

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE
"AMEDEO AVOGADRO"

TESI DI DOTTORATO IN MEDICINA MOLECOLARE
XVII CICLO

Lipid metabolites affect cell viability and signaling
in neuroblastoma cell lines

Candidata:
Dott.ssa Deborah Pace

Relatore:
Prof. Ciro Isidoro
Co-relatore:
Dott. Fabrizio Condorelli

Coordinatore
Prof. Umberto Dianzani



DISCAFF 
Dipartimento di Scienze Chimiche,
Alimentari, Farmaceutiche e Farmacologiche

INDICE

IL NEUROBLASTOMA

Incidenza e fattori predisponenti
Riarrangiamenti sul cromosoma 1
Espressione e amplificazione di myc
Espressione dei recettori per i fattori di crescita nervosi Trk
Caratterizzazione genetica dei neuroblastomi
Caratteristiche cliniche
Classificazione istologica
Protocolli terapeutici

GENESI DEL CANCRO

CERAMIDE: STRUTTURA E SINTESI

SFINGOLIPIDI E LORO NELLA FISILOGIA E FISIOPATOLOGIA NEURONALE

Regolazione delle sfingomielinasi
Catabolismo

CICLO DELLA SFINGOMIELINA

ANALOGHI STRUTTURALI

I SEGNALI DI CALCIO

I canali della membrana plasmatica
Pompe e uniporti
I canali intracellulari del calcio
I messaggeri del rilascio del calcio
Caratteristiche del rilascio di calcio indotto da NAADP: il rilascio di calcio mediato dall'NAADP negli invertebrati
Rilascio di NAADP nei vertebrati

RISULTATI E CONCLUSIONI

Sintesi della 7-oxasfingosina e analoghi di ceramide e valutazione dei loro effetti in un modello di apoptosi

Synthesis of 7-oxasphingosine and -ceramide Analogues and their Evaluation in a model for apoptosis

La sfingosina determina il rilascio di calcio dai depositi intracellulari attraverso il recettore della ryanodina in omogenati di uova di riccio di mare

Sphingosine releases Ca²⁺ from intracellular stores via ryanodine receptor in sea urchin egg homogenates

BIBLIOGRAFIA

Introduzione

Il Neuroblastoma

Il neuroblastoma è una neoplasia del nevrasso a localizzazione extracranica altamente maligna e con elevata capacità metastatizzante che interessa originariamente i tessuti del sistema nervoso periferico. Rappresenta la principale neoplasia maligna solida della prima infanzia essendo responsabile di circa il 15% dei decessi per tumore in età pediatrica.

La trasformazione cancerosa è a carico dei neuroblasti, cellule indifferenziate di derivazione neuroectodermica, da cui originano gangli nervosi e neuroni periferici. Tali popolazioni cellulari presentano origini comuni a cellule epiteliali ed annessi cutanei: ciò può spiegare la possibile morfologia epiteloide e la classica forma poliedrica.

Monitorando l'espressione sequenziale di geni correlati alla maturazione e allo sviluppo neuroblastico è stata identificata l'origine del fenomeno neoplastico nell'arresto differenziativo dei neuroblasti durante la morfogenesi e nella trasformazione cancerosa a vari stadi del differenziamento neuronale.

Alla classe di tumori neuroblastici appartengono, inoltre, il ganglioneuroblastoma (forma differenziata del neuroblastoma che colpisce cellule gangliari e fibre nervose) e il ganglioneuroma (forma tumorale ben incapsulata che interessa cellule gangliari mature e cellule di Schwann). Il neuroblastoma, in particolare, si dimostra occasionalmente associato ad alcuni disordini legati allo sviluppo della cresta neurale, tra cui i più comuni sono la neurofibromatosi e la malattia di Hirschsprung (agangliosi del colon).

In alcuni pazienti, soprattutto nei bambini, il tumore può svilupparsi e metastatizzare oppure regredire spontaneamente per differenziamento cellulare (Brodeur *et al.*, 1988), mentre negli adulti in genere il neuroblastoma si differenzia in ganglioneuroma. Allorquando vadano in contro a differenziamento le cellule di neuroblastoma assumono la morfologia tipica del neurone: a livello macroscopico si osserva la presenza del classico pirenoforo e di strutture simil assoniche come risultato di un profondo riarrangiamento molecolare a livello citoscheletrico (Haase *et al.*, 1999). Le cellule di neuroblastoma umane presentano quindi due distinti fenotipi morfologici, uno neuroblastico (N-type), caratterizzato da processi neuritici e fenomeni biochimici tipici neurali e uno epiteliale (S-type), con caratteristiche biochimiche di cellule di Schwann immature, gliali o melanociti. Un terzo fenotipo intermedio biochimicamente e morfologicamente tra N-type e S-type è indicato come I-type. Le cellule I-type possono essere considerate dei precursori

multipotenti delle N-type e S-type, ma i “pathway” che portano a questa “trans-differenziazione” non sono, a tutt’oggi, chiariti (Melino *et al.*, 1997).

In definitiva i neuroblastomi rappresentano un ottimo modello di studio per il differenziamento, un’opportunità unica per analizzare i segnali di maturazione di specifiche linee cellulari ed esaminare come alterazioni del meccanismo di differenziamento svolgano un ruolo fondamentale nella genesi e nello sviluppo tumorale (Israel, 1993).

Capire i segnali cellulari che mediano la maturazione di cellule con origine ectodermica permetterebbe, inoltre, di identificare i meccanismi alla base del fenomeno neoplastico e di mettere a punto strategie terapeutiche più specifiche ovvero meno tossiche e con minor rischio di resistenza.

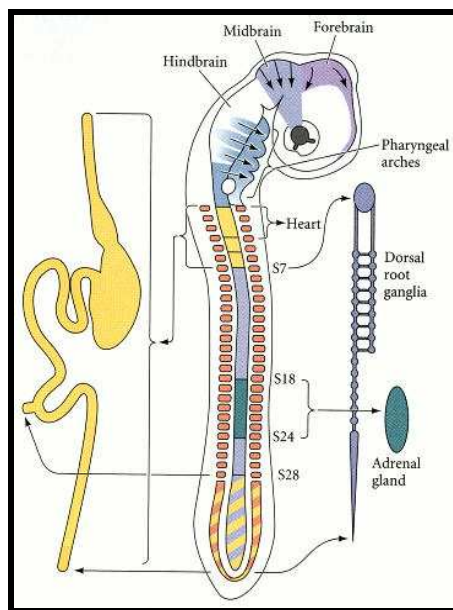


Fig . 1: Regioni della cresta neurale.

Incidenza e fattori predisponenti

Il neuroblastoma è, con l'esclusione delle neoplasie del cervello, il tumore solido più frequente nei bambini rendendo conto del 8-10% di quelli tipici dell'infanzia (Voute *et al.*, 1984). Studi epidemiologici mostrano come questo colpisca con incidenza maggiore il sesso femminile e i bambini di razza bianca (Voute *et al.*, 1984).

La diagnosi avviene mediamente intorno ai 22 mesi ed alcuni studi mostrano la presenza di due picchi d'incidenza, uno antecedente il primo anno d'età ed un secondo tra i due e i quattro anni. Il riscontro diagnostico entro l'anno di vita è associato ad una buona probabilità di sopravvivenza per regressione della forma tumorale; in età più avanzata si evidenzia invece un'evoluzione a ganglioneuroma associata ad una prognosi meno favorevole.

