimero di PDGF interagisce con una subunità di recettore. La configurazione del recettore attivo è quindi determinata dal dimero di ligando. A sinistra sono mostrate le interazioni dimostrate in vitro. Le linee tratteggiate indicano interazioni deboli o risultati contrastanti. A destra le interazioni che sono state dimostrate importanti durante lo sviluppo dei mammiferi in vivo.

I recettori del PDGF interagiscono inoltre con le integrine portando ad un aumento della proliferazione cellulare, del differenziamento e della sopravvivenza. L'interazione del PDGFR con le integrine favorisce la localizzazione del recettore a livello delle adesioni focali, siti in cui alcune vie di segnalazione iniziano e interagiscono tra loro (Clark, 1995).

Il *signalling* del PDGF è finemente regolato mediante meccanismi di controllo a *feedback* negativo (Figura 21). La segnalazione del recettore può essere terminata dalla proteina fosfatasi SHP-2 che lega PDGFR mediante il suo dominio SH2 e defosforila il recettore e i suoi substrati. La via di Ras può essere terminata anche dal legame del suo regolatore negativo, Ras-GAP, a PDGFR- $\beta$  mediante il suo dominio SH2. L'occupazione del recettore da parte del ligando promuove inoltre l'internalizzazione endocitica di PDGFR: la maggior parte dei recettori internalizzati viene degradata per via lisosomiale, limitando la durata della segnalazione del PDGFR. È stato recentemente osservato il riciclo del recettore PDGFR- $\beta$ , ma non PDGFR- $\alpha$  in cellule mancanti della fosfatasi TC-PTP, regolatore negativo della fosforilazione di PDGFR- $\beta$  (Karlsson, 2006).

Alcune delle risposte cellulari a PDGF avvengono entro un tempo compreso tra secondi e minuti dall'attivazione del PDGFR e sono indipendenti dall'induzione genica e dalla sintesi proteica. PDGFR- $\alpha$  e PDGFR- $\beta$  mediano risposte rapide simili ma non identiche: entrambi i recettori stimolano il riarrangiamento dei filamenti di actina, ma solo PDGFR- $\beta$  promuove la formazione di *ruffles* circolari; PDGFR- $\beta$  provoca una mobilitazione di ioni calcio molto più efficientemente rispetto a PDGFR- $\alpha$ ; PDGFR- $\beta$ , inoltre, inibisce la comunicazione giunzionale tra le cellule mediante fosforilazione della proteina delle *gap junction* connessina 43.

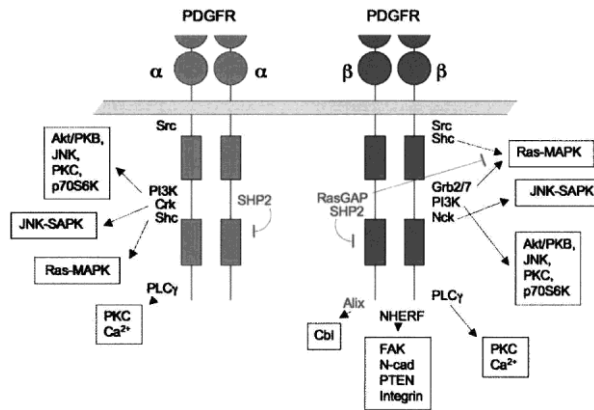


Figura 21. Trasduzione del segnale dei PDGFR. Le frecce indicano legami ai principali pathways di segnalazione e a effettori secondari.

Sebbene i due recettori trasducano il segnale mediante vie simili, lo specifico *pathway* attivato e il grado di attivazione dello stesso non sono identici. La sostituzione *in vivo* della subunità di segnalazione intracellulare di un recettore con quella di un altro non è infatti in grado di riepilogare un normale sviluppo, suggerendo che ogni recettore abbia una trasduzione del segnale unica in seguito al legame del PDGF (Andrae, 2008).

Oltre alle risposte rapide post-traduzionali, i PDGFR inducono cambiamenti trascrizionali rapidi che coinvolgono i cosiddetti *immediate early genes* (IEGs), *target* diretti di fattori di trascrizione attivati da varie vie di segnalazione. Le ri-

sposte mediate dagli IEGs sono probabilmente necessarie per molti degli effetti a lungo termine dei PDGF *in vivo* e *in vitro*.

### 7.1 PDGF e muscolo scheletrico

Il PDGF è uno dei fattori di crescita implicati nella regolazione di proliferazione e differenziamento delle cellule satelliti. È stato infatti dimostrato che il PDGF aumenta il numero di mioblasti coinvolti nella rigenerazione in seguito a danno muscolare, stimolando la proliferazione delle cellule miogeniche e inibendone contemporaneamente il differenziamento. In mioblasti C2C12 il PDGF-BB induce infatti un aumento significativo della sintesi di DNA e riduce contemporaneamente la frequenza di mioblasti differenziati. PDGF-AB ha solo un piccolo effetto nell'indurre la proliferazione dei mioblasti, mentre PDGF-AA non ha alcun effetto su questo processo (Yablonka-Reuveni, 1990). Allo stesso modo è stato dimostrato che il trattamento di mioblasti di ratto L6J1 con PDGF-BB aumenta la velocità di sintesi del DNA e stimola la proliferazione cellulare. Inoltre, il trattamento di cellule L6J1 con il fattore di crescita in terreno differenziante previene la fusione di mioblasti confluenti e abolisce il differenziamento biochimico. L'inibizione del differenziamento dei mioblasti è, tuttavia, reversibile: la rimozione del PDGF-BB dal terreno di coltura permette la fusione dei mioblasti (Jin, 1991). PDGF-BB potrebbe dunque avere un ruolo chiave durante la rigenerazione muscolare aumentando il numero di mioblasti proliferanti che partecipano, in seguito, alla riparazione del trauma muscolare. L'attivazione della via di segnalazione del PDGF-BB induce dunque proliferazione delle cellule miogeniche, processo che deve essere inibito durante la fase successiva della rigenerazione muscolare in cui i precursori miogenici fondono a dare miofibre differenziate. In effetti è stato dimostrato che la via di segnalazione del PDGFR- $\beta$  risulta fortemente inibita in miotubi maturi rispetto a mioblasti. Analisi Northern blot condotte in mioblasti L6J1 dimostrano infatti che l'espressione dell'mRNA del recettore PDGFR- $\beta$  è ridotta a livelli non rilevabili quando mioblasti confluenti vengono indotti a differenziare mediante deprivazione di siero (Jin, 1991). Utilizzando come modello la linea cellulare di mioblasti C2C12 è stato inoltre recentemente dimostrato che il *signalling* del PDGFR- $\beta$  è inibito durante il differenziamento miogenico sebbene i suoi livelli di espressione rimangano invariati. La via di segnalazione del PDGF è inibita mediante una riduzione nei livelli di fosforilazione dei residui di tirosina dei PDGFR- $\beta$ , che causa una ridotta attivazione delle vie di trasduzione intracellulari a valle. La ridotta fosforilazione dei PDGFR- $\beta$  sembra essere dovuta ad un'aumentata espressione e attivazione di alcune fosfotirosina fosfatasi (PTP) durante la miogenesi (Fiaschi, 2003). Tali evidenze suggeriscono quindi che il commissionamento verso un fenotipo muscolare differenziato necessita l'inibizione della via di segnalazione del PDGFR- $\beta$ , mediante riduzione dell'espressione del recettore (Jin, 1991) o della sua attività (Fiaschi, 2003).

È stato recentemente dimostrato che IGF-1 e PDGF-BB hanno effetto anti-apoptotico in mioblasti. Tale effetto biologico è mediato dai due fattori di crescita mediante il reclutamento di vie di segnalazione differenti. IGF-1, infatti, porta

a una stimolazione prolungata della via di segnalazione PI3K/Akt e solo transiente di ERK1/2, mentre PDGF-BB causa una stimolazione di ERK1/2 sostenuta nel tempo e solo una transiente attivazione di Akt. I due fattori di crescita mantengono dunque la vitalità delle cellule muscolari mediante meccanismi specifici non sovrapposti: IGF-1 stimola l'attività della PI3K e di Akt per promuovere la sopravvivenza mentre l'inibizione dell'apoptosi mediata da PDGF-BB richiede la via di segnalazione MEK/ERK1/2 (Lawlor, 2000). La comprensione della modalità mediante la quale fattori di crescita differenti promuovono la sopravvivenza delle cellule muscolari rappresenta un'opportunità per controllare la miogenesi attraverso la manipolazione di specifiche vie di trasduzione del segnale.

In ultima analisi, tra i fattori rilasciati dai macrofagi infiltranti nel muscolo in seguito a danno, è stato recentemente dimostrato che i PDGF-BB e PDGF-AB, ma non PDGF-AA, hanno un ruolo chiave nell'indurre chemiotassi di cellule precursori muscolari, un processo fondamentale per la corretta rigenerazione del muscolo danneggiato (Robertson, 1993).

#### 8. *Cross-talk* tra vie di segnalazione di S1P, fattori di crescita e citochine

Gli effetti biologici di S1P coincidono in differenti tipi cellulari con quelli di una vasta gamma di citochine e fattori di crescita. Un numero sempre maggiore di evidenze dimostra che tale sovrapposizione di effetti è correlata sia alla capacità di fattori di crescita e citochine di transattivare la via di segnalazione di S1P che alla capacità dello sfingolipide bioattivo di transattivare le cascate di segnalazione di fattori di crescita e citochine. Tale reciproco *cross-talk* influisce su crescita cellulare, differenziamento e migrazione ed è coinvolto in molti processi fisiologici e patologici, quali ad esempio flogosi e cancro.

Uno dei meccanismi mediante i quali si esplica il *cross-talk* tra le vie di segnalazione di S1P e fattori di crescita e citochine prevede la regolazione del metabolismo di S1P, i cui livelli possono essere modulati mediante la regolazione dell'attività o dell'espressione degli enzimi che ne catalizzano la sintesi e la degradazione. La maggior parte di fattori di crescita e citochine modula il metabolismo di S1P aumentandone la sintesi, regolando quindi l'espressione e/o l'attivazione delle due isoforme dell'enzima sfingosina chinasi (SK), specialmente SK1.

Numerose citochine e fattori di crescita, quali PDGF, VEGF, EGF e TNF $\alpha$  inducono una rapida attivazione e traslocazione della SK1 dal citoplasma alla membrana plasmatica. Il PDGF, che stimola la motilità cellulare, induce una traslocazione specifica della SK1 a livello dei bordi principali dei lamellipodi delle cellule migranti. Differenti agonisti, quali esteri del forbolo e TNF $\alpha$ , inducono attivazione e traslocazione della SK1 mediante la fosforilazione sul residuo di Ser225 mediata da ERK1/2 (Pitson, 2003). L'attivazione di ERK1/2 indotta da TNF $\alpha$  dipende a sua volta da SK1 (Pitson, 2000). Tali osservazioni suggeriscono che l'attivazione della SK1 potrebbe servire ad amplificare o prolungare l'attivazione di ERK1/2 mediata dall'agonista. L'attivazione della SK1 indotta da TNF $\alpha$  ha un ruolo fondamentale nell'effetto biologico pro-infiammatorio della

citochina dal momento che il silenziamento dell'espressione dell'enzima abolisce la capacità di  $\text{TNF}\alpha$  di indurre l'interleuchina-8 in cellule epiteliali di polmone (Chandru, 2007) oltre a bloccare l'induzione dovuta alla citochina della cicloossigenasi-2 e la conseguente secrezione della prostaglandina E2 in fibroblasti e macrofagi (Pettus, 2003; Hammad, 2008).

L'attivazione e traslocazione della SK1 è indotta anche da fattori di crescita, quali IGF-1 e PDGF, che trasducono il segnale mediante recettori tirosina chinasi. IGF-1 e IGF-2 attivano l'enzima in modo ERK1/2 dipendente; come nel caso del  $\text{TNF}\alpha$  l'attivazione di SK1 si trova sia a monte che a valle dell'attivazione di ERK1/2 dato il recettore tirosina chinasi può indurre direttamente l'attivazione della MAPK che sembra necessaria per l'attivazione di SK1 (Olivera, 2003). La stimolazione di ERK1/2 è a sua volta dipendente sia dall'attivazione di SK1 che dai recettori specifici per S1P, indicando che il *cross-talk* tra le vie di segnalazione di IGF e SK/S1P implica il modello "inside-out" o "sequenziale" (Figura 22).

In tale modello di *cross-talk* l'agonista attiva SK1 e conseguentemente aumenta i livelli di S1P la quale, secreta o esportata, attiva i recettori specifici in modo autocrino e paracrino (Figura 22).

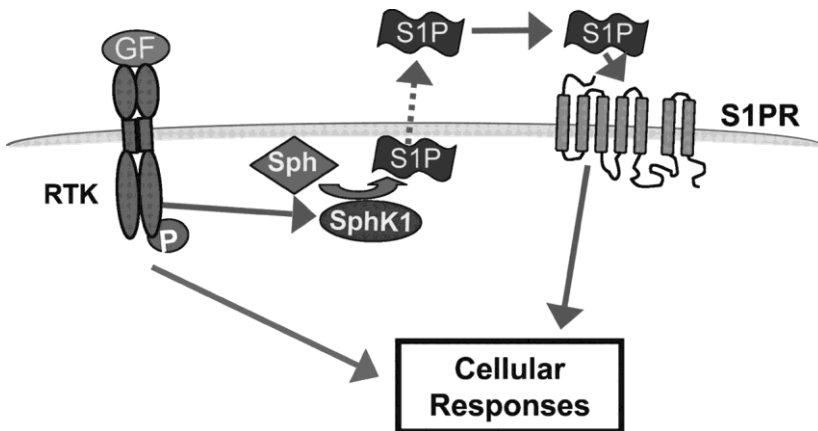


Figura 22. Modello di *cross-talk* "Inside-out" o "sequenziale". L'attivazione di recettori tirosina chinasi (RTK) mediata da differenti fattori di crescita induce attivazione e traslocazione di SK1 alla membrana plasmatica; la formazione di S1P in tale sede porta all'attivazione dei suoi specifici recettori e delle vie di segnalazione a valle.

Deve essere sottolineato che, secondo tale modello, l'attivazione di specifiche cascate di segnalazione dipende dal *pattern* di espressione dei recettori di S1P e contribuisce potenzialmente all'effetto cellula-specifico di citochine e fattori di crescita. Il meccanismo mediante il quale PDGF induce chemiotassi in fibroblasti implica l'attivazione di SK1 ed è correlato al *pattern* di espressione degli S1PR. L'effetto pro-migratorio del fattore di crescita dipende infatti dall'espressione del recettore  $\text{S1P}_1$ : i riarrangiamenti citoscheletrici, l'estensione dei lamellipodi e la motilità cellulare indotti da PDGF sono abrogati in fibroblasti mancanti di  $\text{S1P}_1$  (Rosenfeldt, 2001; Hobson, 2001). Al contrario, la

presenza del recettore  $S1P_2$  agisce come elemento di regolazione negativo dell'effetto del PDGF: la delezione del recettore  $S1P_2$  aumenta fortemente la migrazione di fibroblasti murini verso PDGF. Tale aumento dipende da  $S1P_1$  e SK1 dal momento che la specifica sottoespressione mediante interferenza ad RNA del recettore o dell'enzima reverte l'effetto (Goparaju, 2005).

Un modello alternativo di *cross-talk* prevede che S1P, sintetizzata in seguito a rapida attivazione di SK1, agisca come secondo messaggero. Tale modello è esemplificato da VEGF dal momento che la stimolazione di ERK1/2 indotta dal fattore di crescita dipende da SK1 ma non da recettori accoppiati a proteine G (Shu, 2002). Questi due modelli di *cross-talk* non sono mutualmente esclusivi. L'attivazione di SK1 è implicata in molti effetti biologici del PDGF, quali induzione di crescita cellulare, sopravvivenza, formazione di fibre da stress e chemiotassi: mentre il movimento cellulare verso il PDGF dipende dall'attivazione di recettori per S1P, l'effetto di induzione della sopravvivenza cellulare mediato dalla citochina è indipendente da S1PR (Olivera, 2003).

È stato recentemente descritto un meccanismo di segnalazione tripartito che coinvolge l'ormone steroideo  $17\beta$ -estradiolo (E2), la SK1 e il recettore dell'EGF (EGFR) (Sukocheva, 2006) (Figura 23). Al pari di altri fattori di crescita, l'estrogeno è capace di indurre una rapida e transiente attivazione di SK1 la quale, a sua volta, attiva la via di ERK1/2 e promuove la crescita di cellule tumorali di seno (Sukocheva, 2003).

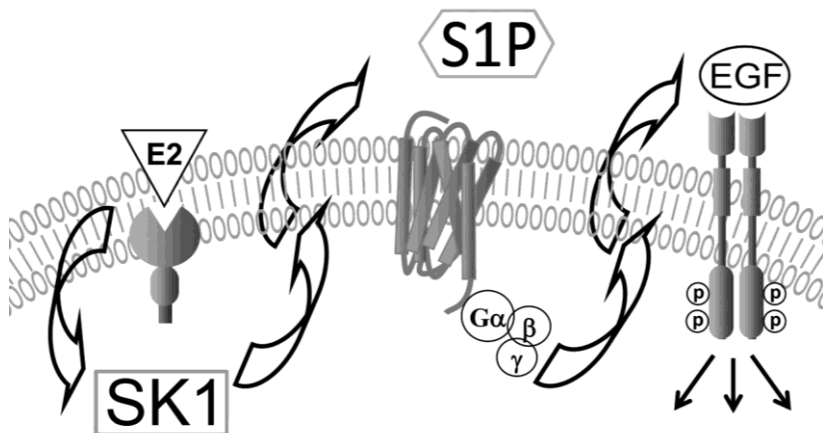


Figura 23. Modello di *cross-talk* "criss-cross". E2, interagendo con i suoi recettori specifici, induce l'attivazione di SK1, il rilascio di S1P e la conseguente attivazione di  $S1P_3$ , portando alla transattivazione di EGFR.

La S1P, generata dall'attivazione di SK1 indotta da E2, agisce via  $S1P_3$  per attivare EGFR in modo dipendente da metalloproteasi: l'attivazione delle metalloproteasi indotta da S1P porta al taglio proteolitico del precursore inattivo pro-EGF con conseguente rilascio di EGF che, essendo una molecola solubile, va a le-

garsi al proprio recettore attivandolo (Sukocheva, 2006). La SK1 ha dunque un ruolo chiave nella transattivazione “*criss-cross*”, ovvero nell'accoppiamento di tre segnali che attraversano la membrana, indotti rispettivamente da estradiolo, S1P ed EGF (Sukocheva, 2006).

Citochine e fattori di crescita, oltre ad attivare rapidamente la SK, possono regolare la sua espressione. Nei fibroblasti TGF $\beta$  aumenta indirettamente l'attività enzimatica di SK1, ma non SK2, aumentando l'espressione della proteina per un periodo di tempo prolungato (Yamanaka, 2004). L'attivazione prolungata di SK1 ha un ruolo cruciale nell'induzione dell'espressione dell'inibitore tissutale delle metalloproteinasi indotta da TGF $\beta$ . L'espressione di SK1 è aumentata da TGF $\beta$  anche in miofibroblasti (Kono, 2007). È interessante notare che in questo tipo cellulare la citochina provoca anche un rapido aumento di S1P intracellulare suggerendo che la regolazione di SK1 da parte di TGF $\beta$  possa essere contemporaneamente trascrizionale e post-traduzionale. Lo stesso tipo di regolazione dell'enzima SK1 è stato osservato per l'NGF: oltre a regolare l'espressione dell'enzima (Sobue, 2005) il fattore di crescita può provocarne una rapida attivazione che porta alla sintesi di S1P la quale, agendo extracellulamente attraverso S1P<sub>1</sub>, promuove l'estensione di neuriti (Toman, 2004).

Esistono inoltre alcune evidenze che supportano un modello in cui il *cross-talk* è mediato da complessi stabili costituiti da recettori per S1P associati a recettori tirosina chinasi. È stato dimostrato che complessi recettoriali costituiti da PDGFR- $\beta$  e S1P<sub>1</sub> in forma costitutivamente attiva si formano indipendentemente dalla stimolazione con PDGF o S1P in vari tipi cellulari, quali HEK293, cellule della muscolatura liscia aerea e fibroblasti (Alderton, 2001; Waters, 2003; Waters, 2006). La stimolazione con PDGF causa l'endocitosi del complesso di recettori che in seguito si associa a ERK1/2 portando ad attivazione della MAPK. Molto probabilmente il recettore tirosina chinasi, una volta attivato, fosforila la subunità  $\alpha$  della proteina G eterotrimerica associata a S1P<sub>1</sub> (Alderton, 2001), evento che sembra abilitato dalla vicinanza fisica dei due recettori. La subunità G $\alpha$  fosforilata risulterebbe in uno stato attivato in cui legherebbe preferenzialmente GTP piuttosto che GDP; la fosforilazione ne impedirebbe inoltre la riassociazione con le subunità G $\beta\gamma$ . Sembra che la subunità G $\alpha$  possa così rappresentare un intermedio “attivo” con il quale il recettore del PDGF attiva ERK1/2 MAPK. L'endocitosi del complesso recettoriale potrebbe coinvolgere le subunità  $\beta\gamma$  della proteina G associata a S1P<sub>1</sub>. Una volta che la subunità G $\alpha$  è stata fosforilata, le subunità G $\beta\gamma$  sono infatti disponibili per l'interazione con proteine chinasi a valle di PDGFR, quali Src: l'associazione alle subunità G $\beta\gamma$  abilita la fosforilazione mediata da Src di Gab1, costitutivamente associata a Grb2, che promuove il reclutamento della dinamina al complesso PI3K/Gab1. Una volta associata a tale complesso la dinamina potrebbe catalizzare il distacco delle vescicole endocitotiche contenenti il complesso PDGFR- $\beta$ -S1P<sub>1</sub> per la sua associazione con ERK1/2 e conseguente attivazione delle MAPK (Figura 24). Alternativamente l'endocitosi del complesso recettoriale può essere guidata dalla  $\beta$ -arrestina, molecola di solito coinvolta nei processi di desensitizzazione per internalizzazione dei GPCR dovuti a endocitosi clatrina-dipendente (Alderton, 2001). La  $\beta$ -arrestina è reclutata a livello del complesso recettoriale per associazione con il



recettore  $S1P_1$  dipendente da  $G\beta\gamma$ , la sua conseguente associazione a proteine adattatrici che interagiscono con la clatrina recluta quest'ultima a livello del complesso recettoriale attivo determinandone l'endocitosi e la conseguente attivazione di ERK1/2 (Figura 24).

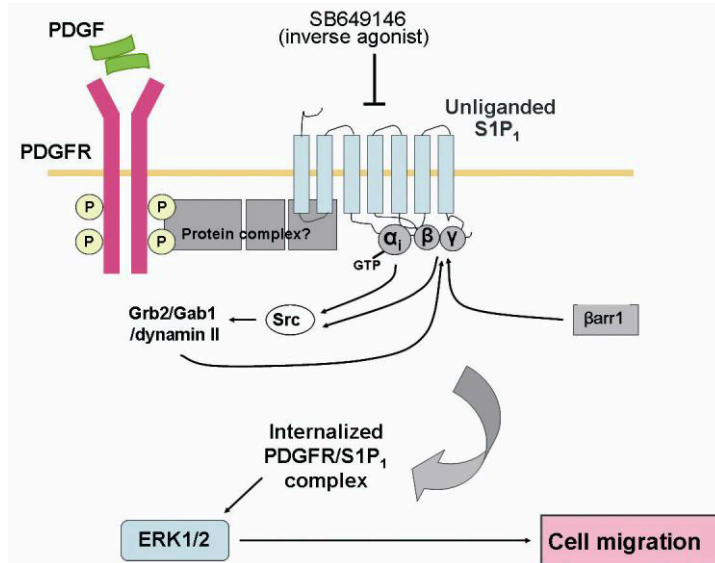


Figura 24. Modello per il *cross-talk* tra le vie di segnalazione di  $S1P_1$  e PDGFR.

In contrasto al modello "sequenziale" che prevede l'attivazione della SK1 e la generazione di  $S1P$  fornendo un meccanismo generale che lega i recettori tirosina chinasi all'attivazione dei GPCR, il modello "integrale", in cui è prevista un'associazione fisica tra i due tipi di recettori a dare una piattaforma, è stato fino ad oggi dimostrato essere rilevante solo per il *cross-talk* tra le vie di segnalazione di PDGF e  $S1P$  (Figura 25).

L'interazione di  $S1P$  con le vie di segnalazione di fattori di crescita è bidirezionale dal momento che lo sfingolipide può transattivare i recettori dei fattori di crescita. È stato riportato che in vari tipi cellulari  $S1P$  induce la fosforilazione di Akt mediante  $S1P_3$  in maniera dipendente dalla fosforilazione in tirosina di PDGFR- $\beta$ : l'inibizione della transattivazione di PDGFR- $\beta$  annulla la capacità di  $S1P$  di attivare Akt (Baudhuin, 2004). La fosforilazione del recettore per il PDGF indotta da  $S1P$  è  $G_i$  dipendente, in quanto abolita dal pre-trattamento con PTx. Alternativamente l'attivazione della via di segnalazione di PDGF indotta da  $S1P$  può essere mediata dall'aumentata trascrizione del fattore di crescita indotta dallo sfingolipide, come osservato in cellule della muscolatura liscia dei vasi (Usui, 2004). La bidirezionalità del *cross-talk* è stata per la prima volta descritta per l'interazione tra le vie di segnalazione di  $S1P$  e VEGF. Due studi dimostrano che almeno alcuni degli effetti della stimolazione di cellule endoteliali con  $S1P$  sono dovuti alla sua capacità di attivare il recettore VEGF2 del VEGF. L'attivazione di VEGF2 indotta da  $S1P$  è dipendente da  $G_i$  e Src e non richiede la

sintesi di VEGF (Endo, 2002). Nello stesso tipo cellulare è stato dimostrato che VEGF, a sua volta, induce attivazione di SK, fondamentale per l'attivazione di ERK1/2 e per l'effetto biologico di stimolazione della sintesi del DNA del fattore di crescita.

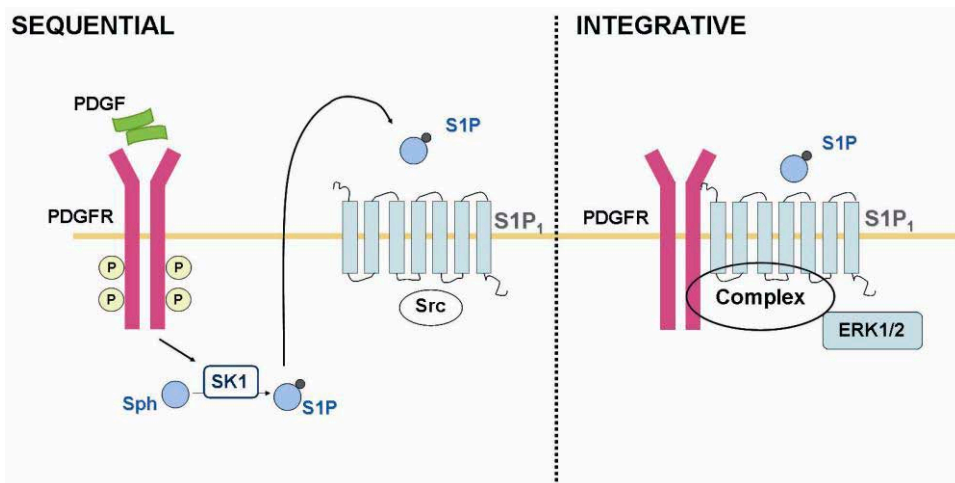


Figura 25. Modelli per il *cross-talk* tra le vie di segnalazione di S1P e PDGF.

Studi più recenti hanno dimostrato l'esistenza di un complesso *cross-talk* tra la via di segnalazione di S1P e TGF $\beta$ . S1P e TGF $\beta$  sono agenti pro-migratori e anti-proliferativi in cheratinociti. Tale sovrapposizione di effetti biologici ha indotto Kleuser e colleghi a esplorare la possibilità di un'interazione tra le vie di segnalazione dello sfingolipide e della citochina. Nel loro studio hanno dimostrato che S1P induce fosforilazione di Smad2 e Smad3 con una cinetica simile a TGF $\beta$  in cheratinociti. L'attivazione di Smad3 è necessaria per l'effetto chemiotattico di S1P dal momento che né lo sfingolipide né TGF $\beta$  sono in grado di indurre tale effetto in cheratinociti isolati da topi *Smad3*<sup>-/-</sup>. Utilizzando una combinazione di approcci molecolare e farmacologico è stato inoltre dimostrato che l'induzione della fosforilazione di Smad3 e degli effetti biologici di S1P dipendono sia da S1P<sub>1</sub> che da T $\beta$ RI (Sauer, 2004) suggerendo un modello in cui il *cross-talk* S1P-TGF $\beta$  dipenda dall'attivazione di recettori per S1P e di quelli per TGF $\beta$ . Tale modello è ulteriormente supportato da studi effettuati in miofibroblasti nei quali la forma fosforilata di FTY720 induce differenziamento in maniera dipendente da S1P<sub>3</sub> (Sauer, 2004). Il differenziamento dei miofibroblasti stimolato da S1P richiede la fosforilazione di Smad3 ma non la secrezione di TGF $\beta$ .

Il *cross-talk* tra le vie di segnalazione di S1P e TGF $\beta$  è stato inoltre osservato in cellule mesangiali renali (Xin, 2004; Xin, 2006). In questo tipo cellulare S1P attiva ERK1/2 e porta alla fosforilazione di Smad1 e Smad2, anche se con cinetiche differenti. Al contrario dell'attivazione di ERK1/2, la fosforilazione delle Smad, richiesta per l'induzione del fattore di crescita del tessuto connettivo (CTGF) e per l'espressione di collagene indotte da S1P, risulta essere indipendente da un recettore accoppiato a proteine G<sub>i</sub>. Ulteriori esperimenti hanno di-

mostrato che T $\beta$ RII è richiesto per l'attivazione delle Smad e che S1P sembra indurre oligomerizzazione dei recettori per il TGF $\beta$ . Quest'ultimo risultato conduce a un modello in cui S1P induce la formazione di un complesso recettoriale S1PR-T $\beta$ RII che forma un eteromero con T $\beta$ RI risultando nella fosforilazione di Smad 1, 2 e 3 (Xin, 2006) (Figura 26). Tale modello è stato confermato da studi in cui cellule mesangiali renali sono state trattate con l'immunomodulatore FTY720. Al pari di S1P, FTY720 e la sua forma fosforilata attivano ERK1/2 oltre ad indurre la fosforilazione di Smad1, 2 e 3 (Xin, 2006). Inoltre, l'attivazione delle Smad mediata da FTY720 dipende da T $\beta$ RII ma non da recettori accoppiati a proteine G.

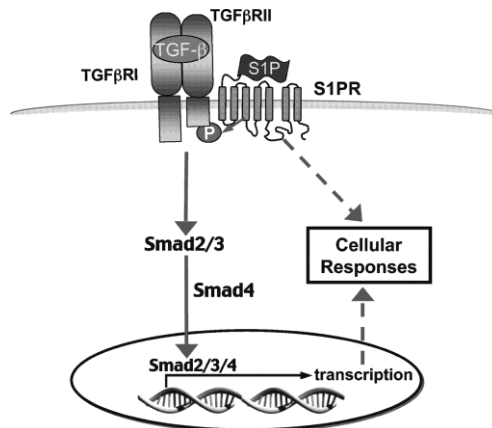


Figura 26. S1P induce la formazione di un complesso recettoriale S1PR-T $\beta$ RII che forma un eteromero con T $\beta$ RI risultando nella fosforilazione di Smad 1, 2 e 3.

La discrepanza tra i modelli di *cross-talk* S1P-TGF $\beta$  in cellule mesangiali renali e cheratinociti o miofibroblasti può essere potenziamente spiegata dalle differenze nel *signalling* del TGF $\beta$  in questi tipi cellulari. Il *signalling* della citochina coinvolge generalmente il reclutamento di un recettore T $\beta$ RI di tipo ALK5 da parte di T $\beta$ RII, con conseguente fosforilazione di Smad2 e Smad3. Tuttavia, in alcuni tipi cellulari, quali le cellule endoteliali, T $\beta$ RII può anche reclutare un T $\beta$ RI di tipo ALK1 e indurre la fosforilazione di Smad1 e Smad5 (Levy, 2006).

Crescenti evidenze dimostrano che il *cross-talk* tra le vie di segnalazione di S1P e TGF $\beta$  ha un ruolo significativo in molti processi biologici. Il ruolo di TGF $\beta$  nella progressione della fibrosi polmonare è mediato da tale *cross-talk*: la citochina aumenta l'espressione di SK1 portando ad un aumento di S1P che, a sua volta, si lega ai suoi recettori S1P<sub>2</sub> e S1P<sub>3</sub> e induce un aumento nell'espressione di  $\alpha$ -SMA, coinvolta nel processo fibrogenico (Kono, 2007) (Figura 27).

Come precedentemente descritto in cellule mesangiali renali Smad3 è richiesta per l'induzione del CTGF e per l'espressione di collagene da S1P (Xin, 2004). Ciò, combinato alle osservazioni che il TGF $\beta$  stimola l'espressione della SK1 per indurre un'aumentata sintesi di TIMP-1 nei fibroblasti (Yamanaka, 2004) e regola il differenziamento dei miofibroblasti (Keller, 2007), suggerisce

un ruolo del *cross-talk* bidirezionale S1P-TGF $\beta$  nella patologia polmonare e nel rimodellamento tissutale.

Smad3 è anche coinvolta nel *cross-talk* tra S1P e IL1 $\beta$ , agendo a valle dello sfingolipide nel bloccare l'espressione di iNOS, cPLA2 e MMP-9 indotta da IL1 $\beta$  (Xin, 2004). Ciò suggerisce che il *cross-talk* S1P-TGF $\beta$  abbia un ruolo nell'infiammazione e nell'immunità innata. Tale ipotesi è ulteriormente supportata dall'osservazione che S1P induce migrazione di cellule dendritiche mediante attivazione di Smad3 (Radeke, 2005).

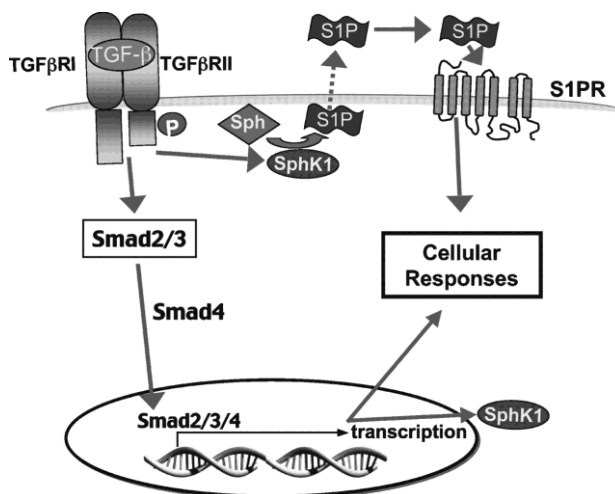


Figura 27. La regolazione genica mediata dall'attivazione delle Smad porta ad un aumento nell'espressione di SK1. I recettori del TGF $\beta$  attivano inoltre SK1, portando alla formazione di S1P che, a sua volta, attiva i suoi recettori con modalità autocrina.

È stato inoltre dimostrato che la transattivazione della via di segnalazione di S1P indotta da TGF $\beta$  rappresenta parte del *signalling* non dipendente dalle Smad che trasduce l'effetto pro-oncogenico della citochina. In cellule di adenocarcinoma esofageo TGF $\beta$  attiva le due isoforme dell'enzima SK con conseguente aumento della sintesi di S1P. Migrazione ed invasività delle cellule tumorali indotte dalla citochina dipendono da tale attivazione e dal successivo legame dello sfingolipide bioattivo con il recettore S1P $_2$ : tale *signalling* è dunque importante per la progressione del cancro esofageo (Miller, 2008).

I mesoangioblasti sono cellule staminali associate ai vasi capaci di differenziare in differenti tipi cellulari mesodermici quali muscolo scheletrico, cardiaco e liscio, osso e tessuto adiposo. Tali cellule sembrano rappresentare una strategia promettente per la terapia delle patologie primarie del muscolo. In effetti è stato dimostrato che il trapianto intra-arterioso di mesoangioblasti porta a un recupero significativo della struttura e della funzione del muscolo in modelli distrofici di topo (Sampaolesi, 2003) e di cane (Sampaolesi, 2006). L'efficacia terapeutica dei mesoangioblasti potrebbe tuttavia essere ulteriormente aumentata migliorando la loro sopravvivenza nell'ambiente tossico del muscolo danneggiato. Donati e collaboratori hanno dimostrato che TGF $\beta$  esercita un potente ef-

fetto anti-apoptotico in mesoangioblasti con un meccanismo dipendente sia dall'attivazione che dall'induzione dell'espressione dell'enzima SK1 (Donati, 2009). Questi dati stabiliscono un'importanza fondamentale del *cross-talk* S1P-TGF $\beta$  in cellule staminali responsabili della riparazione e rigenerazione dei tessuti.

## Capitolo 2

### Results

#### 1. Paper 1

Molecular Biology of the Cell 2010 Mar; 21(6):1111-24. Epub 2010 Jan 20.

Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 Induces Transdifferentiation of Myoblasts into Myofibroblasts via Up-Regulation of Sphingosine Kinase-1/S1P3 Axis

Francesca Cencetti, Caterina Bernacchioni, Paola Nincheri, Chiara Donati and Paola Bruni

Under normal biological conditions adult skeletal muscle is an extremely stable tissue. However, upon damage due to specific diseases, trauma or strong physical exercise, skeletal muscle exhibits a remarkable capacity of self-repair. Regeneration of skeletal muscle almost exclusively depends on tissue-resident stem cells, called satellite cells, which become activated upon skeletal muscle injury, giving rise to proliferating myogenic precursor cells that eventually differentiate and fuse to form multinucleated myotubes (Dhawan, 2005; Le Grand, 2007). The molecular events that take place subsequent to the activation of satellite cells and allow muscle repair are quite complex and, at present, a matter of intense investigation, also for their critical implication in the development of therapies for many diseases characterized by degeneration of skeletal muscle. However, the recovery of the injured skeletal muscle often is hindered by the development of fibrosis. Skeletal muscle fibrosis is a major pathological hallmark of chronic myopathies in which myofibers are replaced by progressive deposition of extracellular matrix proteins (Huard, 2002; Sato, 2003). Myofibroblasts, resulting from transdifferentiation of myoblast during the regenerative process, exert a key role in the onset of fibrosis. Among the cues released by infiltrating lymphocyte during the inflammation caused by skeletal muscle damage TGF $\beta$  has been identified as the major inducer of differentiation of myogenic cells into fibrotic cells. (Sato, 2003; Li, 2004; Gosselin, 2004). Indeed, the cytokine exerts a complex role in skeletal muscle inhibiting myogenic differentiation (Liu, 2001) and promoting myoblasts transdifferentiation into myofibroblasts

(Li, 2004). Canonical signalling, mediated by Smad proteins, is implicated in the negative regulation of myogenic transcription factors such as Myo D and MEF2 (Liu, 2001). However, the TGF $\beta$  downstream signalling responsible for myogenic cells differentiation into myofibroblast is, at present, unknown. Several recent studies have demonstrated that some of the effects elicited by TGF $\beta$  are transmitted by the pathway initiated by the activation of sphingosine kinase (SK), followed by intracellular generation of the bioactive lipid sphingosine 1-phosphate (S1P) (Watterson, 2007). Once formed, S1P can in turn act as extracellular ligand of a panel of five distinct membrane receptors (S1P<sub>1-5</sub>) or as intracellular mediator (Alvarez, 2007). The well-established pro-fibrotic action of TGF $\beta$  together with the emerging role of SK/S1P axis as TGF $\beta$ -regulated signalling pathway, spurred us to investigate whether TGF $\beta$  regulates SK in myoblasts and whether it has any role in its biological response.

In this paper, we showed that TGF $\beta$ 1 up-regulates SK1 in C2C12 myoblasts in a Smad-dependent manner, and consequently modifies sphingolipid metabolite levels. Next, the potential role of TGF $\beta$ 1-dependent up-regulation of SK1 in the pro-fibrotic action of the cytokine was examined: using a combination of molecular and pharmacological approaches we demonstrated that SK1 up-regulation is required for TGF $\beta$ 1-dependent transdifferentiation of C2C12 myoblasts into myofibroblasts. However, the addition of exogenous S1P did not mimic the pro-fibrotic effect of the cytokine, suggesting that the implicated mechanism could rely on additional molecular effects exerted by TGF $\beta$ 1 on SK/S1P signalling pathway. Indeed, in this paper we demonstrated that, besides up-regulating SK1, cell treatment with TGF $\beta$ 1 affected S1PR expression pattern. Inhibition of S1P<sub>3</sub>, which is up-regulated in a Smad-dependent manner and becomes the highest expressed S1PR after TGF $\beta$ 1 challenge, strongly attenuated the pro-fibrotic response to TGF $\beta$ 1. Gaining inside into the molecular mechanism downstream of SK1/S1P<sub>3</sub> axis, we demonstrated that up-regulation of SK1, as well as S1P<sub>3</sub>, was critically required for TGF $\beta$ 1-dependent RhoA activation, necessary in turn for the induction of myofibroblastic phenotype by the cytokine. Thus, the combined action on S1PR expression remodelling and SK1 up-regulation convey the TGF $\beta$ 1-directed S1P inside-out signalling to act primarily via S1P<sub>3</sub>, responsible for transmitting the pro-fibrotic action of the cytokine.

Paper in appendix.

## 2. Paper 2

Cellular Signalling 2010 Nov; 22(11):1688-99. Epub 2010 Jul 1.

Sphingosine kinase-1/S1P1 signalling axis negatively regulates mitogenic response elicited by PDGF in mouse myoblasts

Paola Nincheri, Caterina Bernacchioni, Francesca Cencetti, Chiara Donati and Paola Bruni

Sphingosine 1-phosphate (S1P) is a bioactive sphingolipid metabolite that regulates a wide spectrum of biological processes acting both as an intracellular messenger and as a ligand of specific cell surface G protein-coupled receptors (S1PR). At present, five distinct receptors (S1P<sub>1-5</sub>) capable of differentially coupling to one or multiple G-proteins, have been identified in mammals. Interestingly, recent studies have provided evidence that growth factors and cytokines are able to increase intracellular S1P activating or up-regulating the enzyme, sphingosine kinase (SK), that generates the bioactive sphingolipid which, in turn, can act in a paracrine or autocrine fashion to activate its cell surface receptors (Alvarez, 2007).

PDGF (Platelet Derived Growth Factor) is known to be critically implicated in skeletal muscle repair: upon skeletal muscle injury it is released from neighbouring cells such as endothelial cells and macrophages and is crucially implicated in the stimulation of proliferation and migration of myogenic cells leading to muscle repair (Chazaud, 2003; Chazaud, 2009; Christov, 2007). Although proliferation of muscle progenitor cells and their migration to the site of muscle lesion are both important for tissue regeneration, these two events must be temporally regulated to ensure an adequate repopulation of the damaged tissue. Since a bidirectional cross-talk between PDGF and S1P signalling has been demonstrated in a variety of cell types (Waters, 2003; Hobson, 2001; Baudhuin, 2004; Usui, 2004), in this paper we examine whether the mitogenic and/or the chemotactic response elicited by PDGF in mouse C2C12 myoblasts imply a cross-communication with S1PRs.

In this study we showed that in mouse myoblasts PDGF transactivates S1P<sub>1</sub> receptor via SK1 activation and that this molecular event exerts a negative regulation of the mitogenic effect elicited by this growth factor.

The well-known mitogenic effect of PDGF in myoblasts was confirmed measuring labelled thymidine incorporation: C2C12 cells were induced to proliferate by PDGF in a dose-dependent manner, 0.5 ng/ml being the lowest efficacious concentration and 30 ng/ml capable of eliciting maximal effect on DNA synthesis. Pharmacological inhibition of S1P<sub>1</sub>, or its specific silencing, increased PDGF-dependent cell proliferation, whereas S1P<sub>1</sub> overexpression diminished the biological effect. These data demonstrate that S1P<sub>1</sub> expression levels modulate the responsiveness of C2C12 myoblasts to the mitogenic stimulus brought about by PDGF. To investigate in detail the mechanism by which S1P<sub>1</sub> participates to the PDGF-directed mitogenic signalling in C2C12 cells, the possible effect of PDGF on SK activity was then studied. Results of *in vitro* SK assay in cell lysates obtained from myoblasts treated with 30 ng/ml PDGF for different time intervals showed that the growth factor was able to rapidly and transiently increase the enzymatic activity. Moreover, the mitogenic response to PDGF was enhanced by pharmacological inhibition of SK activity as well as specific silencing of SK1 but not SK2. These data demonstrated that SK1 is the enzyme isoform re-



sponsible for S1P production that is negatively involved in the proliferative response induced by PDGF in myoblasts.

Furthermore in this paper we demonstrated that ERK1/2 is a critical downstream effector of S1P<sub>1</sub>: the phosphorylation of the MAPK induced by PDGF was considerably decreased by S1P<sub>1</sub> blockade or specific silencing. Moreover, the pharmacological inhibition of ERK1/2 pathway remarkably increased the PDGF-dependent stimulation of thymidine incorporation.

Interestingly, PDGF-directed engagement of S1P<sub>1</sub> exerted also a positive modulatory action of the growth factor-dependent cell motility. In this paper we confirmed that PDGF stimulates myoblast chemotaxis in a concentration-dependent manner, with a maximal effect at 10 ng/ml. Interestingly, when myoblasts were previously incubated with a pharmacological inhibitor of SK to block endogenous S1P formation, or with an S1P<sub>1</sub> antagonist to prevent the engagement of this receptor, the chemotactic response evoked by PDGF was severely impaired. These results demonstrate the dual function of S1P<sub>1</sub> in PDGF signalling, which acts as a negative regulator of the growth factor-induced proliferation and a positive regulator of chemotaxis directed by this growth factor. This dual role of S1P<sub>1</sub>-mediated signalling in response to myoblast challenge with PDGF is likely to be important to guarantee the fine control of the biological response to this growth factor, finalized to efficient repopulation of skeletal muscle after damage, where a tight balance between proliferation and migration of tissue progenitor cells is required.

Paper in appendix.

### 3. Paper 3

Biochimie. 2012 Mar;94(3):597-607. Epub 2011 Sep 17.

Ceramide 1-Phosphate stimulates proliferation of C2C12 myoblasts

Patricia Gangoiti\*, Caterina Bernacchioni\*, Chiara Donati, Francesca Cencetti, Alberto Ouro, Antonio Gómez-Muñoz, Paola Bruni

\*These authors contributed equally to this work

Sphingolipids, molecules derived from sphingomyelin catabolism and from de novo synthesis of ceramide, have recently emerged as highly versatile molecules acting both as structural components of the membrane lipid bilayer and precursors of powerful bioactive signalling molecules such as ceramide, sphingosine, sphingosine 1-phosphate (S1P) and the recently identified ceramide 1-

phosphate (C1P). Of note, sphingolipid mediators are capable of regulating fundamental biological processes in a variety of tissues, including skeletal muscle. Mammalian skeletal muscles can regenerate following injury and this response is mediated by a specific type of resident stem cell, the satellite cell. Skeletal muscle damage stimulates an inflammatory response with invasion of macrophages, followed by activation of satellite cells, which undergo proliferation, differentiation and fusion to one another or to undamaged portions of the fiber.

S1P plays a unique role in skeletal muscle regeneration: it is able to promote both the activation of satellite cells (Nagata, 2006) and the myogenic differentiation of myoblasts (Donati, 2005). Therefore S1P plays a unique role in skeletal muscle regeneration, being required at multiple steps leading skeletal muscle resident stem cells to repair damaged tissue. On the contrary, ceramide appears to be negatively associated with myoblast differentiation (Mebarek, 2007). Hence, different bioactive sphingolipids can exert opposite role in the regulation of complex biological processes like skeletal muscle regeneration.

However, up to date, there are no evidences on the biological effect of C1P in skeletal muscle. This recently identified sphingolipid exerts a regulatory role on cellular proliferation and apoptosis (Gómez-Muñoz, 2006). Moreover, this bioactive sphingolipid plays a key role in inflammatory responses: C1P binds and activates cytosolic phospholipase A2, thus favouring prostanoid biosynthesis (Lamour, 2008). These biological effects of C1P are mediated by intracellular actions of the sphingolipid. Recently C1P was shown to stimulate migration of macrophages in a PTx-sensitive manner (Granado, 2009), suggesting the existence of a  $G_i$  protein-coupled specific receptor for the sphingolipid.

In this paper we examined whether C1P could play a regulatory role of myoblast biological parameters. We demonstrated that myoblasts are responsive to C1P. Indeed, in this cell type the bioactive sphingolipid stimulated DNA synthesis, as determined by measuring labelled thymidine incorporation into DNA, in a concentration-dependent manner, with a maximal effect at 15  $\mu$ M C1P. Cytofluorimetric analysis of cell cycle confirmed the ability of the sphingolipid to stimulate progression of the myoblasts through the cell cycle. The mitogenic role of C1P in myoblasts was further supported by Western blot analysis of proteins involved in cell cycle progression at the restriction point: C1P increased the phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  and product of retinoblastoma gene, and enhanced cyclin D1 protein levels. By contrast, C1P does not affect myogenic differentiation or myoblast susceptibility to pro-apoptotic stimuli. Indeed, treatment of myoblasts with C1P did not affect the expression of myogenic markers, such as myosin heavy chain, myogenin and caveolin-3, nor the fusion index, used to assess the extent of myotube formation as a result of the differentiation process. Moreover, C1P was unable to reduce the extent of caspase-3 activation in serum-starved myoblasts or in cells that were treated with the pro-apoptotic agent staurosporine. In agreement with these results, flow cytometry analysis of cells that were labelled with propidium iodide and annexin V-FITC demonstrated that treatment with C1P did not influence the percentage of cells in early or late apoptosis induced by serum deprivation.

Gaining insight into the mechanism by which C1P stimulates myoblast proliferation, we demonstrated that the mitogenic action of the sphingolipid was dependent upon prior activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt, ERK1/2 and mammalian target of rapamycin, all of which were transiently activated by C1P. Moreover we ruled out the involvement of the G<sub>i</sub> protein-coupled receptor in the mitogenic effect of C1P in myoblasts since PTx was unable to block C1P-dependent ERK1/2 or Akt phosphorylation and cell proliferation.

These results extend the current knowledge on cell targets of C1P, which so far has been mainly confined to cells implicated in the inflammatory response. Moreover, C1P appears to be the only sphingolipid endowed with mitogenic properties in myoblasts suggesting that the release of the sphingolipid by cells such as macrophages, which are recruited to the sites of muscle damage (Lescaudron, 1999; Merly, 1999; Tidball, 2007), might participate to the beneficial effect of muscle growth and regeneration.

Paper in appendix

## Capitolo 3

### Discussion

Skeletal muscle damaged by injury or by degenerative diseases such as muscular dystrophy is able to regenerate new muscle fibers. Muscle fibers are syncytial cells that contain several hundred nuclei within a continuous cytoplasm. The process of regeneration depends upon the fusion of mononucleated precursor cells, named satellite cells (SCs), located between the basal lamina, which surrounds each muscle fiber, and the plasma membrane. The healing of skeletal muscle in response to trauma consists of three phases: the destruction phase, the repair phase, and the remodelling phase (Huard, 2002; Chargé, 2004; Grefte, 2007). The destruction phase is characterized by necrosis, hematoma formation, and the influx of inflammatory cells. During the repair phase, the necrotic debris is phagocytosed, and regeneration of myofibers occurs through the action of SCs (Zammit, 2006). Firstly, activated SCs migrate to the site of injury, up-regulate the myogenic regulatory factors (MRFs) MyoD and Myf5, and become proliferative (Smith, 1994; Yablonka-Reuveni, 1994; Cornelison, 1997). From now on, the SCs are also known as myoblasts. Subsequent differentiation of the myoblasts is marked by the up-regulation of the MRFs, Mrf4 and Myogenin (Smith, 1994; Yablonka-Reuveni, 1994; Cornelison, 1997). Ultimately, these differentiated myoblasts form multinucleated myofibers or fuse to damaged myofibers for muscle regeneration (Hawke, 2001; Chargé, 2004). During the last phase, the remodeling phase, the regenerated myofibers mature and contract. However, in some cases, reorganization and contraction of unstructured connective tissue occur, resulting in scar tissue and subsequent incomplete skeletal muscle regeneration (Kaariainen, 2000; Jarvinen, 2005). Next to skeletal muscle injury, diseases such as different human muscular dystrophies, including Duchenne muscular dystrophy (DMD) and most limb girdle dystrophies, and inflammatory myopathies, such as dermatomyositis or polymyositis, also lead to impaired muscle function. These diseases are characterized by repeated cycles of muscle fiber necrosis and regeneration until the regenerative capacity is exhausted. Eventually the muscle fibers are mostly replaced by adipose and fibrous tissue (DiMario, 1991; Briguët, 2004).

There is much interest in understanding the cellular and molecular mechanisms underlying skeletal muscle regeneration in different contexts because such knowledge might help in the development of cell therapies for diseases characterized by skeletal muscle degeneration.

In the present PhD thesis I contributed to clarify the role of bioactive sphingolipids in the regulation of skeletal muscle regeneration process.

In the first paper we evaluated the involvement of sphingosine kinase (SK)/sphingosine 1-phosphate (S1P) in the pro-fibrotic action of the cytokine TGF $\beta$ 1. In this study, we described a novel signalling pathway triggered by TGF $\beta$ 1 in C2C12 myoblasts, via Smad-dependent up-regulation of SK1 and S1P<sub>3</sub>, that is critically implicated in the transdifferentiation of myoblasts into myofibroblasts through Rho/Rho kinase signalling pathway.

The pro-fibrotic action of TGF $\beta$ 1 is mediated by SK1 up-regulation in different types of fibroblasts (Yamanaka, 2004; Kono, 2007; Gellings Lowe, 2009), in accordance with the pro-fibrotic effect exerted by S1P in various cellular contexts, including human lung and dermal fibroblasts and retinal pigmented epithelial cells (Urata, 2005; Keller, 2007; Swaney, 2008). This study, for the first time, demonstrated that the TGF $\beta$ 1-directed transcriptional regulation of SK1 and S1P<sub>3</sub>, upstream of the up-regulation of myofibroblast marker proteins, is a Smad-mediated event.

Previously, we demonstrated that exogenous S1P acts as powerful pro-differentiating agent in C2C12 cells via engagement of S1P<sub>2</sub> (Donati, 2005). Moreover we demonstrated that in myoblasts SK/S1P axis, via S1P<sub>2</sub> engagement, is physiologically required for the achievement of myogenic differentiation of C2C12 myoblasts triggered *in vitro* by serum withdrawal (Meacci, 2008) or by challenge with low doses of tumor necrosis factor- $\alpha$  (Donati, 2007). In this paper we found that exogenous S1P does not affect the expression of fibrosis marker proteins in mouse myoblasts, consistently with the past results. Nonetheless, herein SK1 up-regulation was found to be critical for transmitting the pro-fibrotic effect of TGF $\beta$ 1 in myoblasts. The different biological outcome mediated by SK1/S1P axis after TGF $\beta$ 1 challenge seems to depend on the effect exerted by the cytokine on S1PR expression pattern. Thus, the combined action on S1PR expression remodelling and SK1 up-regulation convey the TGF $\beta$ 1-directed S1P inside-out signalling to act primarily via S1P<sub>3</sub>, which becomes the prevailing expressed receptor, rather than S1P<sub>2</sub>.

Interestingly, in our study Rho/Rho kinase was identified downstream of SK1 induction and upstream of fibrosis marker expression triggered by TGF $\beta$ 1. The Rho/Rho kinase pathway is known to be involved in the fibrotic process that affects multiple different tissues (Dolman, 2008; Soon, 2008; Haudek, 2009). Moreover, our data are in agreement with a previous study in which Rho kinase was found implicated in the mechanism by which SK1 regulates differentiation of lung fibroblasts mediated by TGF $\beta$ 1 (Kono, 2007).

In summary, results presented in this paper for the first time demonstrate the key role of SK1/S1P<sub>3</sub> axis in the TGF $\beta$ 1-induced transdifferentiation of myoblasts into myofibroblasts and, more importantly, demonstrate that TGF $\beta$ 1, by remodelling S1PR expression, redirects the pro-myogenic effect, S1P<sub>2</sub>-mediated, of endogenous S1P into a pro-fibrotic cue. Moreover, identifying the ability of TGF $\beta$ 1 to exploit S1P signalling to transdifferentiate myoblasts into myofibroblasts, we provide new clues on the molecular mechanisms underlying

the pro-fibrotic response elicited by the cytokine that could be pharmacologically addressed to ameliorate skeletal muscle regeneration.

In the second paper we demonstrated that transactivation of S1P<sub>1</sub> via activation of SK1 is clearly implicated in the negative control of the mitogenic response elicited by PDGF in myoblasts. Interestingly, the chemotactic activity of PDGF was here found to be positively regulated by S1P<sub>1</sub> engagement, supporting the notion that the extent of S1P<sub>1</sub> transactivation directed by PDGF plays an important modulatory role of the biological action exerted by PDGF in these cells, decisive to switch between cell proliferation and motility. Two distinct mechanisms of cross-communication between PDGF receptor and S1P<sub>1</sub> are reported: the sequential signalling, where PDGF engages S1P<sub>1</sub> following receptor dependent activation of SK and subsequent production of S1P (Hobson, 2001); and the integrative signalling where S1P<sub>1</sub> can be engaged by PDGF ligation to its receptor independently from S1P formation (Waters, 2003). These two models are not mutually exclusive and in certain cell types might function in concert (Pyne, 2008). We demonstrated that in C2C12 myoblasts the S1P<sub>1</sub>-mediated biological response following PDGF treatment was blocked by pharmacological inhibition of SK as well as by specific silencing of SK1, supporting the view that even if constitutive activity of S1P<sub>1</sub> is present in myoblasts, it is too low to enhance PDGF signalling in the complex, requiring therefore a PDGF-dependent release of S1P. Moreover, we observed that exogenous S1P was not able to enhance ERK1/2 phosphorylation via S1P<sub>1</sub>, or to increase agonist-dependent PDGFR- $\beta$  phosphorylation demonstrating the absence of bidirectionality in the cross-communication between PDGF and S1P and supporting the view that the PDGFR- $\beta$ -S1P<sub>1</sub> complex mainly acts as a modulator of the biological response elicited by PDGF. In this paper we found that S1P<sub>1</sub> engagement exerts a dual role, being responsible not only for the full chemotactic response elicited by PDGF but also for the reduction of its mitogenic effect. These results are in contrast with previous studies, where the sequential action mode was found to be exclusively involved in the positive regulation of cell motility by PDGF (Rosenfeldt, 2001).

In disagreement with our results, in NIH-3T3 fibroblasts, SK inhibition did not affect the mitogenic effect elicited by PDGF, whereas it reduced the growth factor-dependent migratory response (Veracini, 2006). Moreover, in hepatic stellate cells S1P<sub>1</sub> seems to be required for the transmission of the full mitogenic action of PDGF: cell proliferation in response to PDGF was strongly reduced by cell treatment with VPC23019, a compound known to antagonize S1P<sub>1</sub> 10-fold more than S1P<sub>3</sub> (Brunati, 2008).

Therefore, it appears that the molecular effects elicited by PDGF via S1P<sub>1</sub> engagement are strictly dependent on the cellular setting. De Donatis et al. have recently proposed that PDGF receptor internalization via rafts or clathrin differentially directs the signalling towards proliferation or migration (De Donatis, 2008). Although here the internalization mechanism of S1P<sub>1</sub> was not investigated, it is tempting to speculate that S1P<sub>1</sub> engagement by PDGF signalling is

critical for clathrin-dependent endocytosis, decisive for the growth factor dependent cell migration.

A key role of SK in the promotion of cell proliferation is reported in different cell types. Moreover, multiple growth factors exploit SK activation to elicit their mitogenic response (Watterson, 2003; Lebman, 2008; Pyne, 2009) and its overexpression is associated with various types of cancers (French, 2003). In contrast, here we found that SK1 activation by PDGF plays an inhibitory role in the regulation of myoblast proliferation. This piece of information is in accordance with a previous study in which overexpression of SK1 in C2C12 myoblasts was reported to inhibit serum-stimulated cell proliferation (Meacci, 2008), confirming the peculiar anti-mitogenic effect exerted by SK1 in these cells.

In the present study we also investigated the molecular mechanism by which S1P<sub>1</sub> attenuates the PDGF-dependent cell proliferation: ERK1/2 pathway, but not Akt, is involved in the negative modulation of PDGF-induced mitogenic response exerted by SK1/S1P<sub>1</sub>. Although a wealth of data in literature demonstrate a positive role of ERK1/2 in the mitogenic action of PDGF, earlier studies performed in C2C12 myoblasts demonstrated that ERK1/2 pathway is involved in the S1P-dependent inhibition of serum-induced cell proliferation (Donati, 2005) and in the reduced cell growth of myoblasts overexpressing SK1 (Meacci, 2008). Thus, the present results are coherent with previous findings, further supporting the notion that the pool of ERK1/2 downstream of S1P signalling negatively regulates the proliferation of myoblasts.

In conclusion the here identified peculiar feature of PDGF signalling via S1P<sub>1</sub> transactivation, by shifting from proliferation to migration, can exert an important modulatory role of the final biological effect, proliferation or migration, elicited by the growth factor in myoblasts. These two events must be temporally regulated to ensure an adequate repopulation of the damaged tissue therefore, the here described role of S1P<sub>1</sub> in PDGF signalling represents a novel mechanism for redirecting the final biological effect elicited by the growth factor.

In previous studies we demonstrated that exogenous S1P exerts a physiologically important biological activity in myoblasts acting simultaneously as anti-proliferating and pro-differentiating agent via engagement of S1P<sub>2</sub> (Donati, 2005). Moreover SK/S1P axis, via S1P<sub>2</sub> engagement, is physiologically required for the achievement of myogenic differentiation of C2C12 myoblasts triggered *in vitro* by serum withdrawal (Meacci, 2008). In line with these findings, Donati et al. (Donati, 2007) have shown that the pro-myogenic effect exerted by low doses of TNF $\alpha$  requires the activation of SK1 and the subsequent engagement of S1P<sub>2</sub>, demonstrating that the SK1/S1P<sub>2</sub> axis is part of the molecular machinery that regulates agonist-dependent myogenesis.

Intriguingly, in this PhD thesis, activation of myoblast SK1 by extracellular cues was found implicated in transdifferentiation of myoblasts into myofibroblasts in response to TGF $\beta$ 1, or in redirecting the biological outcome induced by PDGF from proliferation to migration, making highly versatile the biological outcome of SK1 stimulation in these cells. In all these instances SK1 activation requires the engagement of a specific S1PR such as S1P<sub>2</sub>, critical for mediating

myogenesis (Meacci, 2008), or S1P<sub>3</sub>, which is selectively up-regulated by TGFβ1 in order to promote the onset of myofibroblast phenotype (paper 1), or S1P<sub>1</sub> (paper 2), identified crucial for inhibition of cell proliferation and enhancement of cell motility brought about by PDGF. Thus, it appears that inside-out S1P signalling following myoblast challenge with different agents requires specific routing towards a receptor subtype in order to evoke a precise biological response. In this scenario the selective spatial control of S1P formation inside myoblasts very likely becomes crucial for the generation of a specific biochemical response, in order to make possible the selective interaction of the bioactive lipid with an individual S1PR, subsequent to its release outside the cell. One further line of evidence supporting the importance of tight regulation of topology of intracellular S1P formation comes from the observation that endogenous S1P formed in response to PDGF challenge stimulates cell motility via S1P<sub>1</sub> (paper 2), whereas exogenous S1P was previously reported to inhibit motility of the same cell type acting through S1P<sub>2</sub> (Becciolini, 2006). Furthermore, although SK/S1P<sub>1</sub> signalling axis was identified as negative modulator of the mitogenic activity of PDGF (paper 2), in earlier studies the silencing of S1P<sub>1</sub> in myoblasts, or its ligation to a specific agonist, did not affect the anti-proliferative effect of exogenously added S1P (Donati, 2005; Rapizzi, 2008), further supporting the notion that localized S1P production is a key issue to determine its biological outcome.

In the third paper we demonstrated that skeletal muscle is responsive to the recently identified bioactive sphingolipid C1P, whose target, so far, has been mainly confined to cells implicated in the inflammatory response. In this study we demonstrated that C1P exerts a potent mitogenic effect in mouse myoblasts. This phosphosphingolipid was previously found to promote cell survival in different cell types (Gómez-Muñoz, 2004; Gómez-Muñoz, 2006). Other critical biological functions of myoblasts, such as myogenic differentiation or cell survival, appear to be unaffected by challenge with C1P demonstrating that the sphingolipid evokes a specific response in myoblasts.

Skeletal muscle cell physiology is also regulated by other bioactive sphingolipids: S1P is known to stimulate myoblast differentiation towards myotubes (Donati, 2005) and to inhibit their chemotactic response (Becciolini, 2006) whereas sphingosine, its immediate precursor, was reported to inhibit chicken myoblast fusion (Kim, 1993), and de novo synthesized ceramide was found to be responsible for inhibition of myogenic differentiation of rat myoblasts (Mebarek, 2007). Thus, at present, C1P appears to be the only sphingolipid endowed with mitogenic properties in myoblasts, providing further evidence that sphingolipids are critical for regulation of skeletal muscle development and regeneration, and reinforcing the notion that individual bioactive sphingolipids play specific and distinct roles in the control of this highly orchestrated biological process.

Moreover, we identified the molecular mechanisms by which C1P stimulates C2C12 cell proliferation: PI3K/Akt and ERK1/2 signalling pathways were found both necessary for the mitogenic response to C1P, since selective inhibition of these pathways abrogated the biological action of this sphingolipid. Accordingly,



in bone marrow-derived macrophages (Gangoiti, 2008) the PI3K/Akt and ERK1/2 pathways were also identified as mediators of the mitogenic effect of C1P, suggesting a common mechanism of action of C1P in macrophages and myoblasts. However, contrary to the pro-survival role of C1P in macrophages and although C1P stimulates Akt and ERK1/2 in myoblasts, C1P does not inhibit apoptosis in these cells.

Granado et al. demonstrated that C1P stimulates macrophage migration through interaction with a  $G_i$  protein-coupled receptor (Granado, 2009). Given the rapid time-course of signalling cascades triggered by C1P in myoblasts we evaluated the involvement of such receptor in the mitogenic action of the sphingolipid. However, the involvement of the  $G_i$  protein-coupled receptor in the mitogenic effect of C1P in myoblasts was ruled out by the inability of PTx to block C1P-dependent ERK1/2 or Akt phosphorylation and cell proliferation. In agreement with these observations, PTx also failed to prevent the mitogenic and anti-apoptotic responses elicited by C1P in bone marrow-derived macrophages (Gómez-Muñoz, 2005), where the mitogenic effect of C1P seems to be associated to the generation of intracellular C1P (Lankalapalli, 2009). Nonetheless, a possible involvement of receptors other than  $G_i$  protein-coupled ones in the mitogenic effect of C1P in myoblasts remains to be determined.

In summary, we show here that C1P promotes proliferation of mouse myoblasts, strongly suggesting the involvement of this sphingolipid, released by other cells, such as macrophages recruited to the sites of muscle damage (Lescaudron, 1999; Merly, 1999; Tidball, 2007), in the regulation of muscle regeneration and repair.

## References

- Alderton F., Rakhit S., Choi K.K., Palmer T., Sambhi B., Pyne S., Pyne N. (2001) Tethering of the platelet-derived growth factor beta receptor to G-protein-coupled receptors. A novel platform for integrative signaling by these receptor classes in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 276, 28578-28585
- Alvarez S.E., Milstien S., Spiegel S. (2007) Autocrine and paracrine roles of sphingosine-1-phosphate. *Trends Endocrinol. Metab.* 18, 300-307
- Alvarez S.E., Harikumar K.B., Hait N.C., Allegood J., Strub G.M., Kim E.Y., Maceyka M., Jiang H., Luo C., Kordula T., Milstien S., Spiegel S. (2010) Sphingosine-1-phosphate is a missing cofactor for the E3 ubiquitin ligase TRAF2. *Nature* 465, 1084-1088
- An S., Zheng Y., Bleu T. (2000) Sphingosine 1-phosphate-induced cell proliferation, survival, and related signaling events mediated by G protein-coupled receptors Edg3 and Edg5. *J. Biol. Chem.* 275, 288-296
- Ancellin N., Colmont C., Su J., Li Q., Mittereder N., Chac S.S., Stefansson S., Liao G., Hla T. Extracellular export of sphingosine kinase-1 enzyme. Sphingosine 1-phosphate generation and the induction of angiogenic vascular maturation. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 6667-6675
- Andrae J., Gallini R., Betsholtz C. (2008) Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev.* 22, 1276-1312
- Arana L., Gangoiti P., Ouro A., Trueba M., Gómez-Muñoz A. (2010) Ceramide and ceramide 1-phosphate in health and disease. *Lipids Health Dis.* Feb 5, 9-15
- Bach L.A., Salemi R., Leeding K.S. (1995) Roles of insulin-like growth factor (IGF) receptors and IGF-binding proteins in IGF-II-induced proliferation and differentiation of L6A1 rat myoblasts. *Endocrinology* 136, 5061-5069
- Bajjalieh S.M., Martin T.F., Floor E. (1989) Synaptic vesicle ceramide kinase. A calcium-stimulated lipid kinase that co-purifies with brain synaptic vesicles. *J Biol Chem* 264, 14354-14360
- Barnard J.A., Lyons R.M., Moses H.L. (1990) The cell biology of transforming growth factor beta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163, 56-63
- Barr R.K., Lynn H.E., Moretti P.A., Khew-Goodall Y., Pitson S.M. (2008) Deactivation of sphingosine kinase 1 by protein phosphatase 2A. *J. Biol.Chem.* 283, 34994-35002
- Baudhuin L.M., Jiang Y., Zaslavsky A., Ishii I., Chun J., Xu Y. (2004) S1P3-mediated Akt activation and cross-talk with platelet-derived growth factor receptor (PDGFR). *FASEB J.* 18, 341
- Becciolini L., Meacci E., Donati C., Cencetti F., Rapizzi E., Bruni P. (2006) Sphingosine 1-phosphate inhibits cell migration in C2C12 myoblasts. *Biochim.Biophys.Acta.* 1761, 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. (2003) Effects of sphingosine 1-phosphate on excitation-contraction coupling in mammalian skeletal muscle. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 24, 539-554

- Berkes C.A., Tapscott S.J. (2005) MyoD and the transcriptional control of myogenesis. *Sem. Cell Dev. Biol.* 16, 585-595
- Betsholtz C. (2004). Insight into the physiological functions of PDGF through genetic studies in mice. *Cytokine Growth Factor Rev.* 15, 215-228
- Betto R., Teresi A., Fachechi-Cassano G., Salviati G., Sabbadini R.A. (1992) Sphingosine inhibits calcium release from sarcoplasmic reticulum membranes. *Adv. Exp. Med. Biol.* 311, 403-404
- Black B.L., Olson E.N. (1998) Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 14, 167-196
- Blau H.M., Webster C., Pavlath G.K. (1983) Defective myoblasts identified in Duchenne muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 80, 4856-60
- Boath A., Graf C., Lidome E., Ullrich T., Nussbaumer P., Bornancin F. (2008) Regulation and traffic of ceramide 1-phosphate produced by ceramide kinase: comparative analysis to glucosylceramide and sphingomyelin. *J Biol Chem* 283, 8517-8526
- Bornancin F., Mechtcheriakova D., Stora S., Graf C., Wlachos A., Dévay P., Urtz N., Baumruker T., Billich A. (2005) Characterization of a ceramide kinase-like protein. *Biochim Biophys Acta.* Feb 21;1687(1-3), 31-43
- Brack A.S., Rando T.A. (2007) Intrinsic changes and extrinsic influences of myogenic stem cell function during aging. *Stem Cell Rev* 3, 226-37
- Brack A.S., Conboy I.M., Conboy M.J., Shen J., Rando T.A. (2008) A temporal switch from notch to Wnt signaling in muscle stem cells is necessary for normal adult myogenesis. *Cell Stem Cell* 2, 50-9
- Branton M.H., Kopp J.B. (1999) TGF-beta and fibrosis. *Microbes Infect.* 1, 1349-1365
- Briguet A., Courdier-Fruh I., Foster M., Meier T., Magyar J.P. (2004) Histological parameters for the quantitative assessment of muscular dystrophy in the mdx-mouse. *Neuromuscul Disord* 14, 675-682
- Brindley D.N., English D., Pilquill C., Buri K., Ling Z.C. (2002) Lipid phosphate phosphatases regulate signal transduction through glycerolipids and sphingolipids. *Biochim. Biophys. Acta.* 1582, 33-44
- Brindley D.N. (2004) Lipid phosphate phosphatases and related proteins: signaling functions in development, cell division, and cancer. *J. Cell Biochem.* 92, 900-912
- Brunati A.M., Tibaldi E., Carraro A., Gringeri E., D'Amico F. Jr., Toninello A., Massimino M.L., Pagano M.A., Nalesso G., Cillo U. (2008) Cross-talk between PDGF and S1P signalling elucidates the inhibitory effect and potential antifibrotic action of the immunomodulator FTY720 in activated HSC-cultures. *Biochim. Biophys. Acta* 1783, 347
- Cambron L.D., Leskawa K.C. (1994) Glycosphingolipids during skeletal muscle cell differentiation: comparison of normal and fusion-defective myoblasts. *Mol. Cell. Biochem.* 130, 173-185
- Chalfant C.E., Spiegel S. (2005) Sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate: expanding roles in cell signaling. *J Cell Sci.* Oct 15;118(Pt 20),4605-12
- Chandru H., Boggaram V. (2007) The role of sphingosine 1-phosphate in the TNF-alpha induction of IL-8 gene expression in lung epithelial cells. *Gene* 391, 150-160
- Chargé S.B., Rudnicki M.A. (2004) Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol. Rev.* 84, 209-238
- Chazaud B., Sonnet C., Lafuste P., Bassez G., Rimaniol A.C., Poron F., Authier F.J., Dreyfus P.A., Gherardi R.K. (2003) Satellite cells attract monocytes and use macrophages as a support to escape apoptosis and enhance muscle growth. *J. Cell Biol.* 163, 1133
- Chazaud B., Brigitte M., Yacoub-Youssef H., Arnold L., Gherardi R., Sonnet C., Lafuste P., Chretien F. (2009) Dual and beneficial roles of macrophages during skeletal muscle regeneration. *Exerc Sport Sci Rev* 37, 18-22

- Chen Y.G., Hata A., Lo R.S., Wotton D., Shi Y., Pavletich N., Massagué. (1998) Determinants of specificity in TGF-beta signal transduction. *J. Genes. Dev.* 12, 2144-2152
- Chen H.B., Rud J.G., Lin K., Xu L. (2005) Nuclear targeting of transforming growth factor-beta-activated Smad complexes. *J. Biol. Chem.* 280, 21329-21336
- Cheresh D.A., Leng J., Klemke R.L. (1999) Regulation of cell contraction and membrane ruffling by distinct signals in migratory cells. *J. Cell. Biol.* 146, 1107-1116
- Chi H., Flavell R.A. (2005) Cutting edge: regulation of T cell trafficking and primary immune responses by sphingosine 1-phosphate receptor 1. *J. Immunol.* 174, 2485-2488
- Christov C., Chretien F., Abou-Khalil R., Bassez G., Vallet G., Authier F.J., Bassaglia Y., Shinin V., Tajbakhsh S., Chazaud B., Gherardi R.K. (2007) Muscle satellite cells and endothelial cells: close neighbors and privileged partners. *Mol. Biol. Cell* 18, 1397
- Chun J. (1999) Lysophospholipid receptors: implications for neural signaling. *J. Crit. Rev. Neurobiol.* 13, 151-168
- Chun J., Goetz E.J., Hla T., Igarashi Y., Lynch K.R., Moolenaar W., Pyne S., Tigyi G. (2002) International Union of Pharmacology. XXXIV. Lysophospholipid receptor nomenclature. *Pharmacol. Rev.* 54, 265-269
- Ciciliot S., Schiaffino S. (2010) Regeneration of mammalian skeletal muscle. Basic mechanisms and clinical implications. *Current Pharmaceutical Design* 16, 906-914
- Clark E.A., Brugge J.S. (1995) Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 268, 233-239
- Cohn R.D., van Erp C., Habashi J.P., Soleimani A.A., Klein E.C., Lisi M.T., Gamradt M., ap Rhys C.M., Holm T.M., Loeys B.L., Ramirez F., Judge D.P., Ward C.W., Dietz H.C. (2007) Angiotensin II type 1 receptor blockade attenuates TGF-beta-induced failure of muscle regeneration in multiple myopathic states. *Nat Med.* Feb;13(2), 204-10
- Conboy I.M., Rando T.A. (2002) The regulation of Notch signaling controls satellite cell activation and cell fate determination in postnatal myogenesis. *Dev Cell* 3, 397-409
- Cornelison D.D.W., Wold B. (1997) Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells. *J. Dev. Biol.* 191, 270-283
- Cross T.G., Scheel-Toellner D., Henriquez N.V., Deacon E., Salmon M., Lord J.M. (2000) Serine/threonine protein kinases and apoptosis. *Exp. Cell Res.* 256, 34-41
- Cuvillier O., Pirianov G., Kleuser B., Vanek P.G., Coso O.A., Gutkind S., Spiegel S. (1996) Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature* 381, 800-803
- Cuvillier O., Edsall L., Spiegel S. (2000) Involvement of sphingosine in mitochondria-dependent Fas-induced apoptosis of type II Jurkat T cells. *J. Biol. Chem.* 275, 15691-15700
- Cyster J.G. (2005) Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 127-159
- D'Angelo G., Polishchuk E., Di Tullio G., Santoro M., Di Campli A., Godi A., West G., Bielański J., Chuang C.C., van der Spoel A.C., Platt F.M., Hannun Y.A., Polishchuk R., Mattjus P., De Matteis M.A. (2007) Glycosphingolipid synthesis requires FAPP2 transfer of glucosylceramide. *Nature.* Sep 6;449(7158), 35-7
- Danieli-Betto D., Germinario E., Esposito A., Megighian A., Midrio M., Ravara B., Damiani E., Libera L.D., Sabbadini R.A., Betto R. (2005) Sphingosine 1-phosphate protects mouse extensor digitorum longus skeletal muscle during fatigue. *Am. J. Physiol Cell. Physiol.* 288, C1367-C1373
- Danieli-Betto D., Peron S., Germinario E., Zanin M., Sorci G., Franzoso S., Sandonà D., Betto R. (2010) Sphingosine 1-phosphate signaling is involved in skeletal muscle regeneration. *Am J Physiol Cell Physiol.* Mar;298(3), C550-8

- Davaille J., Gallois C., Habib A., Li L., Mallat A., Tao J., Levade T., Lotersztajn S. (2000) Antiproliferative properties of sphingosine 1-phosphate in human hepatic myofibroblasts. A cyclooxygenase-2 mediated pathway. *J Biol Chem.* 275, 34628-34633
- Davis R.L., Weintraub H., Lassar A.B. (1987) Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 51, 987-1000
- De Angelis L., Borghi S., Melchionna R., Berghella L., Baccarani-Contri M., Parise F., Ferrari S., Cossu G. (1998) Inhibition of myogenesis by transforming growth factor beta is density-dependent and related to the translocation of transcription factor MEF2 to the cytoplasm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 12358-12363
- De Donatis A., Comito G., Buricchi F., Vinci M.C., Parenti A., Caselli A., Camici G., Manao G., Ramponi G., Cirri P. (2008) Proliferation versus migration in platelet-derived growth factor signaling: the key role of endocytosis. *J. Biol. Chem.* 283, 19948
- Delaporte C., Dehaupas M., Fardeau M. (1984) Comparison between the growth pattern of cell cultures from normal and Duchenne dystrophy muscle. *J Neurol Sci* 64: 149-60
- Denissova N.G., Pouponnot C., Long J., He D., Liu F. (2000) Transforming growth factor beta -inducible independent binding of SMAD to the Smad7 promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 6397-6402
- Derynck R., Gelbart W.M., Harland R.M., Heldin C.H., Kern S.E., Massagué J., Melton D.A., Mlodzik M.B., Padgett R.W., Roberts A.G., Smith J., Thomsen G.H., Vogelstein B., Wang X.F. (1996) Nomenclature: vertebrate mediators of TGFbeta family signals. *Cell* 87, 173
- Derynck R., Zhang Y.E. (2003) Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 425, 577-584
- Dhawan J., Rando T.A. (2005) Stem cells in postnatal myogenesis: molecular mechanisms of satellite cell quiescence, activation and replenishment. *Trends Cell. Biol.* 15, 666-673
- DiMario J.X., Uzman A., Strohman R.C. (1991) Fiber regeneration is not persistent in dystrophic (MDX) mouse skeletal muscle. *Dev Biol* 148, 314-321
- Ding G., Sonoda H., Yu H., Kajimoto T., Goparaju S.K., Jahangeer S., Okada T., Nakamura S. (2007) Protein kinase D-mediated phosphorylation and nuclear export of sphingosine kinase 2. *J. Biol.Chem.* 282, 27493-27502
- Dobrosotskaya I.Y., Seegmiller A.C., Brown M.S., Goldstein J.L., Rawson R.B. (2002) Regulation of SREBP processing and membrane lipid production by phospholipids in *Drosophila*. *Science* 296, 879-883
- Dolman M.E., Fretz M.M., Segers G.J., Lacombe M., Prakash J., Storm G., Hennink W.E., Kok R.J. (2008) Renal targeting of kinase inhibitors *Int. J. Pharm.* 364, 249-257
- Donati C., Meacci E., Nuti F., Becciolini L., Farnararo M., Bruni P. (2005) Sphingosine 1-phosphate regulates myogenic differentiation: a major role for S1P2 receptor. *FASEB J.* 19, 449-451
- Donati C., Bruni P. (2006) Sphingosine 1-phosphate regulates cytoskeleton dynamics: implications in its biological response. *Biochim. Biophys. Acta* 1758, 2037-2048
- Donati C., Nincheri P., Cencetti F., Rapizzi E., Farnararo M., Bruni P. (2007) Tumor necrosis factor-alpha exerts pro-myogenic action in C2C12 myoblasts via sphingosine kinase/S1P2 signaling. *FEBS Lett.* 581, 4384-4388
- Donati C., Cencetti F., Nincheri P., Bernacchioni C., Brunelli S., Clementi E., Cossu G., Bruni P. (2007) Sphingosine 1-phosphate mediates proliferation and survival of mesoangioblasts. *Stem Cells.* 25, 1713-1719 (b)

- Donati C., Cencetti F., De Palma C., Rapizzi E., Brunelli S., Cossu G., Clementi E., Bruni P. (2009) TGFbeta protects mesoangioblasts from apoptosis via sphingosine kinase-1 regulation. *Cell Signal*. 21(2), 228-36
- Dorsam G., Graeler M.H., Seroogy C., Kong Y., Voice J.K., Goetzl E.J. (2003) Transduction of multiple effects of sphingosine 1-phosphate (S1P) on T cell functions by the S1P1 G protein-coupled receptor. *J. Immunol*. 171, 3500-3507
- Edsall L.C., Pirianov G.G., Spiegel S. (1997) Involvement of sphingosine 1-phosphate in nerve growth factor-mediated neuronal survival and differentiation. *J. Neurosci*. 17, 6952-6960
- Edsall L.C., Cuvillier O., Twitty S., Spiegel S., Milstien S. (2001) Sphingosine kinase expression regulates apoptosis and caspase activation in PC12 cells. *J Neurochem*. 76, 1573-1584
- Endo A., Nagashima K.I., Kurose H., Mochizuki S., Matsuda M., Mochizuki N. (2002) Sphingosine 1-phosphate induces membrane ruffling and increases motility of human umbilical vein endothelial cells via vascular endothelial growth factor receptor and Crkl. *J. Biol. Chem*. 277, 23747-23754
- Fanzani A., Giuliani R., Colombo F., Zizzoli D., Presta M., Preti A., Marchesini S. (2003) Overexpression of cytosolic sialidase Neu2 induces myoblast differentiation in C2C12 cells. *FEBS Lett*. 547, 183-188
- Feng X.H., Filvaroff E.H., Derynck R. (1995) Transforming growth factor-beta (TGF-beta)-induced down-regulation of cyclin A expression requires a functional TGF-beta receptor complex. Characterization of chimeric and truncated type I and type II receptors. *J. Biol. Chem*. 270, 24237-24245
- Ferrari G., Cusella-De Angelis G., Coletta M., Paolucci E., Stornaiuolo A., Cossu G., Mavilio F. (1998) Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279, 1528-1530
- Fiaschi T., Chiarugi P., Buricchi F., Giannoni E., Taddei M.L., Magnelli L., Cozzi G., Raugei G., Ramponi G. (2003) Down-regulation of platelet-derived growth factor receptor signaling during myogenesis. *Cell. Mol. Life Sciences Sci*. 60, 2721-2735
- Formigli L., Meacci E., Sassoli C., Squecco R., Nosi D., Chellini F., Naro F., Francini F., Zecchi-Orlandini S. (2007) Cytoskeleton/stretch-activated ion channel interaction regulates myogenic differentiation of skeletal myoblasts. *J. Cell. Physiol*. 211, 296-306
- Fredriksson L., Li H., Eriksson U. (2004) The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms. *Cytokine Growth Factor Rev*. 15, 197-204
- French K.J., Schrecengost R.S., Lee B.D., Zhuang Y., Smith S.N., Eberly J.L., Yun J.K., Smith C.D. (2003) Discovery and evaluation of inhibitors of human sphingosine kinase. *Cancer Res*. 63, 5962-5969
- Fruttiger M., Calver A.R., Richardson W.D. (2000) Platelet-derived growth factor is constitutively secreted from neuronal cell bodies but not from axons. *Curr. Biol*. 10, 1283-1286
- Fukushima K., Badlani N., Usas A., Riano F., Fu F.H., Huard J. (2001) The use of an antifibrosis agent to improve muscle recovery after laceration. *Am. J. Sports. Med*. 29, 394-402
- Galli R., Borello U., Gritti A., Minasi M.G., Bjornson C., Coletta M., Mora M., De Angelis M.G., Fiocco R., Cossu G., Vescovi A.L. (2000) Skeletal myogenic potential of human and mouse neural stem cells. *Nat. Neurosci*. 3, 986-991
- Gangoiti P., Granada M.H., Wang S.W., Kong J.Y., Steinbrecher U.P., Gómez-Muñoz A. (2008) Ceramide 1-phosphate stimulates macrophage proliferation through activation of the PI3-kinase/PKB, JNK and ERK1/2 pathways. *Cell Signal* 20, 726-736

- Gangoiti P., Granado M.H., Arana L., Ouro A., Gómez-Muñoz A. (2010) Activation of protein kinase C- $\alpha$  is essential for stimulation of cell proliferation by ceramide 1-phosphate. *FEBS Lett. Feb* 5;584(3): 517-24
- Gellings Lowe N., Swaney J.S., Moreno K.M., Sabbadini R.A. (2009) Sphingosine-1-phosphate and sphingosine kinase are critical for transforming growth factor- $\beta$ -stimulated collagen production by cardiac fibroblasts. *Cardiovasc. Res.* 82, 303-312
- Goetzl E.J., Wang W., McGiffert C., Huang M.C., Graler M.H. (2004) Sphingosine 1-phosphate and its G protein-coupled receptors constitute a multifunctional immunoregulatory system. *J. Cell. Biochem.* 92, 1104-1114
- Gómez-Muñoz A., Duffy P.A., Martin A., O'Brien L., Byun H.S., Bittman R., Brindley D.N. (1995) Short-chain ceramide-1-phosphates are novel stimulators of DNA synthesis and cell division: antagonism by cell-permeable ceramides. *Mol Pharmacol* 47,833-839
- Gómez-Muñoz A., Frago L., Alvarez L., Varela-Nieto I. (1997) Stimulation of DNA synthesis by natural ceramide 1-phosphate. *Biochem. J.* 325, 435-440
- Gómez-Muñoz A. (1998) Modulation of cell signalling by ceramides. *Biochim. Biophys. Acta* 1391, 92-109
- Gómez-Muñoz A., Kong J.Y., Salh B., Steinbrecher U.P. (2004) Ceramide-1-phosphate blocks apoptosis through inhibition of acid sphingomyelinase in macrophages. *J Lipid Res* 45, 99-105
- Gómez-Muñoz A. (2004) Ceramide-1-phosphate: a novel regulator of cell activation. *FEBS Lett* 562, 5-10
- Gómez-Muñoz A., Kong J.Y., Parhar K., Wang S.W., Gangoiti P., Gonzalez M., Eivemark S., Salh B., Duronio V., Steinbrecher U.P. (2005) Ceramide-1-phosphate promotes cell survival through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *FEBS Lett* 579, 3744-3750
- Gómez-Muñoz A. (2006) Ceramide 1-phosphate/ceramide, a switch between life and death. *Biochim Biophys Acta.* 1758, 2049-2056
- Goparaju S.K., Jolly P.S., Watterson K.R., Bektas M., Alvarez S., Sarkar S., Mel L., Ishii I., Chun J., Milstien S., Spiegel S. (2005) The S1P2 receptor negatively regulates platelet-derived growth factor-induced motility and proliferation. *Mol. Cell. Biol.* 25, 4237-4249
- Gosselin L.E., Williams J.E., Deering M., Brazeau D., Koury S., Martinez D.A. (2004) Localization and early time course of TGF- $\beta$  1 mRNA expression in dystrophic muscle. *Muscle Nerve* 30, 645-653
- Graeler M., Goetzl E.J. (2002) Activation-regulated expression and chemotactic function of sphingosine 1-phosphate receptors in mouse splenic T cells. *FASEB J.* 16, 1874-1878
- Graf C., Rovina P., Tauzin L., Schanzer A., Bornancin F. (2007) Enhanced ceramide-induced apoptosis in ceramide kinase overexpressing cells. *Biochem Biophys Res Commun* 354, 309-314
- Graf C., Klumpp M., Habig M., Rovina P., Billich A., Baumruker T., Oberhauser B., Bornancin F. (2008) Targeting ceramide metabolism with a potent and specific ceramide kinase inhibitor. *Mol Pharmacol* 74, 925-932
- Graler M.H., Goetzl E.J. (2002) Lysophospholipids and their G protein-coupled receptors in inflammation and immunity. *Biochim. Biophys. Acta.* 1582, 168-174
- Granado M.H., Gangoiti P., Ouro A., Arana L., Gómez-Muñoz A. (2009) Ceramide 1-phosphate inhibits serine palmitoyltransferase and blocks apoptosis in alveolar macrophages. *Biochim Biophys Acta* 1791, 263-272

- Grefte S., Kuijpers-Jagtman A.M., Torensma R., Von den Hoff J.W. (2007) Skeletal muscle development and regeneration. *Stem Cells Dev* 16, 857-868
- Gros J., Manceau M., Thome V., Marcelle C. (2005) A common somitic origin for embryonic muscle progenitors and satellite cells. *Nature* 435, 954-958
- Hait N.C., Allegood J., Maceyka M., Strub G.M., Harikumar K.B., Singh S.K., Luo C., Marmorstein R., Kordula T., Milstien S., Spiegel S. (2009) Regulation of histone acetylation in the nucleus by sphingosine-1-phosphate. *Science* 325: 1254-1257
- Hait N.C., Oskeritzian C.A., Paugh S.W., Milstien S., Spiegel S. (2006) Sphingosine kinases, sphingosine 1-phosphate, apoptosis and diseases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1758, 2016-2026
- Hait N.C., Bellamy A., Milstien S., Kordula T., Spiegel S. (2007) Sphingosine kinase type 2 activation by ERK-mediated phosphorylation. *J. Biol.Chem.* 282, 12058-12065
- Hammad S.M., Crellin H.G., Wu B.X., Melton J., Anelli V., Obeid L.M. (2008) Dual and distinct roles for sphingosine kinase 1 and sphingosine 1 phosphate in the response to inflammatory stimuli in RAW macrophages. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 85, 107-114
- Hammad S.M., Taha T.A., Nareika A., Johnson K.R., Lopes-Virella M.F., Obeid L.M. (2006) Oxidized LDL immune complexes induce release of sphingosine kinase in human U937 monocytic cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 79, 126-140
- Hanada K., Kumagai K., Yasuda S., Miura Y., Kawano M., Fukasawa M., Nishijima M. (2003) Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide. *Nature* 426, 803-809
- Hanel P., Andreani P., Graler M.H. (2007) Erythrocytes store and release sphingosine 1-phosphate in blood. *FASEB J.* 21, 1202-1209
- Hannun Y.A., Obeid L.M. (2008) Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Feb;9(2), 139-50
- Hata A., Lagna G., Massagué J., Hemmati-Brivanlou A. (1998) Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor. *Genes & Dev.* 12, 186-197
- Haudek S.B., Gupta D., Dewald O., Schwartz R.J., Wei L., Trial J., Entman M.L. (2009) Rho kinase-1 mediates cardiac fibrosis by regulating fibroblast precursor cell differentiation. *Cardiovasc. Res.* 83, 511-518
- Hawke T.J., Garry D.J. (2001) Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol* 91, 534-551
- Heine U.I., Munoz E.F., Flanders K.C., Ellingsworth L.R., Lam H.Y.P., Thompson N.L., Roberts A.B., Sporn M.B. (1987) Role of transforming growth factor-beta in the development of the mouse embryo. *J. Cell Biol.* 105, 2861-2876
- Heldin C.H., Westermark B. (1999) Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol. Rev.* 79, 1283-1316
- Herr D.R., Fyrst H., Pha V., Heinecke K., Georges R., Harris G.L., Saba J.D. (2003) Sply regulation of sphingolipid signaling molecules is essential for Drosophila development. *Development* 130, 2443-2453
- Hinkovska-Galcheva V., Kjeldsen L., Mansfield P.J., Boxer L.A., Shayman J.A., Suchard S.J. (1998) Activation of a plasma membrane-associated neutral sphingomyelinase and concomitant ceramide accumulation during IgG-dependent phagocytosis in human polymorphonuclear leukocytes. *Blood.* Jun 15;91(12), 4761-9
- Hinkovska-Galcheva V.T., Boxer L.A., Mansfield P.J., Harsh D., Blackwood A., Shayman J.A. (1998) The formation of ceramide-1-phosphate during neutrophil phagocytosis and its role in liposome fusion. *J Biol Chem.* Dec 11;273(50), 33203-9



- Hinkovska-Galcheva V., Boxer L.A., Kindzelskii A., Hiraoka M., Abe A., Goparju S., Spiegel S., Petty H.R., Shayman J.A. (2005) Ceramide 1-phosphate, a mediator of phagocytosis. *J Biol Chem* 280, 26612-26621
- Hla T., Maciag T. (1990) An abundant transcript induced in differentiating human endothelial cells encodes a polypeptide with structural similarities to G-protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* 265, 9308-9313
- Hla T., Lee M.J., Ancellin N., Paik J.H., Kluk M.J. (2001) Lysophospholipids--receptor revelations. *Science* 294, 1875-1878
- Hobson J.P., Rosenfeldt H.M., Barak L.S., Olivera A., Poulton S., Caron M.G., Milstien S., Spiegel S. (2001) Role of the sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1 in PDGF-induced cell motility. *Science* 291, 1800-1803
- Hofmann L.P., Ren S., Schwalm S., Pfeilschifter J., Huwiler A. (2008) Sphingosine kinase 1 and 2 regulate the capacity of mesangial cells to resist apoptotic stimuli in an opposing manner. *Biol. Chem.* 389, 1399-1407
- Hornemann T., Richard S., Rutti M.F., Wei Y., von Eckardstein A. (2006) Cloning and initial characterization of a new subunit for mammalian serine-palmitoyltransferase. *J Biol Chem* 281, 37275-8
- Hu Q., Klippel A., Muslin A.J., Fantl W.J., Williams L.T. (1995) Ras-dependent induction of cellular responses by constitutively active phosphatidylinositol-3 kinase. *Science* 268, 100-102
- Huard J., Li Y., Fu F.H. (2002) Muscle injuries and repair: current trends in research. *J. Bone Joint Surg. Am.* 84A, 822-832
- Hung W.C., Chang H.C., Chuang L.Y. (1999) Activation of caspase-3-like proteases in apoptosis induced by sphingosine and other long-chain bases in Hep3B hepatoma cells. *Biochem. J.* 338, 161-166
- Huse M., Muir T.W., Xu L., Chen Y.G., Kuriyan J., Massagué J. (2001) The TGF beta receptor activation process: an inhibitor- to substrate-binding switch. *Mol. Cell* 8, 671-682
- Hyde R., Hajduch E., Powell D.J., Taylor P.M., Hundal H.S. (2005) Ceramide down-regulates System A amino acid transport and protein synthesis in rat skeletal muscle cells. *FASEB J.* 19, 461-463
- Igarashi J., Michel T. (2000) Agonist-modulated targeting of the EDG-1 receptor to plasmalemmal caveolae. eNOS activation by sphingosine 1-phosphate and the role of caveolin-1 in sphingolipid signal transduction. *J. Biol. Chem.* 275, 32363-32370
- Igarashi J., Michel T. (2001) Sphingosine 1-phosphate and isoform-specific activation of phosphoinositide 3-kinase beta. Evidence for divergence and convergence of receptor-regulated endothelial nitric-oxide synthase signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 276, 36281-36288
- Igarashi N., Okada T., Hayashi S., Fujita T., Jahangeer S., Nakamura S. (2003) Sphingosine kinase 2 is a nuclear protein and inhibits DNA synthesis. *J. Biol.Chem.* 278, 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. (2003) Antiproliferative property of sphingosine 1-phosphate in rat hepatocytes involves activation of Rho via Edg-5. *Gastroenterology* 124, 459-469
- Ikeda M., Kihara A., Igarashi Y. (2006) Lipid asymmetry of the eukaryotic plasma membrane: functions and related enzymes. *Biol Pharm Bull* 29, 1542-6
- Ishii I., Friedman B., Ye X., Kawamura S., McGiffer C., Contos J.J., Kingsbury M.A., Zhang G., Brown J.H., Chun J. (2001) Selective loss of sphingosine 1-phosphate signaling with no obvious phenotypic abnormality in mice lacking its G protein-coupled receptor, LP(B3)/EDG-3. *J. Biol. Chem.* 276, 33697-33704