I fattori predisponenti l'insorgenza di questa neoplasia sono tanto ambientali quanto ereditari. Una correlazione tra la comparsa del neuroblastoma ed esposizione a tossici ambientali non è stata ancora definita, ma alcuni studi suggeriscono una connessione marcata tra esposizione prenatale a idantoina, fenobarbitale e alcool ed il verificarsi della patologia neoplastica (Allen *et al.*, 1980).

A tutt'oggi, non è stata identificata una sindrome genetica o un'anomalia congenita che possa essere associata alla predisposizione per il neuroblastoma, anche se il 22% dei bambini affetti da tale patologia sembra avere una predisposizione genetica di tipo autosomico dominante (questo vuol dire che è sufficiente la presenza del difetto in uno dei genitori perché sia trasmesso al figlio). Un'altra ipotesi "genetica" per l'insorgenza del neuroblastoma in bambini è legata ad un evento "mutazionale" intercorrente in cellule della linea germinale (Brodeur *et al.*, 1993).

La teoria più accreditata per la forma tumorale in cui non è riscontrabile una base ereditaria è quella per cui la trasformazione neoplastica sia il risultato di due mutazioni post-zigotiche in una singola cellula oppure di una prezigotica seguita da una seconda post-zigotica (Brodeur *et al.*, 1993). Mediante l'analisi del cariotipo, infatti, sono state evidenziate numerose anomalie: la principale è la delezione del braccio corto del cromosoma 1 che, associata all'amplificazione dell'oncogene myc, sul medesimo cromosoma, porta alla forma tumorale più maligna. Di seguito passeremo brevemente in rassegna le principali anomalie riscontrate in pazienti affetti da neuroblastoma.

Riarrangiamenti sul cromosoma 1

La delezione del braccio corto del cromosoma 1 (1p) rappresenta l'anomalia citogenetica caratteristica dei tessuti tumorali e delle corrispondenti linee cellulari. Ad essere coinvolta è la regione compresa tra 1p36.1 e 1p36.3 con probabile perdita o soppressione di geni critici per il controllo della progressione tumorale.

La traslocazione 1p-17q è associata ad un aumento della frequenza d'insorgenza della neoplasia (Maris *et al.*, 1997).

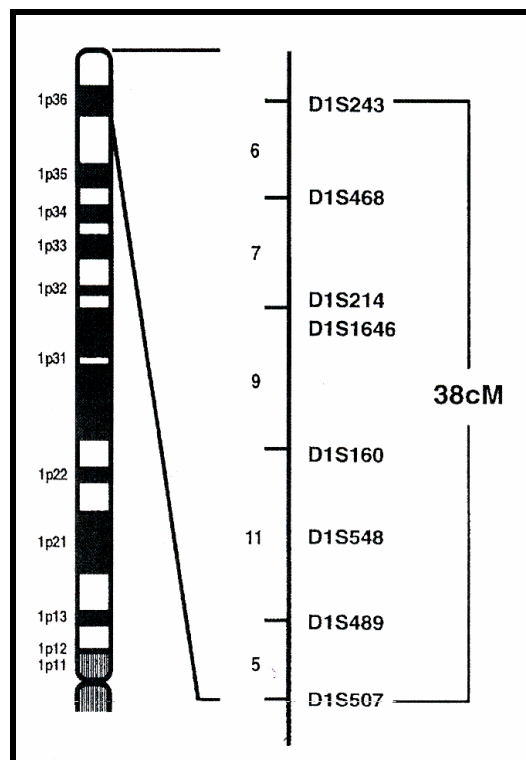


Fig. 2: Mappa citogenetica del braccio corto del cromosoma 1.

Espressione e amplificazione di myc

L'oncogene n-myc è amplificato in molte linee cellulari di neuroblastoma e in circa il 25% dei tumori primari. Il locus di tale gene si trova a livello della porzione distale del braccio corto del cromosoma 2. L'amplificazione comporta rapida progressione della forma tumorale indipendentemente dallo stadio del tumore e dall'età del paziente; questo suggerisce che tale riarrangiamento è una proprietà biologica intrinseca dell'aggressività del neuroblastoma (Lanzkowsky P., 1994).

E' importante sottolineare che amplificazione di myc e delezione 1p sono correlati; probabilmente la delezione precede l'amplificazione che risulterebbe facilitata dalla rimozione di geni regolatori sul cromosoma 1 (i principali candidati sono HKR3 e DAN).

Espressione dei recettori per i fattori di crescita nervosi Trk

Importante nello sviluppo clinico e biologico del neuroblastoma è il ruolo dei geni che codificano per una classe di protein-chinasi recettoriali, dette Trk (A, B, C), in grado di fosforilare i propri substrati specificamente su residui di tirosina. Tali proteine individuano la famiglia di recettori per le neurotrofine quali, ad esempio, il Nerve Growth Factor (NGF) ed il Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF). Questi ultimi svolgono diverse funzioni nella fisiologia del sistema nervoso promuovendo la sopravvivenza, la crescita e il differenziamento di diverse classi di neuroni.

In cellule di neuroblastoma, l'interazione NGF/TrkA promuove l'arresto della crescita ed il differenziamento in senso neuronale mentre quella tra BDNF ed il suo recettore, TrkB, determina sopravvivenza e crescita neuronale. E', altresì, interessante notare l'esistenza di una correlazione inversa tra l'espressione di TrkA (gp140trk-A) e l'amplificazione dell'oncogene myc; ciò spiegherebbe il blocco differenziativo osservato in cellule esprimenti livelli abnormi dell'oncogene. Sulla base di queste osservazioni, un'adeguata espressione di TrkA (così come dell'omologa TrkC) rappresenta un aspetto positivo nella valutazione della prognosi clinica dei neuroblastomi. Per quanto concerne TrkB, questo supporterebbe la sopravvivenza cellulare in presenza di NGF. In questo caso la forma "full-length" (gp145, TrkB) è associata all'amplificazione dell'oncogene myc e ad una prognosi negativa mentre la forma tronca (gp95trk-B) priva del dominio tirosin-cinasico è predominante nei tumori differenziati (Brodeur *et al.*, 1997, Lucarelli *et al.*, 1997, Eggert *et al.*, 2002). Per i motivi sopra elencati le Trk rappresentano quindi un bersaglio ideale nello sviluppo di una terapia che intervenga sui meccanismi di differenziamento.

Caratterizzazione genetica dei neuroblastomi

In base alle caratteristiche citogenetiche si identificano tre gruppi di tumori (Brodeur 1995,1997) :

Caratteristiche	Tipo I	Tipo II	Tipo III
MYCN	Normale	Normale	Amplificato
TRKA	Alto	Variabile	Basso
Età	Inferiore a 1 anno	Superiore a 1 anno	Entro i 5 anni
Stadio	1, 2, 4S	3, 4	3, 4
Sopravvivenza	95%	25-50%	<5%

Caratteristiche cliniche

Le manifestazioni cliniche e la prognosi dipendono dalla posizione della massa tumorale primaria, dall'estensione di questa, dall'età del paziente al momento della diagnosi e dal grado di differenziamento istologico (Shimana *et al.*, 1984).

Nei bambini, in oltre un terzo dei casi, la malattia esordisce nell'addome e interessa prevalentemente i surreni mentre nella quota restante ad essere interessati sono i gangli del sistema simpatico nella regione paravertebrale mediastinica e lombare con metastasi che, in genere, si manifestano a livello linfonodale, ematico e scheletrico.

Raramente il neuroblastoma può originare dai gangli intramurali dell'utero, dell'intestino e della vescica e in questo caso è spesso associato a malformazioni di questi organi.

Nell'adulto il tumore insorge preferenzialmente nel capo, nel collo e nelle gambe. Nel caso si verifichi regressione spontanea della neoplasia per differenziamento e apoptosi cellulare massiva permangono *in situ* aree fibrotiche tendenti alla calcificazione. In tutti i casi citati, il quadro sintomatologico è conseguente alla compressione meccanica.

I tumori primari localizzati a livello del collo e della testa si presentano come "masse" palpabili, sono in genere associati ad esoftalmo, miosi, difetto di sudorazione e colpi di calore dal lato della faccia interessato con possibile paralisi (Sindrome di Bernard-Soullier). Nelle localizzazioni a livello addominale la sintomatologia è rappresentata da vomito e perdita di appetito; anche in questo caso la massa tumorale è riscontrabile alla palpazione.

L'interessamento della parte alta del torace, determinando compressione linfatica, è causa di infezioni polmonari, dispnea e disfagia. Sintomi "nervosi" si registrano quando il tumore è localizzato nell'area paraspinale: ipotonia, atrofia, areflessia (mancanza di riflessi) o iperreflessia (esasperazione dei riflessi), scoliosi, disfunzioni della vescica e dello sfintere anale (Lanzkowsky P., 1994).

Classificazione istologica

Il neuroblastoma può essere diviso in due categorie in base a caratteristiche istopatologiche e all'età del bambino (Brodeur *et al.*, 1988). Considerando le caratteristiche citologiche tessutali la classificazione è legata alla valutazione di:

- presenza o assenza dello stroma di Schwann
- difetto di maturazione cellulare
- MKI (indice mitotico) :
 - grado 1, basso indice mitotico o calcificazione presente
 - grado 2, basso indice mitotico e calcificazione presente
 - grado 3, calcificazione assente e indice mitotico alto.

Sulla base dei reperti istologici possono essere identificati quattro stadi nell'evoluzione della patologia:

I. Il tumore appare confinato nell'organo d'origine; non sono presenti residui tumorali microscopici; l'infiltrazione tumorale dei linfonodi regionali è negativa; sono assenti le metastasi distali.

II. Il tumore si estende con continuità oltre i confini dell'organo di origine senza oltrepassare la linea mediana, i linfonodi possono o meno essere colonizzati da cellule tumorali; si può verificare rottura della capsula tumorale.

III. Il tumore si estende con continuità oltre la linea mediana; i linfonodi possono essere o meno "metastatici". Sono assenti le metastasi in altri organi.

IV. Metastasi interessano visceri, linfonodi distali, tessuti molli e scheletro.

IV-S.(Speciale). Pazienti la cui malattia dovrebbe essere classificata come stadio I o II, ma con interessamento di fegato, cute e midollo osseo.

Protocolli terapeutici

Tre sono gli approcci terapeutici attualmente in uso: chirurgico, chemioterapico e radioterapico (Niethammer *et al.*, 1995). Il trattamento d'elezione è quello chemioterapico,

eccezion fatta per i casi in cui sia possibile rimuovere chirurgicamente la massa tumorale o questa si presenti allo stadio 4S (Brodeur *et al.*, 1988).

I principali agenti chemioterapici, riconosciuti efficaci nel trattamento del neuroblastoma, sono ciclofosfamide, cisplatino, doxorubicina, teniposide ed etoposide generalmente somministrati in associazione al fine di sfruttarne l'azione sinergica (National Cancer Institute).

Tra i protocolli più usati :

- OPEC/OJEC
- OJEC rapido
- Fattori di crescita ematopoietici.

La decisione di rimuovere il tumore è legata alla sua localizzazione, al coinvolgimento dei principali vasi sanguigni e alla tempestività della diagnosi. La complicazione più frequente legata al trattamento chirurgico è l'insorgenza della sindrome di Horner.

Nei casi in cui la localizzazione del tumore e l'età del bambino lo suggeriscano viene impiegata la terapia con radiazioni ionizzanti in un "range" compreso tra 15-30 Gray, in genere associata al trattamento chirurgico o chemioterapico.

Altri trattamenti farmacologici sono in studio come l'uso di anticorpi monoclonali diretti verso il GD2 ganglioside (già attuale) o la stimolazione delle risposte di difesa "cellulo-mediate" con interleuchina 2 (ancora in fase sperimentale).

L'uso di agenti differenzianti, grazie agli incoraggianti risultati ottenuti, rappresenta oggi più che mai l'ultima frontiera nella ricerca di terapie efficaci in associazione con lo studio dei meccanismi molecolari alla base del fenomeno neoplastico geneticamente determinati.

Genesi del cancro

Proliferazione cellulare, differenziamento e apoptosi sono in parte mediati da segnali comuni e non ancora del tutto chiari. L'omeostasi cellulare è legata al risultato della continua integrazione di questi segnali che risultano alterati nella genesi tumorale; in questo senso la neoplasia può essere interpretata come un disordine risultante dal mancato bilanciamento tra proliferazione e morte cellulare.

Numerosi progressi sono stati compiuti negli ultimi due decenni sull'identificazione delle basi molecolari del fenomeno neoplastico; ciò ha permesso l'introduzione di rivoluzionari metodi di trattamento mirati ad intervenire sulle basi molecolari della cancerogenesi. Neoplasie possono svilupparsi in quasi tutti i tessuti dell'organismo e molti di questi possono ospitare più tumori: diverse sono quindi le caratteristiche morfologiche e topografiche; ne deriva che ciascuna neoplasia ha caratteristiche peculiari ma i meccanismi di base sembrano essere simili.

Alcune caratteristiche delle cellule embrionali, tra cui la capacità di riprodursi attivamente, nei tumori diventano condizione permanente e autonoma. Le cellule "normali" si riproducono solo quando vengono istruite in proposito e ciò affinché ogni tessuto mantenga le dimensioni e la struttura appropriate ai bisogni dell'organismo. A caratterizzare il comportamento biologico delle cellule tumorali è l'insensibilità agli usuali meccanismi di controllo della proliferazione cellulare con alterazione del bilancio proliferazione/morte a favore della proliferazione.

I tumori benigni si differenziano da quelli con maggiore aggressività biologica poiché, pur presentano indipendenza proliferativa e sviluppo espansivo, crescono comprimendo i tessuti vicini sì da mantenere con essi i rapporti di contiguità in assenza di infiltrazioni. Se l'asportazione della massa tumorale è totale, essi difficilmente recidivano; possono però trasformarsi in forme maligne.

Le cellule neoplastiche maligne assumono aspetti morfologico-funzionali diversi da quelle d'origine, possedendo la capacità di migrare in siti distanti dal locus primario (formando masse tumorali metastatiche) e di invadere i tessuti circostanti. I tumori costituiti da queste cellule diventano sempre più aggressivi con il passare del tempo distruggendo organi e tessuti, con debilitazione generale dell'organismo (cachessia) e morte in breve tempo. Questo tipo di evoluzione è da attribuire, probabilmente, alla selezione di cellule con un fenotipo più spiccatamente maligno.