- Jarman K.E., Moretti P.A.B., Zebol J.R., Pitson S.M. (2010) Translocation of sphingosine kinase 1 to the plasma membrane is mediated by calcium- and integrin-binding protein 1. *J. Biol. Chem.* 285, 483-492
- Jarvinen T.A.H., Jarvinen T.L.N., Kaariainen M., Kalimo H., Jarvinen M. (2005) Muscle injuries: biology and treatment. *Am J Sports Med* 33, 745-764
- Jessup W. (2008) Lipid metabolism: sources and stability of plasma sphingosine-1-phosphate. *Lipid Curr. Opin. Lipidol.* 19, 543-544
- Jin P., Sejersen T., Ringertz N.R. (1991) Recombinant platelet-derived growth factor-BB stimulates growth and inhibits differentiation of rat L6 myoblasts. *J. Biol. Chem.* 266, 1245-1249
- Jolly P.S., Bektas M., Olivera A., Gonzalez-Espinosa C., Proia R.L., Rivera J., Milstien S., Spiegel S. (2004) Transactivation of sphingosine-1-phosphate receptors by FcepsilonRI triggering is required for normal mast cell degranulation and chemotaxis. *J. Exp. Med.* 199, 959-970
- Kaariainen M., Jarvinen T., Jarvinen M., Rantanen J., Kalimo H. (2000) Relation between myofibers and connective tissue during muscle injury repair. *Scand J Med Sci Sports* 10, 332-337
- Kalhovde J.M., Jerkovic R., Sefland I., Cordonnier C., Calabria E., Schiaffino S., Lomo T. (2005) "Fast" and "slow" muscle fibres in hindlimb muscles of adult rats regenerate from intrinsically different satellite cells. *J Physiol* 562, 847-57
- Karlsson S., Kowanetz K., Sandin A., Persson C., Ostman A., Heldin C.H., Hellberg C. (2006) Loss of T-cell protein tyrosine phosphatase induces recycling of the platelet-derived growth factor (PDGF) beta-receptor but not the PDGF alpha-receptor. *Mol. Biol. Cell* 17, 4846-4855
- Keller C.D., Rivera Gil P., Tolle M., van der Giet M., Chun J., Radeke H.H., Schafer-Korting M., Kleuser B. (2007) Immunomodulator FTY720 induces myofibroblast differentiation via the lysophospholipid receptor S1P3 and Smad3 signaling. *Am. J. Pathol.* 170, 281-292
- Kihara A., Ikeda M., Kariya Y., Lee Y.M., Igarashi Y. (2003) Sphingosine-1-phosphate lyase is involved in the differentiation of F9 embryonal carcinoma cells to primitive endoderm. *J. Biol. Chem.* 278, 14578-14585
- Kim H.S., Lee I.H., Jeon Y.J., Chung C.H., Ha D.B. (1993) Sphingosine blocks both membrane fusion and calmodulin-dependent phosphorylation of the 100-kDa protein of chick embryonic myoblasts. *Exp Cell Res* 205, 408-4
- Kim T.J., Mitsutake S., Kato M., Igarashi Y. (2005) The leucine 10 residue in the pleckstrin homology domain of ceramide kinase is crucial for its catalytic activity. *FEBS Lett.* 579, 4383-4388
- Kim J.W., Inagaki Y., Mitsutake S., Maezawa N., Katsumura S., Ryu Y.W., Park C.S., Taniguchi M., Igarashi Y. (2005) Suppression of mast cell degranulation by a novel ceramide kinase inhibitor, the F-12509A olefin isomer K1. *Biochim Biophys Acta* 1738, 82-90
- Kim T.J., Mitsutake S., Igarashi Y. (2006) The interaction between the pleckstrin homology domain of ceramide kinase and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate regulates the plasma membrane targeting and ceramide 1-phosphate levels. *Biochim. Biophys. Res Commun.* 342, 611-617
- Kim H.J., Lee Y., Chang E.J., Kim H.M., Hong S.P., Lee Z.H., Ryu J., Kim H.H. (2007) Suppression of osteoclastogenesis by N,N-dimethyl-D-erythro-sphingosine: a sphingosine kinase inhibition-independent action. *Mol. Pharmacol.* 72, 418-428
- Kim R.H., Takabe K., Milstien S., Spiegel S. *Biochim Biophys Acta.* (2009) Export and functions of sphingosine-1-phosphate. *Jul;1791(7), 692-6*

- Klinghoffer R.A., Hamilton T.G., Hoch R., Soriano P. (2002) An allelic series at the PDGF $\alpha$ R locus indicates unequal contributions of distinct signaling pathways during development. *Dev. Cell* 2, 103-113
- Kono Y., Nishiuma T., Nishimura Y., Kotani Y., Okada T., Nakamura S., Yokoyama M. (2007) Sphingosine kinase 1 regulates differentiation of human and mouse lung fibroblasts mediated by TGF- $\beta$ 1. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 37, 395-404
- Kovacs E.J., DiPietro L.A. (1994) Fibrogenic cytokines and connective tissue production. *FASEB J.* 8, 854-861
- Kretzschmar M., Massagué J.J. (1998) SMADs: mediators and regulators of TGF- $\beta$  signaling. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8, 103-111
- Kundra V., Escobedo J.A., Kazlauskas A., Kim H.K., Rhee S.G., Williams L.T., Zetter B.R. (1994) Regulation of chemotaxis by the platelet-derived growth factor receptor- $\beta$ . *Nature* 367, 474-476
- Kupperman E., An S., Osborne N., Waldron S., Stainier D.Y. (2000) A sphingosine-1-phosphate receptor regulates cell migration during vertebrate heart development. *Nature* 406, 192-195
- Lamour N.F., Chalfant C.E. (2005) Ceramide-1-phosphate: the "missing" link in eicosanoid biosynthesis and inflammation. *Mol Interv* 5, 358-367
- Lamour N.F., Stahelin R.V., Wijesinghe D.S., Maceyka M., Wang E., Allegood J.C., Merrill A.H. Jr, Cho W., Chalfant C.E. (2007) Ceramide kinase uses ceramide provided by ceramide transport protein: localization to organelles of eicosanoid synthesis. *J Lipid Res* 48, 1293-1304
- Lamour N.F., Chalfant C.E. (2008) Ceramide kinase and the ceramide-1-phosphate/cPLA2 $\alpha$  interaction as a therapeutic target. *Curr Drug Targets* 9, 674-682
- Lankalapalli R.S., Ouro A., Arana L., Gómez-Muñoz A., Bittman R. (2009) Caged ceramide 1-phosphate analogues: synthesis and properties. *J Org Chem* 74, 8844-8847
- Laviad E.L., Albee L., Pankova-Kholmyansky I., Epstein S., Park H., Merrill A.H. Jr, Futerman A.H. (2008) Characterization of ceramide synthase 2: tissue distribution, substrate specificity, and inhibition by sphingosine 1-phosphate. *J. Biol. Chem.* 283, 5677-5684
- Lawlor M.A., Feng X., Everding D.R., Sieger K., Stewart C.E., Rotwein P. (2000) Dual control of muscle cell survival by distinct growth factor-regulated signaling pathways. *Mol. Cell. Biol.* 20, 3256-3265
- Le Grand F., Rudnicki M.A. (2007) Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 19, 628-33
- Le Stunff H.L., Galve-Roperh I., Peterson C., Milstien S., Spiegel S. (2002) Sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase in regulation of sphingolipid metabolism and apoptosis. *J. Cell. Biol.* 158, 1039-1049
- Lebman D.A., Spiegel S. (2008) Cross-talk at the crossroads of sphingosine-1-phosphate, growth factors, and cytokine signaling. *J. Lipid Res.* 49, 1388
- Leclercq T.M., Pitson S.M. (2006) Cellular signalling by sphingosine kinase and sphingosine 1-phosphate. *IUBMB Life* 58, 467-472
- Lecour S., Smith R.M., Woodward B., Opie L.H., Rochette L., Sack M.N. (2002) Identification of a novel role for sphingolipid signaling in TNF  $\alpha$  and ischemic preconditioning mediated cardioprotection. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 34, 509-518
- Lee M.J., Evans M., Hla T. (1996) The inducible G protein-coupled receptor edg-1 signals via the G(i)/mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.* 271, 11272-11282

- Lee M.J., Van Brocklyn J.R., Thangada S., Liu C.H., Hand A.R., Menzeleev R., Spiegel S., Hla T. (1998) Sphingosine-1-phosphate as a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-1. *Science* 279, 1552-1555
- Lee M.J., Thangada S., Claffey K.P., Ancellin N., Liu C.H., Kluk M., Volpi M., Sha'afi R.I., Hla T. (1999) Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate. *Cell* 99, 301-312
- Lee M.J., Thangada S., Paik J.H., Sapkota G.P., Ancellin N., Chae S.S., Wu M., Morales-Ruiz M., Sessa W.C., Alessi D.R., Hla T. (2001) Akt-mediated phosphorylation of the G protein-coupled receptor EDG-1 is required for endothelial cell chemotaxis. *Mol. Cell* 8, 693-704
- Lee Y.M., Venkataraman K., Hwang S.I., Han D.K., Hla T. (2007) A novel method to quantify sphingosine 1-phosphate by immobilized metal affinity chromatography (IMAC). *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 84, 154-162
- Lescaudron L., Peltekian E., Fontaine-Perus J., Paulin D., Zampieri M., Garcia L., Parrish E. (1999) Blood borne macrophages are essential for the triggering of muscle regeneration following muscle transplant. *Neuromuscul Disord* 9, 72-80
- Leskawa K.C., Hogan E.L. (1990) Regulation of glycolipid synthesis during differentiation of clonal murine muscle cells. *Mol Cell Biochem.* 96, 163-173
- Levade T., Jaffrezou J.P. (1999) Signalling sphingomyelinases: which, where, how and why? *Biochim. Biophys. Acta* 1438, 1-17
- Levi M., Meijler M.M., Gómez-Muñoz A., Zor T. (2010) Distinct receptor-mediated activities in macrophages for natural ceramide-1-phosphate (C1P) and for phosphoceramide analogue-1 (PCERA-1). *Molecular and Cellular Endocrinology* Jan 27;314(2), 248-55
- Levy L., Hill C.S. (2006) Alterations in components of the TGF-beta superfamily signaling pathways in human cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 17, 41-58
- Li Y., Foste W., Deasy B.M., Chan Y., Prisk V., Tang Y., Cummins J., Huard J. (2004) Transforming growth factor-beta1 induces the differentiation of myogenic cells into fibrotic cells in injured skeletal muscle: a key event in muscle fibrogenesis. *Am. J. Pathol.* 164, 1007-1018
- Liu C.H., Hla T. (1997) The mouse gene for the inducible G-protein-coupled receptor edg-1. *Genomics* 43, 15-24
- Liu H., Sugiura M., Nava V.E., Edsall L.C., Kono K., Poulton S., Milstien S., Kohama T., Spiegel S. (2000) Molecular cloning and functional characterization of a novel mammalian sphingosine kinase type 2 isoform. *J. Biol. Chem.* 275, 19513-19520
- Liu D., Black B.L., Derynck R. (2001) TGF-beta inhibits muscle differentiation through functional repression of myogenic transcription factors by Smad3. *Genes Dev.* 15, 2950-2966
- Liu H., Chakravarty D., Maceyka M., Milstien S., Spiegel S. (2002) Sphingosine kinases: a novel family of lipid kinases. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 71, 493-511
- Liu H., Toman R.E., Goparaju S., Maceyka M., Nava V.E., Sankala H., Payne S.G., Bektas M., Ishii I., Chun J., Milstien S., Spiegel S. (2003) Sphingosine kinase type 2 is a putative BH3-only protein that induces apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278, 40330-40336
- Liu D., Kang J.S., Derynck R. (2004) TGF-beta-activated Smad3 represses MEF2-dependent transcription in myogenic differentiation. *EMBO J.* 23, 1557-1566
- Mac Lennan A.J., Carney P.R., Zhu W.J., Chaves A.H., Garcia J. (2001) An essential role for the H218/AGR16/Edg-5/LP(B2) sphingosine 1-phosphate receptor in neuronal excitability. *Eur. J. Neurosci.* 14, 203-209
- Maceyka M., Payne S.G., Milstien S., Spiegel S. (2002) Sphingosine kinase, sphingosine-1-phosphate, and apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1585, 193-201

- Maceyka M., Sankala H., Hait N.C., Le Stunff H., Liu H., Toman R., Collier C., Zhang M., Satin L., Merrill Jr A.H., Milstien S., Spiegel S. (2005) SphK1 and SphK2, sphingosine kinase isoenzymes with opposing functions in sphingolipid metabolism. *J. Biol. Chem.* 280, 37118-37129
- Maceyka M., Alvarez S.E., Milstien S., Spiegel S. (2008) Filamin A links sphingosine kinase 1 and sphingosine-1-phosphate receptor 1 at lamellipodia to orchestrate cell migration. *Mol. Cell Biol.* 28, 5687-5697
- Malek R.L., Toman R.E., Edsall L.C., Wong S., Chiu J., Letterle C.A., Van Brocklyn J.R., Milstien S., Spiegel S., Lee N.H. (2001) Nrg-1 belongs to the endothelial differentiation gene family of G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptors. *J. Biol. Chem.* 276, 5692-5699
- Mandala S., Hajdu R., Bergstrom J., Quackenbush E., Xie J., Milligan J., Thornton R., Shei G.J., Carol D., Keohane C., Rosenbach M., Hale J., Lynch C.L., Rupprecht K., Parsons W., Rosen H. (2002) Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists. *Science* 296, 346-349
- Marchesini N., Hannun Y.A. (2004) Acid and neutral sphingomyelinases: roles and mechanisms of regulation. *Biochem. Cell Biol.* 82, 27-44
- Massagué J., Cheifetz S., Endo T., Nadal.Ginard B. (1986) Type beta transforming growth factor is an inhibitor of myogenic differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 83, 8206-8210
- Massagué J., Cheifetz S., Laiho M., Ralph D.A., Weiss F.M.B., Zentella A. (1992) Transforming growth factor-beta. *Cancer Sureveys.* 12, 81-103
- Massagué J., Chen Y.G. (2000) Controlling TGF-beta signaling. *Genes. Dev.* 14, 627-644
- Massagué J., Gomis R.R. (2006) The logic of TGFbeta signaling. *FEBS Lett.* 580, 2811-2820
- Mathias S., Pena L.A., Kolesnick R.N. (1998) Signal transduction of stress via ceramide. *Biochem. J.* 335, 465-480
- Matloubian M., Lo C.G., Cinamon G., Lesneski M.J., Xu Y., Brinkmann V., Allende M.L., Proia R.L., Cyster J.G. (2004) Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* 427, 355-360
- Matsuyuki H., Maeda Y., Yano K., Sugahara K., Chiba K., Kohno T., Igarashi Y. (2006) Involvement of sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor type 1 and type 4 in migratory response of mouse T cells toward S1P. *Cell. Mol. Immunol.* 3, 429-437
- Mattie M., Brooker G., Spiegel S. (1994) Sphingosine-1-phosphate, a putative second messenger, mobilizes calcium from internal stores via an inositol trisphosphate-independent pathway. *J. Biol. Chem.* 269, 3181-3188
- Mauro A. (1961) Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9, 493-495
- McVerry B.J., Garcia J.G. (2005) In vitro and in vivo modulation of vascular barrier integrity by sphingosine 1-phosphate: mechanistic insights. *Cell Signal* 17, 131-139
- Meacci E., Vasta V., Donati C., Farnararo M., Bruni P. (1999) Receptor-mediated activation of phospholipase D by sphingosine 1-phosphate in skeletal muscle C2C12 cells. A role for protein kinase C. *FEBS Lett.* 457, 184-188
- Meacci E., Donati C., Cencetti F., Romiti E., Bruni P. (2000) Permissive role of protein kinase C alpha but not protein kinase C delta in sphingosine 1-phosphate-induced Rho A activation in C2C12 myoblasts. *FEBS Lett.* 482, 97-101
- Meacci E., Cencetti F., Formigli L., Squecco R., Donati C., Tiribilli B., Quercioli F., Zecchi Orlandini S., Francini F., Bruni P. (2002) Sphingosine 1-phosphate evokes calcium signals in C2C12 myoblasts via Edg3 and Edg5 receptors. *Biochem. J.* 362, 349-357
- Meacci E., Cencetti F., Donati C., Nuti F., Farnararo M., Kohno T., Igarashi Y., Bruni P. (2003) Down-regulation of EDG5/S1P2 during myogenic differentiation results in

- the specific uncoupling of sphingosine 1-phosphate signalling to phospholipase D. *Biochim. Biophys. Acta.* 1633, 133-142
- Meacci E., Cencetti F., Donati C., Nuti F., Becciolini L., Bruni P. (2004) Sphingosine kinase activity is required for sphingosine-mediated phospholipase D activation in C2C12 myoblasts. *Biochem. J.* 381, 655-663
- Meacci E., Nuti F., Donati C., Cencetti F., Farnararo M., Bruni P. (2008) Sphingosine kinase activity is required for myogenic differentiation of C2C12 myoblasts. *J. Cell. Physiol.* 214, 210-220
- Meadows K.A., Holly J.M., Stewart C.E. (2000) Tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis is associated with suppression of insulin-like growth factor binding protein-5 secretion in differentiating murine skeletal myoblasts. *J. Cell. Physiol.* 183, 330-337
- Mebarek S., Komati H., Naro F., Zeiller C., Alvisi M., Lagarde M., Prigent A.F., Nemoz G. (2007) Inhibition of de novo ceramide synthesis upregulates phospholipase D and enhances myogenic differentiation. *J. Cell. Sci.* 120, 407-416
- Merly F., Lescaudron L., Rouaud T., Crossin F., Gardahaut M.F. (1999) Macrophages enhance muscle satellite cell proliferation and delay their differentiation. *Muscle Nerve* 22, 724-732
- Meyer zu Heringdorf D., Lass H., Kuchar I., Alemany R., Guo Y., Schmidt M., Jakobs K.H. (1999) Role of sphingosine kinase in Ca(2+) signalling by epidermal growth factor receptor. *FEBS Lett.* 461, 217-222
- Miller K.J., Thaloer D., Matteson S., Pavlath G.K. (2000) Hepatocyte growth factor affects satellite cell activation and differentiation in regenerating skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 278,C174-81
- Mitra P., Oskeritzian C.A., Payne S.G., Beaven M.A., Milstien S., Spiegel S. (2006) Role of ABCC1 in export of sphingosine-1-phosphate from mast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 16394-16399
- Mitra P., Maceyka M., Payne S.G., Lamour N., Milstien S., Chalfant C.E., Spiegel S. (2007) Ceramide kinase regulates growth and survival of A549 human lung adenocarcinoma cells. *FEBS Lett* 581, 735-740
- Mitsutake S., Kim T.J., Inagaki Y., Kato M., Yamashita T., Igarashi Y. (2004) Ceramide kinase is a mediator of calcium-dependent degranulation in mast cells. *J Biol Chem* 279, 17570-17577
- Mizugishi K., Yamashita T., Olivera A., Miller G.F., Spiegel S., Proia R.L. (2005) Essential role for sphingosine kinases in neural and vascular development. *Mol. Cell Biol.* 25, 11113-11121
- Morales-Ruiz M., Sessa W.C., Alessi D.R., Hla T. (2001) Akt-mediated phosphorylation of the G protein-coupled receptor EDG-1 is required for endothelial cell chemotaxis. *Mol. Cell.* 8, 693-704
- Nagata Y., Kobayashi H., Umeda M., Ohta N., Kawashima S., Zammit P.S., Matsuda R. (2006) Sphingomyelin levels in the plasma membrane correlate with the activation state of muscle satellite cells. *J. Histochem. Cytochem.* 54, 375-384
- Nagata Y., Partridge T.A., Matsuda R., Zammit P.S. (2006) Entry of muscle satellite cells into the cell cycle requires sphingolipid signaling. *J. Cell. Biol.* 174, 245-253 (b)
- Nakajima N., Cavalli A.L., Biral D., Glembofski C.C., McDonough P.M., Ho P.D., Betto R., Sandona D., Palade P.T., Dettbarn C.A., Klopper R.E., Sabbadini R.A. (2000) Expression and characterization of Edg-1 receptors in rat cardiomyocytes: calcium deregulation in response to sphingosine 1-phosphate. *Eur. J. Biochem.* 267, 5679-5686

- Nakao A., Afrakhta M., Moren A., Najayama T., Christian J.L., Heuchel R., Itoh S., Kawabata M., Heldin N.E., Heldin C.H., ten Dijke P. (1997) Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature* 389, 631-635
- Neves S.R., Ram P.T., Iyenga, R. (2002) G protein pathways. *Science* 296, 1636-1639
- Newton A.C. (1995) Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J. Biol. Chem.* 270, 28495-28498
- Ng C.K., Carr K., McAinsh M.R., Powell B., Hetherington A.M. (2001) Drought-induced guard cell signal transduction involves sphingosine-1-phosphate. *Nature* 410, 596-599
- Ohmori T., Yatomi Y., Osada M., Kazama F., Takafuta T., Ikeda H., Ozaki Y. (2003) Sphingosine 1-phosphate induces contraction of coronary artery smooth muscle cells via S1P2. *Cardiovasc. Res.* 58, 170-177
- Okada T., Ding G., Sonoda H., Kajimoto T., Haga Y., Khosrowbeygi A., Gao S., Miwa N., Jahangeer S., Nakamura S. (2005) Involvement of N-terminal-extended form of sphingosine kinase 2 in serum-dependent regulation of cell proliferation and apoptosis. *J. Biol.Chem.* 280, 36318-36325
- Okadome T., Yamashita H., Franzen P., Moren A., Heldin C.H., Miyazono K. (1995) Distinct roles of the intracellular domains of transforming growth factor-beta type I and type II receptors in signal transduction. *J. Biol. Chem.* 269, 30753-30756
- Okamoto H., Takuwa N., Yatomi Y., Gonda K., Shigematsu H., Takuwa Y. (1999) EDG3 is a functional receptor specific for sphingosine 1-phosphate and sphingosylphosphorylcholine with signaling characteristics distinct from EDG1 and AGR16. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260, 203-208
- Okamoto H., Takuwa N., Yokomizo T., Sugimoto N., Sakurada S., Shigematsu H., Takuwa Y. (2000) Inhibitory regulation of Rac activation, membrane ruffling, and cell migration by the G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptor EDG5 but not EDG1 or EDG3. *Mol. Cell. Biol.* 20, 9247-9261
- Olivera A., Kohama T., Tu Z., Milstein S., Spiegel S. (1998) Purification and characterization of rat kidney sphingosine kinase *J. Biol. Chem.* 273, 12576-12583
- Olivera A., Kohama T., Edsall L., Nava V., Cuvillier O., Poulton S., Spiegel S. (1999) Sphingosine kinase expression increases intracellular sphingosine-1-phosphate and promotes cell growth and survival. *J. Cell. Biol.* 147, 545-558
- Olivera A., Rosenfeldt H.M., Bektas M., Wang F., Ishii I., Chun J., Milstien S., Spiegel S. (2003) Sphingosine kinase type 1 induces G12/13-mediated stress fiber formation, yet promotes growth and survival independent of G protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* 278, 46452-46460
- Olson E.N., Sternberg E., Hu J.S., Spizz G., Wilcox C. (1986) Regulation of myogenic differentiation by type beta transforming growth factor. *J. Cell. Biol.* 103, 1799-1805
- Osawa Y., Banno Y., Nagaki M., Brenner D.A., Naiki T., Nozawa Y., Nakashima S., Moriwaki H. (2001) TNF-alpha-induced sphingosine 1-phosphate inhibits apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in human hepatocytes. *J. Immunol.* 167, 173-180
- Pettus B.J., Bielawska A., Spiegel S., Roddy P., Hannun Y.A., Chalfant C.E. (2003) Ceramide kinase mediates cytokine- and calcium ionophore-induced arachidonic acid release. *J Biol Chem* 278, 38206-38213
- Pettus BJ, Bielawski J, Porcelli AM, Reames DL, Johnson KR, Morrow J, Chalfant CE, Obeid LM, Hannun YA. (2003) The sphingosine kinase 1/sphingosine-1-phosphate pathway mediates COX-2 induction and PGE2 production in response to TNF-alpha. *FASEB J.* 17: 1411-1421

- Pettus B.J., Bielawska A., Subramanian P., Wijesinghe D.S., Maceyka M., Leslie C.C., Evans J.H., Freiberg J., Roddy P., Hannun Y.A., Chalfant C.E. (2004) Ceramide 1-phosphate is a direct activator of cytosolic phospholipase A2. *J Biol Chem* 279, 11320-11326
- Pewzner-Jung Y., Ben-Dor S., Futerman A.H. (2006) When do Lasses (longevity assurance genes) become CerS (ceramide synthases)? Insights into the regulation of ceramide synthesis. *J Biol Chem* 281: 25001-5
- Pitman MR, Pitson SM. (2010) Inhibitors of the sphingosine kinase pathway as potential therapeutics. *Curr. Cancer Drug Targets* 10, 354-367
- Pitson S.M., Moretti P.A., Zebol J.R., Xia P., Gamble J.R., Vadas M.A., D'Andrea R.J., Wattenberg B.W. (2000) Expression of a catalytically inactive sphingosine kinase mutant blocks agonist-induced sphingosine kinase activation. A dominant-negative sphingosine kinase. *J. Biol. Chem.* 275, 33945-33950
- Pitson S.M., D'andrea R.J., Vandeleur L., Moretti P.A., Xia P., Gamble J.R., Vadas M.A., Wattenberg B.W. (2000) Human sphingosine kinase: purification, molecular cloning and characterization of the native and recombinant enzymes. *Biochem. J.* 350, 429-441
- Pitson S.M., Moretti P.A., Zebol J.R., Lynn H.E., Xia P., Vadas M.A., Wattenberg B.W. (2003) Activation of sphingosine kinase 1 by ERK1/2-mediated phosphorylation. *EMBO J.* 22, 5491-5500
- Pitson S.M. (2010) Regulation of sphingosine kinase and sphingolipid signaling. *Trends Biochem Sci.* Sep 24. [Epub ahead of print]
- Potthoff M.J., Arnold M.A., McAnally J., Richardson J.A., Bassel-Duby R., Olson E.N. (2007) Regulation of skeletal muscle sarcomere integrity and postnatal muscle function by Mef2c. *Mol. Cell. Biol.* 27, 8143-8151
- Pyne N.J., Pyne S. (2008) Sphingosine 1-phosphate, lysophosphatidic acid and growth factor signaling and termination. *Biochim. Biophys. Acta* 1781, 467
- Pyne S., Lee S.C., Long J., Pyne N. (2009) Role of sphingosine kinases and lipid phosphate phosphatases in regulating spatial sphingosine 1-phosphate signalling in health and disease. *J. Cell. Signal.* 21, 14
- Radeke H.H., von Wenckstern H., Stoldtner K., Sauer B., Hammer S., Kleuser B. (2005) Overlapping signaling pathways of sphingosine 1-phosphate and TGF-beta in the murine Langerhans cell line XS52. *J. Immunol.* 174, 2778-2786
- Rapizzi E., Donati C., Cencetti F., Nincheri P., Bruni P. (2008) Sphingosine 1-phosphate differentially regulates proliferation of C2C12 reserve cells and myoblasts. *Mol. Cell. Biochem.* 314, 193-199
- Riboni L., Bassi R., Anelli V., Viani P. (2002) Metabolic formation of ceramide-1-phosphate in cerebellar granule cells: evidence for the phosphorylation of ceramide by different metabolic pathways. *Neurochem Res.* Aug;27(7-8): 711-6
- Rigogliuso S., Donati C., Cassarà D., Taverna S., Salamone M., Bruni P., Vittorelli M.L. (2010) An active form of sphingosine kinase-1 is released in the extracellular medium as component of membrane vesicles shed by two human tumor cell lines. *J. Oncol.* DOI: 10.1155/2010/509329
- Rios R., Carneiro I., Arce V.M., Devesa J. (2002) Myostatin is an inhibitor of myogenic differentiation. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 282, C993-C999
- Roberts A.B., Russo A., Felici A., Flanders K.C. (2003) Smad3: a key player in pathogenetic mechanisms dependent on TGF-beta. *Ann N Y Acad Sci.* May;995, 1-10
- Robertson T.A., Maley M.A., Grounds M.D., Papadimitriou J.M. (1993) The role of macrophages in skeletal muscle regeneration with particular reference to chemotaxis. *Exp. Cell Res.* 207, 321



- Romiti E., Meacci E., Tani M., Nuti F., Farnararo M., Ito M., Bruni P. (2000) Neutral/alkaline and acid ceramidase activities are actively released by murine endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275, 746-751
- Rosen H., Goetzl E.J. (2005) Sphingosine 1-phosphate and its receptors: an autocrine and paracrine network. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 560-570
- Rosenfeldt H.M., Hobson J.P., Maceyka M., Olivera A., Nava V.E., Milstien S., Spiegel S. (2001) EDG-1 links the PDGF receptor to Src and focal adhesion kinase activation leading to lamellipodia formation and cell migration. *FASEB J.* 15, 2649-2659
- Sabbadini R., McNutt W., Jenkins G., Betto R., Salviati G. (1993) Sphingosine is endogenous to cardiac and skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 193, 752-728
- Salminen A., Braun T., Buchberger A., Jurs S., Winter B., Arnold H. (1991) Transcription of the muscle regulatory gene *Myf4* is regulated by serum components, peptide growth factors and signaling pathways involving G proteins. *J. Cell. Biol.* 115, 905-917
- Sampaolesi M., Torrente Y., Innocenzi A., Tonlorenzi R., D'Antona G., Pellegrino M.A., Barresi R., Bresolin N., De Angelis M.G., Campbell K.P., Bottinelli R., Cossu G. (2003) Cell therapy of alpha-sarcoglycan null dystrophic mice through intra-arterial delivery of mesoangioblasts. *Science* 301, 487-492
- Sampaolesi M., Blot S., D'Antona G., Granger N., Tonlorenzi R., Innocenzi A., Mognol P., Thibaud J.L., Galvez B.G., Barthélémy I., Perani L., Mantero S., Guttinger M., Pansarasa O., Rinaldi C., Cusella De Angelis M.G., Torrente Y., Bordignon C., Bottinelli R., Cossu G. (2006) Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. *Nature.* 444, 574-579
- Sanchez T., Estrada-Hernandez T., Paik J.H., Wu M.T., Venkataraman K., Brinkman V., Claffey K., Hla T. (2003) Phosphorylation and action of the immunomodulator FTY720 inhibits vascular endothelial cell growth factor-induced vascular permeability. *J. Biol. Chem.* 278, 47281-47290
- Sanchez-Capelo A. (2005) Dual role for TGF-beta1 in apoptosis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16, 15-34
- Sassoon D.A. (1993) Myogenic regulatory factors: dissecting their role and regulation during vertebrate embryogenesis. *Dev. Biol.* 156, 11-23
- Sato K., Li Y., Foster W., Fukushima K., Badlani N., Adachi N., Usas A., Fu F.H., Huard J. (2003) Improvement of muscle healing through enhancement of muscle regeneration and prevention of fibrosis. *Muscle Nerve* 28, 365-372
- Sauer B., Vogler R., von Wenckstern H., Fujii M., Anzano M.B., Glick A.B., Schafer-Korting M., Roberts A.B., Kleuser B. (2004) Involvement of Smad signaling in sphingosine 1-phosphate-mediated biological responses of keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 279, 38471-38479
- Seger R., Krebs E.G. (1995) The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* 9, 726-735
- Shi Y., Wang Y.F., Jayaraman L., Yang H., Massague J., Pavletich N. (1998) Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF-beta signaling. *Cell* 94, 585-594
- Shi Y., Massagué (2003) Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *J. Cell* 113, 685-700
- Shih A.H., Holland E.C. (2006) Platelet-derived growth factor (PDGF) and glial tumorigenesis. *Cancer Letters* 232, 139-147
- Shu X., Wu W., Mosteller R.D., Broek D. (2002) Sphingosine kinase mediates vascular endothelial growth factor-induced activation of ras and mitogen-activated protein kinases. *Mol. Cell. Biol.* 22, 7758-7768

- Smith CK II., Janney M.J., Allen R.E. (1994) Temporal expression of myogenic regulatory genes during activation, proliferation, and differentiation of rat skeletal muscle satellite cells. *J Cell Physiol* 159, 379-385
- Sobue S., Hagiwara K., Banno Y., Tamiya-Koizumi K., Suzuki M., Takagi A., Kojima T., Asano H., Nozawa Y., Murate T. (2005) Transcription factor specificity protein 1 (Sp1) is the main regulator of nerve growth factor-induced sphingosine kinase 1 gene expression of the rat pheochromocytoma cell line, PC12. *J. Neurochem.* 95, 940-949
- Soldi R., Mandinova A., Venkataraman K., Hla T., Vadas M., Pitson S., Duarte M., Graziani I., Kolev V., Kacer D., Kirov A., Maciag T., Prudovsky I. (2007) Sphingosine kinase 1 is a critical component of the copper-dependent FGF1 export pathway. *Exp Cell Res.* Sep 10;313(15), 3308-18
- Soon R.K. Jr, Yee H.F. Jr. (2008) Stellate cell contraction: role, regulation, and potential therapeutic target. *Clin. Liver Dis.* 12, 791-803, viii
- Spiegel S., Merrill A.H. Jr. (1996) Sphingolipid metabolism and cell growth regulation. *FASEB J.* 10, 1388-1397
- Spiegel S., Milstien S. (2003) Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 4, 397-407
- Squecco R., Sassoli C., Nuti F., Martinesi M., Chellini F., Nosi D., Zecchi-Orlandini S., Francini F., Formigli L., Meacci E. (2006) Sphingosine 1-phosphate induces myoblast differentiation through Cx43 protein expression: a role for a gap junction-dependent and -independent function. *Mol. Biol. Cell.* 17, 4896-4910
- Stahelin R.V., Hwang J.H., Kim J.H., Park Z.Y., Johnson K.R., Obeid L.M., Cho W. (2005) The mechanism of membrane targeting of human sphingosine kinase 1. *J. Biol.Chem.* 280, 43030-43038
- Strle K., Broussard S.R., McCusker R.H., Shen W.H., Johnson R.W., Freund G.G., Dantzer R., Kelley K.W. (2004) Proinflammatory cytokine impairment of insulin-like growth factor I-induced protein synthesis in skeletal muscle myoblasts requires ceramide. *Endocrinology.* 145, 4592-4602
- Subramanian P., Stahelin R.V., Szulc Z., Bielawska A., Cho W., Chalfant C.E. (2005) Ceramide 1-phosphate acts as a positive allosteric activator of group IVA cytosolic phospholipase A2 alpha and enhances the interaction of the enzyme with phosphatidylcholine. *J Biol Chem* 280, 17601-17607
- Sugiura M., Kono K., Liu H., Shimizugawa T., Minekura H., Spiegel S., Kohama T. (2002) Ceramide kinase, a novel lipid kinase. Molecular cloning and functional characterization. *J Biol Chem* 277, 23294-23300
- Sukocheva O.A., Wang L., Albanese N., Pitson S.M., Vadas M.A., Xia P. (2003) Sphingosine kinase transmits estrogen signaling in human breast cancer cells. *Mol. Endocrinol.* 17, 2002-2012
- Sukocheva O., Wadham C., Holmes A., Albanese N., Verrier E., Feng F., Bernal A., Derian C.K., Ullrich A., Vadas M.A., Xia P. (2006) Estrogen transactivates EGFR via the sphingosine 1-phosphate receptor Edg-3: the role of sphingosine kinase-1. *J. Cell Biol.* 173, 301-310
- Sun Q., Zhang Y., Yang G., Chen X., Zhang Y., Cao G., Wang J., Sun Y., Zhang P., Fan M., Shao N., Yang X. (2008) Transforming growth factor-beta-regulated miR-24 promotes skeletal muscle differentiation. *Nucleic Acids Res.* 36, 2690-2699
- Suzuki J., Yamazaki Y., Li G., Kaziro Y., Koide H. (2000) Involvement of Ras and Ral in chemotactic migration of skeletal myoblasts. *Mol. Cell. Biol.* 20, 4658-4665
- Swaney J.S., Moreno K.M., Gentile A.M., Sabbadini R.A., Stoller G.L. (2008) Sphingosine-1-phosphate (S1P) is a novel fibrotic mediator in the eye. *Exp. Eye Res.* 87, 367-375

- Taha T.A., Argraves K.M., Obeid L.M. (2004) Sphingosine-1-phosphate receptors: receptor specificity versus functional redundancy. *Biochim Biophys Acta*. Jun 1;1682(1-3), 48-55
- Taha T.A., Hannun Y.A., Obeid L.M. (2006) Sphingosine kinase: biochemical and cellular regulation and role in disease. *J Biochem Mol Biol*. Mar 31;39(2), 113-31
- Taha T.A., Kitatani K., El-Alwani M., Bielawski J., Hannun Y.A., Obeid L.M. (2006) Loss of sphingosine kinase-1 activates the intrinsic pathway of programmed cell death: modulation of sphingolipid levels and the induction of apoptosis. *FASEB J*. 20, 482-484 (b)
- Tang Z.L., Scherer P.E., Okamoto T., Song K., Chu C., Kohtz D.S., Nishimoto I., Lodish H.F., Lisanti M.P. (1996) Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J. Biol. Chem.* 271, 2255-2261
- Tatsumi R., Anderson J.E., Nevoret C.J., Halevy O., Allen R.E. (1998) HGF/SF is present in normal adult skeletal muscle and is capable of activating satellite cells. *Dev Biol* 194, 114-28
- Tatsumi R., Liu X., Pulido A., Morales M., Sakata T., Dial S., Hattori A., Ikeuchi Y., Allen R.E. (2006) Satellite cell activation in stretched skeletal muscle and the role of nitric oxide and hepatocyte growth factor. *Am J Physiol Cell Physiol* 290, C1487-94
- Testai F.D., Landek M.A., Goswami R., Ahmed M., Dawson G. (2004) Acid sphingomyelinase and inhibition by phosphate ion: role of inhibition by phosphatidyl-myoinositol 3,4,5-triphosphate in oligodendrocyte cell signaling. *J Neurochem* 89, 636-644
- Tettamanti G., Bassi R., Viani P., Riboni L. (2003) Salvage pathways in glycosphingolipid metabolism. *Biochimie* 85, 423-437
- Thayer M.J., Tapscott S.J., Davis R.L., Wright W.E., Lassar A.B., Weintraub H. (1989) Positive autoregulation of the myogenic determination gene MyoD1. *Cell* 58, 241-248
- Thomas M., Langley B., Berry C., Sharma M., Kirk S., Bass J., Kambadur R. (2000) Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *J. Biol. Chem.* 275, 40235-40243
- Tidball J.G., Wehling-Henricks M. (2007) Macrophages promote muscle membrane repair and muscle fibre growth and regeneration during modified muscle loading in mice in vivo. *J Physiol* 578, 327-336
- Toman R.E., Payne S.G., Watterson K., Maceyka M., Lee N.H., Milstien S., Bigbee J.W., Spiegel S. (2004) Differential transactivation of sphingosine-1-phosphate receptors modulates NGF-induced neurite extension. *J. Cell Biol.* 166, 381-392
- Tsukazaki T., Chiang T.A., Davison A.F., Attisano L., Wrana J.L. (1998) SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor. *Cell* 95, 779-791
- Urata Y., Nishimura Y., Hirase T., Yokoyama M. (2005) Sphingosine 1-phosphate induces alpha-smooth muscle actin expression in lung fibroblasts via Rho-kinase. *Kobe J Med. Sci.* 51, 17-27
- Usui S., Sugimoto N., Takuwa N., Sakagami S., Takata S., Kaneko S., Takuwa Y. (2004) Blood lipid mediator sphingosine 1-phosphate potently stimulates platelet-derived growth factor-A and -B chain expression through S1P1-Gi-Ras-MAPK-dependent induction of Kruppel-like factor 5. *J. Biol. Chem.* 279, 12300
- Van Brocklyn J.R., Lee M.J., Menzeleev R., Olivera A., Edsall L., Cuvillier O., Thomas D.M., Coopman P.J.P., Thangada S., Hla T., Spiegel S. (1998) Dual actions of sphingosine-1-phosphate: extracellular through the Gi-coupled receptor Edg-1 and intracellular to regulate proliferation and survival. *J. Cell Biol.* 142, 229-240

- Van Brocklyn J.R., Tu Z., Edsall L.C., Schmidt R.R., Spiegel S. (1999) Sphingosine 1-phosphate-induced cell rounding and neurite retraction are mediated by the G protein-coupled receptor H218. *J. Biol. Chem.* 274, 4626-4632
- Van Brocklyn J.R., Behbahani B., Lee N.H. (2002) Homodimerization and heterodimerization of S1P/EDG sphingosine-1-phosphate receptors. *Biochim. Biophys. Acta.* 1582, 89-93
- Van Echten-Deckert G., Zschoche A., Bar T., Schmidt R.R., Raths A., Heinemann T., Sandhoff K. (1997) cis-4-Methylsphingosine decreases sphingolipid biosynthesis by specifically interfering with serine palmitoyltransferase activity in primary cultured neurons. *J. Biol. Chem.* 272, 15825-15833
- Van Meer G., Lisman Q. (2002) Sphingolipid transport: rafts and translocators. *J. Biol. Chem.* 277, 25855-25858
- Venkataraman K., Lee Y.M., Michaud J., Thangada S., Ai Y., Bonkovsky H.L., Parikh N.S., Habrukowich C., Hla T. (2008) Vascular endothelium as a contributor of plasma sphingosine 1-phosphate. *Circ. Res.* 102, 669-676
- Veracini L., Franco M., Boureux A., Simon V., Roche S., Benistant C. (2006) Two distinct pools of Src family tyrosine kinases regulate PDGF-induced DNA synthesis and actin dorsal ruffles. *J. Cell Sci.* 119, 2921
- Visentin B., Vekich J.A., Sibbald B.J., Cavall A.L., Moreno K.M., Matteo R.G., Garland W.A., Lu Y., Yu S., Hall H.S., Kundra V., Mills G.B., Sabbadini R.A. (2006) Validation of an anti-sphingosine-1-phosphate antibody as a potential therapeutic in reducing growth, invasion, and angiogenesis in multiple tumor lineages. *Cancer Cell* 9, 225-238
- Vivien D., Attisano L., Wrana J.L., Massagué J. (1995) Signaling activity of homologous and heterologous transforming growth factor-beta receptor kinase complexes. *J. Biol. Chem.* 270, 7134-7141
- Volonte D., Liu Y., Galbiati F. (2005) The modulation of caveolin-1 expression controls satellite cell activation during muscle repair. *FASEB J.* 19, 237-239
- Waeber C., Blondeau N., Salomone S. (2004) Vascular sphingosine-1-phosphate S1P1 and S1P3 receptors. *Drug News Perspect.* 17, 365-382
- Waggoner D.W., Gómez-Muñoz A., Dewald J., Brindley D.N. (1996) Phosphatidate phosphohydrolase catalyzes the hydrolysis of ceramide 1-phosphate, lysophosphatidate, and sphingosine 1-phosphate. *J. Biol. Chem.* 271, 16506-16509
- Wang T., Li B.Y., Danielson P.D., Rockwell S., Lechleider R.J., Martin J., Manganaro T., Donahoe P.K. (1996) The immunophilin FKBP12 functions as a common inhibitor of the TGF beta family type I receptors. *Cell* 86, 435-444
- Wang W., Graeler M.H., Goetzl E.J. (2005) Type 4 sphingosine 1-phosphate G protein-coupled receptor (S1P4) transduces S1P effects on T cell proliferation and cytokine secretion without signaling migration. *FASEB J.* 19, 1731-1733
- Waters C., Sambhi B., Kong K.C., Thompson D., Pitson S.M., Pyne S., Pyne N.J. (2003) Sphingosine 1-phosphate and platelet-derived growth factor (PDGF) act via PDGF beta receptor-sphingosine 1-phosphate receptor complexes in airway smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 278, 6282-6290
- Waters C.M., Long J., Gorshkova I., Fujiwara Y., Connell M., Belmonte K.E., Tigyi G., Nataraajan V., Pyne S., Pyne N.J. (2006) Cell migration activated by platelet-derived growth factor receptor is blocked by an inverse agonist of the sphingosine 1-phosphate receptor-1. *FASEB J.* 20, 509-511
- Wattenberg B.W., Pitson S.M., Raben D.M. (2006) The sphingosine and diacylglycerol kinase superfamily of signaling kinases: localization as a key to signaling function. *J. Lipid Res.* 47, 1128-1139

- Watterson K., Sankala H., Milstien S., Spiegel S. (2003) Pleiotropic actions of sphingosine-1-phosphate. *Prog. Lipid Res.* 42, 344
- Watterson K.R., Lanning D.A., Diegelmann R.F., Spiegel S. (2007) Regulation of fibroblast functions by lysophospholipid mediators: potential roles in wound healing. *Wound Repair Regen.* 15, 607-616
- Webster C., Blau H.M. (1990) Accelerated age-related decline in replicative life-span of Duchenne muscular dystrophy myoblasts: implications for cell and gene therapy. *Somat Cell Mol Genet* 16, 557-65
- Weigert A., Cremer S., Schmidt M.V., von Knethen A., Angioni C., Geisslinger G., Brüne B. (2010) Cleavage of sphingosine kinase 2 by caspase-1 provokes its release from apoptotic cells. *Blood* 115, 3531-3540
- Wijesinghe D.S., Massiello A., Subramanian P., Szulc Z., Bielawska A., Chalfant C.E. (2005) Substrate specificity of human ceramide kinase. *J Lipid Res* 46, 2706-2716
- Windh R.T., Lee M.J., Hla T., An S., Barr A.J., Manning D.R. (1999) Differential coupling of the sphingosine 1-phosphate receptors Edg-1, Edg-3, and H218/Edg-5 to the G(i), G(q), and G(12) families of heterotrimeric G proteins. *J. Biol. Chem.* 274, 27351-27358
- Wu G., Chen Y.G., Ozdamar B., Gyuricza C.A., Chong P.A., Wrana J.L., Massagué J., Shi Y. (2000) Structural basis of Smad2 recognition by the Smad anchor for receptor activation. *Science* 287, 92-97
- Wu J.W., Hu M., Chai J., Seoane J., Huse M., Li C., Rigotti D.J., Kyin S., Muir T.W., Fairman R., Massagué J., Shi Y. (2001) Crystal structure of a phosphorylated Smad2. Recognition of phosphoserine by the MH2 domain and insights on Smad function in TGF-beta signaling. *Mol. Cell* 8, 1277-1289
- Xia P., Gamble J.R., Wang L., Pitson S.M., Moretti P.A., Wattenberg B.W., D'Andrea R.J., Vadas M.A. (2000) An oncogenic role of sphingosine kinase. *Curr. Biol.* 10, 1527-1530
- Xia Z., Dickens M., Raingeaud J., Davis R.J., Greenberg M.E. (1995) Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270, 1326-1331
- Xin C., Ren S., Kleuser B., Shabahang S., Eberhardt W., Radeke H., Schäfer-Korting M., Pfeilschifter J., Huwiler A. (2004) Sphingosine 1-phosphate cross-activates the Smad signaling cascade and mimics transforming growth factor-beta-induced cell responses. *J. Biol. Chem.* 279, 35255-35262
- Xin C., Ren S., Eberhardt W., Pfeilschifter J., Huwiler A. (2006) The immunomodulator FTY720 and its phosphorylated derivative activate the Smad signalling cascade and upregulate connective tissue growth factor and collagen type IV expression in renal mesangial cells. *Br. J. Pharmacol.* 147, 164-174
- Yablonka-Reuveni Z., Balestreri T.M., Bowen-Pope D.F. (1990) Regulation of proliferation and differentiation of myoblasts derived from adult mouse skeletal muscle by specific isoforms of PDGF. *J. Cell Biol.* 111, 1623
- Yablonka-Reuveni Z., Rivera A.J. (1994) Temporal expression of regulatory and structural muscle proteins during myogenesis of satellite cells on isolated adult rat fibers. *Dev Biol* 164, 588-603
- Yamaguchi F., Tokuda M., Hatase O., Brenner S. (1996) Molecular cloning of the novel human G protein-coupled receptor (GPCR) gene mapped on chromosome 9. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 227, 608-614
- Yamanaka M., Shegogue D., Pei H., Bu S., Bielawska A., Bielawski J., Pettus B., Hannun Y.A., Obeid L., Trojanowska M. (2004) Sphingosine kinase 1 (SPHK1) is induced by transforming growth factor-beta and mediates TIMP-1 up-regulation. *J. Biol. Chem.* 279, 53994-54001

- Yoshida N., Yoshida S., Koishi K., Masuda K., Nabeshima Y. (1998) Cell heterogeneity upon myogenic differentiation: down-regulation of MyoD and Myf-5 generates 'reserve cells'. *J. Cell. Sci.* 111, 769-779
- Zammit P.S., Partridge T.A., Yablonka-Reuveni Z. (2006) The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold. *J Histochem Cytochem* 54, 1177-1191
- Zanin M., Germinario E., Dalla Libera L., Sandon D., Sabbadini R.A., Betto R., Danieli-Betto D. (2008) Trophic action of sphingosine 1-phosphate in denervated rat soleus muscle. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 294, C36-C46



## Appendix





# Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 Induces Transdifferentiation of Myoblasts into Myofibroblasts via Up-Regulation of Sphingosine Kinase-1/S1P<sub>3</sub> Axis

Francesca Cencetti,\*<sup>†</sup> Caterina Bernacchioni,\*<sup>†</sup> Paola Nincheri,\* Chiara Donati,\*<sup>††</sup> and Paola Bruni\*<sup>††</sup>

\*Dipartimento di Scienze Biochimiche, Università di Firenze, 50134, Firenze, Italy; and <sup>†</sup>Istituto Interuniversitario di Miologia, Firenze, Italy

Submitted September 21, 2009; Revised December 15, 2009; Accepted January 12, 2010  
Monitoring Editor: Kunxin Luo

The pleiotropic cytokine transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1 is a key player in the onset of skeletal muscle fibrosis, which hampers tissue repair. However, the molecular mechanisms implicated in TGF $\beta$ 1-dependent transdifferentiation of myoblasts into myofibroblasts are presently unknown. Here, we show that TGF $\beta$ 1 up-regulates sphingosine kinase (SK)-1 in C2C12 myoblasts in a Smad-dependent manner, and concomitantly modifies the expression of sphingosine 1-phosphate (S1P) receptors (S1PRs). Notably, pharmacological or short interfering RNA-mediated inhibition of SK1 prevented the induction of fibrotic markers by TGF $\beta$ 1. Moreover, inhibition of S1P<sub>3</sub>, which became the highest expressed S1PR after TGF $\beta$ 1 challenge, strongly attenuated the profibrotic response to TGF $\beta$ 1. Furthermore, downstream of S1P<sub>3</sub>, Rho/Rho kinase signaling was found critically implicated in the profibrotic action of TGF $\beta$ 1. Importantly, we demonstrate that SK/S1P axis, known to play a key role in myogenesis via S1P<sub>2</sub>, consequently to TGF $\beta$ 1-dependent S1PR pattern remodeling, becomes responsible for transmitting a profibrotic, antidifferentiating action. This study provides new compelling information on the mechanism by which TGF $\beta$ 1 gives rise to fibrosis in skeletal muscle, opening new perspectives for its pharmacological treatment. Moreover, it highlights the pleiotropic role of SK/S1P axis in skeletal myoblasts that, depending on the expressed S1PR pattern, seems capable of eliciting multiple, even contrasting biological responses.

## INTRODUCTION

Repair and maintenance of skeletal muscle depends on satellite cells, tissue resident stem cells that become activated after tissue injury and rapidly generate myoblasts that proliferate, migrate at the lesion site, fuse or differentiate into new myofibers (Hawke and Garry, 2001). However, the recovery of the injured skeletal muscle often is hindered by the development of fibrosis. Skeletal muscle fibrosis is a major pathological hallmark of chronic myopathies in which myofibers are replaced by progressive deposition of extracellular matrix proteins (Huard *et al.*, 2002; Sato *et al.*, 2003). Moreover, skeletal muscle traumas provoked by repetitive muscle contractions, laceration or denervation lead also to muscular fibrosis (Best and Hunter, 2000). A major role in the onset of fibrosis is exerted by myofibroblasts that result from transdifferentiation of muscle progenitor cells during the regenerative process (Li and Huard, 2002). Among the environmental stimuli released at the injured area, transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1 has been individuated as the major inducer of differentiation of myogenic cells into

fibrotic cells (Sato *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2004; Gosselin *et al.*, 2004); however, the molecular mechanisms responsible for the elicited biological response have not been so far investigated.

TGF $\beta$ 1, the prototypic member of a large family of multifunctional growth factors, regulates crucial events of development, disease, and repair (Rahimi and Leof, 2007). The mechanism by which TGF $\beta$ -related molecules elicit their multiple biological effects is quite complex and presently not fully elucidated. The cytokine signal is transduced via a heteromeric complex of two types of transmembrane serine/threonine kinase receptors that phosphorylate receptor-activated Smad proteins. Subsequently, the translocation into the nucleus of Smad complex and its association with additional transcriptional factors determines the transcriptional regulation of target genes (Massague and Wotton, 2000; Derynck and Zhang, 2003). The long-lasting action exerted by TGF $\beta$ 1 implies the triggering of a complex cascade of transcriptional events not fully characterized yet. Several recent studies have demonstrated that some of the effects elicited by TGF $\beta$ 1 are transmitted by the pathway initiated by enhancement of sphingosine kinase (SK), followed by intracellular generation of the bioactive lipid sphingosine 1-phosphate (S1P) (Watterson *et al.*, 2007). Once formed, S1P can in turn act as extracellular ligand of a panel of five distinct membrane receptors or as intracellular mediator (Alvarez *et al.*, 2007). In particular, it has been shown that the SK/S1P pathway is critically implicated in the mechanism by which TGF $\beta$  elicits invasive behavior of esophageal cancer cells (Miller *et al.*, 2008), antiapoptotic action in mesoangioblasts (Donati *et al.*, 2009), and profi-

This article was published online ahead of print in *MBC in Press* (<http://www.molbiolcell.org/cgi/doi/10.1091/mbc.E09-09-0812>) on January 20, 2010.

<sup>†</sup> These authors contributed equally to this work.

Address correspondence to: Paola Bruni (paola.bruni@unifi.it).

Abbreviations used: S1P, sphingosine 1-phosphate; SK, sphingosine kinase; SMA, smooth muscle actin; TGF, transforming growth factor.

brotic effect in various types of fibroblasts (Yamanaka *et al.*, 2004; Kono *et al.*, 2007; Gellings Lowe *et al.*, 2009). In this regard, up-regulation of SK1 has been found to be critical for the TGF $\beta$ 1-induced transcriptional regulation of the tissue inhibitor of metalloproteinase-1, which inhibits degradation of extracellular matrix in fibroblasts (Yamanaka *et al.*, 2004). Moreover, recent reports have shown that SK1 plays a role in TGF $\beta$ 1-dependent extracellular matrix remodeling and myofibroblast differentiation of lung fibroblasts (Kono *et al.*, 2007), and collagen production by cardiac fibroblasts (Gellings Lowe *et al.*, 2009).

Previously, we have established that SK1/SIP $_2$  axis is required for serum withdrawal-induced myogenic differentiation of myoblasts (Meacci *et al.*, 2008). Moreover, the prodifferentiating effect exerted by low doses of tumor necrosis factor- $\alpha$  in mouse myoblasts was found to rely on the triggering of SK/SIP $_2$  pathway (Donati *et al.*, 2007b). However, at present is not known whether SK is regulated by TGF $\beta$ 1 in myoblasts and eventually participates to its biological action. The well-established profibrotic action of TGF $\beta$ 1 together with the emerging role of SK/SIP axis as TGF $\beta$ -regulated signaling pathway spurred us to investigate whether TGF $\beta$ 1 regulates SK in myoblasts and whether it has any role in its biological response.

Data reported here show for the first time that TGF $\beta$ 1 simultaneously up-regulates SK1 and profoundly modifies SIP receptor (SIPR) expression in mouse myoblasts. Importantly, SIP $_3$ , which becomes the dominant signaling receptor upon TGF $\beta$ 1 challenge, seems to be critically implicated in the transdifferentiation of myoblasts into myofibroblasts. These results represent the first experimental evidence that induction of SK1/SIP $_3$  axis, subsequent to SIPR expression pattern remodelling, is exploited by TGF $\beta$ 1 to carry on cell transdifferentiation. Importantly, they open new perspectives for pharmacological treatment of skeletal muscle fibrosis.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Biochemicals, TRI Reagent, cell culture reagents, DMEM, fetal calf serum (FCS), protease inhibitor cocktail, bovine serum albumin (BSA), monoclonal anti- $\alpha$ -smooth muscle actin (SMA) antibodies, monoclonal anti-skeletal fast myosin heavy chain (MHC) (clone MY-32), and tetramethylrhodamine B isothiocyanate (TRITC)-phalloidin conjugate were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Mouse skeletal muscle C2C12 cells were obtained from the European Collection of Cell Cultures (Salisbury, UK). TGF $\beta$ 1 was purchased from PeproTech (London, United Kingdom). SKI-2 [2-(*p*-hydroxyanilino)-4-(*p*-chlorophenyl)thiazole], U0126, Y27632, and *D*-erythro-SIP were from Calbiochem, (San Diego, CA). Short interfering RNA (siRNA) duplexes corresponding to two DNA target sequences of mouse SK1 (5'-UAGGAACUGGGCCUUAAdTdT-3', 5'-GUGUUUGCAUCUGUUCUAdTdT3'); mouse SIP $_2$  (5'-CUCUGUACGUCCGAUUAAdTdT3', 5'-GACUAAUCAGAUUGUAGUAdTdT3'); mouse SIP $_3$  (5'-CCAUAUGAUGCCAACAAGATT3', 5'-GUAAGUCAAGCUCCAGUAATT3'); mouse SIP $_4$  (5'-CUGCAUAACAACACUGATT3', 5'-CUGACAUCUUUGGUUCUUAATT3'); scrambled siRNA (5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT3'); mouse Smad2 (5'-GAUUUGAGCCACAGAGUAAdTdT3', 5'-UUAUCUCUGGGCUCAAUUCdTdT3'); mouse Smad3 (5'-CAGUUCUACCUCCAGUUGUdTdT3', 5'-AACACUGGAGGUAGAACUGdTdT3'); and mouse Smad4 (5'-CGAUUCAAACCAUCCAAdTdT3', 5'-UGUUGGAUGGUUUGAUAUCdTdT3') were from Sigma-Prolog (The Woodlands, TX). Semiquantitative polymerase chain reaction (PCR) primers for SK1 (forward, 5'-CTTCTGGCTCGGCTCAATTCGT3'; reverse, 5'-GAAAGCAACACCGGCAACA3') (502 base pairs) and SK2 (forward, 5'-TTGCCCTCACCTACAACAACAAG3'; reverse, 5'-CTCTGTAAAGCCGCTGTCCA3') (504 base pairs) were obtained from Sigma-Prolog. Oligofectamine Reagent and Lipofectamine RNAiMAX were purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA). Enhanced chemiluminescence (ECL) reagents and [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP (3000 Ci/mmol) were obtained from GE Healthcare Europe (Milan, Italy). [ $^3$ -H]Sphingosine, *D*-erythro (19.8 Ci/mmol), was from PerkinElmer Life and Analytical Sciences (Boston, MA). Secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase, monoclonal anti-RhoA, polyclonal anti-laminin, and polyclonal anti-Smad2/3

antibodies were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Goat anti-transgelin antibodies were from Everest Biotech (Upper Heyford, Oxfordshire, United Kingdom). Monoclonal antibodies against  $\beta$ -actin were from Cytoskeleton (Denver, CO). Monoclonal anti-caveolin-3 and anti-hemoagglutinin (HA) antibodies were from BD Biosciences Transduction Laboratories (Lexington, KY). Polyclonal antibodies anti-Smad4 were purchased from Cell Signaling Technology (Danvers, MA). Fluorescein-conjugated horse anti-mouse secondary antibodies were obtained from Vector Laboratories (Burlingame, CA). The specific SIP $_{1/3}$  antagonist VPC20319 and the selective SIP $_1$  antagonist W146 were from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). All reagents and probes required to perform real-time PCR were from Applied Biosystems (Foster City, CA). pcDNA3-SIP $_3$  vector was a kind gift of Prof. Y. Igarashi (Hokkaido University, Sapporo, Japan).

### Cell Culture

Murine C2C12 myoblasts were routinely grown in DMEM supplemented with 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100  $\mu$ g/ml streptomycin at 37°C in 5% CO $_2$ . For myofibroblast transdifferentiation and myogenic differentiation experiments, cells were seeded in p35 or in p60 plates and when 90% confluent they were shifted to DMEM without serum containing 1 mg/ml BSA.

### Sphingosine Kinase Activity Assay

SK activity was measured as described in Olivera *et al.* (1994) with few modifications, as described previously (Donati *et al.*, 2007b). Specific activity of SK was expressed as picomoles of SIP formed per minute per milligram of protein.

### Western Blot Analysis

Cell lysates, cytosolic and membrane fractions, were prepared from confluent serum-starved C2C12 myoblasts as described previously (Meacci *et al.*, 2000) and then subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and Western analysis (Donati *et al.*, 2005). Specific anti-SK1 polyclonal antibodies (directed against the 16 carboxy-terminal amino acids of the mouse SK1, kindly provided by Dr. Y. Banno, Gifu University School of Medicine, Gifu, Japan; Murate *et al.*, 2001) were used to immunodetect endogenous SK1. Rabbit polyclonal antibodies generated against SK2 (Igarashi *et al.*, 2003) were a kind gift of Dr. S. Nakamura (Department of Molecular and Cellular Biology, Kobe University Graduate School of Medicine, Kobe, Japan). The expression of fibrosis markers and myogenic differentiation markers was evaluated on total cell lysates (20  $\mu$ g) after 24 and 48 h agonist challenge, respectively. Equally loaded protein was checked by expression of the nonmuscle-specific  $\beta$  isoform of actin. The evaluation of RhoA subcellular localization was performed by Western blotting analysis of membrane and cytosolic fractions (10  $\mu$ g) with a specific monoclonal anti-RhoA antibody.

### Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

Total RNA (2  $\mu$ g), extracted with TRI Reagent from C2C12 myoblasts was reverse transcribed using SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen) and subjected to PCR using SIP $_1$  (1090 base pairs), SIP $_2$  (336 base pairs), SIP $_3$  (225 base pairs), SIP $_4$  (324 base pairs), and  $\beta$ -actin (250 base pairs) PCR primers as described previously (Donati *et al.*, 2007a).  $\beta$ -Actin was used as an internal reference control to normalize relative levels of gene expression.

### Quantitative Real-Time Reverse Transcription (RT)-PCR

The quantification of SIPR mRNA was performed by Real-Time PCR employing TaqMan Gene Expression Assays. Each measurement was carried out in triplicate, using the automated ABI Prism 7700 Sequence Detector System (Applied Biosystems, Foster City, CA), as described previously (Donati *et al.*, 2007a), by simultaneous amplification of the target sequence (SIP $_1$  Mm00514644\_m1, SIP $_2$  Mm01177794\_m1, SIP $_3$  Mm00515669\_m1, and SIP $_4$  Mm00468695\_s1; Applied Biosystems) together with the housekeeping gene 18S rRNA. Results were analyzed by ABI Prism Sequence Detection System software, version 1.7 (Applied Biosystems). The 2 $^{-\Delta\Delta CT}$  method was applied as a comparative method of quantification (Livak and Schmittgen, 2001), and data were normalized to ribosomal 18S RNA expression.

### Lipid Analysis

Cell sphingolipids were labeled with [ $^3$ -H]sphingosine (0.1  $\mu$ Ci/ml for 48 h at 37°C), extracted, and separated on high performance-thin layer chromatography (HPTLC) essentially as described in Kihara *et al.*, (2003). Radioactive lipids were identified by comigration with standard lipids and quantified by a Beta-Imager 2000 instrument (Biospace, Paris, France), with an acquisition time of 48 h, essentially as described in Prinetti *et al.* (2000). The radioactivity associated with individual lipids was determined with the specific  $\beta$ -Vision software (Biospace).

### Immunostaining and Fluorescence Microscopy

C2C12 cells were seeded on microscope slides, precoated with 2% gelatin, and then treated or not with 10  $\mu$ M SKI-2, 60 min before 5 ng/ml TGF $\beta$ 1 treat-

ment. After 24 h cells were fixed in 2% paraformaldehyde in PBS for 20 min and permeabilized in 0.1% Triton X-100-PBS for 30 min. Cells were then blocked in 3% BSA for 1 h and incubated with anti- $\alpha$ -SMA antibody for 2 h and fluorescein-conjugated anti-mouse secondary antibody for 1 h. To stain F-actin filaments, the specimen was incubated with TRITC-phalloidin for 40 min. Images were obtained using an SP5 laser scanning confocal microscope (Leica, Wetzlar, Germany) with a 63 $\times$  objective.

### Cell Transfection

Cells grown into six-well dishes (60,000 cells/well), were transfected with siRNA duplexes using Oligofectamine Reagent transfection system, as described previously (Donati *et al.*, 2007b). In some experiments, cells were transfected using Lipofectamine RNAiMAX, according to manufacturer's instructions. In brief, Lipofectamine RNAiMAX was incubated with siRNA in DMEM without serum and antibiotics at room temperature for 20 min, and afterward the lipid/RNA complexes were added with gentle agitation to C2C12 cells to a final concentration of 50 nM in serum containing DMEM. After 24 h, cells were shifted to DMEM without serum containing 1 mg/ml BSA and then used for the experiments within 48 h from the beginning of transfection. The specific gene knockdown was evaluated by Western blot analysis or alternatively by real-time RT-PCR.

For S1P<sub>3</sub> overexpression, C2C12 cells were transiently transfected with pcDNA3-S1P<sub>3</sub> vector using Lipofectamine 2000 reagent (1 mg/ml), as described previously (Meacci *et al.*, 2003). Ectopic S1P<sub>3</sub> expression levels were evaluated by Western blot analysis using specific monoclonal anti-HA antibodies.

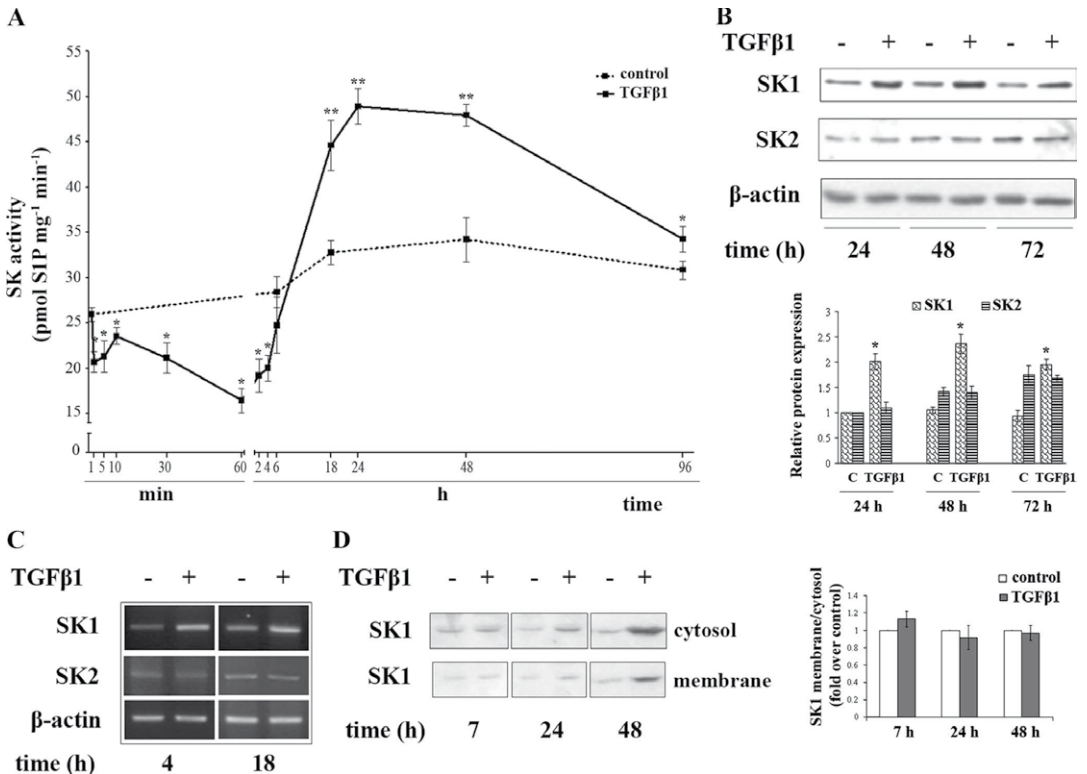
### Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using Student's *t* test. Graphical representations were performed using Excel software (Microsoft, Redmond, WA) and Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). Densitometric analysis of the Western blot bands was performed using imaging and analysis software Quantity One (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Asterisks indicate statistical significance (\**p* < 0.05 and \*\**p* < 0.001).

## RESULTS

### TGFβ1 Regulates SK1 and Sphingolipid Metabolite Levels in C2C12 Myoblasts

The SK/S1P pathway is important in the regulation of cell fate of multiple cell types and has been already found im-



**Figure 1.** TGFβ1 affects SK activity and induces SK1 expression. Confluent C2C12 myoblasts were incubated with DMEM containing 1 mg/ml BSA for the indicated time intervals in the presence of 5 ng/ml TGFβ1. (A) Aliquots of cell extracts (50 μg) were used to determine SK activity. Data represent the mean ± SEM of three independent experiments each performed at least in duplicate. The effect of TGFβ1 was statistically significant by Student's *t* test (\**p* < 0.05, \*\**p* < 0.001). (B) Top, aliquots of total cell lysates (20 μg) were used to perform Western analysis, using specific anti-SK1 and anti-SK2 antibodies. A representative blot is shown. Bottom, densitometric analysis of at least three independent experiments. Data are the mean ± SEM and are reported as protein expression normalized to β-actin, -fold change over control. (C) Two micrograms of total RNA was subjected to semiquantitative RT-PCR analysis, using specific primers for SK1, SK2, and β-actin. (D) Left, Western analysis of SK1 was performed in membrane and cytosolic fractions prepared from myoblasts treated (+) or not (-) with 5 ng/ml TGFβ1 for the indicated time intervals. A blot representative of three independent experiments with analogous results is shown. Right, densitometric analysis of three independent experiments. Data reported are the mean ± SEM of membrane:cytosol ratio to respective control set as 1.

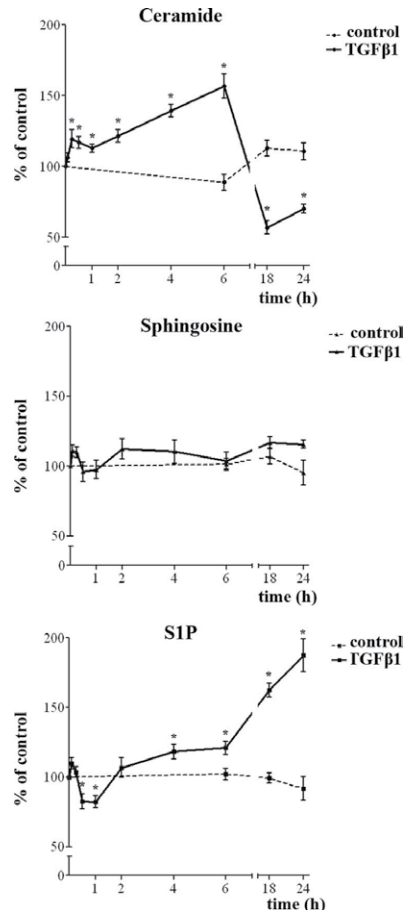
plicated in myogenic differentiation of mouse myoblasts (Donati *et al.*, 2005; Meacci *et al.*, 2008); however, its involvement in TGF $\beta$ 1 action in these cells has not been so far investigated. To explore this issue, at first we examined whether the cytokine was capable of regulating SK activity in C2C12 cells. Experimental data illustrated in Figure 1A show that cell treatment with 5 ng/ml TGF $\beta$ 1 exerted a biphasic effect on SK activity. The enzymatic activity was moderately reduced at early time points (1 min–4 h range), whereas it was significantly enhanced at 18 h and still clearly appreciable at 48 h. These data are in agreement with a previous report in which the cytokine was found to reduce fibroblast SK activity and S1P cellular content within the first hour of incubation, whereas it enhanced SK activity at more prolonged times of incubation (Yamanaka *et al.*, 2004). Given that the time course of TGF $\beta$ 1-dependent increase of SK activity was compatible with transcriptional regulation of SK1 or SK2, to verify this possibility Western analysis of both proteins was performed. As shown in Figure 1B, TGF $\beta$ 1 treatment for 24–72 h resulted in a sustained marked increase of SK1 protein content. Instead, SK2 protein content, which was time-dependently increased by serum starvation, was not changed by the cytokine possibly due to its proapoptotic role (Igarashi *et al.*, 2003).

In agreement with the augmented protein content, SK1 mRNA levels, measured by semiquantitative PCR assay, were enhanced already at 4 h after TGF $\beta$ 1 challenge, and the stimulatory effect of the cytokine was maintained at 18 h (Figure 1C). Figure 1C also shows that mRNA content of SK2 was unaffected. Given that stimulation of SK activity by multiple agonists resides on enzyme translocation to membrane, eventual TGF $\beta$ 1-induced intracellular redistribution of SK1 also was explored. Western analysis of SK1 performed in cytosolic and membrane fractions of myoblasts incubated with 5 ng/ml TGF $\beta$ 1 for various time intervals revealed that the cytokine increased at similar extent SK1 protein content of cytosolic and membrane fractions (Figure 1D), thus not specifically affecting an intracellular pool of SK1. These results demonstrate that the sustained increase of SK activity elicited by TGF $\beta$ 1 is exclusively attributable to the up-regulation of SK1 expression.

To further examine the effect of TGF $\beta$ 1 on sphingolipid metabolism, myoblasts, previously steady-state metabolically labeled with [ $^3$ H]sphingosine, were administered with the cytokine (5 ng/ml) for various time intervals and then subjected to lipid extraction and HPTLC separation followed by digital autoradiography to quantify the various labeled sphingolipid metabolites. Data presented in Figure 2 show that [ $^3$ H]ceramide levels were enhanced by TGF $\beta$ 1 within 6 h, whereas at more prolonged times (18–24 h) they were significantly reduced. In parallel, [ $^3$ H]sphingosine levels were not appreciably modified throughout the incubation. Interestingly, treatment with TGF $\beta$ 1 at 18 and 24 h raised [ $^3$ H]S1P levels by ~60%. Thus, consistently with the complex regulation of SK activity, TGF $\beta$ 1 elicited changes of cellular bioactive sphingolipid metabolite levels.

#### Involvement of SK1 in the Profibrotic Effect of TGF $\beta$ 1

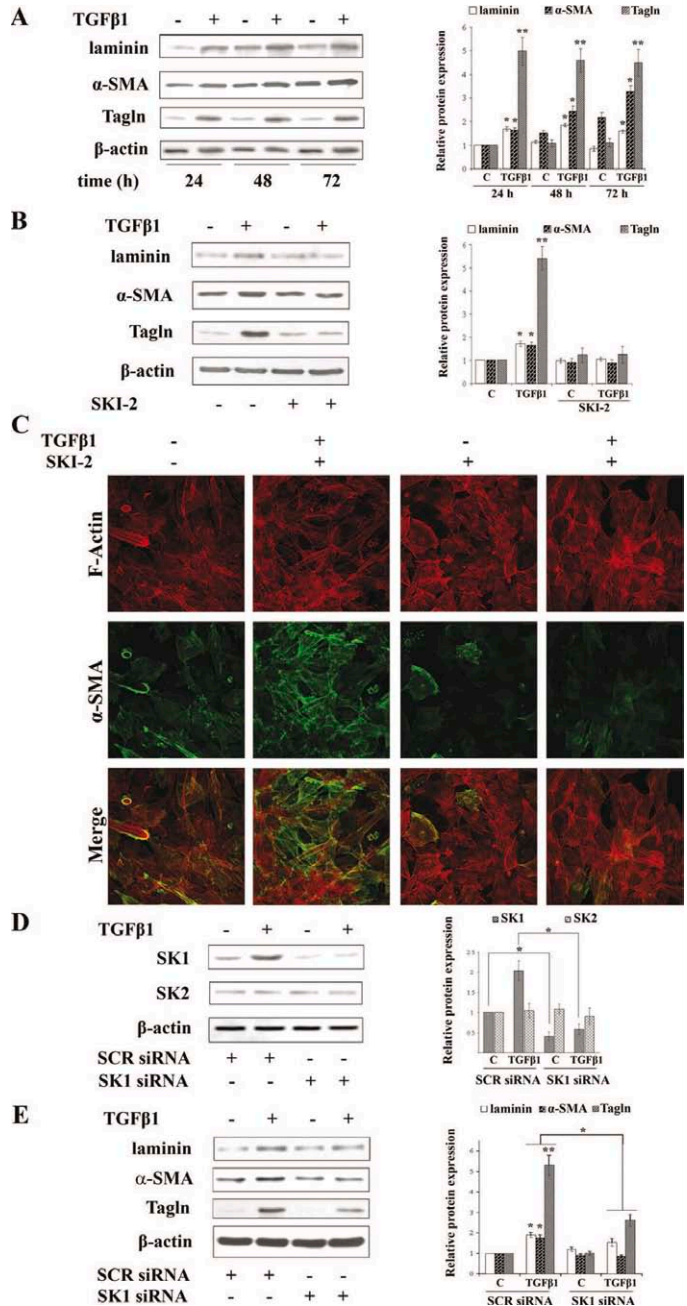
To assess the ability of TGF $\beta$ 1 to promote the transdifferentiation of myoblasts into myofibroblasts, the expression of fibrosis marker proteins such as  $\alpha$ -SMA, laminin, and transgelin in C2C12 myoblasts was evaluated. Western analysis data presented in Figure 3A show that the expression of  $\alpha$ -SMA and laminin in untreated cells underwent to a time-dependent increase, in agreement with their transient expression in skeletal myoblasts during differentiation (Olwin and Hall, 1985; Woodcock-Mitchell *et al.*, 1988); moreover,



**Figure 2.** TGF $\beta$ 1 affects sphingolipid metabolite levels in C2C12 myoblasts. C2C12 myoblasts were labeled for 48 h with [ $^3$ H]sphingosine. Cellular lipids were extracted, separated, and analyzed as described in *Materials and Methods* section. Data represent the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments.

the expression levels of all the chosen markers were appreciably enhanced by 5 ng/ml TGF $\beta$ 1 at all the examined time intervals. In particular, TGF $\beta$ 1 exerted a remarkable effect on transgelin whose levels were barely detectable in controls, whereas they were highly augmented in the cytokine-treated myoblasts. These data were in full agreement with a previous report (Li *et al.*, 2004), in which the profibrotic action of TGF $\beta$ 1 in C2C12 cells was described for the first time.

Next, the potential role of TGF $\beta$ 1-dependent up-regulation of SK1 in the profibrotic action of the cytokine was examined. For this purpose, C2C12 myoblasts were treated with SKI-2, a specific pharmacological inhibitor of SK, already successfully used to block the enzymatic activity in these cells (Donati *et al.*, 2007b). As shown in Figure 3B, enhanced expression of  $\alpha$ -SMA, laminin, and transgelin induced by 24-h treatment with TGF $\beta$ 1 was completely reversed by preincubation with 10  $\mu$ M SKI-2. Confocal immu-

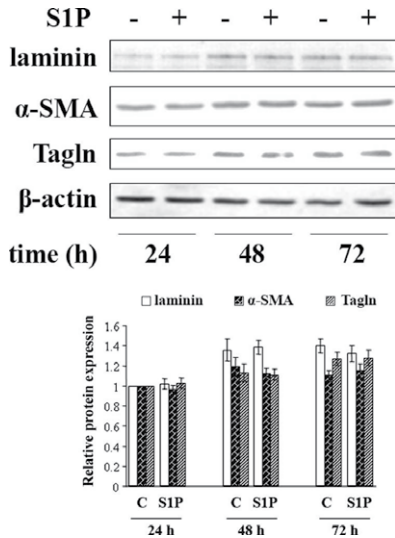


**Figure 3.** SK1 is involved in TGFβ1-dependent transdifferentiation of C2C12 myoblasts. (A) Left, C2C12 myoblasts were incubated in the absence (–) or in the presence (+) of 5 ng/ml TGFβ1 for the indicated time intervals. The content of laminin, α-SMA and transgelin (Tagln) was analyzed by Western blotting in cell lysates, using specific primary antibodies. Right, densitometric analysis. Data are reported as described in the legend to Figure 1B. (B) Left, C2C12 myoblasts were incubated in the presence of 10 μM SKI-2 60 min before 5 ng/ml TGFβ1 challenge for 24 h. Fibrosis marker proteins were detected as described in A. Right, densitometric analysis. Data are reported as described in the legend to Figure 1B. (C) C2C12 cells were seeded on microscope slides and treated as described in B. Images were obtained using a specific mouse anti-α-SMA antibody immunorevealed by a fluorescein-conjugated secondary antibody and TRITC-phalloidin staining of F-actin filaments (images are representative of three separate experiments). (D) Left, C2C12 myoblasts, transfected with scrambled (SCR) or SK1 siRNA, incubated in the absence (–) or in the presence (+) of 5 ng/ml TGFβ1 for the last 24 h of transfection, were checked for expression of SK1 or SK2 by Western blot analysis. Densitometric analysis is showed in the right panel. (E) Left, fibrosis marker proteins were detected as described in A in lysates (20 μg) of C2C12 myoblasts transfected as described in D. Right, densitometric analysis. Data are reported as described in the legend to Figure 1B.

nonfluorescent analysis revealed the marked enhanced expression of α-SMA in C2C12 cells treated with 5 ng/ml TGFβ1 for 24 h, which resulted mainly localized with F-actin filaments (Figure 3C). In agreement, SKI-2 treatment (10

μM) completely prevented the cytokine-induced expression of α-SMA. To further assess the involvement of SK1 in the biological response evoked by TGFβ1 in C2C12 myoblasts, SK1 was knocked down by employing siRNA technology. In





**Figure 4.** S1P does not induce transdifferentiation of C2C12 myoblasts. C2C12 myoblasts were incubated in the absence (–) or in the presence (+) of 1  $\mu$ M S1P for the indicated time intervals. Top, the content of laminin,  $\alpha$ -SMA, and transgelin (Tagln) was analyzed by Western blotting in cell lysates, using specific primary antibodies. Bottom, densitometric analysis is reported as described in the legend to Figure 1B.

accordance with previous reports (Donati *et al.*, 2007b; Meacci *et al.*, 2008), specific siRNA treatment efficaciously reduced basal expression levels of SK1 (Figure 3D); moreover, it fully inhibited the TGF $\beta$ 1-induced SK1 up-regulation, without affecting SK2 protein content. In agreement, the TGF $\beta$ 1-dependent expression increase of laminin and  $\alpha$ -SMA was totally abrogated when SK1 was down-regulated by RNA interference, whereas transgelin content was robustly decreased (Figure 3E), further supporting the key role of SK1 in the transdifferentiation of myoblasts into myofibroblasts brought about by TGF $\beta$ 1.

Because S1P acts as profibrotic mediator in various cell types, such as cultured fibroblasts and retinal pigmented epithelial cells (Urata *et al.*, 2005; Keller *et al.*, 2007; Swaney *et al.*, 2008), the effect of exogenous S1P on fibrosis marker proteins was then investigated. Treatment of myoblasts with 1  $\mu$ M S1P for various time intervals did not influence the expression of  $\alpha$ -SMA, laminin, or transgelin (Figure 4). Analogous results were obtained employing S1P in the concentration range 1–100 nM (data not shown). Thus, TGF $\beta$ 1-directed transdifferentiation of myoblasts into myofibroblasts required up-regulation of SK1 but was not mimicked by the addition with exogenous S1P, suggesting that the implicated mechanism could rely on additional molecular effects exerted by TGF $\beta$ 1 on SK/S1P signaling pathway.

**Profibrotic Effect of TGF $\beta$ 1 Is Dependent on S1PR Expression Change**

To gain further insight into the mechanism by which TGF $\beta$ 1 can exploit SK/S1P axis to exert its profibrotic effect in myoblasts, we examined whether cell treatment with the cytokine affected S1PR expression pattern. Notably, semi-quantitative PCR analysis depicted in Figure 5A shows that

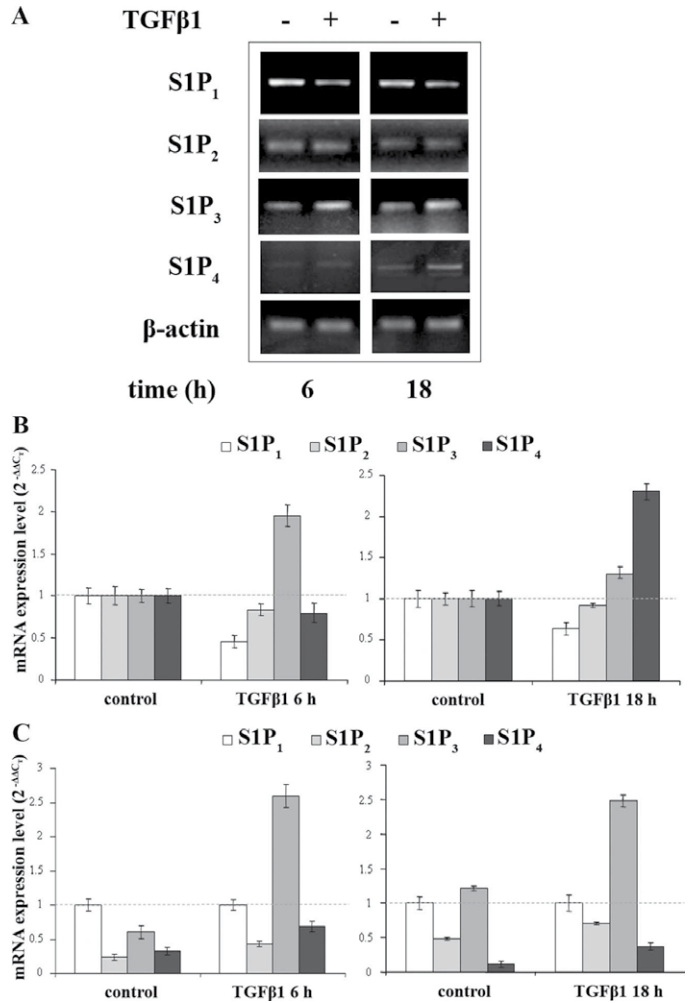
incubation of myoblasts for 6 or 18 h in the presence of 5 ng/ml TGF $\beta$ 1, apparently reduced the band corresponding to S1P<sub>1</sub>; increased that of S1P<sub>3</sub>; and rendered clearly detectable a band of 324 base pairs, corresponding to S1P<sub>4</sub>. More importantly, quantitative analysis of S1PR expression performed by real-time PCR confirmed that TGF $\beta$ 1 strongly modified S1PR mRNA expression levels. In particular, it markedly reduced S1P<sub>1</sub> and at a lesser extent S1P<sub>2</sub>, at 6 and 18 h of incubation, whereas it highly increased S1P<sub>3</sub> at both time intervals and very potently up-regulated S1P<sub>4</sub> mRNA levels at 18 h (Figure 5B). As a consequence, when the expression of each S1PR was referred to that of S1P<sub>1</sub> to calculate the ranking order, the obtained profile in untreated myoblasts was S1P<sub>1</sub> > S1P<sub>3</sub> > S1P<sub>2</sub>  $\gg$  S1P<sub>4</sub>, whereas it became S1P<sub>3</sub> > S1P<sub>1</sub> > S1P<sub>4</sub> > S1P<sub>2</sub> in TGF $\beta$ 1-treated cells at 6 h and S1P<sub>3</sub> > S1P<sub>1</sub> > S1P<sub>2</sub> > S1P<sub>4</sub> at 18 h (Figure 5C).

Because the profound alteration of S1PR pattern provoked by TGF $\beta$ 1 could be implicated in the cross-talk between the cytokine and the S1P signaling pathway, next we examined whether the profibrotic action exerted by TGF $\beta$ 1 was S1PR-mediated. For this purpose, the expression of fibrosis marker proteins was evaluated in C2C12 cells challenged with TGF $\beta$ 1 in the presence or absence of 1  $\mu$ M VPC23019, selective S1P<sub>1</sub>/S1P<sub>3</sub> antagonist or 10  $\mu$ M W146, selective antagonist of S1P<sub>1</sub>. Results illustrated in Figure 6, A and B, show that the increased content of  $\alpha$ -SMA, laminin or transgelin after TGF $\beta$ 1 treatment was abrogated when S1P<sub>1</sub> and S1P<sub>3</sub> were blocked but was not affected by inhibition of S1P<sub>1</sub>, suggesting a role of S1P<sub>3</sub> but not S1P<sub>1</sub> in TGF $\beta$ 1-induced response. To further support this hypothesis, individual S1PRs were knocked down by specific siRNA. Notably, as shown in Figure 6C, siRNA directed against S1P<sub>3</sub>, which significantly reduced the receptor expression, strongly attenuated the enhancement of laminin and transgelin levels elicited by TGF $\beta$ 1 and abrogated the increase of  $\alpha$ -SMA. Conversely, the down-regulation of S1P<sub>2</sub> or S1P<sub>4</sub> by specific siRNA did not alter the profibrotic effect of the cytokine (Figure 6, D and E). Altogether, these data support the view that transactivation of S1P<sub>3</sub> by TGF $\beta$ 1 is critical for the induction of myofibroblastic phenotype.

To confirm the importance of S1P<sub>3</sub> in TGF $\beta$ 1-induced myofibroblast transdifferentiation, we studied whether exogenous S1P rescued the effect of TGF $\beta$ 1 in myoblasts where the production of endogenous S1P was blocked. As it can be observed from Figure 7, A and B, in cells in which SK was inhibited by 10  $\mu$ M SKI-2 administration or SK1 was specifically silenced prior cell challenge with 5 ng/ml TGF $\beta$ 1, treatment with 1  $\mu$ M S1P 6 h after the addition of the cytokine partially restored the stimulatory effect of TGF $\beta$ 1 on transgelin expression. Importantly, S1P could not rescue the up-regulation of transgelin brought about by TGF $\beta$ 1 in cells where SK was pharmacologically inhibited and S1P<sub>3</sub> specifically silenced by siRNA administration (Figure 7C). Moreover, in contrast to what observed in native cells (Figure 4), S1P challenge of S1P<sub>3</sub>-overexpressing myoblasts provoked an appreciable increase of transgelin expression, whereas the profibrotic response elicited by TGF $\beta$ 1 was significantly enhanced (Figure 7D). These data provide further experimental evidence that up-regulation of S1P<sub>3</sub> by TGF $\beta$ 1 is required to readress S1P signaling toward the onset of myofibroblastic phenotype.

**Up-Regulation of SK1/S1P<sub>3</sub> Induced by TGF $\beta$ 1 Is Smad Dependent**

Given that Smad proteins transmit most of the transcriptional effect exerted by TGF $\beta$ 1, subsequently their implication in the up-regulation of SK1 and/or S1P<sub>3</sub> by TGF $\beta$ 1 was



**Figure 5.** TGFβ1 modulates the expression of S1PRs. (A) Two micrograms of total RNA extracted from C2C12 myoblasts stimulated (+) or not (-) with 5 ng/ml TGFβ1 for the indicated time intervals was subjected to semiquantitative RT-PCR analysis, using specific primers for S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub>, S1P<sub>3</sub>, S1P<sub>4</sub>, and β-actin. (B) Quantitative mRNA analysis was performed by real-time PCR in total RNA extracted from C2C12 myoblasts stimulated (+) or not (-) with 5 ng/ml TGFβ1 for the indicated time intervals. S1PR mRNA quantitation was based on the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method, using individual S1PR subtype of the unchallenged specimen as calibrator. (C) Quantitative mRNA analysis was performed as described in B. Results are expressed as -fold changes according to the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method, using S1P<sub>1</sub> as calibrator. Data are the mean  $\pm$  SD of one representative experiment performed in triplicate and repeated three times with analogous results.

examined. For this purpose, myoblasts transfected with specific siRNAs, capable of significantly attenuating the expression of Smad2, Smad3, or Smad4 (Figure 8A), were tested for the responsiveness to TGFβ1 in regard to up-regulation of SK1/S1P<sub>3</sub> axis. As shown in Figure 8B, silencing of Smad2, Smad3, or Smad4 blunted the TGFβ1-dependent increase of SK1 protein content at 24 h; moreover, it also abolished the enhancement of S1P<sub>3</sub> mRNA content elicited at the same time of incubation (Figure 8C). In agreement with these results, silencing of Smad2 or Smad3 strongly attenuated the expression of transgelin, which was fully abolished by Smad4 knockdown (Figure 8B).

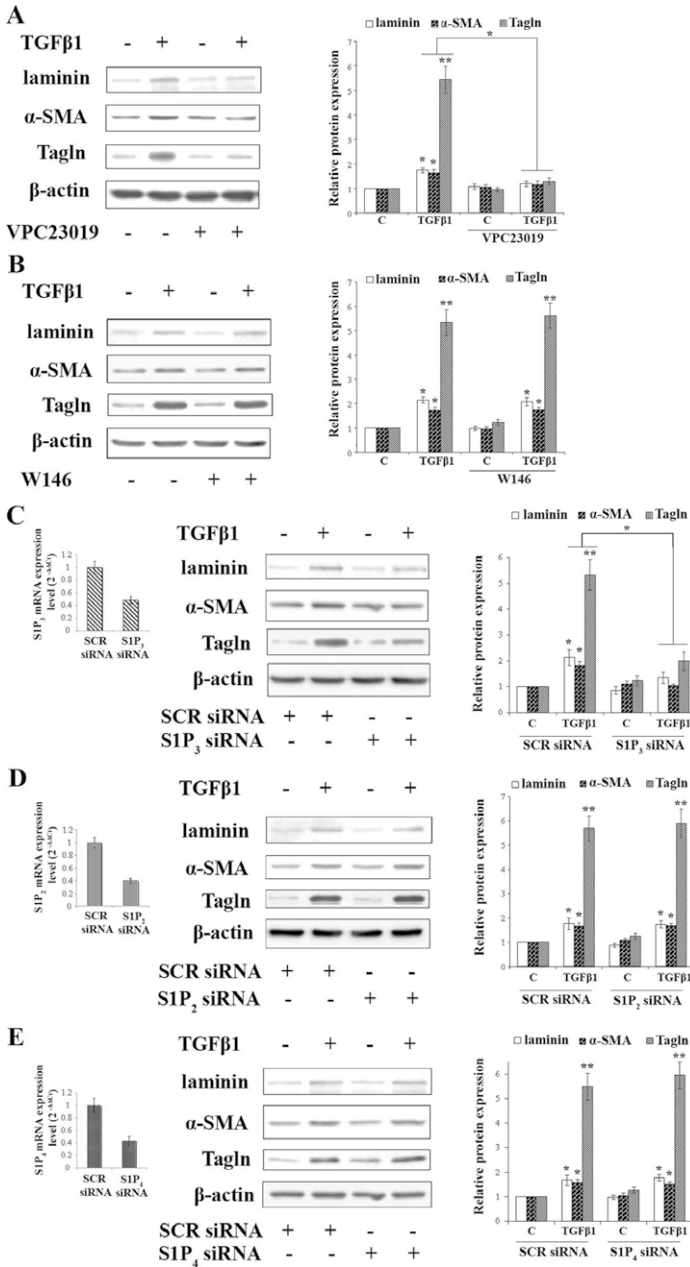
#### **Profibrotic Response Elicited by TGFβ1 Is Downstream of Rho/Rho Kinase Pathway**

Next, to investigate the signaling pathways downstream of SK1/S1P<sub>3</sub> axis implicated in the TGFβ1-directed myoblast transdifferentiation into myofibroblasts, cells were incu-

bated with compounds such as U0126 (10 μM) or Y27632 (25 μM), which specifically inhibit extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2 and Rho kinase pathway, respectively. As shown in Figure 9A, prevention of ERK1/2 or Rho kinase activation did not impair TGFβ1-induced SK1, but Rho kinase inhibition strongly reduced the positive effect of the cytokine on transgelin protein content. Thus, these results suggest that Rho kinase is downstream of SK1 induction and upstream of fibrosis marker expression triggered by TGFβ1.