Ciò che caratterizza le cellule tumorali è:

1. *la perdita del controllo:*

- a) proliferativo e del potenziale replicativo, ciò che permette di distinguere tumore e iperplasia. In genere la cellula continua a duplicarsi per un certo numero di generazioni e termina il suo ciclo vitale attraverso la morte programmata. Questo non vale per le cellule tumorali che diventano immortali e continuano a proliferare;
- b) di posizione, per alterazione delle molecole di adesione; ciò permette alle cellule di “camminare” le une sulle altre. Questa caratteristica viene identificata come perdita dell’inibizione da contatto;
- c) di territorio, la cellula tumorale può spostarsi dal sito d’origine e diffondere nell’organismo per alterazione del suo programma genetico.

2. *l’atipia:*

la cellula tumorale è morfologicamente ed istologicamente atipica. Le differenze sono di ordine chimico, metabolico, funzionale e comportamentale. A questa è associata l’*anaplasia*, alterazione del differenziamento con perdita delle sue caratteristiche specifiche;

3. *l’eterogeneità:*

che può essere istogenica (dipende dal tessuto d’origine), istiotipica (nell’ambito dello stesso tumore vi possono essere cellule di diverso tipo) e tumorale (per selezione delle cellule con il fenotipo più maligno).

In conclusione le cellule tumorali discendono tutte da una cellula ancestrale che attua un programma di riproduzione incontrollata.

La trasformazione maligna di una cellula è promossa dall’accumulo di mutazioni in classi specifiche di geni, i proto-oncogeni e i geni oncosoppressori, capaci di modulare la proliferazione cellulare in senso rispettivamente positivo e negativo.

Diversi sono gli eventi che possono modificare le funzioni fisiologiche associate ai geni sopra citati. Nel caso dei proto-oncogeni, questi potrebbero perdere la capacità di “sentire” i segnali di arresto del ciclo per mutazione nei siti di interazione con molecole regolatorie. In altri casi vi potrebbe essere una produzione eccessiva delle proteine da questi codificate, tale da sopraffare i meccanismi usualmente preposti al controllo della loro attività. Per i geni oncosoppressori l’eventualità più frequente è data da mutazioni nella sequenza nucleotidica tali da impedire la traduzione proteica o, in altre circostanze, da generare proteine non funzionali, incapaci cioè di bloccare il ciclo proliferativo. In particolare l’alterazione di geni codificanti per p53 e pRb è stata riscontrata in una elevata percentuale di forme tumorali.

p53 rappresenta un vero e proprio sistema di difesa per preservare l'integrità genomica, tanto che, in presenza di danni a carico del DNA genomico, viene attivata nella sua funzione di fattore di trascrizione. In questa maniera p53 determina, attraverso una intricata rete di segnali, il blocco del ciclo proliferativo necessario perché gli enzimi preposti alla riparazione del danno genetico abbiano il tempo di agire. Nel caso in cui l'entità dell'insulto genetico sia tale da sopraffare i processi di riparazione intrinseci alla cellula, p53 determina la morte "programmata" della stessa (apoptosi).

La proteina Rb rappresenta, in condizioni normali, il principale freno del ciclo cellulare. La sua inibizione, operata per fosforilazione dal complesso ciclica D/cdk4, permette la progressione in fase S rilasciando il fattore di trascrizione E2F, con il quale è abitualmente accoppiato. Quest'ultimo, libero di traslocare nel nucleo, attiva la sintesi di proteine necessarie per l'attuazione del ciclo cellulare.

In genere perché si sviluppi un tumore maligno devono verificarsi mutazioni in almeno cinque o sei geni coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare, accompagnate da riarrangiamenti in altri geni che conferiscono capacità invasiva e metastatizzante alle cellule neoplastiche.

La cancerogenesi chimica ha permesso di identificare i tre momenti fondamentali nella genesi del tumore: l'iniziazione, la promozione e la progressione.

Iniziazione: processo per cui in un organismo viene indotta la formazione di cellule diverse, "iniziate", ma non ancora neoplastiche. Ciò si verifica a fronte di una lesione biochimica e di almeno un ciclo di proliferazione necessario per fissare il danno che in genere è localizzato su geni deputati al controllo della proliferazione o del differenziamento. La cellula iniziata risulterebbe così essere resistente alla morte cellulare indotta con presidi farmacologici o sostanze tossiche.

L'iniziazione porta a genesi tumorale solo se si verificano eventi "mutazionali" subentranti quello primario. Questa prima fase è rapida e irreversibile ed è importante sottolineare che:

- mutazioni del DNA non codificante sono fenotipicamente silenti e mutazioni di geni non coinvolti nel controllo e nel differenziamento cellulare non provocano il cancro;
- esistono meccanismi di controllo che riducono la possibilità di fissazione del danno anche a costo di indurre morte della cellula;
- in questo stadio non esiste ancora il tumore ma solo una cellula potenzialmente pericolosa.

Promozione: fattori extracellulari promuovono la proliferazione cellulare in modo aspecifico e con meccanismi non ancora del tutto noti. Si verifica espansione clonale della cellula “iniziata” che recepisce lo stimolo proliferativo in maniera diversa dalle cellule normali. Queste ultime possono seguire destini diversi: oltre la proliferazione seguono la via del differenziamento e della morte cellulare; tutto ciò contribuisce alla formazione di una lesione benigna o pre-neoplastica. Questa seconda fase può durare parecchi anni.

Progressione: è la fase più temibile, caratterizzata dall'evoluzione della lesione pre-neoplastica; condurrà alla manifestazione clinica della neoplasia nei suoi aspetti più gravi.

Nel corso della progressione si formano varianti cellulari capaci di resistere agli attacchi farmacologici ed immunologici per selezione di cellule con il fenotipo più aggressivo.

Formazione e sviluppo tumorale dipendono da una serie di eventi molecolari che non si esauriscono con la formazione della massa primaria ma continuano a verificarsi. Il tumore è quindi un'entità dinamica suscettibile a modificazioni; da ciò dipende la comparsa di nuove caratteristiche fenotipiche. La curva di crescita di una neoplasia presenta un andamento trifasico: di latenza, di accrescimento esponenziale e di crescita lenta.

Trascurando le cellule che abbandonano il tumore primario per metastatizzare, si può ritenere che l'accrescimento della massa tumorale nel suo insieme dipenda sostanzialmente dal bilancio dinamico tra la riproduzione e la morte cellulare. In tale ambito angiogenesi, invasività e metastatizzazione presentano un ruolo chiave.

Ceramide: struttura e sintesi

La ceramide strutturalmente è costituita da un residuo di sfingosina e da un acido grasso uniti tramite un legame amminico.

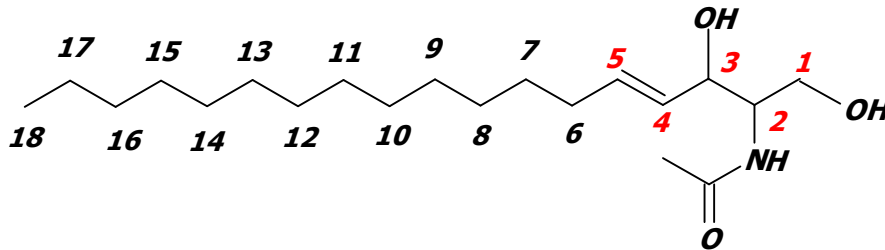


Fig. 3. Struttura della C2-Ceramide.