Because Rho kinase activity relies on stimulation by RhoA, it was then examined the effect of TGFβ1 on RhoA intracellular distribution, a validated procedure to assess the entity of active GTP-bound RhoA in C2C12 myoblasts (Meacci *et al.*, 2000). As illustrated in Figure 9B, 5 ng/ml TGFβ1 provoked an early increase of membrane-bound RhoA, evident already at 1 h of incubation, and a more delayed effect clearly appreciable at 8 h, still detectable at 16 h. Interestingly, preincubation with 10 μM SKI-2 did not affect the

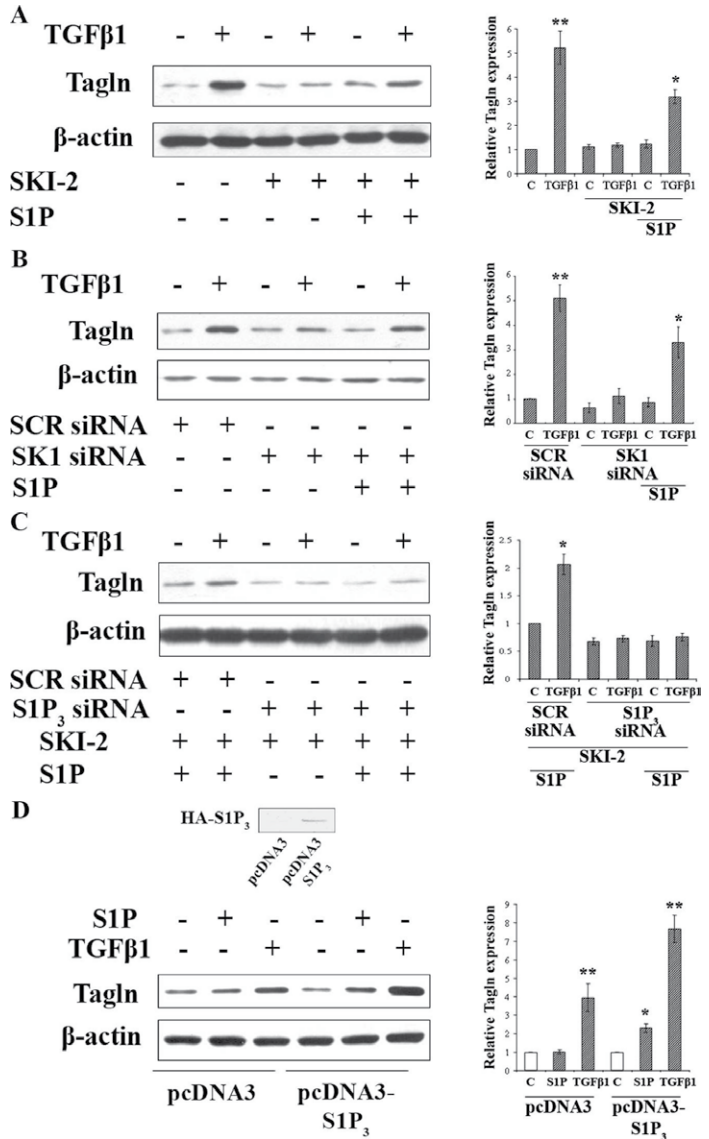




**Figure 6.** Role of S1PRs in TGFβ1-induced transdifferentiation of C2C12 myoblasts. (A) Left, confluent serum-starved C2C12 myoblasts were treated with or without 1 μM VPC23019 30 min before 5 ng/ml TGFβ1 challenge for 24 h. The content of laminin, α-SMA, and transgelin (Tagln) was analyzed by Western blotting of whole cell lysates (20 μg). Right, densitometric analysis. Data are reported as described in the legend to Figure 1B. (B) Left, confluent serum-starved C2C12 myoblasts were treated with or without 10 μM W146, 30 min before 5 ng/ml TGFβ1 challenge for 24 h. Fibrosis marker proteins were detected as described in A. Right, data are reported as described in the legend to Figure 1B. (C) C2C12 myoblasts, transfected with scrambled (SCR) or SIP<sub>3</sub> siRNA, incubated in the absence (-) or in the presence (+) of 5 ng/ml TGFβ1 for the last 24 h of transfection, were checked for down-regulation by real-time PCR (left). Middle, fibrosis marker proteins were analyzed as described in A. Right, densitometric analysis. Data are reported as described in the legend to Figure 1B. Myoblasts transfected with SCR or SIP<sub>2</sub> siRNA (D) and with SCR or SIP<sub>4</sub> siRNA (E) were treated and used as described in C.

early RhoA activation but abrogated the delayed activation, indicating that SK activation was upstream of this TGFβ1-driven molecular event. Moreover, the enhancement of membrane-bound RhoA induced by 8-h TGFβ1 treatment was prevented by previous cell incubation with 1 μM VPC23019 (Figure 9C). These findings were corroborated by

results obtained in myoblasts where SK1 or SIP<sub>3</sub> were knocked down by transfection with specific siRNA. Both experimental conditions prevented TGFβ1-dependent RhoA association to membrane at 8 h of incubation (Figure 9D). These data strongly support the view that up-regulation of SK1 as well as SIP<sub>3</sub> are critically required for RhoA activa-



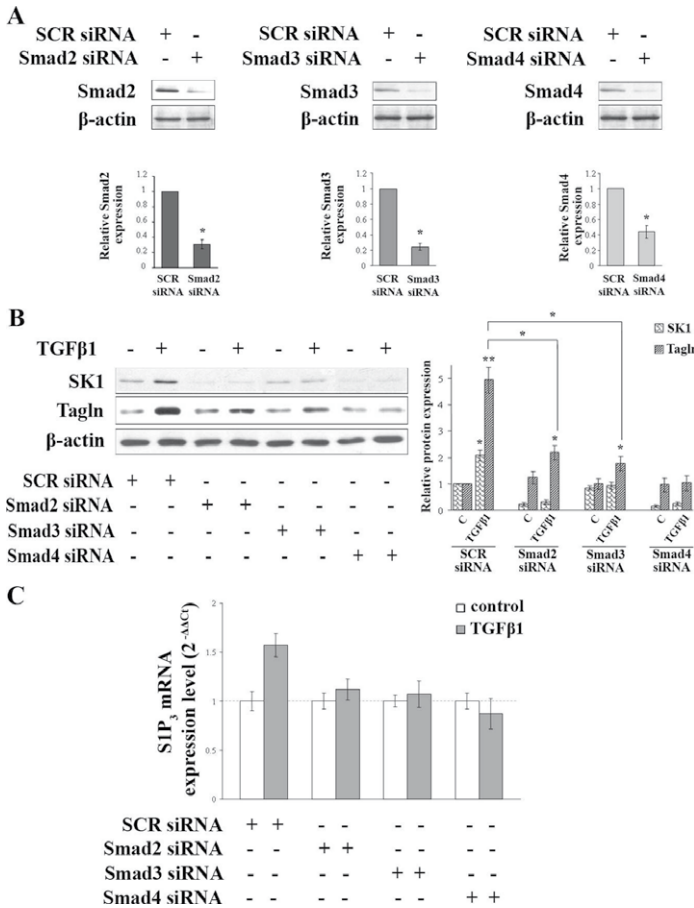
**Figure 7.** Dominant SIP<sub>3</sub> signaling is required for the induction of profibrotic response by SIP. (A) Left, confluent serum-starved C2C12 myoblasts were pretreated or not with 10 μM SKI-2 for 60 min and then incubated in the presence (+) or absence (-) of 5 ng/ml TGFβ1, 6 h before the challenge with 1 μM SIP for 24 h. Transgelin (Tagln) was detected in aliquots (20 μg) of total cell lysates by Western blot analysis. Right, densitometric analysis. Data are reported as described in the legend to Figure 1B. (B) C2C12 myoblasts, transfected with scrambled (SCR) or SKI siRNA, were incubated for 24 h in the presence (+) or absence (-) of 5 ng/ml TGFβ1, 6 h before 1 μM SIP challenge. Tagln was detected as described in A. Right, densitometric analysis. Data are reported as described in the legend to Figure 1B. (C) Left, C2C12 myoblasts, transfected with SCR or SIP<sub>3</sub> siRNA, were treated with 10 μM SKI-2 for 60 min and then incubated in the presence (+) or absence (-) of 5 ng/ml TGFβ1, 6 h before 1 μM SIP challenge. Tagln was detected as described in A. Right, densitometric analysis. Data are reported as described in the legend to Figure 1B. (D) Left, C2C12 cells were transiently transfected with pcDNA3-SIP<sub>3</sub> or empty vector. Cells were treated with 1 μM SIP or 5 ng/ml TGFβ1 for 24 h and cell lysates used to detect Tagln as described in A. Inset, SIP<sub>3</sub> expression levels was evaluated in transfected C2C12 myoblasts by Western blot analysis using specific monoclonal anti-HA antibodies. Right, densitometric analysis. Data are reported as described in the legend to Figure 1B.

tion by TGFβ1, necessary in turn for the induction of myofibroblastic phenotype via Rho kinase stimulation.

**SKI/SIP<sub>3</sub> Signaling Pathway Is Implicated in the Antimyogetic Action of TGFβ1**

The antidifferentiating property of TGFβ1 is well established (Olson *et al.*, 1986; Leask and Abraham, 2004). In agreement, treatment of myoblasts with the cytokine (5 ng/ml) caused a strong reduction of expression of known myogenic markers such as myosin heavy chain (MHC), and caveolin-3 at all the chosen times of incubation (Figure 10). Figure 10 also

shows that the inhibition of SK signaling pathway by preincubation with 10 μM SKI-2 attenuated the inhibitory effect of TGFβ1 on myogenesis at 48 h of incubation. In accordance, a similar reduction of the antimyogetic effect of TGFβ1 was detected in myoblasts where SK1 was specifically down-regulated by siRNA treatment. Moreover, Figure 10 shows that the inhibitory effect of TGFβ1 on myogenesis was likewise diminished in cells where SIP<sub>3</sub> was knocked down. These results support the view that transactivation of SIP<sub>3</sub> by TGFβ1 plays also a role in its antimyogetic action.



**Figure 8.** Role of Smad proteins in TGFβ1-dependent SK1 and S1P<sub>3</sub> up-regulation and in TGFβ1-induced transdifferentiation of C2C12 myoblasts. C2C12 myoblasts were transfected with Smad2 or Smad3 or Smad4 siRNA, using scrambled (SCR) siRNA as a control. (A) Top, C2C12 myoblasts were checked for expression of Smad2, Smad3, or Smad4 by Western blot analysis, using specific anti-Smad2/3 or anti-Smad4 antibodies. Densitometric analysis is shown in the bottom panels. Data are reported as described in the legend to Figure 1B. (B) Left, C2C12 myoblasts, transfected with SCR, Smad2, Smad3, or Smad4 siRNA, were incubated in the presence (+) or absence (-) of 5 ng/ml TGFβ1 for 24 h. Total cell lysates (20 μg) were subjected to Western blot analysis to detect SK1 and Transgelin (Tagln) expression. Right, densitometric analysis is reported as described in the legend to Figure 1B. (C) Quantitative analysis of S1P<sub>3</sub> mRNA was performed by real-time PCR in total RNA extracted from C2C12 myoblasts transfected with SCR, Smad2, Smad3, or Smad4 siRNA, stimulated (+) or not (-) with 5 ng/ml TGFβ1 for 24 h. Results are expressed as -fold changes according to the 2<sup>-ΔΔCT</sup> method, using S1P<sub>3</sub> subtype of the unchallenged specimen as calibrator. Data are the mean ± SD of one representative experiment performed in triplicate and repeated three times with analogous results.

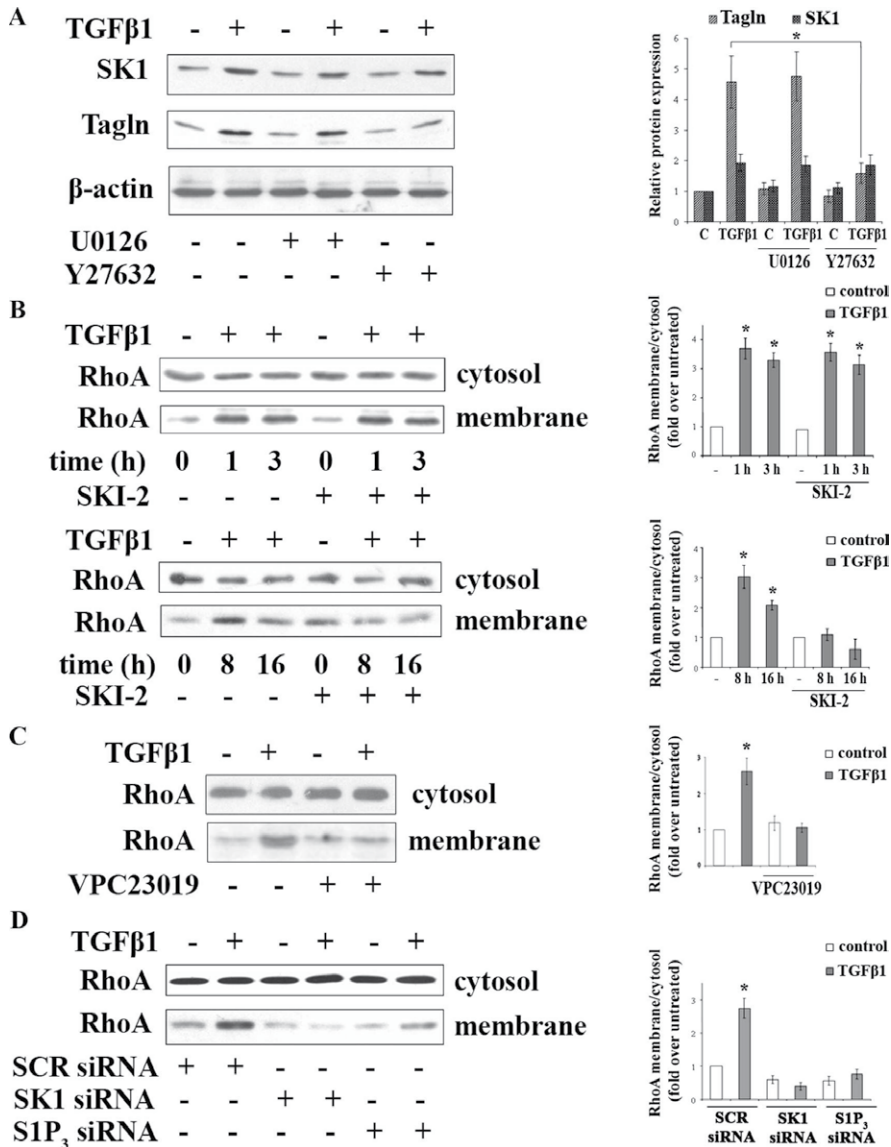
**DISCUSSION**

In this study, we describe a novel signaling pathway triggered by TGFβ1 in C2C12 myoblasts via Smad-dependent up-regulation of SK1 and S1P<sub>3</sub> that is critically implicated in the transdifferentiation of myoblasts into myofibroblasts through Rho/Rho kinase signaling pathway.

Recent studies have highlighted a pivotal role of TGFβ1-directed SK1 up-regulation in mediating the profibrotic action in different types of fibroblasts (Yamanaka *et al.*, 2004; Kono *et al.*, 2007; Gellings Lowe *et al.*, 2009), in full accordance with the profibrotic effect exerted by S1P in various cellular contexts, including human lung and dermal fibroblasts and retinal pigmented epithelial cells (Urata *et al.*, 2005; Keller *et al.*, 2007; Swaney *et al.*, 2008). This study for the first time demonstrates that the TGFβ1-directed transcriptional regulation of SK1 and S1P<sub>3</sub>, upstream of the up-regulation of myofibroblast marker proteins is a Smad-mediated event, where the role of Smad2, Smad3, and Smad4 seems to be critical.

Previously, we demonstrated that in myoblasts SK/S1P axis, via S1P<sub>2</sub> engagement, is physiologically required for the achievement of myogenic differentiation of C2C12 myo-

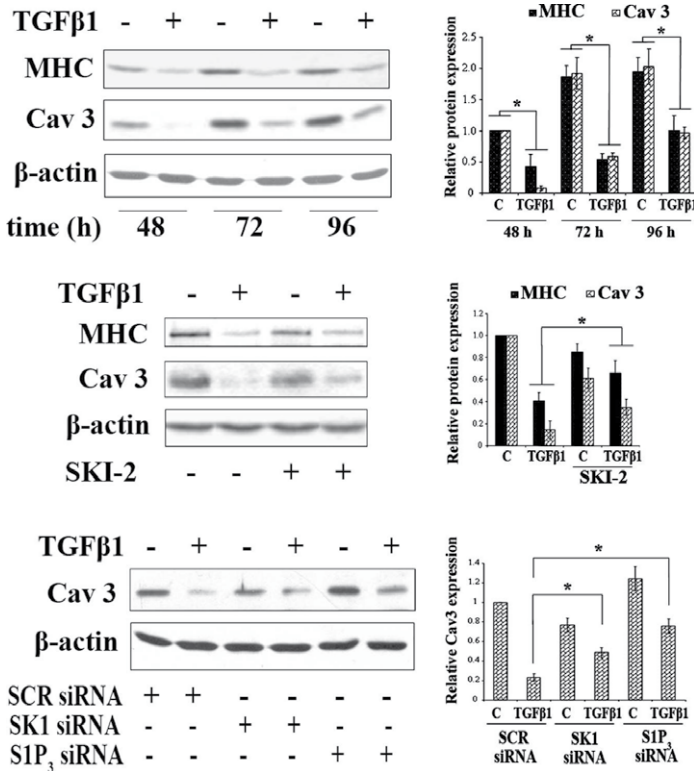
blasts triggered in vitro by serum withdrawal (Meacci *et al.*, 2008) or by challenge with low doses of tumor necrosis factor-α (Donati *et al.*, 2007b). In agreement, exogenous S1P was recognized previously to exert promyogenic activity in C2C12 cells, via engagement of S1P<sub>2</sub> (Donati *et al.*, 2005). The present finding that S1P does not influence the expression of fibrosis marker proteins in mouse myoblasts is consistent with the past results and with the notion that skeletal muscle fibrosis is associated with impairment of skeletal muscle differentiation (Best and Hunter, 2000; Sato *et al.*, 2003). Nonetheless, herein SK1 up-regulation was found to be critical for transmitting the profibrotic effect of TGFβ1 in myoblasts. Strikingly, the different biological outcome mediated by SK1/S1P axis after TGFβ1 challenge seems to depend on the effect exerted by the cytokine on S1PR expression pattern. Thus, the combined action on S1PR expression remodelling and SK1 up-regulation convey the TGFβ1-directed S1P inside-out signaling to act primarily via S1P<sub>3</sub>, which becomes the prevailing expressed receptor, rather than S1P<sub>2</sub>. Interestingly, the stimulation of the SK/S1P<sub>3</sub> axis by TGFβ1 was also implicated in its antidifferentiating activity, supporting the view that in these cells S1P-dependent pathways



**Figure 9.** TGFβ1-dependent transdifferentiation of C2C12 myoblasts is dependent on RhoA/Rho kinase activation, downstream of SK1 and S1P<sub>3</sub>. (A) Left, C2C12 myoblasts were treated with or without 10 μM U0126 or 25 μM Y27632, 30 min before 5 ng/ml TGFβ1 challenge for 24 h. The content of SK1 and transgelin (Tagln) was analyzed by Western analysis of whole cell lysates (20 μg). Right, densitometric analysis. A blot representative of three independent experiments is shown. Data are reported as described in the legend to Figure 1B. (B) Left, C2C12 myoblasts were incubated for the indicated time intervals with or without 5 ng/ml TGFβ1 in the presence or absence of 10 μM SKI-2. Western analysis of RhoA was performed in membrane and cytosolic fractions (10 μg). Right, densitometric analysis of three independent experiments. Data are reported as described in the legend to Figure 1D. (C) Left, C2C12 myoblasts were treated with or without 5 ng/ml TGFβ1 for 8 h in the presence or in the absence of 1 μM VPC23019. Western analysis was performed as described in B. Right, densitometric analysis. Data are reported as described in the legend to Figure 1D. (D) C2C12 myoblasts, transfected with scrambled (SCR), SK1, or S1P<sub>3</sub> siRNA, were incubated in the presence (+) or absence (-) of 5 ng/ml TGFβ1 for 8 h. Left, Western analysis was performed as described in B. Right, densitometric analysis is reported as described in the legend to Figure 1D.

are exploited by TGFβ1 to elicit multiple biological effects. It is also interesting to note that the here identified Smad-

dependent up-regulation of SK1/S1P<sub>3</sub> brought about by TGFβ1 contributes to better define at mechanistic level the



**Figure 10.** SK1/SIP<sub>3</sub> pathway is implicated in the antimyogenic action of TGFβ1. Top left, C2C12 myoblasts were incubated for the indicated time-intervals with (+) or without (-) 5 ng/ml TGFβ1. The content of MHC and caveolin-3 (Cav 3) was analyzed by Western blot in aliquots (20 μg) of whole cell lysates. Top right, densitometric analysis. Data are reported as described in the legend to Figure 1B. Middle left, C2C12 myoblasts were incubated in the presence of 10 μM SKI-2, 60 min before 5 ng/ml TGFβ1 challenge for 48 h and analyzed for myogenic marker expression. Middle right, densitometric analysis. Data are reported as described in the legend to Figure 1B. Bottom left, C2C12 myoblasts, transfected with scrambled (SCR), SK1, or SIP<sub>3</sub> siRNA, were incubated in the presence (+) or absence (-) of 5 ng/ml TGFβ1. The content of Cav 3 was analyzed as described in A. Bottom right, densitometric analysis is reported as described in the legend to Figure 1B.

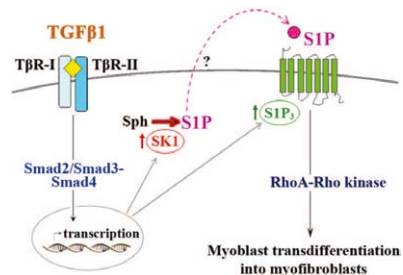
well-known antimyogenic action elicited by TGFβ1 via Smad proteins (Liu *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 2004).

It should be noted that our study on S1PR expression relies exclusively on expression levels of mRNA, due to the lack of suitable S1P<sub>3</sub> and S1P<sub>2</sub> antibodies. However, even though the actual increase of S1P<sub>3</sub> and decrease of S1P<sub>2</sub> protein content could not be measured, the altered S1PR profile at myoblast plasma membrane could be inferred from the finding that in myoblasts exogenous S1P is myogenic and not profibrotic, but after TGFβ1 treatment it becomes able to enhance fibrosis and reduce myogenic marker expression, similarly to what observed in S1P<sub>3</sub>-overexpressing myoblasts.

Several lines of experimental evidence are provided here in support of a key role of S1P<sub>3</sub> in transmitting the profibrotic action of TGFβ1 in myoblasts. In agreement, S1P<sub>3</sub> was previously individuated downstream of TGFβ1 regulation of α-SMA expression in lung fibroblasts (Kono *et al.*, 2007), although in these cells it shared with S1P<sub>2</sub> the profibrotic signaling. Moreover, the structural analogue of S1P, FTY720-phosphate, has been recently reported to elicit myofibroblast differentiation of fibroblasts via S1P<sub>3</sub>, because its effect was abrogated in S1P<sub>3</sub>-null mice (Keller *et al.*, 2007). Intriguingly, in the same study Smad3 activation was identified downstream of S1P<sub>3</sub> signaling, whereas here Smad3, together with Smad2 and Smad4, was found upstream of S1P<sub>3</sub> transcriptional regulation, suggesting the occurrence of positive loop in the regulation of these two proteins worth of a more careful investigation.

The Rho/Rho kinase pathway is known to be involved in the fibrotic process that affects multiple different tissues (Dolman *et al.*, 2008; Soon and Yee, 2008; Haudek *et al.*, 2009). Interestingly, in our study Rho/Rho kinase was identified upstream of S1P<sub>3</sub>-dependent up-regulation of fibrosis marker expression brought about by TGFβ1. These data are in agreement with a previous study in which Rho kinase was found implicated in the mechanism by which SK1 regulates differentiation of lung fibroblasts mediated by TGFβ1 (Kono *et al.*, 2007).

Another original finding of this study entails the up-regulation of S1P<sub>4</sub> by TGFβ1, supporting the notion that



**Figure 11.** Working model of the mechanism by which TGFβ1 elicits myoblast transdifferentiation into myofibroblasts.



S1P<sub>4</sub> in addition to acting in lymphoid tissue (Wang *et al.*, 2005; Matsuyuki *et al.*, 2006) is probably involved in biological responses in other cellular settings. The delayed enhancement of S1P<sub>4</sub> expression in comparison with the more rapid induction of SK1 and S1P<sub>3</sub> suggests that its up-regulation requires the synthesis of secondary factors downstream of TGFβ1. Although in this study S1P<sub>4</sub> was found disengaged from the TGFβ1-induced profibrotic response its transcriptional regulation by TGFβ1 probably participates to some other molecular event that concur to achieve the full biological response to the cytokine.

In summary, the present results for the first time demonstrate the key role of SK1/S1P<sub>3</sub> axis in the TGFβ1-induced transdifferentiation of myoblasts into myofibroblasts and more importantly demonstrate that TGFβ1 by remodelling S1PR expression redirects the promyogenic effect of endogenous S1P into a profibrotic, antidifferentiating cue. A model of TGFβ1 action is illustrated in Figure 11.

The concept that the peculiar flexibility of S1P inside-out signaling is strictly dependent on a given S1PR profile is also supported by a previous study in which platelet-derived growth factor-BB-induced up-regulation of SK1 and SK2, together with that of S1P<sub>2</sub>, was found as part of a regulatory loop finalized to trigger hepatic wound repair by hepatic myofibroblasts (Serriere-Lanneau *et al.*, 2007). In the same vein, up-regulation of S1P<sub>2</sub> triggered by cross-linking of the high-affinity receptor for immunoglobulin E, contributed to the regulatory balance between mast cell migration and degranulation (Jolly *et al.*, 2004).

TGFβ1 is the main elicitor of overproduction of the extracellular matrix proteins that cause muscle fibrosis, a biological process that negatively interferes with repair and functional recovery of injured skeletal muscle (Best and Hunter, 2000; Sato *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2004). Thus, neutralization of TGFβ1 action seems to be a promising approach to improve muscle regeneration (Huard *et al.*, 2002; Cohn *et al.*, 2007). Finally, it is worth mentioning that the adverse effects exerted by TGFβ1 on muscle regeneration in multiple myopathic states imply not only the stimulation of fibrotic response but also a decline of performance of satellite cells, the muscle-resident stem cells that differentiate into myoblasts (Cohn *et al.*, 2007). In this regard, because S1P has been individuated among the most powerful regulators of satellite cell proliferation (Nagata *et al.*, 2006), it seems to be of great importance to understand whether cross-talk with S1P pathway plays any role in the deleterious action of TGFβ1 in these cells.

In conclusion, this study has identified the unique ability of TGFβ1 to exploit S1P signaling to transdifferentiate myoblasts into myofibroblasts, by simultaneously affecting SK1 and S1PR expression pattern, providing new clues on the molecular mechanisms underlying the profibrotic and antidifferentiating response elicited by the cytokine that could be pharmacologically addressed to ameliorate skeletal muscle regeneration.

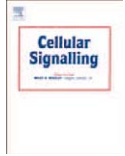
## ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to Dr. Y. Banno for providing SK1 antibodies and to Dr. S. Nakamura for providing SK2 antibodies. We thank Dr. Giuditta Illuzzi for the technical assistance with digital autoradiography analysis, performed in the Radiochemistry Laboratory at the Department of Medical Chemistry, Biochemistry and Biotechnology, University of Milan. This research was supported by grants from Italian Ministry of University and Scientific Research (PRIN2007), Telethon Italy (GGP08053), University of Florence, and Ente Cassa di Risparmio di Firenze.

## REFERENCES

- Alvarez, S. E., Milstien, S., and Spiegel, S. (2007). Autocrine and paracrine roles of sphingosine-1-phosphate. *Trends Endocrinol. Metab.* 18, 300–307.
- Best, T. M., and Hunter, K. D. (2000). Muscle injury and repair. *Phys. Med. Rehabil. Clin. N. Am.* 11, 251–266.
- Cohn, R. D., *et al.* (2007). Angiotensin II type 1 receptor blockade attenuates TGF-beta-induced failure of muscle regeneration in multiple myopathic states. *Nat. Med.* 13, 204–210.
- Derynck, R., and Zhang, Y. E. (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 425, 577–584.
- Dolman, M. E., Fretz, M. M., Segers, G. J., Lacombe, M., Prakash, J., Storm, G., Hennink, W. E., and Kok, R. J. (2008). Renal targeting of kinase inhibitors. *Int. J. Pharm.* 364, 249–257.
- Donati, C., Cencetti, F., De Palma, C., Rapizzi, E., Brunelli, S., Cossu, G., Clementi, E., and Bruni, P. (2009). TGFbeta protects mesoangioblasts from apoptosis via sphingosine kinase-1 regulation. *Cell Signal.* 21, 228–236.
- Donati, C., Cencetti, F., Nincheri, P., Bernacchioni, C., Brunelli, S., Clementi, E., Cossu, G., and Bruni, P. (2007a). Sphingosine 1-phosphate mediates proliferation and survival of mesoangioblasts. *Stem Cells* 25, 1713–1719.
- Donati, C., Meacci, E., Nuti, F., Becciolini, L., Farnararo, M., and Bruni, P. (2005). Sphingosine 1-phosphate regulates myogenic differentiation: a major role for S1P2 receptor. *FASEB J.* 19, 449–451.
- Donati, C., Nincheri, P., Cencetti, F., Rapizzi, E., Farnararo, M., and Bruni, P. (2007b). Tumor necrosis factor-α exerts pro-myogenic action in C2C12 myoblasts via sphingosine kinase/S1P2 signaling. *FEBS Lett.* 581, 4384–4388.
- Gellings Lowe, N., Swaney, J. S., Moreno, K. M., and Sabbadini, R. A. (2009). Sphingosine-1-phosphate and sphingosine kinase are critical for TGF-beta-stimulated collagen production by cardiac fibroblasts. *Cardiovasc. Res.* 82, 303–312.
- Gosselin, L. E., Williams, J. E., Deering, M., Brazeau, D., Koury, S., and Martinez, D. A. (2004). Localization and early time course of TGF-beta 1 mRNA expression in dystrophic muscle. *Muscle Nerve* 30, 645–653.
- Haudek, S. B., Gupta, D., Dewald, O., Schwartz, R. J., Wei, L., Trial, J., and Entman, M. L. (2009). Rho kinase-1 mediates cardiac fibrosis by regulating fibroblast precursor cell differentiation. *Cardiovasc. Res.* 83, 511–518.
- Hawke, T. J., and Garry, D. J. (2001). Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J. Appl. Physiol.* 91, 534–551.
- Huard, J., Li, Y., and Fu, F. H. (2002). Muscle injuries and repair: current trends in research. *J. Bone Joint Surg. Am.* 84A, 822–832.
- Igarashi, N., Okada, T., Hayashi, S., Fujita, T., Jahangeer, S., and Nakamura, S. (2003). Sphingosine kinase 2 is a nuclear protein and inhibits DNA synthesis. *J. Biol. Chem.* 278, 46832–46839.
- Jolly, P. S., Bektas, M., Olivera, A., Gonzalez-Espinosa, C., Proia, R. L., Rivera, J., Milstien, S., and Spiegel, S. (2004). Transactivation of sphingosine-1-phosphate receptors by FcεpsilonR1 triggering is required for normal mast cell degranulation and chemotaxis. *J. Exp. Med.* 199, 959–970.
- Keller, C. D., Rivera, G. P., Tolle, M., van der, G. M., Chun, J., Radeke, H. H., Schafer-Korting, M., and Kleuser, B. (2007). Immunomodulator FTY720 induces myofibroblast differentiation via the lysophospholipid receptor S1P3 and Smad3 signaling. *Am. J. Pathol.* 170, 281–292.
- Kihara, A., Ikeda, M., Kariya, Y., Lee, E. Y., Lee, Y. M., and Igarashi, Y. (2003). Sphingosine-1-phosphate lyase is involved in the differentiation of F9 embryonal carcinoma cells to primitive endoderm. *J. Biol. Chem.* 278, 14578–14585.
- Kono, Y., Nishiuma, T., Nishimura, Y., Kotani, Y., Okada, T., Nakamura, S., and Yokoyama, M. (2007). Sphingosine kinase 1 regulates differentiation of human and mouse lung fibroblasts mediated by TGF-beta1. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 37, 395–404.
- Leask, A., and Abraham, D. J. (2004). TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J.* 18, 816–827.
- Li, Y., Foster, W., Deasy, B. M., Chan, Y., Prisk, V., Tang, Y., Cummins, J., and Huard, J. (2004). Transforming growth factor-beta1 induces the differentiation of myogenic cells into fibrotic cells in injured skeletal muscle: a key event in muscle fibrogenesis. *Am. J. Pathol.* 164, 1007–1019.
- Li, Y., and Huard, J. (2002). Differentiation of muscle-derived cells into myofibroblasts in injured skeletal muscle. *Am. J. Pathol.* 161, 895–907.
- Liu, D., Black, B. L., and Derynck, R. (2001). TGF-beta inhibits muscle differentiation through functional repression of myogenic transcription factors by Smad3. *Genes Dev.* 15, 2950–2966.
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402–408.

- Massague, J., and Wotton, D. (2000). Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J* 19, 1745–1754.
- Matsuyuki, H., Maeda, Y., Yano, K., Sugahara, K., Chiba, K., Kohno, T., and Igarashi, Y. (2006). Involvement of sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor type 1 and type 4 in migratory response of mouse T cells toward S1P. *Cell Mol. Immunol.* 3, 429–437.
- Meacci, E., Cencetti, F., Donati, C., Nuti, F., Farnararo, M., Kohno, T., Igarashi, Y., and Bruni, P. (2003). Down-regulation of EDG5/S1P2 during myogenic differentiation results in the specific uncoupling of sphingosine 1-phosphate signalling to phospholipase D. *Biochim. Biophys. Acta* 1633, 133–142.
- Meacci, E., Donati, C., Cencetti, F., Romiti, E., and Bruni, P. (2000). Permissive role of protein kinase C alpha but not protein kinase C delta in sphingosine 1-phosphate-induced Rho A activation in C2C12 myoblasts. *FEBS Lett.* 482, 97–101.
- Meacci, E., Nuti, F., Donati, C., Cencetti, F., Farnararo, M., and Bruni, P. (2008). Sphingosine kinase activity is required for myogenic differentiation of C2C12 myoblasts. *J. Cell Physiol.* 214, 210–220.
- Miller, A. V., Alvarez, S. E., Spiegel, S., and Lebman, D. A. (2008). Sphingosine kinases and sphingosine-1-phosphate are critical for transforming growth factor beta-induced extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 activation and promotion of migration and invasion of esophageal cancer cells. *Mol. Cell Biol.* 28, 4142–4151.
- Murate, T., *et al.* (2001). Cell type-specific localization of sphingosine kinase 1a in human tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 49, 845–855.
- Nagata, Y., Partridge, T. A., Matsuda, R., and Zammit, P. S. (2006). Entry of muscle satellite cells into the cell cycle requires sphingolipid signaling. *J. Cell Biol.* 174, 245–253.
- Olivera, A., Rosenthal, J., and Spiegel, S. (1994). Sphingosine kinase from Swiss 3T3 fibroblasts: a convenient assay for the measurement of intracellular levels of free sphingoid bases. *Anal. Biochem.* 223, 306–312.
- Olson, E. N., Sternberg, E., Hu, J. S., Spizz, G., and Wilcox, C. (1986). Regulation of myogenic differentiation by type beta transforming growth factor. *J. Cell Biol.* 103, 1799–1805.
- Olwin, B. B., and Hall, Z. W. (1985). Developmental regulation of laminin accumulation in the extracellular matrix of a mouse muscle cell line. *Dev. Biol.* 112, 359–367.
- Prinetti, A., Chigorno, V., Tettamanti, G., and Sonnino, S. (2000). Sphingolipid-enriched membrane domains from rat cerebellar granule cells differentiated in culture. A compositional study. *J. Biol. Chem.* 275, 11658–11665.
- Rahimi, R. A., and Leof, E. B. (2007). TGF-beta signaling: a tale of two responses. *J. Cell Biochem.* 102, 593–608.
- Sato, K., Li, Y., Foster, W., Fukushima, K., Badlani, N., Adachi, N., Usas, A., Fu, F. H., and Huard, J. (2003). Improvement of muscle healing through enhancement of muscle regeneration and prevention of fibrosis. *Muscle Nerve* 28, 365–372.
- Serriere-Lanneau, V., *et al.* (2007). The sphingosine 1-phosphate receptor S1P2 triggers hepatic wound healing. *FASEB J.* 21, 2005–2013.
- Soon, R. K., Jr., and Yee, H. F., Jr. (2008). Stellate cell contraction: role, regulation, and potential therapeutic target. *Clin. Liver Dis.* 12, 791–803, viii.
- Swaney, J. S., Moreno, K. M., Gentile, A. M., Sabbadini, R. A., and Stoller, G. L. (2008). Sphingosine-1-phosphate (S1P) is a novel fibrotic mediator in the eye. *Exp. Eye Res.* 87, 367–375.
- Urata, Y., Nishimura, Y., Hirase, T., and Yokoyama, M. (2005). Sphingosine 1-phosphate induces alpha-smooth muscle actin expression in lung fibroblasts via Rho-kinase. *Kobe J. Med. Sci.* 51, 17–27.
- Wang, W., Graeler, M. H., and Goetzl, E. J. (2005). Type 4 sphingosine 1-phosphate G protein-coupled receptor (S1P4) transduces S1P effects on T cell proliferation and cytokine secretion without signaling migration. *FASEB J.* 19, 1731–1733.
- Watterson, K. R., Lanning, D. A., Diegelmann, R. F., and Spiegel, S. (2007). Regulation of fibroblast functions by lysophospholipid mediators: potential roles in wound healing. *Wound Repair Regen.* 15, 607–616.
- Woodcock-Mitchell, J., Mitchell, J. J., Low, R. B., Kienny, M., Sengel, P., Rubbia, L., Skalli, O., Jackson, B., and Gabbiani, G. (1988). Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed in embryonic rat cardiac and skeletal muscles. *Differentiation* 39, 161–166.
- Yamanaka, M., Shegogue, D., Pei, H., Bu, S., Bielawska, A., Bielawski, J., Pettus, B., Hannun, Y. A., Obeid, L., and Trojanowska, M. (2004). Sphingosine kinase 1 (SPHK1) is induced by transforming growth factor-beta and mediates TIMP-1 up-regulation. *J. Biol. Chem.* 279, 53994–54001.
- Zhu, S., Goldschmidt-Clermont, P. J., and Dong, C. (2004). Transforming growth factor-beta-induced inhibition of myogenesis is mediated through Smad pathway and is modulated by microtubule dynamic stability. *Circ. Res.* 94, 617–625.



## Sphingosine kinase-1/S1P<sub>1</sub> signalling axis negatively regulates mitogenic response elicited by PDGF in mouse myoblasts

Paola Nincheri<sup>a</sup>, Caterina Bernacchioni<sup>a,b</sup>, Francesca Cencetti<sup>a,b</sup>, Chiara Donati<sup>a,b,1</sup>, Paola Bruni<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Dipartimento di Scienze Biochimiche, Università di Firenze, 50134, Firenze, Italy

<sup>b</sup> Istituto Interuniversitario di Miologia, Firenze, Italy

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 2 April 2010

Received in revised form 17 July 2010

Accepted 17 June 2010

Available online 1 July 2010

#### Keywords:

PDGF

Sphingosine 1-phosphate

S1P<sub>1</sub>

Sphingosine kinase-1

C2C12 myoblasts

Skeletal muscle

### ABSTRACT

PDGF is known to be critically implicated in skeletal muscle repair; however its molecular mechanism of action has been only marginally investigated. In this study we show that in mouse myoblasts PDGF transactivates S1P<sub>1</sub> receptor via sphingosine kinase (SK)-1 activation and that this molecular event exerts a negative regulation of the mitogenic effect elicited by this growth factor. Indeed, pharmacological inhibition of S1P<sub>1</sub>, or its specific silencing increased PDGF-dependent cell proliferation, whereas S1P<sub>1</sub> overexpression diminished the biological effect. Moreover, the mitogenic response to PDGF was enhanced by pharmacological inhibition of SK activity as well as specific silencing of SK1 but not SK2. Furthermore, ERK1/2 signalling pathway was found to be upstream of the observed attenuation of PDGF-induced cell proliferation. Interestingly, PDGF-directed engagement of S1P<sub>1</sub> exerted also a positive modulatory action of the growth factor-dependent cell motility. The here highlighted dual role of S1P<sub>1</sub>-mediated signalling in response to myoblast challenge with PDGF is likely important to guarantee the fine control of the biological response to this growth factor, finalized to efficient repopulation of skeletal muscle after damage, where a tight balance between proliferation and migration of tissue progenitor cells is required.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Sphingosine 1-phosphate (S1P) is a bioactive sphingolipid generated by sphingomyelin metabolism which regulates key biological processes crucially implicated in cell homeostasis [1,2]. S1P is present at submicromolar concentration in plasma, being released by various cell types including platelets, erythrocytes and endothelial cells [3–6]. Additionally, S1P can be autonomously produced in many cell types, being endogenous levels of the bioactive lipid strictly regulated by the balance between biosynthetic and catabolic enzymatic activities such as sphingosine kinase (SK)-1 and SK2 on one side [7], and S1P lyase and specific phosphatases on the other [8,9]. The molecular mechanisms by which S1P elicits specific cellular responses appear to be highly complex and only partially identified. It is commonly accepted that the extracellular action of S1P as ligand of a family of five specific G-protein coupled receptors named S1P receptors (S1PRs), accounts

for the majority of its biological effects. Singularly, since all S1PRs, apart from S1P<sub>1</sub>, are coupled to a specific set of G proteins they can trigger a wide variety of signalling pathways determining distinct and even contrasting final cellular effects. Thus, the S1PR expression pattern exhibited by a given cell type appears to be critical for the final biological outcome elicited by S1P. A further layer of complexity in S1P action mode is added by the occurrence of strong cross-communication between S1P signalling and a wide variety of extracellular cues. Indeed, in many instances the biological effects exerted by S1P are superimposable to those elicited by specific growth factors and cytokines due to their ability to transactivate S1P signalling cascades as well as the ability of S1P to transactivate growth factor and cytokine signalling cascades [10,11]. In this respect it is important to note that S1P was originally identified as an intracellular messenger generated in response to PDGF with a role in the elicited mitogenic response [12]. Subsequently, it has been established that S1P and PDGF cross-communicate employing multiple mechanisms including the occurrence of a functional complex comprising PDGF receptor-beta (PDGFR-β) and S1P<sub>1</sub>, [13,14] as well as the sequential activation of S1P<sub>1</sub> driven by PDGF challenge via SK1 activation and S1P formation [15], both critically implicated in the regulation of cell motility. Moreover, the occurrence of S1P-directed transactivation of PDGFR-β via enhancement of its tyrosine phosphorylation state in vascular smooth muscle cells [16], as well as the S1P-mediated induction of PDGF-BB mRNA expression reported to occur via S1P<sub>1</sub> in vascular smooth

**Abbreviations:** S1P, sphingosine 1-phosphate; SK, sphingosine kinase; S1PR, S1P receptor; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; BSA, bovine serum albumin; FCS, fetal calf serum; siRNA, short interfering RNA; SDS, sodium dodecyl sulphate; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; DMS, dimethylsphingosine; PTX, pertussis toxin; PDGFR-β, PDGF receptor-beta.

\* Corresponding author. Dipartimento di Scienze Biochimiche, University of Florence, Viale GB Morgagni 50, 50134 Firenze, Italy. Tel.: +39 0554598328; fax: +39 0554598905.

E-mail address: [paola.bruni@unifi.it](mailto:paola.bruni@unifi.it) (P. Bruni).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.



muscle cells [17] and to be S1P<sub>2</sub>-dependent in injured hepatocytes [18] has also been described.

PDGF acts as an important regulator of proliferation and motility of multiple mesenchymal-derived cell types, including skeletal muscle precursor cells. Previous studies have clearly established that PDGF stimulates mitogenesis and chemotaxis of cultured myoblasts [19–21]. Despite its recognized biological activity in skeletal muscle, the signalling pathways downstream of PDGF receptor activation are presently poorly defined.

A number of studies have clearly demonstrated that cultured mouse myoblasts express at least three distinct S1P<sub>R</sub> subtypes, specifically S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub>, and S1P<sub>3</sub> [22], among which S1P<sub>2</sub> plays a prominent role acting as transducer of exogenous as well as endogenous S1P in the triggering of myogenic differentiation [23,24].

In this study we have examined whether the mitogenic response elicited by PDGF in mouse myoblasts implies a cross-communication with S1P<sub>Rs</sub>. Data here presented clearly show that PDGF-directed S1P<sub>1</sub> transactivation reduces myoblast proliferation, via a mechanism dependent on SK1 activation. Moreover, the engagement of S1P<sub>1</sub> in PDGF signalling concomitantly enhances the chemotactic response to the growth factor, in favour of a dual role of SK/S1P<sub>1</sub> axis in the control of the biological response to PDGF that could be critical for the efficient recruitment of myoblasts during muscle repair.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Biochemicals, TriReagent, cell culture reagents, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal calf serum (FCS), protease inhibitor cocktail, bovine serum albumin (BSA), Blotto, non-fat dry milk and pertussis toxin (PTx) from *Bordetella pertussis* were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Mouse skeletal muscle C2C12 cells were obtained from the European Collection of Cell Cultures (Salisbury, UK). PDGF-BB was purchased from PeproTech (London, UK). SKI-2 [2-(phydroxyanilino)-4-(p-chlorophenyl)thiazole], U0126, S1P<sub>1</sub> receptor agonist (SEW2871), D-erythro-S1P, MK-571 and propidium iodide were from Calbiochem (San Diego, CA, USA). N,N-Dimethyl-sphingosine (DMS) was obtained from Alexis Corporation (San Diego, CA, USA). Trans-wells were purchased from Corning Incorporated Life Sciences (Lowell, MA, USA). Short interfering RNA (siRNA) duplexes corresponding to two DNA target sequences of mouse SK1 (5'-UAGGAACUGUGCCUCUAAAdTdT-3'; 5'-GUGUUAUGCAUCUGUUCUAdTdT-3'), mouse SK2 (5'-GCCUACUUCUGCAUCUACAdTdT-3'; 5'-CCUCAUACAGACAGACGAdTdT-3'), mouse S1P<sub>1</sub> (5'-UCACCUACUACUGUUAGAdTdT-3'; 5'-CUUGCUAACUUAUUGGAAAdTdT-3'), mouse S1P<sub>2</sub> (5'-CUCUGUACGUCCGAAUGUAdTdT-3'; 5'-GACUUAUCAGAUUGUAGUAdTdT-3'), mouse S1P<sub>3</sub> (5'-CCAUAUGCCAAACAAGAdTdT-3'; 5'-GUAAGUCAAGCUCAGUAdTdT-3'), mouse PDGFR-β (5'-CCAUGAAGUGGUGUCUAdTdT-3'; 5'-UUGACAGCCACUUAUGGdAdTdT-3') and scrambled siRNA (5'-UUCUCCGAAACGUGUCACGUDdT-3') were from Sigma-Prologo (The Woodlands, TX, USA). Lipofectin® Reagent and Lipofectamine RNAiMAX™ were purchased from Life Technologies (Carlsbad, CA, USA). Enhanced chemiluminescence reagents and [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (3000 Ci/mmol) were obtained from GE Healthcare Europe GmbH (Milan, Italy). Thymidine [methyl-<sup>3</sup>H] (20.0 Ci/mmol) was from Perkin Elmer (Waltham, MA, USA). Secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase, polyclonal anti-Akt 1/2/3 (H-136), anti-phospho-Akt 1/2/3 (Ser473) and anti-phospho-PDGFR-β (Tyr857) were obtained from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA). Polyclonal anti-phospho-ERK1/ERK2 (Thr202/Tyr204), anti-ERK1/ERK2, anti-PDGFR-β (28E1) and monoclonal anti-phospho-tyrosine (P-Tyr-100) were from Cell Signaling Technology, Inc. (Beverly, MA, USA). Polyclonal anti-S1P<sub>1</sub> antibody was from Abcam (Cambridge, UK). Monoclonal antibodies against β-actin were from Cytoskeleton Inc. (Denver, CO, USA).