Dal punto di vista biologico i siti più importanti di reattività sono:

- ✚ i carboni dalla posizione 1 alla 5 appartenenti al residuo di sfingosina;
- ✚ i due gruppi ossidrilici in posizione 1 e 3; in particolare quello in C1 che è sede dei possibili legami della ceramide con gli zuccheri per formare glicosfingolipidi;
- ✚ il gruppo amminico di legame tra le due subunità strutturali;
- ✚ la stereochimica del doppio legame in posizione 4-5 di tipo trans (Fig. 3).

Possibili variazioni nella struttura possono comportare da un lato la perdita di attività dall'altro un aumento della tossicità della molecola; ad esempio l'idrogenazione del doppio legame rende inattiva la molecola e ciò conferisce notevole importanza a quelle modificazioni strutturali ai fini dell'induzione della morte cellulare (Kishida *et al.*, 1997). Il possibile ridimensionamento della lunghezza della catena dell'acido grasso determina invece tossicità cellulare, e la possibile sostituzione del gruppo carbossilico del legame ammidico con un metilene aumenta la potenza della ceramide come stimolo apoptotico. Effetto che si verifica per diminuzione della velocità di idrolisi con conseguente aumento dell'emivita della ceramide (Karasavvas *et al.*, 1996).

Sintesi

La ceramide può essere generata attraverso due vie sintetiche differenti:

- 1- via sfingomielinasi-dipendente
- 2- via di neosintesi

1 - Le sfingomielinasi sono gli enzimi più studiati per valutare il metabolismo lipidico; vengono attivati in risposta a stimoli esterni di diversa natura e promuovono l'inizio del ciclo della sfingomielina. Attualmente, sono noti cinque diversi enzimi identificati in base al pH ottimale per lo svolgimento della loro funzione, alla localizzazione cellulare e alla dipendenza cationica (Perry *et al.*, 1998). La prima forma enzimatica di sfingomielinasi scoperta è stata quella acida (A-SMase). Tale attività risiede in compartimenti acidi come gli endosomi o i lisosomi e si ritrova come forma solubile nel citosol e nell'ambiente extracellulare legato alla membrana plasmatica; la sua azione si svolge in maniera ottimale ad un pH intorno a 5, ma recenti studi hanno evidenziato la sua attività anche a pH neutro e in presenza di ioni Mg^{2+} e Zn^{2+} . Dopo l'avvenuta clonazione si è ipotizzato che l'enzima sia prodotto dall'espressione di un gene conservato e abbia un ruolo importante nell'apoptosi indotta da radiazioni (Schissel *et al.*, 1996). Entrambe le forme di sfingomielinasi acida sono codificate dallo stesso m-RNA e non derivano da forme di splicing alternative (Schissel *et al.*, 1996). Una sua possibile carenza è stata riscontrata nella malattia di Niemann-Pick di tipo A e B. La forma neutra (N-SMase) Mg^{2+} -indipendente è stata parzialmente purificata da cellule HL-60 trattate con vitamina D; ne sono state ritrovate due forme che differiscono per localizzazione, una presente nel citosol, l'altra legata alla membrana cellulare. Altre forme attive a pH alcalino sono state riscontrate a livello del tratto gastro-intestinale ed il loro substrato è la sfingomielina localizzata a livello della membrana cellulare. La sintesi della ceramide avviene tramite allontanamento di una molecola di fosforilcolina dalla sfingomielina una rapida azione della sfingomielinasi (uno-tre minuti) (Adam *et al.*, 1996).

STIMOLI INDUCENTI L'ATTIVAZIONE DELLA VIA SFINGOMIELINICA

TNF-α	Stress ossidativo
IL-1	Complemento C5b
CD28	Daunorubicina
γ-Interferon	Vincristina
Vitamina D3	Deprivazione di siero
NGF	Progesterone
CD95-L	UV
Heat	Corticosteroidi
PDGF	Radiazioni ionizzanti

2 - La sintesi *de novo* di ceramide viene indotta sulla superficie del reticolo endoplasmatico grazie all'azione della serina-palmitoil-transferasi in una reazione di condensazione che dà luogo a chetosfinganina e palmitoil-CoA. L'enzima successivo, la chetosfinganina reductasi, riduce il gruppo chetonico promovendo la sintesi di sfinganina. L'ordine della sequenza degli eventi successivi, N-acilazione e formazione del doppio legame, nella sintesi della ceramide è stato difficile da individuare fino alla dimostrazione che la sfinganina è inizialmente N-acilata dalla diidroceramide-sintetasi (Ong *et al.*, 1973; Merrill *et al.*, 1986). Questa reazione è poi seguita dall'introduzione del doppio legame catalizzato dalla diidroceramide denaturasi (Michel *et al.*, 1997) che risiede sulla superficie citosolica del reticolo endoplasmatico. La diidroceramide denaturasi è inibita da gruppi tiolici (Michel *et al.*, 1997), sottolineando l'importanza dello stato di ossido-riduzione della cellula nella regolazione dei livelli intracellulari di ceramide (Fig. 4).