Fluorescein-conjugated horse anti-rabbit secondary antibodies were obtained from Vector (Burlingame, CA, USA). Specific anti-SK1 polyclonal antibodies (directed against the 16 carboxy-terminal amino acids of the mouse SK1) [25] were kindly provided by Dr. Y. Banno (Gifu University School of Medicine, Japan). Rabbit polyclonal antibodies generated against SK2 [26] were a kind gift of Dr. S. Nakamura (Department of Molecular and Cellular Biology, Kobe University Graduate School of Medicine, Kobe, Japan). The selective S1P<sub>1</sub> antagonist, W146 was from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). All reagents and probes required to perform Real-Time PCR were from Applied Biosystems Inc. (Foster City, CA, USA). pcDNA3-S1P<sub>1</sub> vector was a kind gift of Prof. Y. Igarashi (Hokkaido University, Sapporo, Japan). Sphingosine 1-phosphate ELISA Kit was from Echelon Biosciences Inc. (Salt Lake City, UT, USA).

### 2.2. Cell culture

Murine C2C12 myoblasts were routinely grown in DMEM supplemented with 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 μg/ml streptomycin at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>.

For proliferation experiments cells were seeded in 12-well plates and utilized when approximately 50% confluent. When requested cells were incubated with inhibitors or antagonist 30 min before challenge with PDGF.

### 2.3. Cell proliferation

Cell proliferation was determined by measuring [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation. To evaluate [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation C2C12 cells were serum-starved for 24 h and then challenged with or without the indicated concentrations of PDGF (100 ng/μl stock solution in sterile water). [<sup>3</sup>H]Thymidine (1 μCi/well) was added for the last 1 h of incubation. Cells were washed twice in ice-cold PBS before 500 μl addition of 10% trichloroacetic acid for 5 min at 4 °C. Cells were washed again in ice-cold PBS, and 250 μl of ethanol:ether (3:1 v/v) was added to the insoluble material. Samples were then lysed in 0.25 N NaOH for 1 h at 37 °C. Incorporation of [<sup>3</sup>H]thymidine was measured by scintillation counting.

### 2.4. Cytofluorometric analysis

C2C12 cells were seeded onto 60-mm dishes, and after 24 h of starvation, they were stimulated with 30 ng/ml PDGF. After 16 h, cells were rinsed twice with cold PBS and lysed in 500 μl of 50 mg/L propidium iodide solution. Sample analysis was performed in a BD Biosciences FACSCanto (Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA) using FACSDiva and ModFit cell analysis software.

### 2.5. Cell transfection

C2C12 cells were transfected employing Lipofectamine RNAiMAX™, according to the manufacturer's instructions. Briefly, Lipofectamine RNAiMAX™ was incubated with siRNA in DMEM without serum and antibiotics at room temperature for 20 min and afterwards the lipid/RNA complexes were added with gentle agitation to C2C12 cells to a final concentration of 50 nM in DMEM containing serum. After 24 h cells were shifted to DMEM without serum containing 1 mg/ml BSA and then used for the experiments within 48 h from the beginning of transfection. The specific gene knock-down was evaluated by Western blot analysis, or alternatively by Real-Time PCR.

Cells grown into 6-well dishes (60,000 cells/well), were transfected with pcDNA 3.1-S1P<sub>1</sub> using Lipofectin® Reagent transfection system, as previously described [27]. Ectopic S1P<sub>1</sub> expression levels were evaluated by Western blot analysis using specific polyclonal anti-S1P<sub>1</sub> antibodies.

## 2.6. Quantitative Real-Time PCR

The quantification of S1PR mRNA was performed by Real-Time PCR employing TaqMan Gene Expression Assays. Each measurement was carried out in triplicate, using the automated ABI Prism 7700 Sequence Detector System (Applied Biosystems, Foster City, CA), as previously described [28], by simultaneous amplification of the target sequence (S1P<sub>1</sub> Mm00514644\_m1, S1P<sub>2</sub> Mm01177794\_m1, S1P<sub>3</sub> Mm00515669\_m1; Applied Biosystems, Foster City, CA) together with the housekeeping gene, 18S rRNA. Results were analyzed by ABI Prism Sequence Detection System software (version 1.7) (Applied Biosystems, Foster City, CA). The  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method was applied as a comparative method of quantification [29] and data were normalized to ribosomal 18S rRNA expression.

## 2.7. Sphingosine kinase activity assay

SK activity was measured as described in Olivera et al. [30] with few modifications, as previously described [27]. Specific activity of SK was expressed as pmol S1P formed per min per mg protein.

## 2.8. Western blot analysis

C2C12 cells were lysed for 30 min at 4 °C in a buffer containing 50 mM Tris, pH 7.5, 120 mM NaCl, 1 mM EDTA, 6 mM EGTA, 15 mM Na<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 20 mM NaF, 1% Nonidet and protease inhibitor cocktail (1.04 mM AEBSF, 0.08 μM aprotinin, 0.02 mM leupeptin, 0.04 mM bestatin, 15 μM pepstatin A, and 14 μM E-64). To prepare total cell lysates, cell extracts were centrifuged for 15 min at 10,000 g at 4 °C. Proteins (25 μg) from lysates were resuspended in Laemmli's sodium dodecyl sulphate (SDS) sample buffer. Samples were subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) for 90 min at 100 mA, before transfer of proteins to PVDF membranes, which were incubated 1 h at room temperature with 20 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl containing 0.1% Tween 20 and 5% non-fat milk. After rinsing, membranes were incubated overnight with the primary antibodies at 4 °C and then with specific secondary antibodies for 1 h at room temperature. Bound antibodies were detected by chemiluminescence.

## 2.9. Immunostaining and fluorescence microscopy

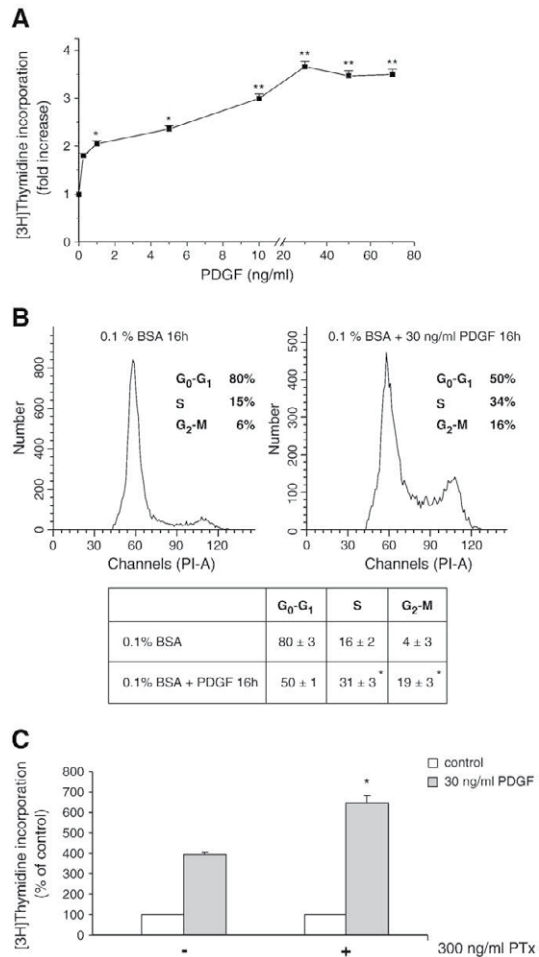
C2C12 cells were seeded on microscope slides and then challenged with 30 ng/ml PDGF for 5 min. Cells were fixed in 2% paraformaldehyde in PBS for 20 min, and permeabilized in 0.1% Triton-PBS for 30 min. Cells were then blocked in 3% BSA for 1 h and incubated with anti-phospho-ERK1/2 for 2 h and Fluorescein-conjugated anti-rabbit secondary antibody for 1 h. To stain nuclei, the specimen was incubated with 50 mg/L propidium iodide in PBS for 15 min, followed by confocal microscopy analysis. Images were obtained using a Leica SP5 laser scanning confocal microscope with 63× objective.

## 2.10. Determination of cell migration

Cell migration was measured using a Boyden chamber-based cell migration assay using twenty four-well chemotaxis chambers. Myoblasts were serum-starved for 24 h before being added to the upper wells of 24-well chemotaxis chambers. Agonists were added to the lower wells in 300 μl of medium supplemented with 0.1% of BSA and 0.2% delipidated FCS and incubated at 37 °C to initiate migration. When used, inhibitors were added to the upper and lower wells and preincubated for 30 min prior to agonist addition. Non-migrated cells were removed with a cotton swab, and filters fixed with 5% formaldehyde and stained with hematoxylin–eosin. Migration was assessed by counting the number of migrated cells in 10 randomly selected microscopy fields per well at 10× magnification.

## 2.11. Statistical analysis

Graphical representations were performed using Microsoft Excel Software (Microsoft Excel Corp., New York, USA) and Microcal™ Origin™ 5.0 (Northampton, MA, USA). Densitometric analysis of the Western Blot bands was performed using ImageJ. Statistical analysis was performed using Student's *t* test. Asterisks indicate statistical significance: \**P*<0.05; \*\**P*<0.01.



**Fig. 1.** Effect of PDGF on C2C12 cell proliferation. (A) Labelled thymidine incorporation was measured in serum-starved C2C12 myoblasts approximately 50% confluent treated with the indicated concentrations of PDGF for 16 h. [<sup>3</sup>H]Thymidine (1 μCi/well) was added during the last hour of incubation. [<sup>3</sup>H]Thymidine incorporation in untreated cells was 38,600 ± 2650 dpm. The results are reported as fold increase relative to control set as 1. The effect of PDGF was statistically significant by Student's *t* test. (B) Cell cycle distribution of serum-starved C2C12 myoblasts treated with or without 30 ng/ml PDGF for 16 h, was analyzed by DNA staining with propidium iodide (50 mg/L) employing a FACSCanto instrument. Data presented in the table are means ± SEM of three independent experiments performed in duplicate. The mitogenic effect of PDGF was statistically significant by Student's *t* test. (C) C2C12 cells, ~50% confluent, were added or not with 300 ng/ml PTX in DMEM containing 1 mg/ml BSA for 5 h before being stimulated with 30 ng/ml PDGF. [<sup>3</sup>H]Thymidine (1 μCi/well) was added during the last hour of incubation. The results are reported as percentage relative to the respective control set as 100. Data are means ± SEM of three independent experiments performed in triplicate. The effect of PTX was statistically significant by Student's *t* test.

### 3. Results

#### 3.1. S1P<sub>1</sub> reduces the mitogenic effect exerted by PDGF in C2C12 myoblasts

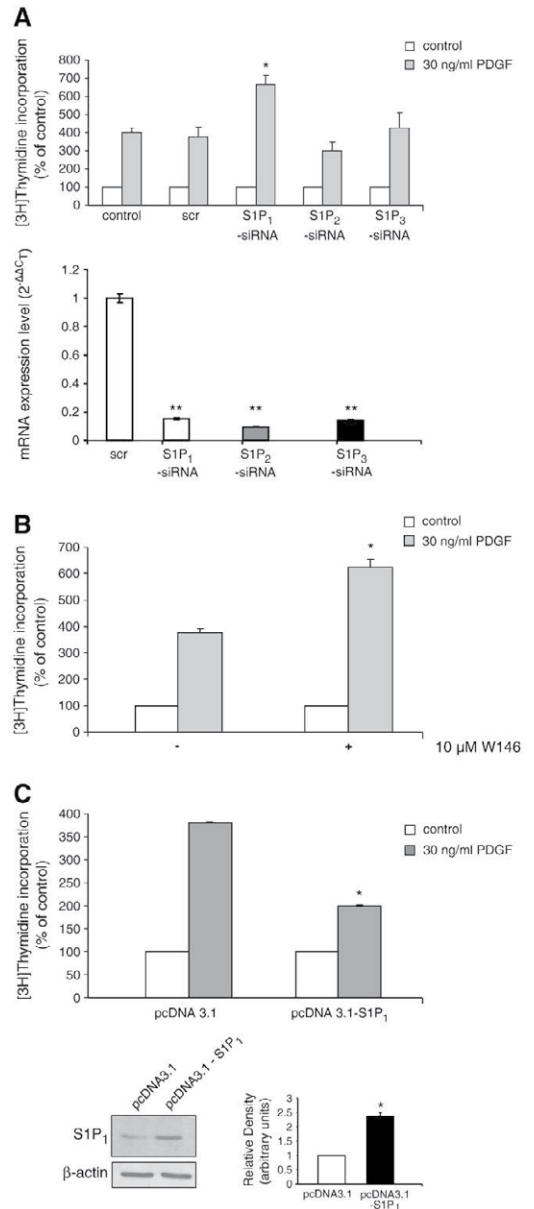
PDGF and S1P are known to exert important biological effects in myoblasts [19,21,31]. Although in various experimental settings PDGF and S1P signalling pathways appear to be intertwined via multiple mechanisms, the possible occurrence of such a relationship between these two cues in myoblasts is presently unknown. To explore this possibility, at first the mitogenic response elicited by various concentrations of PDGF in C2C12 myoblasts was examined. As shown in Fig. 1A, serum-starved cells were induced to proliferate by PDGF in a dose-dependent manner, 0.5 ng/ml being the lowest efficacious concentration and 30 ng/ml capable of eliciting maximal effect on labelled thymidine incorporation. In agreement, cell cycle analysis showed that challenge with 30 ng/ml PDGF provoked a significant stimulatory effect of S phase cell entry (Fig. 1B). Interestingly, treatment of myoblasts with 300 ng/ml PTx for 5 h prior addition of 30 ng/ml PDGF, appreciably enhanced the mitogenic effect exerted by the growth factor (Fig. 1C), suggesting that Gi-mediated signalling pathways negatively modulate the proliferative response elicited by PDGF.

To gain further insight into the possible modulatory role of PDGF mitogenic signalling by G-protein coupled receptors, the involvement of S1PRs was then examined. Data presented in Fig. 2A clearly show that down-regulation of S1P<sub>1</sub> expression by specific siRNA transfection enhanced the extent of labelled thymidine incorporation by myoblasts in response to treatment with 30 ng/ml PDGF, whereas cell transfection with siRNA that specifically down-regulated S1P<sub>2</sub> or S1P<sub>3</sub> did not impair the mitogenic effect of PDGF. In accordance, cell treatment with 10  $\mu$ M W146, a selective antagonist of S1P<sub>1</sub>, potentiated PDGF-induced cell proliferation (Fig. 2B). To obtain further information on the role of S1P<sub>1</sub> in the regulation of the mitogenic action of PDGF in myoblasts, the mitogenic response evoked by the growth factor was examined in myoblasts stably overexpressing S1P<sub>1</sub>. Results illustrated in Fig. 2C show that in these cells PDGF-stimulated cell proliferation was decreased by nearly 50%, reinforcing the notion that S1P<sub>1</sub> expression levels modulate the responsiveness of C2C12 myoblasts to the mitogenic stimulus brought about by PDGF.

**Fig. 2.** Role of S1PRs in the mitogenic effect of PDGF. (A) upper panel: serum-starved C2C12 myoblasts transfected or not with unspecific siRNA (scr) or with specific siRNA for individual S1PRs were stimulated with 30 ng/ml PDGF for 16 h. [<sup>3</sup>H]Thymidine (1  $\mu$ Ci/well) was added during the last hour of incubation. Data are means  $\pm$  SEM of 4 independent experiments performed in triplicate. The effect of S1P<sub>1</sub> silencing was statistically significant by Student's *t* test. Lower panel: quantitative mRNA analysis was performed in cells transfected with non-specific siRNA (scr) or with siRNA specific for S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub>, or S1P<sub>3</sub>; the content of housekeeping gene 18S rRNA was analyzed in parallel. Results are expressed as fold changes according to the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method, utilizing as calibrator each receptor subtype in cells transfected with scrambled siRNA. Data are means  $\pm$  SEM of three independent experiments performed in triplicate. (B) Cells, approximately 50% confluent, were preincubated for 30 min in the presence (+) or absence (–) of 10  $\mu$ M W146 before being stimulated with 30 ng/ml PDGF for 16 h. [<sup>3</sup>H]Thymidine (1  $\mu$ Ci/well) was added during the last hour of incubation. Results are reported as percentage relative to the respective control set as 100. Data are means  $\pm$  SEM of 5 independent experiments performed in triplicate. The effect of W146 was statistically significant by Student's *t* test. (C). Upper panel: myoblasts stably overexpressing S1P<sub>1</sub> or vector alone were incubated with DMEM containing 1 mg/ml BSA for 16 h in the absence (white bar) or in the presence (grey bar) of 30 ng/ml of PDGF. [<sup>3</sup>H]Thymidine (1  $\mu$ Ci/well) was added during the last hour of incubation. Results are reported as percentage relative to the respective control set as 100. Data are means  $\pm$  SEM of 4 independent experiments performed in triplicate. The effect of S1P<sub>1</sub> overexpression was statistically significant by Student's *t* test. Lower panel, left: the content of S1P<sub>1</sub> receptor was analyzed by Western analysis of cell lysates. Equally loaded protein was checked by expression of the non-muscle specific  $\beta$  isoform of actin. A blot representative of at least three independent experiments is shown. Lower panel, right: band intensity, quantified by densitometric analysis, is reported as fold increase relative to the intensity of the band corresponding to S1P<sub>1</sub> receptor in cells transfected with empty vector set as 1.

#### 3.2. S1P<sub>1</sub>-mediated inhibition of PDGF mitogenic response requires SK1

To investigate in detail the mechanism by which S1P<sub>1</sub> participates to the PDGF-directed mitogenic signalling in C2C12 cells, the possible effect of PDGF on SK activity was then studied. Results of in vitro SK assay in cell lysates obtained from myoblasts treated with 30 ng/ml PDGF for different time intervals, show that the enzymatic activity was rapidly increased following PDGF treatment and its appreciable

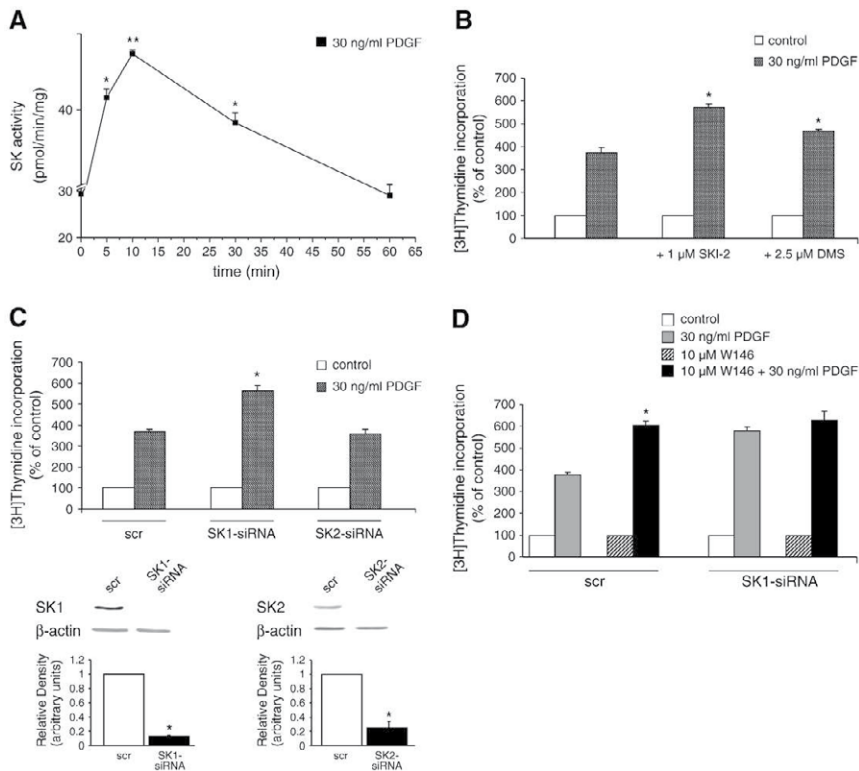


enhancement was maintained for the first 30 min of incubation to decrease thereafter (Fig. 3A). To test the involvement of PDGF-dependent biosynthesis of S1P in the engagement of S1P<sub>1</sub> in the mitogenic signalling initiated by the growth factor, thymidine incorporation experiments in response to PDGF challenge were performed in myoblasts where SK activity had been pharmacologically inhibited by 1  $\mu$ M SKI-2 or 2.5  $\mu$ M DMS. As shown in Fig. 3B, both SK inhibitors significantly enhanced the mitogenic effect of PDGF in favour of a role of SK in the engagement of S1P<sub>1</sub> by PDGF. To clarify which of the two SK isoforms was responsible for S1P production that was negatively involved in the proliferative response elicited by PDGF, labelled thymidine incorporation experiments were performed in cells where individual SK isoforms had been specifically knocked down by siRNA administration. Results presented in Fig. 3C show that, in agreement with results obtained employing pharmacological inhibitors of SK activity, siRNA directed against SK1, robustly augmented PDGF-stimulated DNA synthesis; in contrast, knocking-down of SK2 did not affect the mitogenic effect of PDGF,

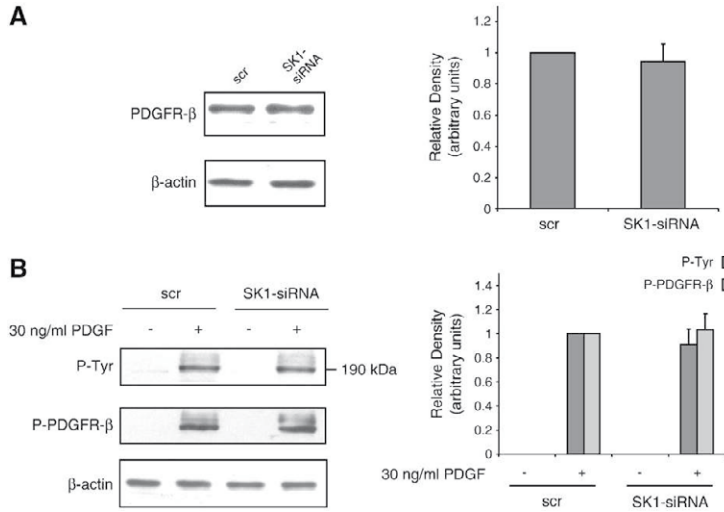
ruling out the involvement of this enzyme isoform in the control of PDGF response.

Then, to ascertain whether the mechanism by which PDGF-induced formation of S1P inhibited cell proliferation actually relays on engagement of S1P<sub>1</sub>, experiments analogous to those described in Fig. 3C were performed in the presence of 10  $\mu$ M W146. In this experimental condition the enhanced PDGF-dependent labelled thymidine incorporation due to SK1 silencing was not further increased, demonstrating that the engagement of S1P<sub>1</sub>, negatively implicated in the mitogenic effect of PDGF, depends on the growth factor-stimulated S1P formation via SK1 activation (Fig. 3D).

To rule out that SK1 knock-down modulates PDGF-mediated response by affecting PDGFR- $\beta$ , it was examined if SK1 silencing reduced PDGFR- $\beta$  protein content. However, data reported in Fig. 4A exclude this possibility. Moreover, as it can be observed in Fig. 4B, knock-down of SK1, did not influence PDGFR- $\beta$  phosphorylation elicited by a 5 min challenge with 30 ng/ml PDGF, detected by employing either phospho-Tyr or phospho-PDGFR- $\beta$  antibodies.



**Fig. 3.** Role of SK in the mitogenic effect of PDGF. (A) Cells were incubated with 30 ng/ml PDGF for the indicated time intervals, then lysed and cell extracts employed for SK activity determination. Data represent the means  $\pm$  SEM of three independent experiments performed in duplicate. The effect of PDGF was statistically significant by Student's *t* test. (B) Cells  $\sim$ 50% confluent were preincubated for 30 min in the presence or absence of 1  $\mu$ M SKI-2 or 2.5  $\mu$ M DMS before being stimulated with 30 ng/ml PDGF for 16 h. [<sup>3</sup>H]Thymidine (1  $\mu$ Ci/well) was added during the last hour of incubation. Results are reported as percentage relative to the respective control set as 100. Data are means  $\pm$  SEM of 4 independent experiments performed in triplicate. The effect of inhibition of SK on the mitogenic effect of PDGF was statistically significant by Student's *t* test. (C) Upper panel: scrambled (scr) or specific SK1- or SK2-siRNA-transfected C2C12 cells were treated or not with 30 ng/ml PDGF for 16 h. [<sup>3</sup>H]Thymidine (1  $\mu$ Ci/well) was added during the last hour of incubation. Data are means  $\pm$  SEM of three independent experiments performed in triplicate. The increase on the PDGF-induced proliferation of C2C12 myoblasts transfected with SK1-siRNA was statistically significant by Student's *t* test. Lower panel: C2C12 myoblasts transfected with non-specific siRNA (scr) or with specific siRNA for SK1 or SK2 were lysed and samples (25  $\mu$ g) were separated by SDS-PAGE, blotted and immunodetected using specific polyclonal anti-SK1 or -SK2 antibodies. Band intensity, quantified by densitometric analysis, is reported as fold change relative to the intensity of the band corresponding to control set as 1. The treatment with SK1-siRNA and SK2-siRNA was statistically significant by Student's *t* test. (D) Labelled thymidine incorporation was measured in serum-starved C2C12 myoblasts transfected with scrambled or SK1-siRNA preincubated with 10  $\mu$ M W146 for 30 min prior to the addition of 30 ng/ml PDGF for 16 h. [<sup>3</sup>H]Thymidine (1  $\mu$ Ci/well) was added during the last hour of incubation. The results are reported as percentage relative to the respective control set as 100. Data are means  $\pm$  SEM of 4 independent experiments performed in triplicate. The lack of effect of the mitogenic action of PDGF in SK1-siRNA-transfected cells preincubated with W146 was statistically significant by Student's *t* test.



**Fig. 4.** PDGFR- $\beta$  expression and PDGF-dependent tyrosine phosphorylation in SK1 knock-down C2C12 myoblasts. Cells were transfected with scrambled siRNA (scr) or with siRNA specific for murine SK1. (A) Lysates (25  $\mu$ g) were analyzed by Western blotting to quantify PDGFR- $\beta$  expression using specific anti-PDGFR- $\beta$  antibodies. A blot representative of three is shown. Band intensity is quantified by densitometric analysis, normalized to  $\beta$ -actin and reported as mean  $\pm$  SEM of three independent experiments, fold change over control set as 1. (B) Lysates (25  $\mu$ g) from cells transfected with scrambled (scr) or SK1-siRNA, treated or not with 30 ng/ml PDGF for 5 min, were subjected to Western blotting using anti-phospho-tyrosine and anti-phospho-PDGFR- $\beta$  (tyr-857) antibodies. A blot representative of three is shown. Band intensity is quantified by densitometric analysis, normalized to  $\beta$ -actin and reported as mean  $\pm$  SEM of three independent experiments, fold change of SK1-siRNA over scr specimen set as 1.

### 3.3. ERK1/2 is involved in the negative modulation of PDGF-induced mitogenic response exerted by SK1/S1P<sub>1</sub>

Next, the possible molecular mechanism by which SK1/S1P<sub>1</sub> axis plays a negative role in the regulation of myoblast proliferation elicited by PDGF was investigated. To this end the time-course of PDGF-dependent activation of Akt and ERK1/2 was examined in myoblasts where S1P<sub>1</sub> had been blocked by treatment with 10  $\mu$ M W146. As it can be observed in Fig. 5A, 30 ng/ml PDGF elicited a rapid and sustained phosphorylation of Akt, maximal at 5 min and still high at 60 min of incubation. Cell treatment with the S1P<sub>1</sub> antagonist reduced Akt phosphorylation at 1 min without substantially affecting the extent of its phosphorylation at longer times of incubation, indicating that Akt is a weak downstream target of S1P<sub>1</sub> engaged by PDGF. In the same figure, it is shown that cell challenge with PDGF evoked also a robust and transient phosphorylation of ERK1/2; more importantly, the degree of ERK1/2 phosphorylation at all the investigated time-points was considerably decreased by S1P<sub>1</sub> blockade, supporting the view that ERK1/2 is a critical downstream effector of S1P<sub>1</sub>. Analogous results were obtained when activation of ERK1/2 by PDGF was examined by confocal immunofluorescence microscopy. Indeed, the intense cytosolic staining of phospho-ERK1/2, which was detectable in myoblasts treated with 30 ng/ml PDGF for 5 min, was almost completely prevented by prior incubation with 10  $\mu$ M W146 (Fig. 5B). To provide further experimental evidence to the hypothesis that ERK1/2 is crucially involved in S1P<sub>1</sub>-mediated signalling upon PDGF challenge, the extent of kinase phosphorylation following PDGF was evaluated in myoblasts in which S1P<sub>1</sub> was specifically silenced with siRNA. As expected, ERK1/2 phosphorylation at 5 min of incubation with 30 ng/ml PDGF was drastically reduced when S1P<sub>1</sub> was knocked down, while Akt phosphorylation was unaffected (Fig. 5C).

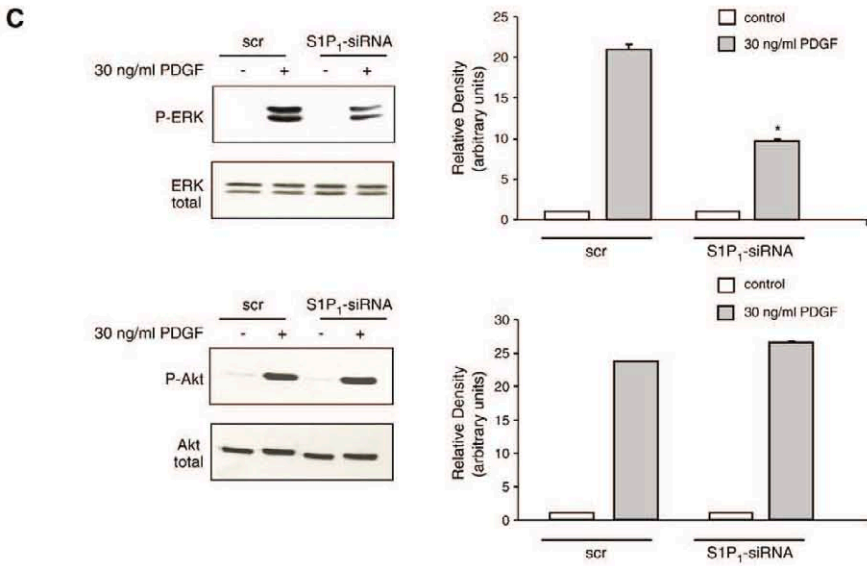
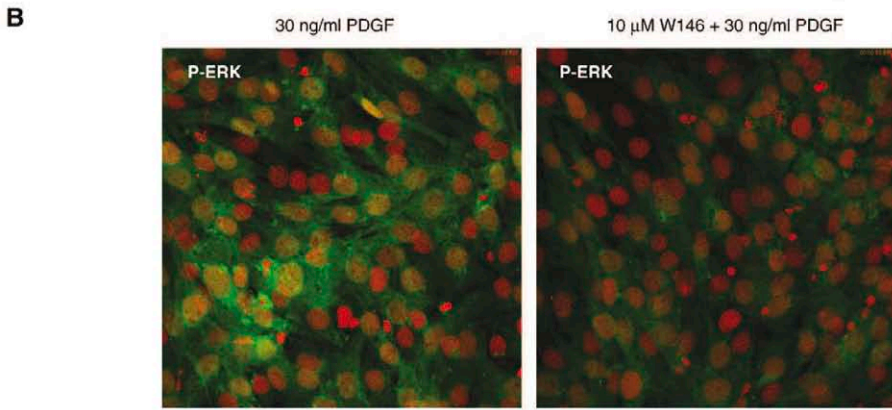
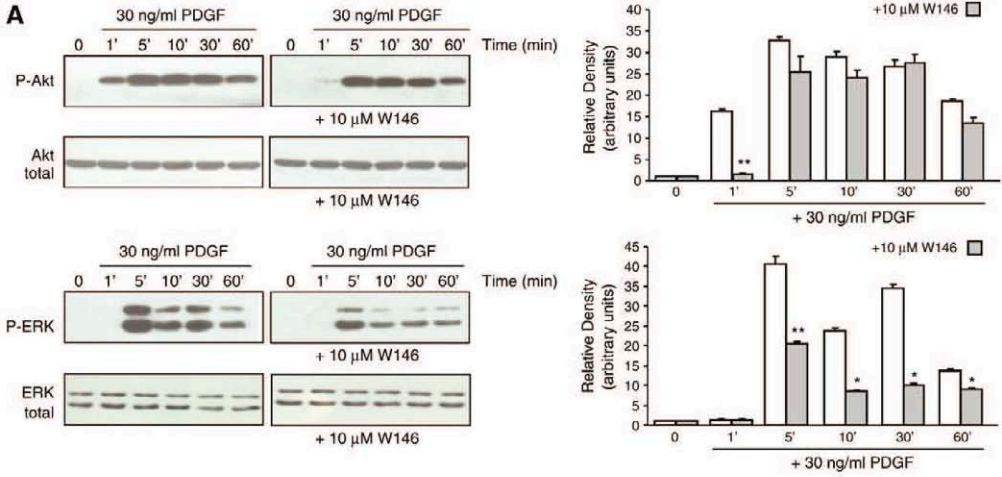
Since the here identified cross-talk between PDGFR- $\beta$  and S1P<sub>1</sub> could be in principle bidirectional, to investigate this issue it was at first examined if exogenous S1P could enhance PDGF-mediated ERK1/2 phosphorylation. As shown in Fig. 6A, addition of 1  $\mu$ M S1P did not significantly increase ERK1/2 phosphorylation elicited by myoblast

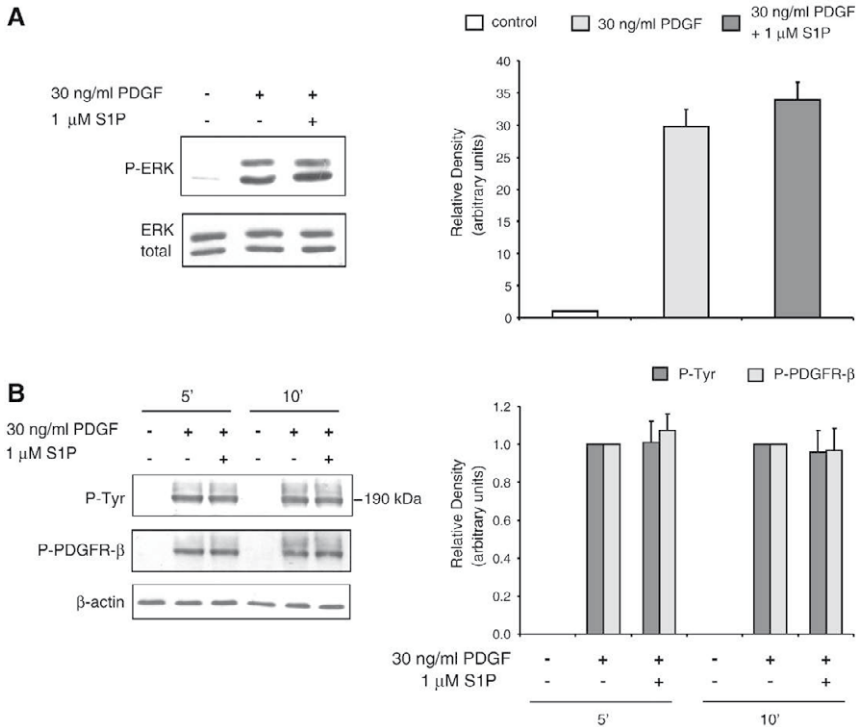
challenge with 30 ng/ml PDGF at 5 min. The potential bidirectional regulation of PDGFR- $\beta$  and S1P<sub>1</sub> was further explored by studying the effect of exogenous S1P on PDGFR- $\beta$  phosphorylation. As shown in Fig. 6B, 1  $\mu$ M S1P did not enhance PDGFR- $\beta$  phosphorylation elicited by 30 ng/ml PDGF at 5 or 10 min. Additionally, ERK1/2 phosphorylation triggered by 1  $\mu$ M S1P at 5 min of incubation was unaffected by knock-down of PDGFR- $\beta$  (Fig. 6C). Interestingly, results presented in Fig. 6D exclude a role for S1P<sub>1</sub> in transmitting ERK1/2 activation by exogenous S1P, given that the extent of the kinase phosphorylation at 5 min of incubation with 1  $\mu$ M S1P was not decreased by knock-down of S1P<sub>1</sub> and the selective S1P<sub>1</sub> agonist SEW2871 (1  $\mu$ M) did not evoke ERK1/2 phosphorylation. These latter results are in agreement with an earlier study in which S1P-dependent ERK1/2 phosphorylation in C2C12 cells was significantly decreased by S1P<sub>2</sub> knock-down [23].

Notably, as illustrated in Fig. 7A, ERK1/2 was implicated in the S1P<sub>1</sub>-dependent reduction of PDGF-induced mitogenic effect. Indeed, inhibition of ERK1/2 pathway employing 5  $\mu$ M U0126 remarkably increased the PDGF-dependent stimulation of thymidine incorporation. The increase of PDGF-induced cell proliferation by ERK1/2 inhibition was confirmed by cell cycle analysis. As shown in Fig. 7B, although U0126 treatment drastically reduced the number of cycling cells, the challenge with PDGF in this experimental condition augmented (+23%) in a statistically significant manner ( $P < 0.05$ ) the percentage of cycling cells.

Given that the modulatory effect exerted by S1P<sub>1</sub> was found to depend on SK1 activity, measurement of S1P production in response to PDGF challenge was also attempted. However, by employing an immunoassay method it was impossible to detect any S1P release in culture medium (data not shown). Moreover, the blockade of ABCC1 transporter, known to be involved in S1P export [32] by treatment with 15  $\mu$ M MK-571 for 1 h did not affect PDGF-mediated ERK1/2 phosphorylation (data not shown). Although it cannot be ruled out that a localized export of S1P mediated by a different transporter takes place in myoblasts, this set of data supports the concept that local S1P formation involves the partition of this lipid into plasma membrane microdomains rather than its release in the extracellular environment.







**Fig. 6.** Effect of S1P on ERK1/2 phosphorylation, PDGFR-β expression and activation in various experimental conditions. (A) Serum-starved C2C12 myoblasts were treated or not with 30 ng/ml PDGF in the presence or absence of 1 μM S1P for 5 min. Lysates (25 μg) were subjected to Western blotting to analyze ERK1/2 phosphorylation using specific anti-phospho-ERK1/2 and anti-ERK1/2 antibodies. A blot representative of three performed separately is shown. Results are reported as described in the legend to Fig. 5A. (B) Serum-starved C2C12 myoblasts were treated or not with 30 ng/ml PDGF in the presence or absence of 1 μM S1P for the indicated time intervals. Lysates (25 μg) were subjected to Western blotting using anti-phospho-tyrosine and anti-phospho-PDGFR-β (tyr-857) antibodies. A blot representative of three independent experiments is shown. Band intensity, quantified by densitometric analysis, is normalized to β-actin and reported as mean ± SEM of three independent experiments, fold change of PDGF plus S1P over PDGF-treated specimen, set as 1. (C) C2C12 myoblasts were transfected with unspecific siRNA (scr) or siRNA specific for murine PDGFR-β. Upper panel: lysates (25 μg) were subjected to Western blotting to analyze ERK1/2 phosphorylation using specific anti-phospho-ERK1/2 and anti-ERK1/2 antibodies. A blot representative of three is shown. Results are reported as described in the legend of Fig. 5A. Lower panel: PDGFR-β expression was checked by Western blotting in lysates (25 μg) from PDGFR-β-siRNA and scr specimens, using specific anti-PDGFR-β antibodies. Band intensity, quantified by densitometric analysis, is reported as mean ± SEM, fold change of PDGFR-β-siRNA over scr specimen set as 1. (D) Myoblasts were transfected with scrambled (scr) or S1P<sub>1</sub>-siRNA and then treated with 1 μM SEW2871 or 1 μM S1P for 5 min. ERK1/2 phosphorylation and band intensity were analyzed as described in the legend of Fig. 5A.

**3.4. SK1/S1P<sub>1</sub> axis positively regulated PDGF-directed myoblast migration**

Lastly, since PDGF receptors and S1P<sub>1</sub> appear to be also critically implicated in the control of cell motility and their cross-communication has been postulated to affect proliferation and migration in opposite fashion [33], the effect of S1P<sub>1</sub> blockade on the migratory response of myoblasts elicited by PDGF was also examined. As expected on the basis of a previous report [21], data presented in Fig. 8A show that PDGF stimulated myoblast chemotaxis in a concentration-dependent manner, with a maximal effect at 10 ng/ml, to decline thereafter. Interestingly, when myoblasts were previously incubated with 1 μM SKI-2, to block endogenous S1P formation, or with 10 μM W146, to prevent the engagement of S1P<sub>1</sub>, the chemotactic response evoked by

10 ng/ml PDGF was severely impaired (Fig. 8B). These results demonstrate the dual function of S1P<sub>1</sub> in PDGF signalling, which acts as a negative regulator of the growth factor-induced proliferation and a positive regulator of chemotaxis directed by this growth factor.

**4. Discussion**

In this study we provided experimental evidence that transactivation of S1P<sub>1</sub> via activation of SK1 is clearly implicated in the negative control of the mitogenic response elicited by PDGF in myoblasts. Interestingly, the chemotactic activity of PDGF was here found to be positively regulated by S1P<sub>1</sub> engagement, supporting the notion that the extent of S1P<sub>1</sub> transactivation directed by PDGF plays an important modulatory role of the biological action exerted by PDGF

**Fig. 5.** Role of ERK1/2 and Akt pathways in the S1P<sub>1</sub>-mediated signalling. (A) Serum-starved ~50% confluent myoblasts were treated with (+) or without (-) 10 μM W146 before being incubated with 30 ng/ml PDGF for the indicated times. Cell lysates (25 μg) were separated by SDS-PAGE, blotted and immunodetected using specific anti-phospho-ERK1/2, anti-ERK1/2, anti-phospho-Akt and anti-Akt antibodies. A blot representative of three independent experiments is presented. Band intensity corresponding to phosphorylated protein was evaluated by densitometric analysis, normalized to its total content and reported as fold increase relative to respective control set as 1. (B) C2C12 cells were seeded on microscope slides and treated or not with 10 μM W146. After 30 min 30 ng/ml PDGF was added for 5 min. Images were obtained using a specific rabbit anti-phospho-ERK1/2 antibody immunorevealed by a fluorescein-conjugated secondary antibody; nuclei were stained with propidium iodide solution (images are representative of three separate experiments). (C) Myoblasts were transfected with scrambled (scr) or S1P<sub>1</sub>-siRNA and cells treated as described in the legend of Fig. 5A. A blot representative of at least three independent experiments is shown. Band intensity, quantified by densitometric analysis, is reported as fold increase relative to the intensity of the band corresponding to the respective unchallenged control set as 1.

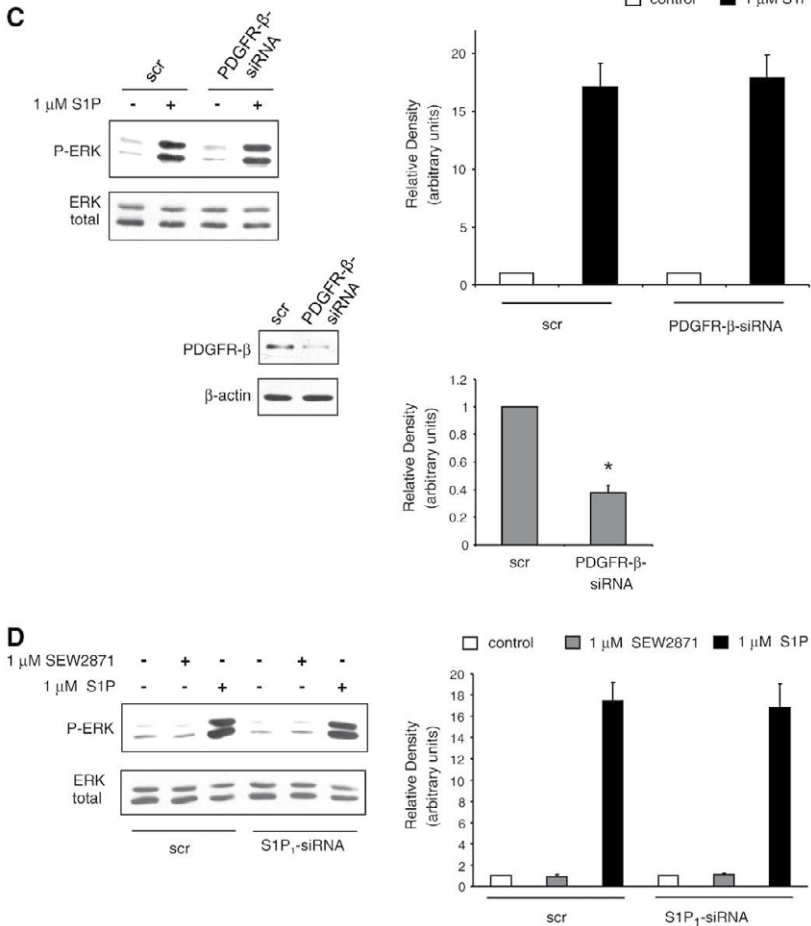


Fig. 6 (continued).

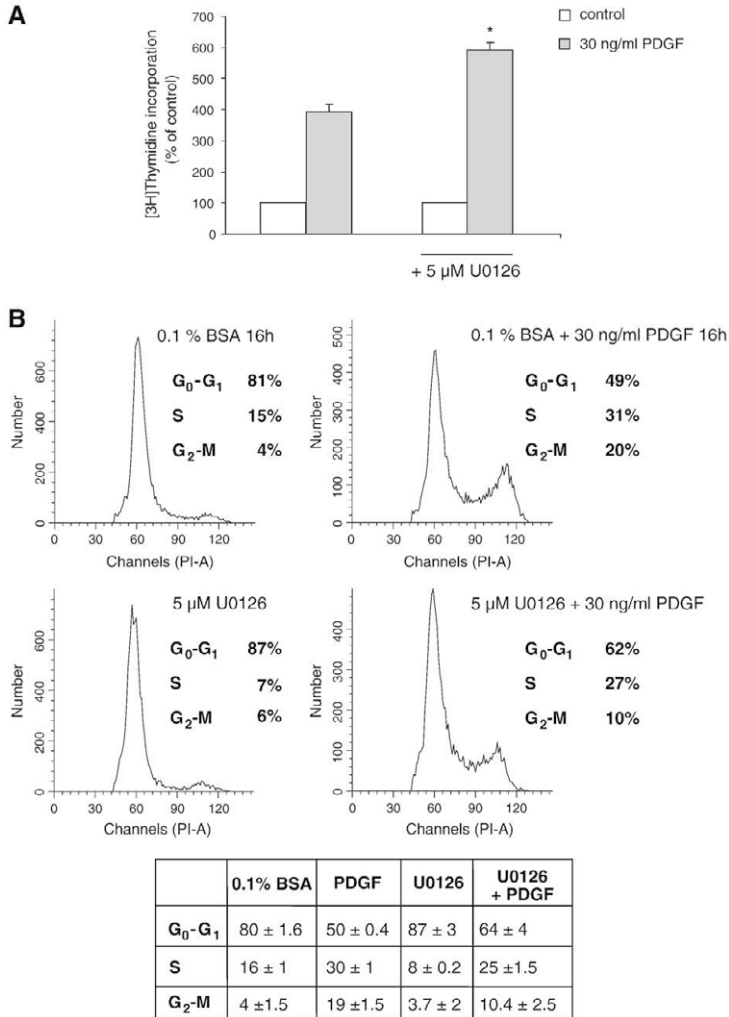
in these cells, decisive to switch between cell proliferation and motility.