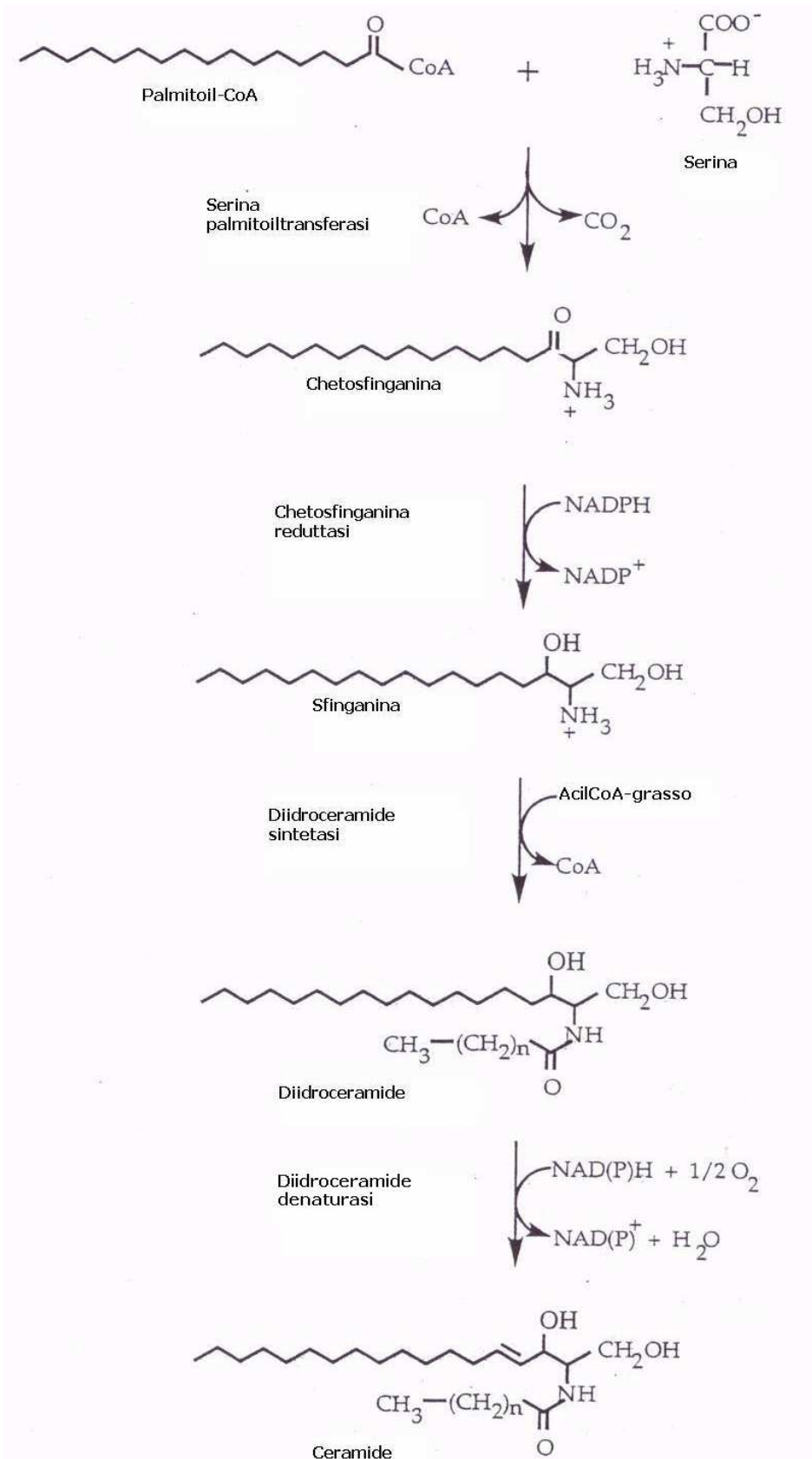


Fig. 4. Schema della sintesi *de novo* della ceramide.

Sfingolipidi e loro ruolo nella fisiologia e fisiopatologia neuronale

La ceramide, lipide appartenente alla classe degli sfingolipidi isolato per la prima volta nel 1874 dallo studioso Thudichum, è un componente critico nell'induzione dell'apoptosi e nella regolazione di altre risposte cellulari quali la differenziazione, l'arresto del ciclo cellulare e la senescenza (Okazaki *et al.*, 1990; Jayadev *et al.*, 1995; Venable *et al.*, 1995; Ping *et al.*, 1997). La ceramide è una molecola fondamentale ed è un componente strutturale comune dei lipidi essendo un prodotto del loro metabolismo. Tutti gli sfingolipidi contengono ceramide come componente a base idrofila, e derivano da una ceramide attraverso vie biosintetiche in cui avviene una modificazione nella posizione 1- idrossilica della ceramide stessa.

Sebbene esista una grande abbondanza di informazioni sulla struttura, metabolismo, e l'attività biologica degli sfingolipidi di membrana (specialmente sui glicosfingolipidi), il ruolo degli sfingolipidi nella trasduzione del segnale è stato fino a poco tempo fa poco apprezzato.

Numerosi sono gli agenti extracellulari, come il calcitriolo, che agisce su recettori intracellulari, il TNF- α , il γ -interferon e l'interleuchina-1, in grado di attivare l'idrolisi della sfingomieline per generare ceramide pur rimanendo poco chiaro il meccanismo che lega l'occupazione del recettore e l'attivazione della sfingomielinasi. Dati recenti, condotti anche in sistemi cell-free, suggeriscono che il TNF- α possa indurre l'attivazione della sfingomielinasi attraverso il coinvolgimento di fosfolipasi A₂ (PLPA₂) e la generazione di acido arachidonico come meccanismo di interazione intermedio.

Nello schema rappresentato in Fig. 8 viene proposto il ruolo della sfingomieline nel segnale di trasduzione e il ruolo di ceramide come secondo messaggero. L'azione di un ligando (L), come TNF- α o IL-1, che si lega al recettore, determina l'attivazione della sfingomielinasi che a sua volta causa idrolisi della sfingomieline di membrana e generazione di ceramide. L'effetto finale della sintesi e dell'azione di ceramide assume particolare rilevanza in quanto è strettamente correlato con specifici fenomeni quali l'induzione del differenziamento, l'arresto del ciclo cellulare e/o l'apoptosi.

Recentemente è stato dimostrato il rapporto tra stimolazione esogena con ceramide ed esposizione in membrana di Fas-L (Gupta *et al.*, 2001). A questa si associano osservazioni su una stretta correlazione tra livelli intracellulari di ceramide ed espressione

di Bcl-2, Bcl-xl e Bax, tutte proteine appartenenti alla famiglia di Bcl-2. Questo gruppo si compone di membri, quali Bcl-2 e Bcl-xl, con funzione di protezione da insulti citotossici di varia origine, ed altri, veri e propri mediatori del danno mitocondriale tipico dell'apoptosi, tra cui Bid, Bad, e Bax (Reed *et al.*, 1997). Sia i primi che i secondi agiscono a livello del mitocondrio influenzandone il potenziale di membrana e la permeabilità ad alcune proteine quali il citocromo c (cit c), protagonista della fase esecutiva della apoptosi (Green e Reed, 1998). La localizzazione di queste proteine a livello mitocondriale definisce lo stato di attivazione tanto in un senso anti- quanto in quello pro-apoptotico (Reed *et al.*, 1997).

La ceramide, inoltre porterebbe all'attivazione di peculiari enzimi proteolitici, quali le caspasi e le catepsine lisosomiali che contribuiscono alle fasi induttiva ed esecutiva dell'apoptosi (Green e Reed, 1998). Inoltre la ceramide sembra modulare l'attività di alcune molecole bersaglio, tra cui la protein chinasi C isozima ζ , la fosfatasi proteica attivata da ceramide (CAPP), la protein chinasi attivata da ceramide (CAPK). Questi "target" una volta attivati, mediano l'azione di ceramide in alcuni eventi intracellulari, come l'attivazione di NF- κ B, l'attivazione del gene Rb (retinoblastoma), la regolazione dell'espressione di c-Myc, l'induzione delle cicloossigenasi e l'inibizione della fosfolipasi D (PLD) (Fig. 5).

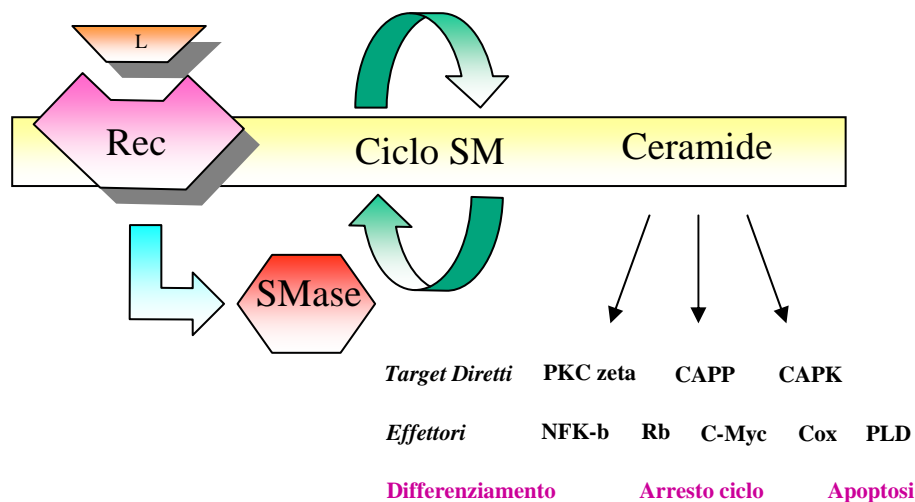


Fig. 5. Schema ruolo del ciclo SM.

In particolare modo NF- κ B è una proteina originariamente identificata per la sua capacità di stimolare nei linfociti B la trascrizione dei geni che codificano per le catene leggere κ delle immunoglobuline. I fattori di trascrizione appartenenti alla famiglia Rel/NF- κ B, scoperti circa tredici anni fa, sono stati indicati come chiave regolatrice di risposte

immunitarie in fase acuta, infiammatorie e come fattori coinvolti nel controllo della proliferazione cellulare e nel processo apoptotico. La famiglia Rel/NF κ B include i fattori Rel A, Rel B, c-Rel, p50/p105 e p52/p100 (Chen *et al.*, 1999). Strutturalmente sono costituiti da una sequenza di circa trecento aminoacidi il cui dominio N-terminale è chiamato "Rel Homology Domain", RH, contenente importanti sequenze per il legame con il DNA, la dimerizzazione ed il legame con uno specifico fattore inibitorio (I κ B). La terminazione carbossilica dei fattori Rel A, Rel B e c-Rel contiene domini trascrizionali di attivazione mentre quella dei fattori p105 e p100 domini inibitori. Le forme mature leganti il DNA di p105 e p100 sono più corte e vengono chiamate rispettivamente p50 e p52. Approssimativamente tutte le proteine della famiglia formano strutture omodimeriche o eterodimeriche in grado di legarsi al DNA in siti specifici (κ B), influenzando l'espressione genica. Il più comune dimero è un eterodimero, p50-RelA, chiamato NF- κ B (Rayet *et al.*, 1999). Normalmente NF- κ B viene rilasciato dallo spazio intermembrana dei mitocondri nel citoplasma in forma inattiva in quanto complessato con il fattore inibitorio I κ B (Ferri *et al.*, 2001). Diversi segnali sono in grado di promuovere la degradazione della proteina inibitrice promuovendo l'attivazione e successiva traslocazione di NF- κ B nel nucleo. Tra gli attivatori troviamo segnali extracellulari o le interazioni cellula-cellula convertite in segnali di attivazione intracellulare attraverso recettori localizzati nella membrana plasmatica. Un fattore di rilievo per l'attivazione di NF- κ B è il TNF- α , citochina pleiotropica prodotta soprattutto dai macrofagi e dai linfociti T. Il legame di TNF con uno specifico recettore di membrana può promuovere una cascata di eventi pro-apoptotici e una concomitante sovraespressione del fattore di trascrizione NF- κ B con azione anti-apoptotica. La capacità di indurre la morte o la sopravvivenza cellulare dipende dall'equilibrio tra questi due processi (Johnstone *et al.*, 2002). Il TNF media i suoi effetti biologici tramite il legame con due diversi recettori, TNFR-I e TNFR-II simili nel dominio extracellulare, ma differenti in quello citoplasmatico. Il legame di TNFR-I induce trimerizzazione del recettore con reclutamento di una proteina adattatrice denominata TRADD (Fig. 9). Questa proteina serve come intermedio nell'attivazione di altre proteine chiamate: FADD, TRAF-2 e RIP. TRAF-2 e RIP sono direttamente coinvolte nella cascata degli eventi che promuovono l'attivazione di NF- κ B. Sono molecole, infatti, in grado di attivare la proteina chinasi inducente NF- κ B (NIK), la quale a sua volta attiva la proteina inibitrice di I κ B (IKK). IKK fosforila I κ B rendendone possibile la degradazione proteosomica e inducendo il rilascio di NF- κ B, che successivamente trasloca al nucleo e attiva la trascrizione di numerosi geni

(Gupta *et al.*, 2001). Da recenti studi è emerso che sebbene RIP sia necessaria per l'induzione controllata da TNFR-I di entrambi i fenomeni, cascata apoptotica/attivazione NF- κ B nelle cellule T, la sua reale azione dipenda dal tipo di cellula cui il TNF- α si lega (Gupta *et al.*, 2001; Johnstone *et al.*, 2002). Il gruppo di lavoro di Van Antwerp (1999) ha dimostrato, inoltre, che introducendo una forma mutata di I κ B, resistente alla fosforilazione, le cellule divengono sensibili all'apoptosi indotta da agenti attivanti NF- κ B, quali TNF- α , radiazioni ionizzanti e chemioterapici (Ferri *et al.*, 2001; Gupta *et al.*, 2001; Johnstone *et al.*, 2002). Questi studi hanno pertanto individuato il ruolo di NF- κ B come un soppressore del processo apoptotico.

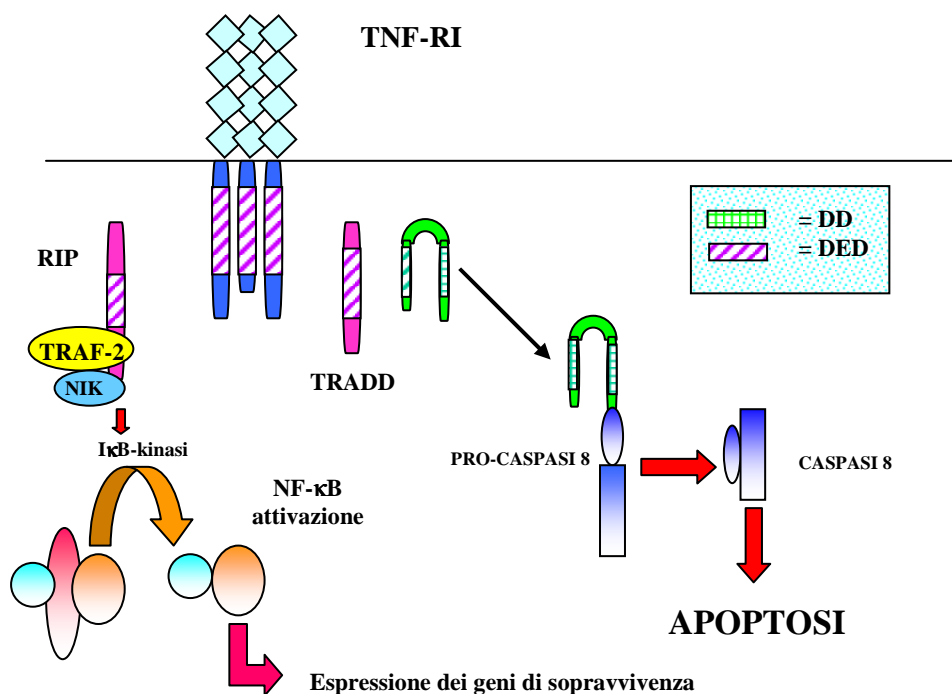


Fig. 6. Schema delle vie di attivazione anti- e pro-apoptotiche mediate dal recettore TNF-R1. Il legame di TNF-R1 risulta rilevante in due importanti processi cellulari quali quello di attivazione del fattore di trascrizione NF- κ B e quello per l'induzione della morte cellulare.