A number of different studies are in favour of a key role of SK in the promotion of cell proliferation. Indeed multiple growth factors are known to exploit SK activation to elicit their mitogenic response [2,10,34]. In agreement with a positive role of SK in cell growth, its overexpression is associated with various types of cancers [35]. In contrast, here SK1 activation by PDGF was found to play an inhibitory role in the regulation of myoblast proliferation. This piece of information is in accordance with a previous study in which overexpression of SK1 in C2C12 myoblasts was reported to inhibit serum-stimulated cell proliferation [24], confirming the peculiar anti-mitogenic effect exerted by SK1 in these cells.

Intriguingly, activation of myoblast SK1 by extracellular cues was previously found implicated in biological effects other than inhibition of cell proliferation, such as TNF $\alpha$ -dependent stimulation of myogenic differentiation [27], and transdifferentiation of myoblasts into myofibroblasts in response to transforming growth factor- $\beta$  [36], making highly versatile the biological outcome of SK1 stimulation in these cells. In all these instances SK1 activation requires the

engagement of a specific S1PR such as S1P<sub>2</sub>, critical for mediating myogenesis [24], or S1P<sub>3</sub>, which is selectively up-regulated by TGF $\beta$  in order to promote the onset of myofibroblast phenotype [36], or S1P<sub>1</sub> here identified crucial for inhibition of cell proliferation and enhancement of cell motility brought about by PDGF. Thus, it appears that inside-out S1P signalling following myoblast challenge with different agents requires specific routing towards a receptor subtype in order to evoke a precise biological response. In this scenario the selective spatial control of S1P formation inside myoblasts very likely becomes crucial for the generation of a specific biochemical response, in order to make possible the selective interaction of the bioactive lipid with an individual S1PR, subsequent to its release outside the cell. One further line of evidence supporting the importance of tight regulation of topology of intracellular S1P formation comes from the present observation that endogenous S1P formed in response to PDGF challenge stimulates cell motility via S1P<sub>1</sub>, whereas exogenous S1P was previously reported to inhibit motility of the same cell type acting through S1P<sub>2</sub> [37]. Furthermore, although here SK-S1P<sub>1</sub> signalling axis was identified as negative modulator of the mitogenic activity of PDGF, in earlier studies the silencing of S1P<sub>1</sub> in myoblasts or its



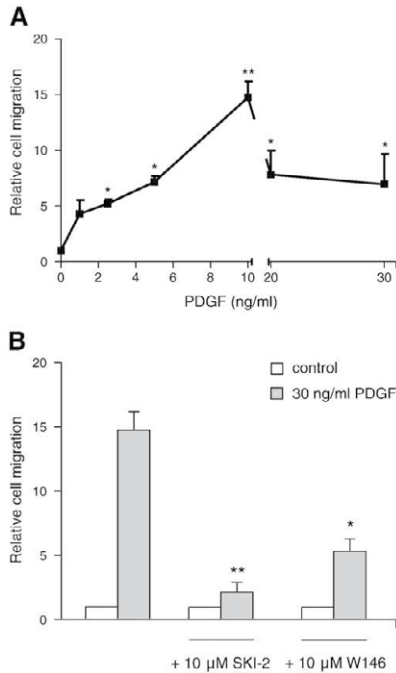


**Fig. 7.** Role of ERK1/2 in the mitogenic effect of PDGF in C2C12 myoblasts. (A) C2C12 cells, ~50% confluent, were preincubated for 30 min in the presence or not of 5 μM U0126 before being stimulated with 30 ng/ml PDGF for 16 h. [<sup>3</sup>H]Thymidine (1 μCi/well) was added during the last hour of incubation. Results are reported as percentage relative to the respective control set as 100. Data are means ± SEM of 5 independent experiments performed in triplicate. The effect of the ERK1/2 inhibitor was statistically significant by Student's *t* test. (B) Cell cycle distribution was analyzed in serum-starved C2C12 myoblasts, treated with or without 5 μM U0126 for 30 min before being stimulated with 30 ng/ml PDGF for 16 h. Cellular DNA was stained with propidium iodide (50 mg/L) and cell cycle analysis was performed by flow cytometry. Data presented in the lower panel are means ± SEM of 4 independent experiments performed in duplicate.

ligation to a specific agonist did not affect the anti-proliferative effect of exogenously added S1P [23,38], further supporting the notion that localized S1P production is a key issue to determine its biological outcome. Moreover, this concept is further strengthened by the present finding that S1P<sub>2</sub> silencing did not influence PDGF-induced cell proliferation, despite its recognized role in mediating the anti-proliferative action of exogenous S1P [23], as well as by the observation that ERK1/2 activation by exogenous S1P is disengaged from S1P<sub>1</sub>, differently from the endogenously formed lipid in response to PDGF challenge.

Data reported in literature support the occurrence of a complex cross-communication between PDGF receptor and S1P<sub>1</sub>, where S1P<sub>1</sub> can be engaged by PDGF ligation to its receptor independently from S1P formation [14] but also PDGF can engage S1P<sub>1</sub> following receptor-

dependent activation of SK and subsequent production of S1P [15]. These two distinct mechanisms have been referred to as sequential and integrative signalling, respectively, however they are not mutually exclusive and in certain cell types might function in concert [33]. The present observation that the S1P<sub>1</sub>-mediated biological response following PDGF treatment is blocked by pharmacological inhibition of SK as well as by specific silencing of SK1, supports the view that even if constitutive activity of S1P<sub>1</sub> is present in myoblasts, it is too low to enhance PDGF signalling in the complex, requiring therefore a PDGF-dependent release of S1P. Additionally, the observed inability of exogenous S1P to enhance ERK1/2 phosphorylation via S1P<sub>1</sub>, or to increase agonist-dependent PDGFR-β phosphorylation together with the disengagement of PDGFR-β from S1P-dependent ERK1/2 phosphorylation demonstrates the absence of bidirectionality



**Fig. 8.** Effect of PDGF on myoblast migration. (A) C2C12 migration across fibronectin-coated porous membranes was determined after 4 h of incubation in the presence of indicated concentrations of PDGF. Cells were fixed with 5% formaldehyde and stained with hematoxylin–eosin. Migrated cells were counted at 10 $\times$  magnification. The results are reported as fold increase relative to the control set as 1. All data are means  $\pm$  SEM of 4 independent experiments performed in triplicate. The effect of PDGF was statistically significant by Student's *t* test. (B) Cell migration was determined after 4 h of incubation in the presence of 30 ng/ml PDGF in C2C12 cells treated or not with 10  $\mu$ M SKI-2 or 10  $\mu$ M W146 for 30 min. Cells were fixed with 5% formaldehyde and stained with hematoxylin–eosin. Migrated cells were counted at 10 $\times$  magnification. The experiment was repeated three times with analogous results. The effect of SKI-2 or W146 was statistically significant by Student's *t* test.

in the cross-communication between PDGF and S1P, supporting the view that the PDGFR- $\beta$ -S1P<sub>1</sub> complex mainly acts as a modulator of the biological response elicited by PDGF.

Notably, in contrast with previous studies, where the sequential action mode was found to be exclusively involved in the positive regulation of cell motility by PDGF [39], here S1P<sub>1</sub> engagement appears to exert a dual role, being responsible not only for the full chemotactic response elicited by PDGF but also for the reduction of its mitogenic effect. Intriguingly, the unique role of S1P<sub>1</sub> as a receptor capable of reprogramming PDGF from a mitogenic to migratory stimulus was already hypothesized [34]. At variance with the present results, in NIH-3T3 fibroblasts, SK inhibition did not affect the mitogenic effect elicited by PDGF, whereas it reduced the growth factor-dependent migratory response [40]. Moreover, in hepatic stellate cells, it was previously reported that cell proliferation in response to PDGF was strongly reduced by cell treatment with VPC23019, a compound known to antagonize S1P<sub>1</sub> 10-fold more than S1P<sub>3</sub> [41], supporting the view that in these cells S1P<sub>1</sub> is required for the transmission of the full mitogenic action of PDGF. Therefore, it appears that the molecular effects elicited by PDGF via S1P<sub>1</sub> engagement are strictly dependent on the cellular setting.

In the present study the molecular mechanism by which S1P<sub>1</sub> attenuates the PDGF-dependent cell proliferation was also investigated. ERK1/2 pathway but not Akt was identified upstream of the

S1P<sub>1</sub>-mediated effect. Notably, the mechanism here individuated for ERK1/2 activation by PDGF is in full agreement with a previous study performed in HEK293 cells in which IGF1 and IGF2 were shown to elicit ERK1/2 activation by stimulating SK1-dependent transactivation of S1P<sub>1</sub> [42], even though the biological effect of S1P-dependent ERK1/2 activation was not addressed in that study. Although a wealth of data in literature demonstrate a positive role of ERK1/2 in the mitogenic action of PDGF, earlier studies performed in C2C12 myoblasts demonstrated that ERK1/2 pathway is involved in the S1P-dependent inhibition of serum-induced cell proliferation [23] and in the reduced cell growth of myoblasts overexpressing SK1 [24]. Thus, the present results are coherent with previous findings, further supporting the notion that the pool of ERK1/2 downstream of S1P signalling negatively regulates the proliferation of myoblasts.

In a recent paper, De Donatis et al. have proposed that PDGF receptor internalization via rafts or clathrin differentially directs the signalling towards proliferation or migration [43]. Although here the internalization mechanism of S1P<sub>1</sub> was not investigated, it is tempting to speculate that S1P<sub>1</sub> engagement by PDGF signalling is critical for clathrin-dependent endocytosis, decisive for the growth factor-dependent cell migration.

Lastly, it is important to underline that the here identified peculiar feature of PDGF signalling via S1P<sub>1</sub> transactivation, by shifting from proliferation to migration, can exert an important modulatory role of the final biological effect elicited by the growth factor in myoblasts. This can be particularly relevant in view of the recognized role of PDGF in skeletal muscle regeneration *in vivo*. Indeed, this growth factor is released from neighbouring cells such as endothelial cells and macrophages and is crucially implicated in the stimulation of myogenic cell growth leading to muscle repair [44–46]. Although proliferation of muscle progenitor cells and their migration to the site of muscle lesion are both important for tissue regeneration, these two events must be temporally regulated to ensure an adequate repopulation of the damaged tissue. Consequently, in this context the bimodal effect of PDGF on cell proliferation and migration must be tightly controlled. The here described role of S1P<sub>1</sub> in PDGF signalling represents a novel mechanism for redirecting the final biological effect elicited by the growth factor. Experimental evidence obtained in other cell types demonstrates that S1P<sub>1</sub> content at plasma membrane can be modulated by various means including down-regulation, transcriptional control, and ubiquitinylation [47–50]. Further studies will clarify if any of these S1P<sub>1</sub> regulatory mechanisms participates to fine tuning of muscle progenitor cell responsiveness to growth factors during muscle regeneration *in vivo*.

## 5. Conclusion

The present results add a new piece of information to the complex mechanism by which PDGF and S1P<sub>1</sub> cross-communicate. Moreover, they support the hypothesis that precise regulation of PDGF functional coupling to S1P<sub>1</sub> during skeletal muscle regeneration may be important to timely control proliferation and migration of muscle precursor cells.

## Acknowledgements

This research was supported by grants from Italian Ministry of University and Scientific Research (PRIN2007), Telethon Italy (GGP08053), University of Florence, and Ente Cassa di Risparmio di Firenze. We are indebted to Dr. Y. Banno for providing SK1 antibodies and to Dr. S. Nakamura for providing SK2 antibodies.

## References

- [1] S. Pyne, N. Pyne, *Pharmacol. Ther.* 88 (2000) 115.
- [2] K. Watterson, H. Sankala, S. Milstien, S. Spiegel, *Prog. Lipid Res.* 42 (2003) 344.

- [3] P. Hanel, P. Andreani, M.H. Graler, *FASEB J.* 21 (2007) 1202.
- [4] R.H. Kim, K. Takabe, S. Milstien, S. Spiegel, *Biochim. Biophys. Acta* 1791 (2009) 692.
- [5] K. Venkataraman, Y.M. Lee, J. Michaud, S. Thangada, Y. Ai, H.L. Bonkovsky, N.S. Parikh, C. Habrukowich, T. Hla, *Circ. Res.* 102 (2008) 669.
- [6] Y. Yatomi, *Biochim. Biophys. Acta* 1780 (2008) 606.
- [7] R. Alemany, C.J. van Koppen, K. Danneberg, M. Ter Braak, H.D. Meyer Zu, Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 374 (2007) 413.
- [8] H. Fyrst, J.D. Saba, *Biochim. Biophys. Acta* 1781 (2008) 448.
- [9] H. Le Stunff, C. Peterson, H. Liu, S. Milstien, S. Spiegel, *Biochim. Biophys. Acta* 1582 (2002) 8.
- [10] D.A. Lebman, S. Spiegel, *J. Lipid Res.* 49 (2008) 1388.
- [11] K. Takabe, S.W. Paugh, S. Milstien, S. Spiegel, *Pharmacol. Rev.* 60 (2008) 181.
- [12] A. Olivera, S. Spiegel, *Nature* 365 (1993) 557.
- [13] J.S. Long, V. Natarajan, G. Tigyi, S. Pyne, N.J. Pyne, *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 80 (2006) 74.
- [14] C. Waters, B. Sambhi, K.C. Kong, D. Thompson, S.M. Pitson, S. Pyne, N.J. Pyne, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 6282.
- [15] J.P. Hobson, H.M. Rosenfeldt, L.S. Barak, A. Olivera, S. Poulton, M.G. Caron, S. Milstien, S. Spiegel, *Science* 291 (2001) 1800.
- [16] L.M. Baudhuin, Y. Jiang, A. Zaslavsky, I. Ishii, J. Chun, Y. Xu, *FASEB J.* 18 (2004) 341.
- [17] S. Usui, N. Sugimoto, N. Takuwa, S. Sakagami, S. Takata, S. Kaneko, Y. Takuwa, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 12300.
- [18] V. Serriere-Lanneau, F. Teixeira-Clerc, L. Li, M. Schippers, W. de Wries, B. Julien, J. Tran-Van-Nhieu, S. Manin, K. Poelstra, J. Chun, S. Carpentier, T. Levade, A. Mallat, *S. Lotersztajn, FASEB J.* 21 (2007) 2005.
- [19] P. Cirri, M.L. Taddei, P. Chiarugi, F. Buricchi, A. Caselli, P. Paoli, E. Giannoni, G. Camici, G. Manao, G. Raugeri, G. Ramponi, *Mol. Biol. Cell* 16 (2005) 73.
- [20] T.A. Robertson, M.A. Maley, M.D. Grounds, J.M. Papadimitriou, *Exp. Cell Res.* 207 (1993) 321.
- [21] Z. Yablonka-Reuveni, T.M. Balestreri, D.F. Bowen-Pope, *J. Cell Biol.* 111 (1990) 1623.
- [22] E. Meacci, V. Vasta, C. Donati, M. Farnararo, P. Bruni, *FEBS Lett.* 457 (1999) 184.
- [23] C. Donati, E. Meacci, F. Nuti, L. Becciolini, M. Farnararo, P. Bruni, *FASEB J.* 19 (2005) 449.
- [24] E. Meacci, F. Nuti, C. Donati, F. Cencetti, M. Farnararo, P. Bruni, *J. Cell. Physiol.* 214 (2008) 210.
- [25] T. Murate, Y. Banno, K. Koizumi, K. Watanabe, N. Mori, A. Wada, Y. Igarashi, A. Takagi, T. Kojima, H. Asano, Y. Akao, S. Yoshida, H. Saito, Y. Nozawa, *J. Histochem. Cytochem.* 49 (2001) 845.
- [26] N. Igarashi, T. Okada, S. Hayashi, T. Fujita, S. Jahangeer, S. Nakamura, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 46832.
- [27] C. Donati, P. Nincheri, F. Cencetti, E. Rapizzi, M. Farnararo, P. Bruni, *FEBS Lett.* 581 (2007) 4384.
- [28] C. Donati, F. Cencetti, P. Nincheri, C. Bernacchioni, S. Brunelli, E. Clementi, G. Cossu, P. Bruni, *Stem Cells* 25 (2007) 1713.
- [29] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, *Methods* 25 (2001) 402.
- [30] A. Olivera, J. Rosenthal, S. Spiegel, *Anal. Biochem.* 223 (1994) 306.
- [31] P. Bruni, C. Donati, *Cell. Mol. Life Sci.* 65 (2008) 3725.
- [32] P. Mitra, C.A. Oskeritzian, S.G. Payne, M.A. Beaven, S. Milstien, S. Spiegel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103 (2006) 16394.
- [33] N.J. Pyne, S. Pyne, *Biochim. Biophys. Acta* 1781 (2008) 467.
- [34] S. Pyne, S.C. Lee, J. Long, N.J. Pyne, *Cell. Signal.* 21 (2009) 14.
- [35] K.J. French, R.S. Schrecengost, B.D. Lee, Y. Zhuang, S.N. Smith, J.L. Eberly, J.K. Yun, C.D. Smith, *Cancer Res.* 63 (2003) 5962.
- [36] F. Cencetti, C. Bernacchioni, P. Nincheri, C. Donati, P. Bruni, *Mol. Biol. Cell* 21 (2010) 1111.
- [37] L. Becciolini, E. Meacci, C. Donati, F. Cencetti, E. Rapizzi, P. Bruni, *Biochim. Biophys. Acta* 1761 (2006) 43.
- [38] E. Rapizzi, C. Donati, F. Cencetti, P. Nincheri, P. Bruni, *Mol. Cell. Biochem.* 314 (2008) 193.
- [39] H.M. Rosenfeldt, J.P. Hobson, M. Maceyka, A. Olivera, V.E. Nava, S. Milstien, S. Spiegel, *FASEB J.* 15 (2001) 2649.
- [40] L. Veracini, M. Franco, A. Boureux, V. Simon, S. Roche, C. Benistant, *J. Cell Sci.* 119 (2006) 2921.
- [41] A.M. Brunati, E. Tibaldi, A. Carraro, E. Gringeri, F. D'Amico Jr., A. Toninello, M.L. Massimino, M.A. Pagano, G. Nalesso, U. Cillo, *Biochim. Biophys. Acta* 1783 (2008) 347.
- [42] H.M. El Shewy, K.R. Johnson, M.H. Lee, A.A. Jaffa, L.M. Obeid, L.M. Luttrell, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 31399.
- [43] A. De Donatis, G. Comito, F. Buricchi, M.C. Vinci, A. Parenti, A. Caselli, G. Camici, G. Manao, G. Ramponi, P. Cirri, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 19948.
- [44] B. Chazaud, C. Sonnet, P. Lafuste, G. Bassez, A.C. Rimaniol, F. Poron, F.J. Authier, P.A. Dreyfus, R.K. Gherardi, *J. Cell Biol.* 163 (2003) 1133.
- [45] B. Chazaud, M. Brigitte, H. Yacoub-Youssef, L. Arnold, R. Gherardi, C. Sonnet, P. Lafuste, F. Chretien, *Exerc. Sport Sci. Rev.* 37 (2009) 18.
- [46] C. Christov, F. Chretien, R. Abou-Khalil, G. Bassez, G. Vallet, F.J. Authier, Y. Bassaglia, V. Shinin, S. Tajbakhsh, B. Chazaud, R.K. Gherardi, *Mol. Biol. Cell* 18 (2007) 1397.
- [47] M. Birker-Robaczewska, R. Studer, B. Haenig, K. Menyhart, S. Hofmann, O. Nayler, *J. Cell. Biochem.* 105 (2008) 1139.
- [48] C.G. Jung, H.J. Kim, V.E. Miron, S. Cook, T.E. Kennedy, C.A. Foster, J.P. Antel, B. Soliven, *Glia* 55 (2007) 1656.
- [49] M.L. Oo, S. Thangada, M.T. Wu, C.H. Liu, T.L. Macdonald, K.R. Lynch, C.Y. Lin, T. Hla, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 9082.
- [50] S.C. Sensken, M.H. Graler, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 6298.



## Research paper

## Ceramide 1-phosphate stimulates proliferation of C2C12 myoblasts

Patricia Gangoiti<sup>a,1</sup>, Caterina Bernacchioni<sup>b,c,1</sup>, Chiara Donati<sup>b,c</sup>, Francesca Cencetti<sup>b,c</sup>, Alberto Ouro<sup>a</sup>, Antonio Gómez-Muñoz<sup>a</sup>, Paola Bruni<sup>b,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Science and Technology, University of the Basque Country, 48080 Bilbao, Spain

<sup>b</sup> Department of Biochemical Sciences, University of Florence, Firenze, Italy

<sup>c</sup> Interuniversity Institute of Myology (IIM), Italy

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 12 May 2011

Accepted 12 September 2011

Available online 17 September 2011

## Keywords:

Ceramide 1-phosphate

C2C12 myoblasts

Myoblast proliferation

Cell growth

Cell cycle

## ABSTRACT

Recent studies have established specific cellular functions for different bioactive sphingolipids in skeletal muscle cells. Ceramide 1-phosphate (C1P) is an important bioactive sphingolipid that has been involved in cell growth and survival. However its possible role in the regulation of muscle cell homeostasis has not been so far investigated. In this study, we show that C1P stimulates myoblast proliferation, as determined by measuring the incorporation of tritiated thymidine into DNA, and progression of the myoblasts through the cell cycle. C1P induced phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  and the product of retinoblastoma gene, and enhanced cyclin D1 protein levels. The mitogenic action of C1P also involved activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt, ERK1/2 and the mammalian target of rapamycin. These effects of C1P were independent of interaction with a putative G<sub>i</sub>-coupled C1P receptor as pertussis toxin, which maintains G<sub>i</sub> protein in the inactive form, did not affect C1P-stimulated myoblast proliferation. By contrast, C1P was unable to inhibit serum starvation- or staurosporine-induced apoptosis in the myoblasts, and did not affect myogenic differentiation. Collectively, these results add up to the current knowledge on cell types targeted by C1P, which so far has been mainly confined to fibroblasts and macrophages, and extend on the mechanisms by which C1P exerts its mitogenic effects. Moreover, the biological activities of C1P described in this report establish that this phosphosphingolipid may be a relevant cue in the regulation of skeletal muscle regeneration, and that C1P-metabolizing enzymes might be important targets for developing cellular therapies for treatment of skeletal muscle degenerative diseases, or tissue injury.

© 2011 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

## 1. Introduction

Skeletal muscle is mainly involved in active force production, resulting in the movement of the skeletal system. Under normal biological conditions adult skeletal muscle is an extremely stable tissue. However, upon damage due to specific diseases, trauma or strong physical exercise, skeletal muscle exhibits a remarkable

capacity of self-repair. Repair and maintenance of skeletal muscle is attributed to the skeletal muscle stem cell pool, represented by the satellite cells. In response to a number of stimuli, quiescent satellite cells become activated, start to proliferate and differentiate into myoblasts, which then fuse to pre-existing myofibres to regenerate the tissue [1,2]. Although in the last decade much effort has been dedicated to the comprehension of this key biological process, improved understanding of the molecular mechanisms implicated in skeletal muscle myogenesis is critical for the development of therapies to reduce the loss of muscular mass associated with muscle degenerative diseases, injuries, or aging.

In recent years sphingolipids have emerged as highly versatile molecules acting both as structural components of the membrane lipid bilayer and precursors of powerful bioactive signaling molecules. Of note, sphingolipid mediators are capable of regulating fundamental biological processes in a variety of tissues, including skeletal muscle (for detailed reviews see [3,4]). In this regard, it was reported that the plasma membrane content of sphingomyelin (SM), which is the main sphingolipid in plasma membranes,

*Abbreviations:* SM, sphingomyelin; C1P, ceramide 1-phosphate; S1P, sphingosine 1-phosphate; CERK, ceramide kinase; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; DTT, dithiothreitol; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; BSA, bovine serum albumin; ECL, enhanced chemiluminescence; SDS, sodium dodecylsulfate; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; GSK-3 $\beta$ , glycogen synthase kinase-3 $\beta$ ; pRb, product of retinoblastoma gene; mTOR, mammalian target of rapamycin; PTx, pertussis toxin; MHC, myosin heavy chain.

\* Corresponding author. Dipartimento di Scienze Biochimiche, Università di Firenze, Viale G.B. Morgagni 50, 50134 Firenze, Italy. Tel.: +390554598328; fax: +390554598905.

E-mail address: [paola.bruni@unifi.it](mailto:paola.bruni@unifi.it) (P. Bruni).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

correlates with the activation state of muscle satellite cells, supporting the concept that SM hydrolysis produces signals that are necessary for their activation [5]. A key bioactive sphingolipid metabolite is ceramide, which can be formed via *de novo* synthesis or through activation of sphingomyelinases and the subsequent degradation of SM. Ceramide appears to be negatively associated with myoblast differentiation, since inhibition of its *de novo* synthesis enhances the onset of the differentiated phenotype in cultured rat myoblasts [6]. Moreover, a number of recent studies support the view that sphingosine 1-phosphate (S1P), another powerful sphingoid mediator that can be generated by further metabolism of ceramide, exerts a critical role in myogenesis. Indeed, S1P has been found to mediate the entry of satellite cells into the cell cycle, suggesting that the accelerated degradation of SM observed upon cell activation leads to S1P production [7]. In addition, challenging cultured C2C12 myoblasts with S1P enhanced their differentiation into myotubes without affecting their proliferative state [8]. In agreement with this observation, sphingosine kinase, the enzyme that produces S1P, has been described as pro-myogenic for myoblasts [9], and was implicated in cytokine-regulated myogenic differentiation [10].

Another key sphingolipid metabolite is ceramide 1-phosphate (C1P), which is generated via direct phosphorylation of ceramide by ceramide kinase (CERK). It was first demonstrated that C1P stimulated DNA synthesis in cultured rat fibroblasts [11,12] as well as in mouse macrophages [13]. Additionally, macrophage motility and survival are robustly enhanced by treatment with C1P [14,15]. Also, this sphingolipid plays a key role in inflammatory responses. In particular, C1P binds to and activates cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>, thus favoring prostanoid biosynthesis [16].

In this study, we demonstrate for the first time that C1P stimulates myoblast proliferation, an action that may be essential for controlling muscle regeneration. This process implicates activation of a whole panel of signal transduction pathways including phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt, ERK1/2, and mammalian target of rapamycin (mTOR). Furthermore, although C1P promotes macrophage survival, we here demonstrate that it does not inhibit myoblast apoptosis, and that it is not involved in myoblast differentiation. This study highlights skeletal muscle as a novel target tissue for C1P, and suggests that this phosphosphingolipid may play an important role in skeletal muscle regeneration.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Biochemicals, cell culture reagents, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal calf serum (FCS), protease inhibitor cocktail, monoclonal anti-skeletal fast myosin heavy chain (MHC) (clone MY-32), bovine serum albumin (BSA), staurosporine, LPA (synthesized *l*- $\alpha$ -monooleoyl phosphatidic acid), C8-C1P, C16-C1P and natural C1P were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Mouse skeletal muscle C2C12 cells were obtained from the American Type Culture Collection, (Manassas, VA, USA). The ceramide-*D*-erythro-1-phosphate [N-stearoyl-9,10-<sup>3</sup>H] (15  $\mu$ M) was obtained from American Radiolabeled Chemicals (Saint Louis, MO, USA) and [ $\gamma$ -<sup>33</sup>P]ATP was from Perkin Elmer (Waltham, MA, USA). Propidium iodide and the ceramide kinase antibody were from Calbiochem (San Diego, CA, USA). Pertussis toxin (PTx) was obtained from Alexis Corporation (San Diego, CA, USA). Monoclonal anti-caveolin-3 was from Transduction Laboratories (Lexington, KY, USA). LY294002 hydrochloride, 10-DEBC hydrochloride, PD98059, U0126 and rapamycin were from Tocris Cookson Limited (Bristol, UK). TGX-221 was a kind gift of Prof. E. Hirsch (University of Turin, Italy). Antibodies against myogenin (F5D),  $\beta$ -actin (C-11), cyclin D1 (72-13G),

phosphorylated product of retinoblastoma gene (pRb) (Ser 795), phosphorylated glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) (Ser 9), pan-Akt (H-136), phospho-pan-Akt (Ser 473), anti-mouse, anti-rabbit, and anti-goat immunoglobulin G1 conjugated to horseradish peroxidase and Blotto (nonfat dry milk) were obtained from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA). Phospho-ERK1/2, pan ERK1/2, phosphorylated mTOR (Ser 2448) antibodies were from Cell Signaling Technology, Inc. (Beverly, MA, USA). Enhanced chemiluminescence (ECL) reagents was obtained from Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden). [<sup>3</sup>H]thymidine (20 Ci/mmol) was from Perkin Elmer (Waltham, MA, USA). Fluorescein-conjugated horse anti-mouse secondary antibody was obtained from Vector (Burlingame, CA, USA). The caspase-3 substrate Ac-DEVD-AFC was from Biomol Research Laboratories Inc. (PA, USA). Annexin V-FITC apoptosis detection kit and phosphorylated anti-GSK-3 $\beta$  (Tyr 216) were supplied by BD Biosciences (San Jose, CA, USA). Specific CERK inhibitor NVP-231 [17] and the related inactive compound 4 were kindly provided by Dr. F. Bornancin.

### 2.2. Cell culture

C2C12 mouse myoblasts were routinely grown in DMEM supplemented with 10% FCS. For proliferation experiments, cells were seeded in 12- or 6-well plates and used when ~40% confluent. For differentiation experiments, cells were seeded in 6-well plates and, when confluent, were shifted to DMEM without serum containing 1 mg/ml BSA. For apoptosis experiments myoblasts were seeded in 6-well plates and used when subconfluent.

### 2.3. Delivery of C1P to cells in culture

An aqueous dispersion of long-chain natural C1P (from bovine brain, mainly containing stearic and nervonic fatty acids) was added to cultured myoblasts as previously described [11]. Stock solutions were prepared by sonicating C1P (1 mg) in sterile nanopure water (1 ml) on ice using a probe sonicator until a clear dispersion was obtained. Final concentration of the stock solution was approximately 1.47 mM.

### 2.4. Cell treatment with inhibitors

Specific inhibitors of PI3K, Akt, MEK and mTOR were administered to the cells 30 min before agonist addition. Preliminarily, the specific effect of various inhibitors was tested by Western Blot analysis, incubating lysates from LY294002-, 10-DEBC-, TGX-221-, PD98059-, U0126- or rapamycin-treated cells with anti-ERK1/2, anti-phospho-ERK1/2, anti-Akt, anti-phospho-Akt or anti-phospho-mTOR antibodies to verify the actual inhibition of the kinase activity. To investigate G<sub>i</sub>-coupled events, C2C12 cells were incubated with 0.5  $\mu$ g/ml PTx for 16 h before C1P challenge.

### 2.5. Cell proliferation measurement

To evaluate [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation, proliferating myoblasts, previously serum-starved for 24 h, were challenged with various concentrations of C1P for 16 h. In some instances cells were pre-incubated for 30 min in the presence of appropriate inhibitors before being stimulated with C1P for 16 h. [<sup>3</sup>H]thymidine (0.5  $\mu$ Ci/well) was added for the last 2 h of incubation. Cells were washed twice in ice-cold PBS before addition with 500  $\mu$ l 10% trichloroacetic acid for 5 min at 4 °C. Cells were washed again in ice-cold PBS, and 250  $\mu$ l of ethanol:ether (3:1 v/v) was added to the insoluble material. Samples were then lysed in 0.25 N NaOH for 1 h at 37 °C. Incorporation of [<sup>3</sup>H]thymidine was measured by scintillation counting.

Alternatively, proliferation was evaluated by cell counting. Briefly, proliferating myoblasts were serum-starved for 24 h and then challenged with 15  $\mu\text{M}$  C1P for 24 h before being trypsinized and counted by a hemocytometer.

### 2.6. Cell cycle analysis

To investigate the cell cycle distribution, C2C12 myoblasts were challenged with C1P for 16 h. Cell cycle distribution was determined by the propidium iodide-hypotonic citrate method with a FACSCanto instrument (Becton–Dickinson, San Jose, CA, USA) essentially as previously described [18]. Briefly, cells were washed twice in PBS and collected by scraping in a solution containing 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  propidium iodide, 0.1% sodium citrate and 0.1% Nonidet, and analyzed 30 min later. The software used was ModFit LT for Windows, Proliferation Protocol, Verity Software House Inc. (Topsham, ME, USA).

### 2.7. Western blot analysis

Cells were lysed for 30 min at 4 °C in a buffer containing 50 mM Tris, pH 7.5, 120 mM NaCl, 1 mM EDTA, 6 mM EGTA, 15 mM  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , 20 mM NaF, 1% Nonidet, and protease inhibitor cocktail (1.04 mM AEBSF, 0.08  $\mu\text{M}$  aprotinin, 0.02 mM leupeptin, 0.04 mM bestatin, 15  $\mu\text{M}$  pepstatin A, 14  $\mu\text{M}$  E-64) essentially as described [8]. To prepare total cell lysates, cell extracts were centrifuged for 15 min at 10,000  $\times g$  at 4 °C. Protein aliquots (30  $\mu\text{g}$ ) from lysates were resuspended in Laemmli's sodium dodecylsulfate- (SDS) sample buffer. Samples were subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western analysis as previously described [19]. Bound antibodies were detected using ECL reagents.

### 2.8. Cell immunofluorescence assay

Cells were seeded on microscope slides, pre-coated with 2% gelatine, and then treated or not with C1P. After 72 h cells were fixed in 2% paraformaldehyde in PBS for 20 min and permeabilized in 0.1% Triton X-100-PBS for 30 min. Cells were then blocked in 3% BSA for 1 h and incubated with anti-MHC antibody for 2 h and fluorescein-conjugated anti-mouse secondary antibody for 1 h. To stain nuclei, the specimen was incubated with 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  propidium iodide in PBS for 15 min. Images were obtained using a Leica SP5 laser scanning confocal microscope with 40 $\times$  objective. To quantify the fusion of C2C12 cells after treatments, we calculated the fusion index as the average number of nuclei in MHC-positive cells with at least three nuclei above total number of nuclei.

### 2.9. Measurement of apoptosis

C2C12 myoblasts were seeded at a density of approximately  $1 \times 10^5$  cells/well and employed for experiments after 24 h. For serum starvation-induced apoptosis, cells were incubated in serum-free medium for 24 h. In these experiments, C1P was administered 30 min and 18 h after serum starvation. Staurosporine (0.5  $\mu\text{M}$ ) was added for the last 4 h of incubation to cells serum-starved for 24 h, treated or not at 30 min and 18 h incubation with C1P. Thapsigargin (3  $\mu\text{M}$ ) or etoposide (200  $\mu\text{M}$ ) were added for the last 8 h of incubation to cells serum-starved for 24 h, treated or not at 30 min and 18 h incubation with C1P. To measure caspase-3 activity cells were washed twice with PBS and then lysed for 20 min at 4 °C in 20 mM Tris–HCl buffer, pH 7.4, containing 250 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  aprotinin, 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptin, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 4 mM sodium vanadate, and 1 mM dithiothreitol (DTT) essentially as previously described [20]. Cell lysis was completed by sonication,

and the total protein content was determined using the Coomassie Blue reagent. Aliquots of protein (50  $\mu\text{g}$ ) were diluted in 50 mM HEPES-KOH buffer (pH 7.0) containing 10% glycerol, 0.1% 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propane sulfonate, 2 mM EDTA, and 10 mM DTT. Caspase-3 activity was determined by incubating protein samples for 2 h at 37 °C with the fluorescence probe Ac-DEVD-AFC (30  $\mu\text{M}$ ) (excitation 400 nm, emission 505 nm) as previously described [21]. To determine non specific substrate degradation, the assays were also performed by preincubating total protein samples for 15 min at 37 °C with or without the specific caspase inhibitor (200 nM Ac-DEVD-CHO) before substrate addition. Cell apoptosis was also measured by using an annexin V-FITC apoptosis detection kit according to the manufacturer's instructions (BD Biosciences). With this procedure, healthy cells remained unstained whereas annexin V-FITC stained early apoptotic cells, propidium iodide and annexin V-FITC stained late apoptotic cells and propidium iodide stained necrotic cells. Samples were analyzed by flow cytometry with an air-cooled 488 nm argon-ion laser (FACSCalibur, BD Biosciences) and CellQuest software (BD Biosciences), essentially as described [22].

### 2.10. Evaluation of C1P metabolism in C2C12 cells

To examine C1P metabolism, C2C12 cells were treated with 50 nCi/ml of ceramide-*d*-erythro-1-phosphate [*N*-stearoyl-9- $10$ - $^3\text{H}$ ] (15  $\mu\text{M}$ ). Then the cells were collected at different time points to chase for the possible generation of C1P metabolites, mainly ceramide, fatty acids, or sphingomyelin. The possible generation of sphingosine 1-phosphate was evaluated using [ $^3\text{P}$ ]C1P (50 nCi/ml, 15  $\mu\text{M}$ ) which was synthesized according to a previously established procedure [23]. Cells were washed twice with ice-cold calcium-free PBS and scraped into 0.5 ml methanol. They were then washed with a further 0.5 ml methanol, and the two methanol samples were combined and mixed with 0.5 ml chloroform. Lipids were extracted by separation of phases with a further 0.5 ml chloroform and 0.9 ml of a solution containing 2 M KCl and 0.2 M HCl. Chloroform phases were dried under a stream of nitrogen and lipids were separated by thin-layer chromatography using silica gel 60-coated glass plates. The plates were developed in a three solvent system containing chloroform/methanol/ammonium hydroxide (65:35:7.5, v/v/v); chloroform/methanol/acetic acid (9:1:1, v/v/v); and butanol/acetic acid/water (3:1:1, v/v/v). The position of the different lipids was identified after staining with  $\text{I}_2$  vapor by comparison with authentic standards. Radioactivity was quantified by scraping the spots from the plates by liquid scintillation counting.

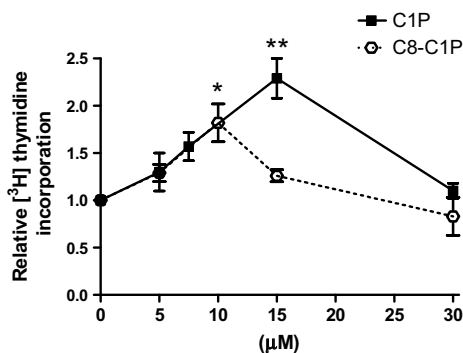
This work has been carried out in accordance with Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals.

## 3. Results

### 3.1. C1P stimulates proliferation of C2C12 myoblasts but does not affect cell differentiation or apoptosis

The aim of the present study was to examine whether C1P could play a regulatory role of myoblast biological parameters. For this purpose, we first tested whether C1P was able to stimulate myoblast proliferation. Fig. 1 shows that C1P stimulated DNA synthesis, as determined by measuring the incorporation of [ $^3\text{H}$ ] thymidine into DNA in C2C12 cells. This effect was concentration-dependent and resulted to be optimum at 15  $\mu\text{M}$  C1P. A similar effect on cell proliferation was observed when pure C16-C1P was employed instead of the C1P from bovine brain (see Materials and methods section) (data not shown). In this study, we also used a synthetic short-chain C1P (C8-C1P), which is more soluble in

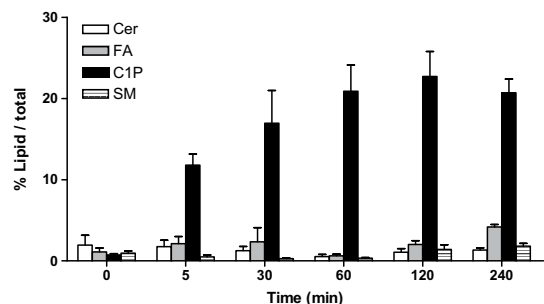




**Fig. 1.** Effect of C1P on [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation. C2C12 myoblasts approximately 40% confluent were serum-starved for 24 h. Cells were treated for 16 h with natural C1P (solid square) or C8-C1P (open circle) at the indicated concentrations (0–30 μM). [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation into DNA was measured as described in the Methods section. Data are means ± SEM of at least three independent experiments performed in triplicate. The effect of C1P was statistically significant by Student's *t* test (\**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01).

aqueous solutions than long-chain C1P. Fig. 1 shows that the DNA synthesis elicited by C8-C1P was optimum at 10 μM. Given the efficacy of all these C1P species at stimulating DNA synthesis, the natural C1P mixture was employed in all subsequent experiments.

To exclude that the observed mitogenic effect exerted by C1P in the myoblasts was mediated by a bioactive metabolite generated following the addition of C1P to the cells, the metabolism of [<sup>3</sup>H]C1P was examined at various time-intervals. Results presented in Fig. 2 show that [<sup>3</sup>H]C1P was taken up by the myoblasts within minutes reaching maximal incorporation after about 60 min of incubation. Metabolism of C1P was very slow, with only traces of free ceramide, fatty acids, or SM being detected up to at least 4 h of incubation. These results are consistent with previous work by Chalfant and co-workers [24] showing that C1P was rapidly taken up by A549 cells with little metabolism to other compounds. Also, similar results were obtained in fibroblasts treated with [<sup>3</sup>H]C8-C1P or with natural long-chain C1P [11,12]. Furthermore, by using [<sup>33</sup>P]C1P it was evident that C1P was not deacylated to S1P up to at least 4 h of incubation (data not shown). These latter



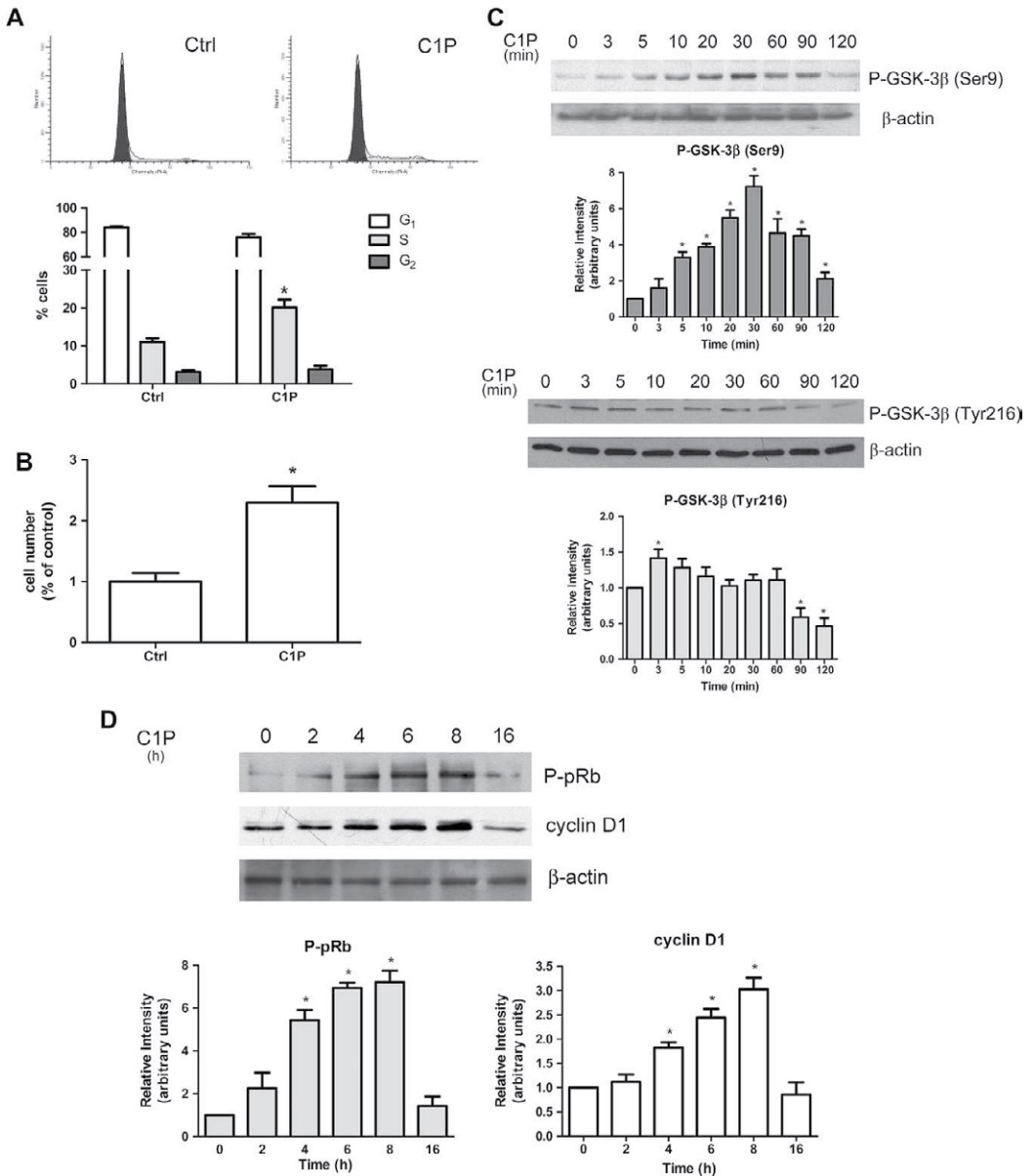
**Fig. 2.** Metabolism of labeled C1P in C2C12 cells. C2C12 myoblasts, approximately 40% confluent, were serum-starved for 24 h and then exposed to 15 μM C1P (100000 dpm/well) for the indicated times. Cell lipids were extracted and analyzed by TLC as described in the Methods section. Results are expressed as the percentage of the radioactivity present in the indicated lipids, ceramide (Cer), fatty acid (FA), C1P and sphingomyelin (SM), compared to that in total lipids and are the mean ± SEM of six independent experiments performed in triplicate.

results are in agreement with the well documented anti-mitogenic effect exerted by S1P in myoblasts [8,18], in contrast to the mitogenic effect of C1P observed in this work. Moreover, we found no significant amount of radioactivity in inorganic phosphate in the culture medium of cells incubated with [<sup>33</sup>P]C1P for up to 4 h, thereby ruling out any possible formation of ceramide by dephosphorylation of [<sup>33</sup>P]C1P, in agreement with our previous work [11,12,25].

Following up on the demonstration that the effect of C1P on DNA synthesis was elicited by C1P *per se*, its mitogenic action was further investigated by performing cell cycle analysis. Results presented in Fig. 3A show that in agreement with the studies on [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation, treatment of myoblasts with 15 μM C1P approximately doubled the percentage of cells in S-phase, thereby reinforcing the notion that C1P is a potent mitogenic agent for myoblasts. Moreover, as shown in Fig. 3B, C1P was capable of increasing myoblast number, thus behaving as a complete mitogen. Interestingly, as shown in Fig. 3C, treatment of myoblasts with 15 μM C1P caused rapid phosphorylation of GSK-3β at Ser9 leading to inactivation of its kinase activity. This effect could be detected as early as 3 min and reached maximum value after about 30 min of treatment with C1P. In addition, phosphorylation of GSK-3β at Tyr 216, which is responsible for stimulation of its kinase activity, was moderately increased by C1P at 3 and 5 min, whereas it was remarkably decreased at 90–120 min. Both pRb and cyclin D1 are known to be maximally expressed throughout the G<sub>1</sub> phase of the cell cycle upon prevention of its GSK-3β-dependent proteolytic degradation [26]. In accordance with the observed phosphorylation and inactivation of GSK-3β, challenge with C1P provoked hyperphosphorylation of pRb and prevented cyclin D1 from being degraded in the myoblasts (Fig. 3D).

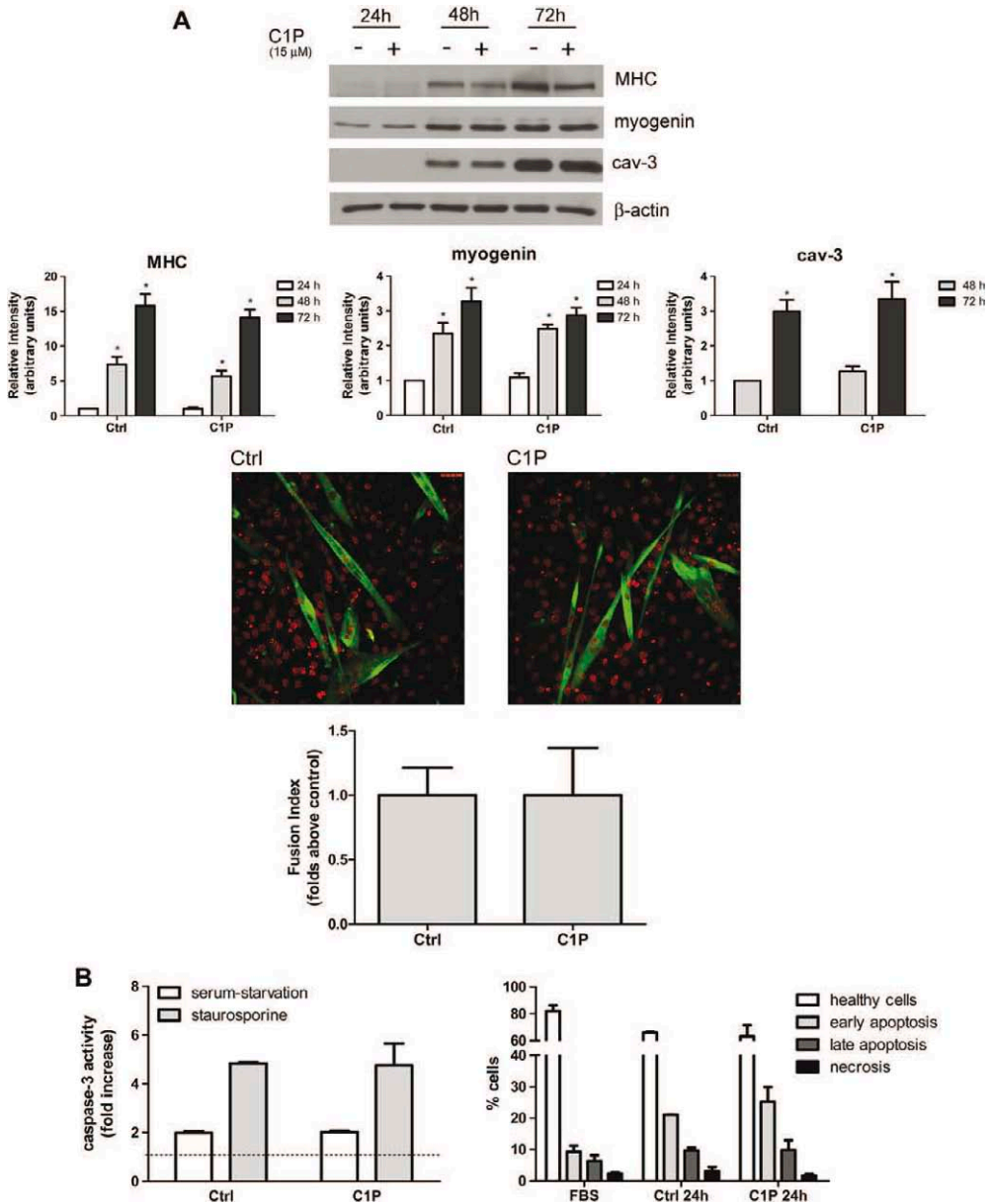
Although myoblasts are endowed with high mitogenic potential, there are conditions when they can stop growing, initiate their differentiation program, and become myotubes, multinucleated cells. Therefore, we examined whether C1P could affect myoblast differentiation. To this end, the expression of myogenic markers such as MHC, myogenin, and caveolin-3 was evaluated by Western blotting analysis of whole cell lysates that were prepared from confluent myoblasts. Fig. 4A shows that the expression of these myogenic markers in unchallenged myoblasts was increased in a time-dependent manner as a consequence of their progressive myogenic differentiation [8]. Administration of 15 μM C1P to the myoblasts did not affect the expression of any of the myogenic markers at any time of incubation. Similar results were obtained when 5 or 30 μM C1P were used (data not shown). Moreover, as shown in the same Figure, C1P was unable to affect the fusion index, which is used to assess the extent of myotube formation as a result of the differentiation process.

It is known that C1P is also capable of protecting macrophages from entering apoptosis [14,27,28]. Therefore, we examined whether C1P could exert an anti-apoptotic action in C2C12 cells incubated under apoptotic conditions (absence of serum in the culture medium or long-term incubation with staurosporin). Unexpectedly, the results presented in Fig. 4B clearly show that C1P (15 μM) was unable to reduce the extent of caspase-3 activation in serum-starved myoblasts or in cells that were treated with the pro-apoptotic agent staurosporine (0.5 μM) for 4 h. Similarly, C1P was ineffective to protect myoblasts from apoptosis induced by thapsigargin (3 μM) or by treatment with etoposide (200 μM), as assessed by measuring caspase-3 activity (data not shown). In agreement with these results, treatment with C1P did not influence the percentage of cells in early or late apoptosis induced by serum deprivation. This was assessed using cells that were labeled with propidium iodide and annexin V-FITC in combination with flow cytometry (Fig. 4B).

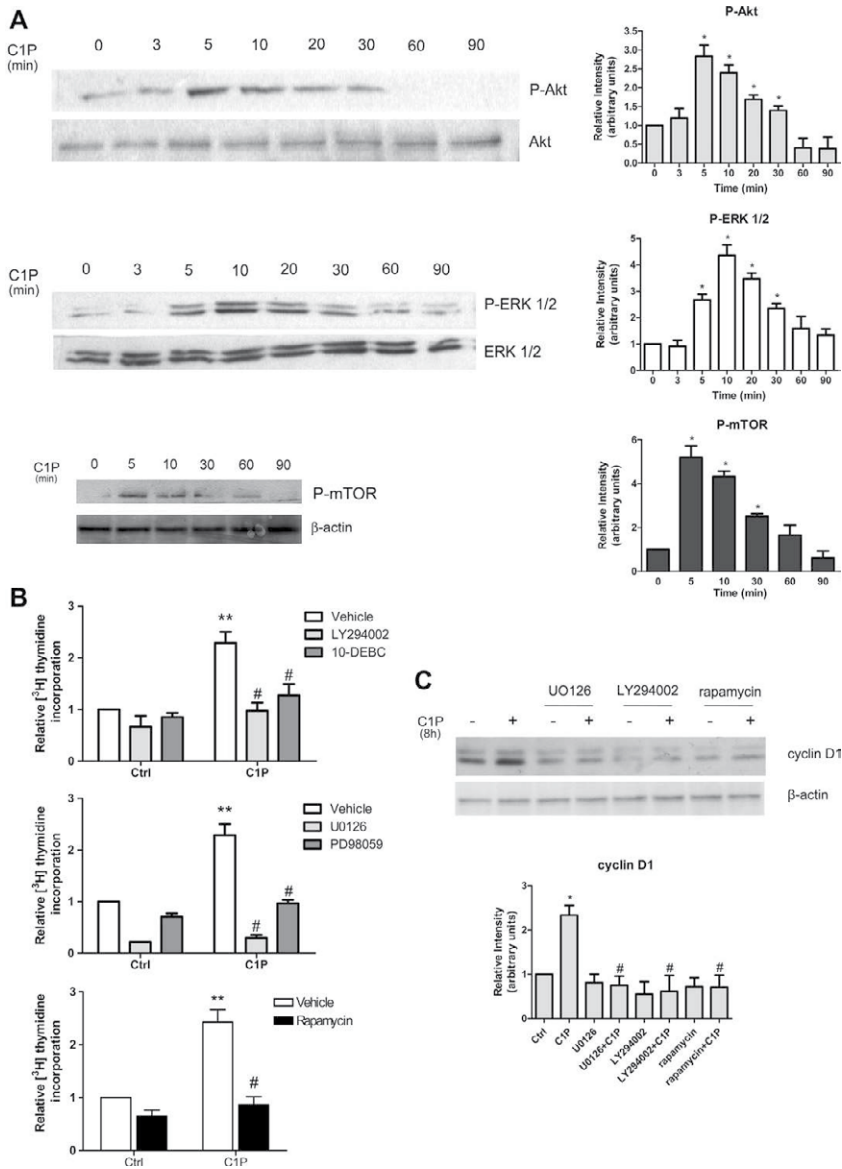


**Fig. 3.** Effect of C1P on cell cycle and cell number. C2C12 myoblasts approximately 40% confluent were serum-starved for 24 h. A) To assess cell cycle distribution serum-starved C2C12 myoblasts were treated or not with 15  $\mu$ M C1P for 16 h. Cellular DNA was stained with propidium iodide (50  $\mu$ g/ml) and cell cycle analysis was performed by flow cytometry. Data are means  $\pm$  SEM of three independent experiments. The effect of C1P was statistically significant by Student's *t* test ( $^*P < 0.05$ ). B) Serum-starved myoblasts were stimulated with 15  $\mu$ M C1P for 24 h before being counted by a hemocytometer. Data are means  $\pm$  SEM of three independent experiments performed in duplicate. The effect of C1P was statistically significant by Student's *t* test ( $^*P < 0.05$ ). C2C12 cells were incubated for the indicated times in the presence of 15  $\mu$ M C1P. Cell lysates were then subjected to immunoblotting to detect phospho-GSK-3 $\beta$  (Ser9) and phospho-GSK-3 $\beta$  (Tyr216) (C), phospho-pRb and cyclin D1 (D). Equally loaded protein was checked by expression of the nonmuscle-specific  $\beta$  isoform of actin. Blots representative of at least three independent experiments are shown. The histograms represent band intensity of phospho-GSK-3 $\beta$  (Ser9), phospho-GSK-3 $\beta$  (Tyr216), P-pRb and cyclin D1 normalized to  $\beta$ -actin and reported as mean  $\pm$  SEM of three independent experiments, fold change over control set as 1. The effect of C1P was statistically significant by Student's *t* test ( $^*P < 0.05$ ).





**Fig. 4.** Effect of C1P on C2C12 myoblast differentiation (A) and apoptosis (B). A) Confluent C2C12 myoblasts were incubated in medium supplemented with 0.1% BSA for the indicated period of time in the absence (–) or in the presence (+) of 15  $\mu$ M C1P. Upper panel: Western blot analysis of myogenic marker expression. The content of myogenin, myosin heavy chain (MHC), and caveolin-3 (cav-3) was analyzed in cell lysates (30  $\mu$ g) by Western Blot analysis. Equally loaded protein was checked by expression of the nonmuscle-specific  $\beta$  isoform of actin. A blot representative of four independent experiments with analogous results is shown. The histograms represent band intensity of MHC, myogenin, and cav-3 normalized to  $\beta$ -actin and reported as mean  $\pm$  SEM of four independent experiments, fold change over control (time 24 h, no addition) set as 1. The effect of C1P was statistically significant by Student's *t* test ( $*P < 0.05$ ). Lower panel: Representative immunofluorescence images of C2C12 myoblasts treated for 72 h with 15  $\mu$ M C1P stained with anti-MHC antibody and propidium iodide are shown. Fusion index represented in the histogram was calculated as described in the Methods section. Data are means  $\pm$  SEM of four independent experiments. B) The apoptotic response was induced by 24 h serum starvation or 4 h treatment with 0.5  $\mu$ M staurosporine in subconfluent myoblasts treated or not with 15  $\mu$ M C1P. Left panel: caspase-3 activity was measured employing a fluorimetric method. Data are means  $\pm$  SEM of three independent experiments performed in duplicate and are reported as fold increase in caspase-3 activity relative to the value measured in control cells set as 1. Right panel: cells were examined for necrosis or early or late apoptosis by flow cytometry analysis as described in the Methods section. Results are expressed as percentage of cells and are the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments performed in duplicate.

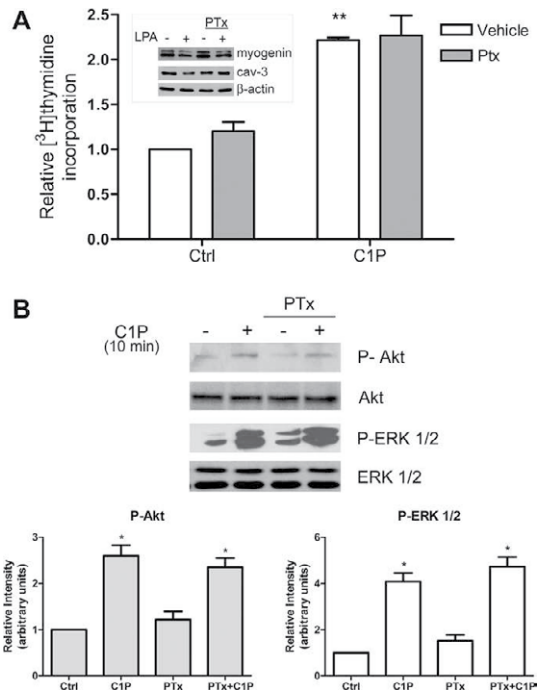


**Fig. 5.** Role of C1P-induced activation of Akt, ERK1/2 and mTOR (A) on DNA synthesis (B), and cyclin D1 expression (C) in C2C12 myoblasts. C2C12 myoblasts approximately 40% confluent were serum-starved for 24 h and incubated with or without 15  $\mu$ M C1P for the indicated time-intervals. A) Cell lysates were separated by SDS-PAGE and immunoblotted using specific anti-phospho-Akt, anti-pan Akt, anti-phospho-ERK1/2, anti-pan ERK1/2, anti-phospho-mTOR and anti- $\beta$ -actin antibodies. Blots representative of at least three independent experiments are shown. In the histograms band intensity corresponding to phosphorylated protein was normalized to its total content or to  $\beta$ -actin and reported as mean  $\pm$  SEM of three independent experiments, fold change over control set as 1. The effect of C1P was statistically significant by Student's *t* test ( $^*P < 0.05$ ). B) C2C12 cells were pre-treated for 30 min with PI3K inhibitor (5  $\mu$ M LY294002) or Akt inhibitor (1  $\mu$ M 10-DEBC) or MEK inhibitor (5  $\mu$ M U0126 or 5  $\mu$ M PD98059) or mTOR inhibitor (10 nM rapamycin) before being challenged with 15  $\mu$ M C1P for 16 h. [ $^3$ H]thymidine incorporation into DNA was measured as described in the Methods section. Data are means  $\pm$  SEM of three independent experiments performed in triplicate. The effect of C1P was statistically significant by Student's *t* test ( $^{**}P < 0.01$ ); the effect of the inhibitors was statistically significant by Student's *t* test ( $\#P < 0.05$ ). C) Western Blot analysis of cyclin D1 expression. C2C12 cells were pre-treated 30 min with PI3K/Akt specific inhibitor (5  $\mu$ M LY294002) or MEK/ERK1/2 specific inhibitor (5  $\mu$ M U0126) or mTOR inhibitor (10 nM rapamycin) before being challenged (+) or not (-) with 15  $\mu$ M C1P for 8 h. Cell extracts were subjected to immunoblotting. Equally loaded protein was checked by expression of the nonmuscle-specific  $\beta$  isoform of actin. A blot representative of at least three independent experiments is shown. The histogram represents band intensity of cyclin D1 normalized to  $\beta$ -actin and reported as mean  $\pm$  SEM of three independent experiments, fold change over control set as 1. The effect of C1P was statistically significant by Student's *t* test ( $^*P < 0.05$ ); the effect of the inhibitors was statistically significant by Student's *t* test ( $\#P < 0.05$ ).

### 3.2. C1P elicits its mitogenic effect in myoblasts via stimulation of PI3K/Akt, ERK1/2 and mTOR

To gain insight into the mechanism by which C1P stimulates myoblast proliferation, we examined whether this sphingolipid could activate signaling pathways specifically implicated in the regulation of cell growth. Western blotting analyses of phospho-Akt, phospho-ERK1/2 and phospho-mTOR performed on lysates obtained from myoblasts treated with 15  $\mu$ M C1P for various time-intervals demonstrate that all of the investigated signaling pathways were transiently activated by C1P. In particular, Akt and mTOR phosphorylation was maximal at 5 min, while ERK1/2 were maximally activated at 10 min (Fig. 5A). To examine the possible role of these pathways in C1P-mediated myoblast proliferation, [ $^3$ H]thymidine incorporation experiments were performed in myoblasts previously incubated in the presence of selective inhibitors of these pathways. As depicted in Fig. 5B, inhibition of PI3K with 5  $\mu$ M LY294002 or blockade of Akt with 1  $\mu$ M 10-DEBC, abolished the mitogenic action of C1P; similarly, this sphingolipid was unable to stimulate myoblast proliferation when ERK1/2 activation was prevented by treatment with the MEK inhibitors UO126 (5  $\mu$ M) or PD98059 (5  $\mu$ M), or when mTOR activation was blocked by treatment with rapamycin (10 nM). The data presented in Fig. 5C show that inhibition of MEK/ERK1/2, PI3K/Akt, or mTOR by UO126, LY294002, or rapamycin, respectively, also blunted the enhancement of cyclin D1 levels elicited by C1P at 8 h of incubation. Given that the activation of these signaling pathways is often detected following membrane receptor(s) engagement and that C1P was shown to stimulate migration of RAW 264.7 macrophages in a PTx-sensitive manner [15], we examined whether the mitogenic action of C1P could be mediated by a  $G_i$  protein-coupled receptor. Myoblast treatment with 0.5  $\mu$ g/ml PTx for 16 h did not affect the mitogenic response to 15  $\mu$ M C1P (Fig. 6A), nor did it alter the extent of Akt or ERK1/2 phosphorylation (Fig. 6B). In contrast, as shown in the inset of Fig. 6A, the anti-myogenic effect of 10  $\mu$ g/ml LPA, mediated through interaction with a  $G_i$  protein-coupled receptor [29], is significantly reduced by the pre-treatment with 0.5  $\mu$ g/ml PTx for 16 h. Therefore, it is unlikely that C1P-stimulated myoblast growth is mediated by a receptor of this kind.

In an attempt to establish a possible cross-talk among the various signaling pathways that were activated by C1P and found to be implicated in its pro-mitogenic action, the effect of C1P on the individual signaling pathways in the presence of different inhibitors was examined. Results presented in Fig. 7 show that pre-incubation with 5  $\mu$ M UO126 prevented C1P-induced ERK1/2 phosphorylation at 10 min of incubation. Moreover, this inhibitor did not reduce Akt phosphorylation indicating that ERK1/2 signaling is not upstream of the PI3K/Akt pathway. Interestingly, the blockade of ERK1/2 pathway abolished the enhancement of mTOR phosphorylation, demonstrating that in this setting ERK1/2 is upstream of mTOR activation, in keeping with the key role of this kinase in the inhibition of its main suppressor, TSC2 [30]. The same Figure shows that the blockade of PI3K with LY294002 blunted Akt phosphorylation and largely decreased ERK1/2 and mTOR activation, strongly suggesting that PI3K/Akt is partially upstream of ERK1/2. To establish whether mTOR activation by C1P is downstream of PI3K/Akt signaling pathway, TGX-221, a selective inhibitor of PI3K $\beta$ , which does not affect mTOR activity was employed [31]. Interestingly, myoblast treatment with 1  $\mu$ M TGX-221 resulted in a nearly complete inhibition of Akt phosphorylation, demonstrating that PI3K $\beta$  is the major PI3K isoform implicated in the signaling cascade triggered by C1P; moreover, in this experimental condition, C1P was not capable of further increasing mTOR phosphorylation, whose basal levels were enhanced, therefore proving that PI3K $\beta$  is upstream of mTOR activation by this sphingolipid.

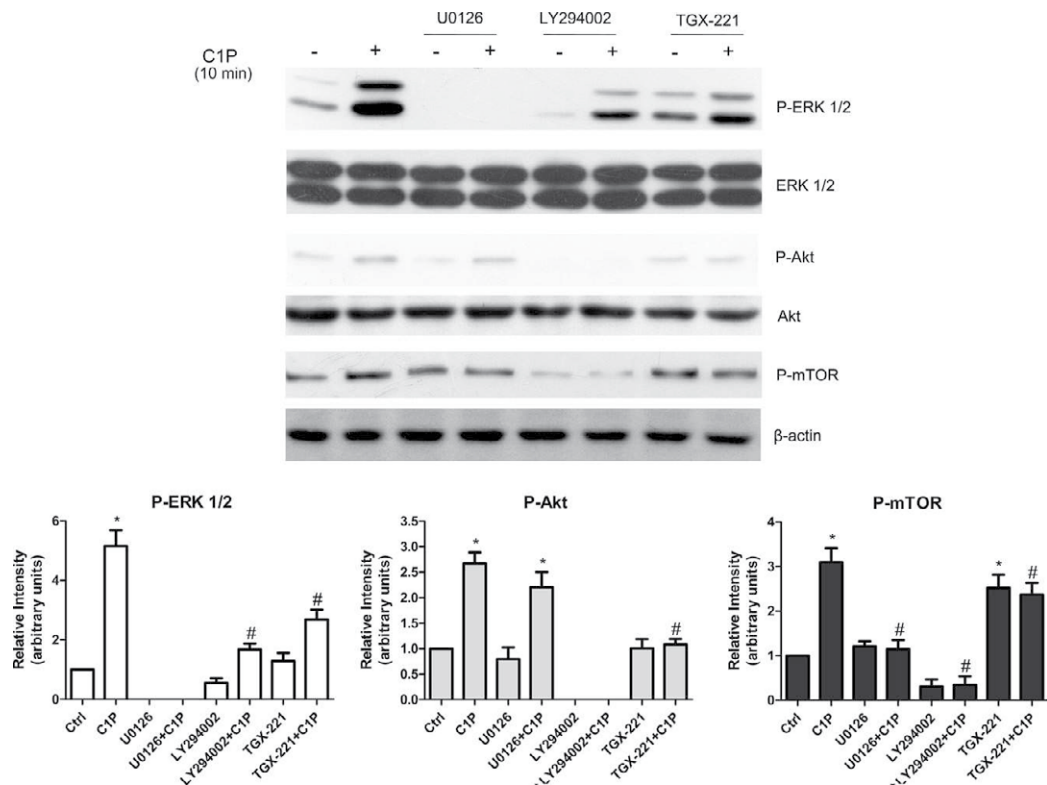


**Fig. 6.** Effect of PTx on C1P mitogenic effect in C2C12 myoblasts. A) C2C12 myoblasts approximately 40% confluent were serum-starved for 24 h. C2C12 cells were pre-incubated for 16 h with PTx (0.5  $\mu$ g/ml) before being challenged with 15  $\mu$ M C1P. [ $^3$ H]thymidine incorporation into DNA after 16 h of treatment with 15  $\mu$ M C1P was measured as described in the Methods section. Data are means  $\pm$  SEM of three independent experiments performed in triplicate. The effect of C1P was statistically significant by Student's *t* test (\*\**P* < 0.01). Inset: confluent C2C12 myoblasts were pre-treated 16 h with PTx (0.5  $\mu$ g/ml) before being challenged (+) or not (-) with 10  $\mu$ g/ml LPA for 48 h. The content of myogenin and caveolin-3 (cav-3) was analyzed in cell lysates (30  $\mu$ g) by Western Blot analysis. Equally loaded protein was checked by expression of the nonmuscle-specific  $\beta$  isoform of actin. A blot representative of three independent experiments with analogous results is shown. B) Effect of PTx on C1P-induced activation of Akt and ERK1/2. Serum-starved myoblasts were pre-incubated for 16 h with PTx (0.5  $\mu$ g/ml) before being challenged with 15  $\mu$ M C1P for 10 min. Cell lysates were analyzed by Western Blotting as described in Methods section. A representative blot of three independent experiments is shown. Histograms represent densitometric quantification of phosphorylated protein normalized to its total content and reported as mean  $\pm$  SEM of three independent experiments, fold change over control set as 1. The effect of C1P was statistically significant by Student's *t* test (\**P* < 0.05).

Finally, the role of endogenous C1P in C2C12 myoblasts was investigated. Cell treatment with the CERK inhibitor NVP-231 (100 nM) reduced [ $^3$ H]thymidine incorporation by approximately 30%, highlighting the involvement of CERK in C2C12 cell proliferation (Fig. 8A). However, the protein content of CERK was not altered during myoblast proliferation or differentiation (Fig. 8B) excluding a role for the transcriptional regulation of this enzyme in these biological processes.

## 4. Discussion

The proliferation of skeletal muscle progenitor cells such as satellite cells and myoblasts is an essential step in the repair of damaged tissue since increases in the number of these cells ensures an adequate repopulation of the tissue. Although there has been



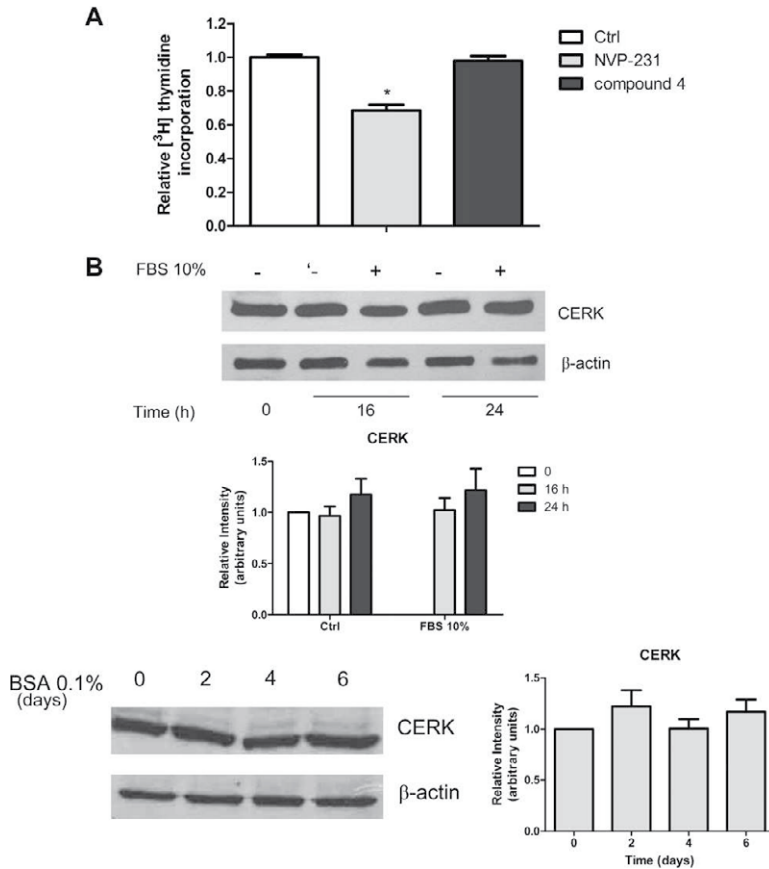
**Fig. 7.** C1P-induced activation of mTOR is downstream of PI3K/Akt and ERK1/2 signaling pathways in C2C12 myoblasts. C2C12 myoblasts approximately 40% confluent were serum-starved for 24 h and pre-incubated for 30 min with PI3K inhibitor (5  $\mu$ M LY294002) or MEK inhibitor (5  $\mu$ M U0126) or PI3K $\beta$  inhibitor (1  $\mu$ M TGX-221) before being challenged with 15  $\mu$ M C1P for 10 min. Cell lysates were separated by SDS-PAGE and immunoblotted using specific anti-phospho-Akt, anti-pan Akt anti-phospho-ERK1/2, anti-pan ERK1/2, anti-phospho-mTOR and anti- $\beta$ -actin antibodies. Blots representative of at least three independent experiments are shown. Histograms represent densitometric quantification of phosphorylated protein normalized to its total content or to  $\beta$ -actin and reported as mean  $\pm$  SEM of three independent experiments, fold change over control set as 1. The effect of C1P was statistically significant by Student's *t* test ( $*P < 0.05$ ); the effect of the inhibitors was statistically significant by Student's *t* test ( $\#P < 0.05$ ).

a considerable attention to this subject, the bioactive molecules implicated in the regulation of this key event have not been fully characterized [32]. In this work we have identified C1P as positive regulator of mouse skeletal myoblast proliferation. Several pieces of experimental evidence are here provided for the mitogenic effect of C1P in these cells. This phosphosphingolipid potentially stimulated [ $^3$ H]thymidine incorporation into DNA, cell cycle progression and cell number. Moreover, C1P enhanced GSK3- $\beta$  and pRb phosphorylation as well as cyclin D1 protein content. However, other critical biological functions of myoblasts, such as myogenic differentiation or cell survival, appear to be unaffected by C1P. This phosphosphingolipid was previously found to promote cell survival in macrophages (reviewed in [28,33]); therefore, the present report supports the notion that C1P evokes a specific response in myoblasts. Notably, the mitogenic action of C1P in myoblasts was elicited by the bioactive compound *per se* and could not be attributable to any possible mediator formed by C1P metabolism in these cells.

So far only few cell types (mainly different types of macrophages) are known to respond to natural (long-chain) C1P [28,33]. The present demonstration that C1P enhances cell growth of mouse myoblasts extends the number of target cells that are responsive to C1P and supports the notion that C1P, besides acting as a mediator

of the inflammatory response, can also participate in other key biological processes such as myogenesis. Intriguingly, other sphingolipids are known to regulate specific aspects of skeletal muscle cell physiology. In particular, S1P is known to stimulate myoblast differentiation toward myotubes [8] and to inhibit their chemotactic response [34]. By contrast sphingosine, its immediate precursor, was reported to inhibit chicken myoblast fusion [35], and *de novo* synthesized ceramide was found to be responsible for inhibition of myogenic differentiation of rat myoblasts [6]. Thus, C1P appears to be the only sphingolipid endowed with mitogenic properties in myoblasts at the present time, providing strong evidence that sphingolipids are critical for regulation of skeletal muscle development and regeneration, and reinforcing the notion that individual bioactive sphingolipids play specific and distinct roles in the control of this highly orchestrated biological process.

In this study, the molecular mechanisms by which C1P stimulates C2C12 cell proliferation were also investigated. The PI3K/Akt and ERK1/2 signaling pathways were found both necessary for the mitogenic response to C1P, since selective inhibition of these kinases abrogated the biological action of this sphingolipid. Interestingly, the mitogenic response elicited by C1P was equally prevented when mTOR was selectively blocked, supporting the view that this kinase, which was here identified downstream of PI3K/Akt



**Fig. 8.** Role of endogenous C1P on C2C12 myoblast proliferation and differentiation. A) C2C12 myoblasts approximately 40% confluent were serum-starved for 24 h before being treated with CERK inhibitor (100 nM NVP-231) or the related inactive compound (100 nM compound 4). [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation into DNA was measured as described in the Methods section. Data are means  $\pm$  SEM of three independent experiments performed in triplicate. The effect of CERK inhibitor was statistically significant by Student's *t* test ( $*P < 0.05$ ). B) C2C12 myoblasts approximately 40% confluent were serum-starved for 24 h and incubated with or without 10% FBS for the indicated time-intervals (upper panel) or grown to confluence and incubated in medium supplemented with 0.1% BSA for the indicated period of time (lower panel). Cell lysates were separated by SDS-PAGE and immunoblotted using specific anti-CERK and anti- $\beta$ -actin antibodies. Blots representative of three independent experiments are shown. The histograms represent band intensity of CERK normalized to  $\beta$ -actin and reported as mean  $\pm$  SEM of three independent experiments, fold change over control set as 1.

and ERK1/2, plays a master regulatory role in myoblast growth. Thus, these results further consolidate the well-established role exerted by PI3K/Akt, mTOR and ERK1/2 in the regulation of myoblast proliferation [36–41] and highlight C1P as a critical metabolite implicated in the control of myoblast proliferation as key regulator of these kinases. In accordance with the findings presented in this report, the PI3K/Akt and ERK1/2 pathways were also identified as mediators of the mitogenic effect of C1P in bone marrow-derived macrophages [13], suggesting a common mechanism of action of C1P in macrophages and myoblasts. By contrast, C1P was found to exert a mitogenic action in fibroblasts via an ERK-independent mechanism [12], reinforcing the notion that this bioactive sphingolipid exploits distinct signaling pathways in different cellular settings for eliciting its biological response. Also, contrary to the pro-survival role of C1P in macrophages and although C1P stimulates Akt, and ERK1/2 in myoblasts, C1P did not inhibit apoptosis in these cells.

The rapid time-course of signaling cascades triggered by C1P in myoblasts might in principle, be consistent with a receptor-mediated

event. In this connection, C1P was shown to stimulate macrophage migration through interaction with a G<sub>i</sub> protein-coupled receptor [15]; however, the involvement of such a receptor in the mitogenic effect of C1P in myoblasts was ruled out by the inability of PTx to block C1P-dependent ERK1/2 or Akt phosphorylation, and cell proliferation. In agreement with these observations, PTx also failed to prevent the mitogenic and anti-apoptotic responses elicited by C1P in bone marrow-derived macrophages [14], where the mitogenic effect of C1P seems to be associated to the generation of intracellular C1P [42]. Nonetheless, a possible involvement of receptors other than G<sub>i</sub> protein-coupled receptors in the mitogenic effect of C1P in myoblasts remains to be determined.

It is well established that endogenous C1P is formed intracellularly by ceramide kinase-catalyzed phosphorylation of ceramide [43,44], although other pathways may also exist [45]. The potential ability of mouse myoblasts to synthesize C1P by their own, which would act as an endogenous regulator of their own proliferation, was not explored here; however, the described mitogenic response of myoblasts to C1P added exogenously strongly supports the



hypothesis that C1P released by other cells, such as macrophages, which are recruited to the sites of muscle damage [46–48], might participate to the beneficial effect of muscle growth and regeneration.

In summary, we show here that C1P promotes proliferation of muscle myoblasts, strongly suggesting the involvement of this sphingolipid in the regulation of muscle regeneration and repair.

## Acknowledgments

This work was supported in part by grant BFU2009-13314/BMC from Ministerio de Ciencia e Innovación (Madrid, Spain) to AM-G and by grants from Telethon Italy (GGP08053) and Italian Ministry of University and Scientific Research (PRIN2007) to PB. PG and AO are the recipients of Fellowships from the “Departamento de Educación, Universidades e Investigación del Gobierno Vasco” (Basque Country, Spain).

## References

- [1] J. Dhawan, T.A. Rando, Stem cells in postnatal myogenesis: molecular mechanisms of satellite cell quiescence, activation and replenishment, *Trends Cell Biol.* 15 (2005) 666–673.
- [2] F. Le Grand, M.A. Rudnicki, Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis, *Curr. Opin. Cell Biol.* 19 (2007) 628–633.
- [3] P. Bruni, C. Donati, Pleiotropic effects of sphingolipids in skeletal muscle, *Cell Mol. Life Sci.* 65 (2008) 3725–3736.
- [4] Y.A. Hannun, L.M. Obeid, Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9 (2008) 139–150.
- [5] Y. Nagata, H. Kobayashi, M. Umeda, N. Ohta, S. Kawashima, P.S. Zammit, R. Matsuda, Sphingomyelin levels in the plasma membrane correlate with the activation state of muscle satellite cells, *J. Histochem. Cytochem.* 54 (2006) 375–384.
- [6] S. Mebarek, H. Komati, F. Naro, C. Zeiller, M. Alvisi, M. Lagarde, A.F. Prigent, G. Nemoz, Inhibition of de novo ceramide synthesis upregulates phospholipase D and enhances myogenic differentiation, *J. Cell Sci.* 120 (2007) 407–416.
- [7] Y. Nagata, T.A. Partridge, R. Matsuda, P.S. Zammit, Entry of muscle satellite cells into the cell cycle requires sphingolipid signaling, *J. Cell Biol.* 174 (2006) 245–253.
- [8] C. Donati, E. Meacci, F. Nuti, L. Becciolini, M. Farnararo, P. Bruni, Sphingosine 1-phosphate regulates myogenic differentiation: a major role for S1P2 receptor, *FASEB J.* 19 (2005) 449–451.
- [9] E. Meacci, F. Nuti, C. Donati, F. Centetti, M. Farnararo, P. Bruni, Sphingosine kinase activity is required for myogenic differentiation of C2C12 myoblasts, *J. Cell Physiol.* 214 (2008) 210–220.
- [10] C. Donati, P. Nincheri, F. Centetti, E. Rapizzi, M. Farnararo, P. Bruni, Tumor necrosis factor- $\alpha$  exerts pro-myogenic action in C2C12 myoblasts via sphingosine kinase/S1P2 signaling, *FEBS Lett.* 581 (2007) 4384–4388.
- [11] A. Gomez-Munoz, P.A. Duffy, A. Martin, L. O'Brien, H.S. Byun, R. Bittman, D.N. Brindley, Short-chain ceramide-1-phosphates are novel stimulators of DNA synthesis and cell division: antagonism by cell-permeable ceramides, *Mol. Pharmacol.* 47 (1995) 833–839.
- [12] A. Gomez-Munoz, L.M. Frago, L. Alvarez, I. Varela-Nieto, Stimulation of DNA synthesis by natural ceramide-1-phosphate, *Biochem. J.* 325 (1997) 435–440.
- [13] P. Gangoi, M.H. Granado, S.W. Wang, J.Y. Kong, U.P. Steinbrecher, A. Gomez-Munoz, Ceramide 1-phosphate stimulates macrophage proliferation through activation of the PI3-kinase/PKB, JNK and ERK1/2 pathways, *Cell. Signal.* 20 (2008) 726–736.
- [14] A. Gomez-Munoz, J.Y. Kong, K. Parhar, S.W. Wang, P. Gangoi, M. Gonzalez, S. Eivenmark, B. Sallh, V. Duronio, U.P. Steinbrecher, Ceramide-1-phosphate promotes cell survival through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway, *FEBS Lett.* 579 (2005) 3744–3750.
- [15] M.H. Granado, P. Gangoi, A. Ouro, L. Arana, M. Gonzalez, M. Trueba, A. Gomez-Munoz, Ceramide 1-phosphate (C1P) promotes cell migration involvement of a specific C1P receptor, *Cell. Signal.* 21 (2009) 405–412.
- [16] N.F. Lamour, C.E. Chalfant, Ceramide kinase and the ceramide-1-phosphate/cPLA2 $\alpha$  interaction as a therapeutic target, *Curr. Drug Targets* 9 (2008) 674–682.
- [17] C. Graf, M. Klumpp, M. Habig, P. Rovina, A. Billich, T. Baumruker, B. Oberhauser, F. Bornancin, Targeting ceramide metabolism with a potent and specific ceramide kinase inhibitor, *Mol. Pharmacol.* 74 (2008) 925–932.
- [18] E. Rapizzi, C. Donati, F. Centetti, P. Nincheri, P. Bruni, Sphingosine 1-phosphate differentially regulates proliferation of C2C12 reserve cells and myoblasts, *Mol. Cell. Biochem.* 314 (2008) 193–199.
- [19] P. Nincheri, P. Luciani, R. Squecco, C. Donati, C. Bernacchioni, L. Borgognoni, G. Luciani, S. Benvenuti, F. Francini, P. Bruni, Sphingosine 1-phosphate induces differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells towards smooth muscle cells, *Mol. Life Sci.* 66 (2009) 1741–1754.
- [20] C. Donati, F. Centetti, C. De Palma, E. Rapizzi, S. Brunelli, G. Cossu, E. Clementi, P. Bruni, TGFBeta protects mesoangioblasts from apoptosis via sphingosine kinase-1 regulation, *Cell. Signal.* 21 (2009) 228–236.
- [21] C. Donati, F. Centetti, P. Nincheri, C. Bernacchioni, S. Brunelli, E. Clementi, G. Cossu, P. Bruni, Sphingosine 1-phosphate mediates proliferation and survival of mesoangioblasts, *Stem Cells* 25 (2007) 1713–1719.
- [22] S.W. Wang, K. Parhar, K.J. Chiu, A. Tran, P. Gangoi, J. Kong, M. Gonzalez, B. Sallh, V. Duronio, U.P. Steinbrecher, A. Gomez-Munoz, Pertussis toxin promotes macrophage survival through inhibition of acid sphingomyelinase and activation of the phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B pathway, *Cell. Signal.* 19 (2007) 1772–1783.
- [23] K.A. Dressler, R.N. Kolesnick, Ceramide 1-phosphate, a novel phospholipid in human leukemia (HL-60) cells. Synthesis via ceramide from sphingomyelin, *J. Biol. Chem.* 265 (25) (1990) 14917–14921.
- [24] D.S. Wijesinghe, J.C. Allegro, L.B. Gentile, T.E. Fox, M. Kester, C.E. Chalfant, Use of high performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry for the analysis of ceramide-1-phosphate levels, *J. Lipid Res.* 51 (2010) 641–651.
- [25] D.S. Wijesinghe, P. Subramanian, N.F. Lamour, L.B. Gentile, M.H. Granado, Z. Szulc, A. Bielawska, A. Gomez-Munoz, C.E. Chalfant, The chain length specificity for the activation of group IV cytosolic phospholipase A2 by ceramide-1-phosphate. Use of the dodecane delivery system for determining lipid specific effects, *J. Lipid Res.* 50 (2009) 1986–1995.
- [26] J. Liang, J.M. Slingerland, Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression, *Cell Cycle* 2 (2003) 339–345.
- [27] P. Gangoi, M.H. Granado, L. Arana, A. Ouro, A. Gomez-Munoz, Involvement of nitric oxide in the promotion of cell survival by ceramide 1-phosphate, *FEBS Lett.* 582 (2008) 2263–2269.
- [28] A. Gomez-Munoz, Ceramide-1-phosphate: a novel regulator of cell activation, *FEBS Lett.* 562 (2004) 5–10.
- [29] S. Yoshida, A. Fujisawa-Sehara, T. Taki, K. Arai, Y. Nabeshima, Lysophosphatidic acid and bFGF control different modes in proliferating myoblasts, *J. Cell Biol.* 132 (1996) 181–193.
- [30] L. Ma, Z. Chen, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, P.P. Pandolfi, Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis, *Cell* 121 (2005) 179–193.
- [31] F.M. Foster, C.J. Traer, S.M. Abraham, M.J. Fry, The phosphoinositide (PI) 3-kinase family, *J. Cell Sci.* 116 (2003) 3037–3040.
- [32] S.B. Charge, M.A. Rudnicki, Cellular and molecular regulation of muscle regeneration, *Physiol. Rev.* 84 (2004) 209–238.
- [33] A. Gomez-Munoz, Ceramide 1-phosphate/ceramide, a switch between life and death, *Biochim. Biophys. Acta* 1758 (2006) 2049–2056.
- [34] L. Becciolini, E. Meacci, C. Donati, F. Centetti, E. Rapizzi, P. Bruni, Sphingosine 1-phosphate inhibits cell migration in C2C12 myoblasts, *Biochim. Biophys. Acta* 1761 (2006) 43–51.
- [35] H.S. Kim, I.H. Lee, Y.J. Jeon, C.H. Chung, D.B. Ha, Sphingosine blocks both membrane fusion and calmodulin-dependent phosphorylation of the 100-kDa protein of chick embryonic myoblasts, *Exp. Cell Res.* 205 (1993) 408–411.
- [36] A.M. Bennett, N.K. Tonks, Regulation of distinct stages of skeletal muscle differentiation by mitogen-activated protein kinases, *Science* 278 (1997) 1288–1291.
- [37] R. Conejo, M. Lorenzo, Insulin signaling leading to proliferation, survival, and membrane ruffling in C2C12 myoblasts, *J. Cell. Physiol.* 187 (2001) 96–108.
- [38] S.A. Coolican, D.S. Samuel, D.Z. Ewton, F.J. McWade, J.R. Florini, The mitogenic and myogenic actions of insulin-like growth factors utilize distinct signaling pathways, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 6653–6662.
- [39] O. Havery, L.C. Cantley, Differential regulation of the phosphoinositide 3-kinase and MAP kinase pathways by hepatocyte growth factor vs. insulin-like growth factor-1 in myogenic cells, *Exp. Cell Res.* 297 (2004) 224–234.
- [40] N.C. Jones, Y.V. Fedorov, R.S. Rosenthal, B.B. Olwin, ERK1/2 is required for myoblast proliferation but is dispensable for muscle gene expression and cell fusion, *J. Cell. Physiol.* 186 (2001) 104–115.
- [41] M. Ohanna, A.K. Sobering, T. Lapointe, L. Lorenzo, C. Praud, E. Petroulakis, N. Sonenberg, P.A. Kelly, A. Sotiropoulos, M. Pende, Atrophy of S6K1(–/–) skeletal muscle cells reveals distinct mTOR effectors for cell cycle and size control, *Nat. Cell Biol.* 7 (2005) 286–294.
- [42] R.S. Lankalapalli, A. Ouro, L. Arana, A. Gomez-Munoz, R. Bittman, Caged ceramide 1-phosphate analogues: synthesis and properties, *J. Org. Chem.* 74 (2009) 8844–8847.
- [43] T. Baumruker, F. Bornancin, A. Billich, The role of sphingosine and ceramide kinases in inflammatory responses, *Immunol. Lett.* 96 (2005) 175–185.
- [44] R.N. Kolesnick, M.R. Hemer, Characterization of a ceramide kinase activity from human leukemia (HL-60) cells. Separation from diacylglycerol kinase activity, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 18803–18808.
- [45] A. Boath, C. Graf, E. Lidome, T. Ullrich, P. Nussbaumer, F. Bornancin, Regulation and traffic of ceramide 1-phosphate produced by ceramide kinase: comparative analysis to glucosylceramide and sphingomyelin, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 8517–8526.
- [46] L. Lescaudron, E. Peltekian, J. Fontaine-Perus, D. Paulin, M. Zampieri, L. Garcia, E. Parrish, Blood borne macrophages are essential for the triggering of muscle regeneration following muscle transplant, *Neuromuscul. Disord.* 9 (1999) 72–80.
- [47] F. Merly, L. Lescaudron, T. Rouaud, F. Crossin, M.F. Gardahaut, Macrophages enhance muscle satellite cell proliferation and delay their differentiation, *Muscle Nerve* 22 (1999) 724–732.
- [48] J.G. Tidball, M. Wehling-Henricks, Macrophages promote muscle membrane repair and muscle fibre growth and regeneration during modified muscle loading in mice in vivo, *J. Physiol.* 578 (2007) 327–336.



## PREMIO TESI DI DOTTORATO

ANNO 2007

- Bracardi M., *La Materia e lo Spirito. Mario Ridolfi nel paesaggio umbro*  
Coppi E., *Purines as Transmitter Molecules. Electrophysiological Studies on Purinergic Signalling in Different Cell Systems*  
Mannini M., *Molecular Magnetic Materials on Solid Surfaces*  
Natali I., *The Ur-Portrait. Stephen Hero ed il processo di creazione artistica in A Portrait of the Artist as a Young Man*  
Petretto L., *Imprenditore ed Università nello start-up di impresa. Ruoli e relazioni critiche*

ANNO 2008

- Bemporad F., *Folding and Aggregation Studies in the Acylphosphatase-Like Family*  
Buono A., *Esercito, istituzioni, territorio. Alloggiamenti militari e «case Herme» nello Stato di Milano (secoli XVI e XVII)*  
Castenasi S., *La finanza di progetto tra interesse pubblico e interessi privati*  
Colica G., *Use of Microorganisms in the Removal of Pollutants from the Wastewater*  
Gabbiani C., *Proteins as Possible Targets for Antitumor Metal Complexes: Biophysical Studies of their Interactions*

ANNO 2009

- Decorosì F., *Studio di ceppi batterici per il biorisanamento di suoli contaminati da Cr(VI)*  
Di Carlo P., *I Kalasha del Hindu Kush: ricerche linguistiche e antropologiche*  
Di Patti F., *Finite-Size Effects in Stochastic Models of Population Dynamics: Applications to Biomedicine and Biology*  
Inzitari M., *Determinants of Mobility Disability in Older Adults: Evidence from Population-Based Epidemiologic Studies*  
Macrì F., *Verso un nuovo diritto penale sessuale. Diritto vivente, diritto comparato e prospettive di riforma della disciplina dei reati sessuali in Italia*  
Pace R., *Identità e diritti delle donne. Per una cittadinanza di genere nella formazione*  
Vignolini S., *Sub-Wavelength Probing and Modification of Complex Photonic Structures*

ANNO 2010

- Fedi M., *«Tuo lumina». L'Accademia dei Risvegliati e lo spettacolo a Pistoia tra Sei e Settecento*  
Fondi M., *Bioinformatics of genome evolution: from ancestral to modern metabolism. Phylogenomics and comparative genomics to understand microbial evolution*  
Marino E., *An Integrated Nonlinear Wind-Waves Model for Offshore Wind Turbines*  
Orsi V., *Crisi e Rigenerazione nella valle dell'Alto Khabur (Siria). La produzione ceramica nel passaggio dal Bronzo Antico al Bronzo Medio*  
Polito C., *Molecular imaging in Parkinson's disease*  
Romano R., *Smart Skin Envelope. Integrazione architettonica di tecnologie dinamiche e innovative per il risparmio energetico*

ANNO 2011

- Acciaioi S., *Il trompe-l'œil letterario, ovvero il sorriso ironico nell'opera di Wilhelm Hauff*  
Bernacchioni C., *Sfingolipidi bioattivi e loro ruolo nell'azione biologica di fattori di crescita e citochine*  
Fabbri N., *Bragg spectroscopy of quantum gases: Exploring physics in one dimension*  
Gordillo Hervás R., *La construcción religiosa de la Hélade imperial: El Panhelenion*  
Mugelli C., *Indipendenza e professionalità del giudice in Cina*  
Pollastrì S., *Il ruolo di TAF12B e UVR3 nel ciclo circadiano dei vegetali*  
Salizzoni E., *Paesaggi Protetti. Laboratori di sperimentazione per il paesaggio costiero euro-mediterraneo*