D'altra parte, però, è stato dimostrato un ruolo di NF- κ B anche nella regolazione positiva dell'apoptosi. Sotto opportune condizioni di stimolazione, infatti, NF- κ B è in grado di indurre una sovraregolazione del CD95L favorendo quindi l'induzione del fenomeno apoptotico mediato dalla formazione del complesso CD95/CD95L (Gupta *et al.*, 2001). Grimm e collaboratori (1996) hanno dimostrato inoltre che in risposta all'attivazione del fattore NF- κ B indotta tramite deprivazione di siero, si rileva una sovraespressione di Bcl-2, gene anti-apoptotico. Altri bersagli dell'attività di NF- κ B, oltre a CD95L, sono i geni p53 e

c-Myc, in molti casi coinvolti nei fenomeni apoptotici (Gupta *et al.*, 2001; Ferri *et al.*, 2001; Johnstone *et al.*, 2002).

c-Myc fa parte di una famiglia che è suddivisa in sei sottoclassi, tra cui le più importanti sono L, N, e C, che sono potenti oncogeni che cooperano con l'oncogene ras allo sviluppo della trasformazione neoplastica. La loro espressione è presente normalmente a livello embrionale, mentre nell'adulto si riscontra solo in particolari periodi della vita come la gravidanza. Una loro mancata regolazione, espressione eccessiva o inappropriata, comporta la possibile comparsa di tumori. Tali distinti programmi biologici appaiono essere dipendenti dal tipo cellulare e sono modulati dall'attivazione di alcune vie coinvolte nei segnali di trasduzione del segnale come per esempio il sistema 1,2-diacilglicerolo (DAG)/PKC.

Tra i complementi cellulari effettori attivati dalla ceramide ricordiamo due protein fosfatasi appartenenti alla famiglia delle CAPP: PP1 e PP2A. PP1 è una protein fosfatasi che si trova associata a microsomi localizzati in diversi tessuti cellulari, mentre PP2A è una protein fosfatasi con struttura trimerica dotata di una porzione regolatoria ed una catalitica. Tali proteine vengono attivate da ceramide a lunga catena sia *in vivo* che *in vitro* e sono importanti bersagli per valutarne l'azione cellulare. Sono entrambe serin/treonin fosfatasi (Wolff *et al.*, 1994; Merrill *et al.*, 1997) ed è rilevante il loro coinvolgimento nella regolazione dell'apoptosi e della crescita cellulare. L'attivazione da parte della ceramide avviene a livello della subunità catalitica. Per PP2A si ha comunque un coinvolgimento di un'area più ampia rispetto alla PP1. L'attivazione è altamente stereospecifica e variando le condizioni *in vitro* si hanno modificazioni del processo di attivazione. La presenza ad esempio di acido fosfatidico (PA), un secondo messaggero lipidico prodotto dalla fosfolipasi D, determina inibizione dell'azione di PP1 (Fig. 7), ma non di PP2A (Kishikawa *et al.*, 1999) suggerendo che tale effetto sia da ricondurre ad una modulazione dell'attivazione indotta dalla ceramide.

Per contro, l'aggiunta di KCl riduce l'inibizione di PP1 da parte di PA diminuendo al contempo la ceramide necessaria per l'attivazione di PP1. Inoltre la pre-incubazione con ioni Mn^{2+} aumenta l'attività basale di entrambi gli enzimi senza però modificare la sensibilità alla ceramide (Kishikawa *et al.*, 1999).

Zn^{2+} e $Fe^{2+}/^{3+}$ sono potenti inibitori di PP1 e PP2A *in vitro*; la loro inibizione è però talmente forte da non potere essere revertita dalla ceramide, presumibilmente come risultato di una modificazione di tipo allosterico (Chu *et al.*, 1996) (Fig. 8).

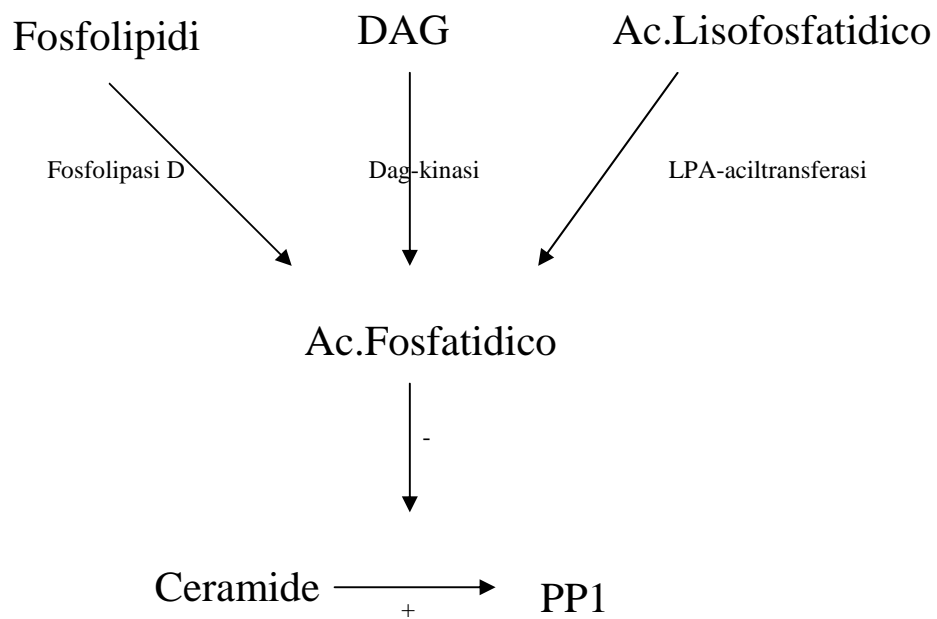


Fig. 7. Schema della cascata di reazioni che mediano l'azione di ceramide.

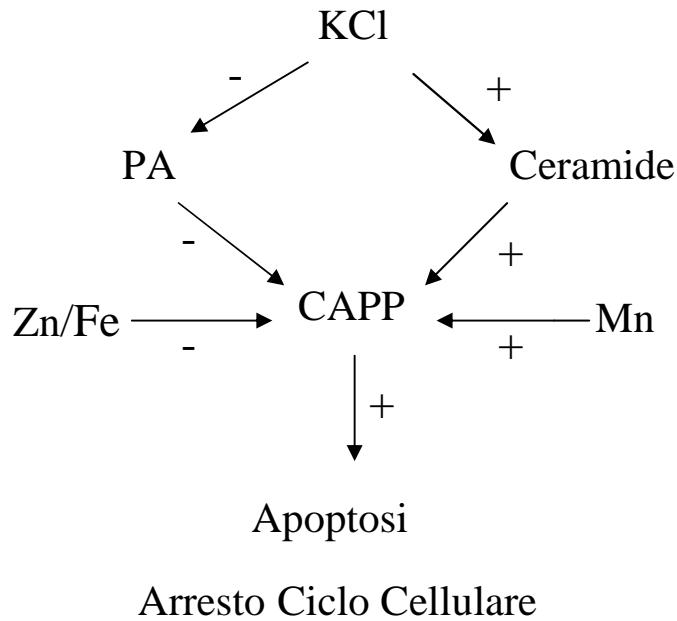


Fig. 8. Modulazione dell'azione di ceramide a livello delle fosfatasi (CAPP).

L'acido okadaico inibisce selettivamente la PP2A mentre la caliculina è in grado di inibire entrambe le forme di fosfatasi (Perry *et al.*, 1998). L'attivazione di PP1 e PP2A indotta da ceramide determina defosforilazione di Rb (proteina del retinoblastoma) che sotto tale forma induce arresto del ciclo cellulare. Inoltre, la ceramide induce l'attivazione della cascata caspatica tramite la proteolisi di PARP, [poly(ADP-ribose)polimerase]; la caliculina, ma non l'acido okadaico, previene questi eventi, ad indicare in PP1 la principale fosfatasi coinvolta nell'azione attivante le caspasi di ceramide mediante un'azione proteolitica di PARP (Smyth *et al.*, 1996) (Fig. 9).

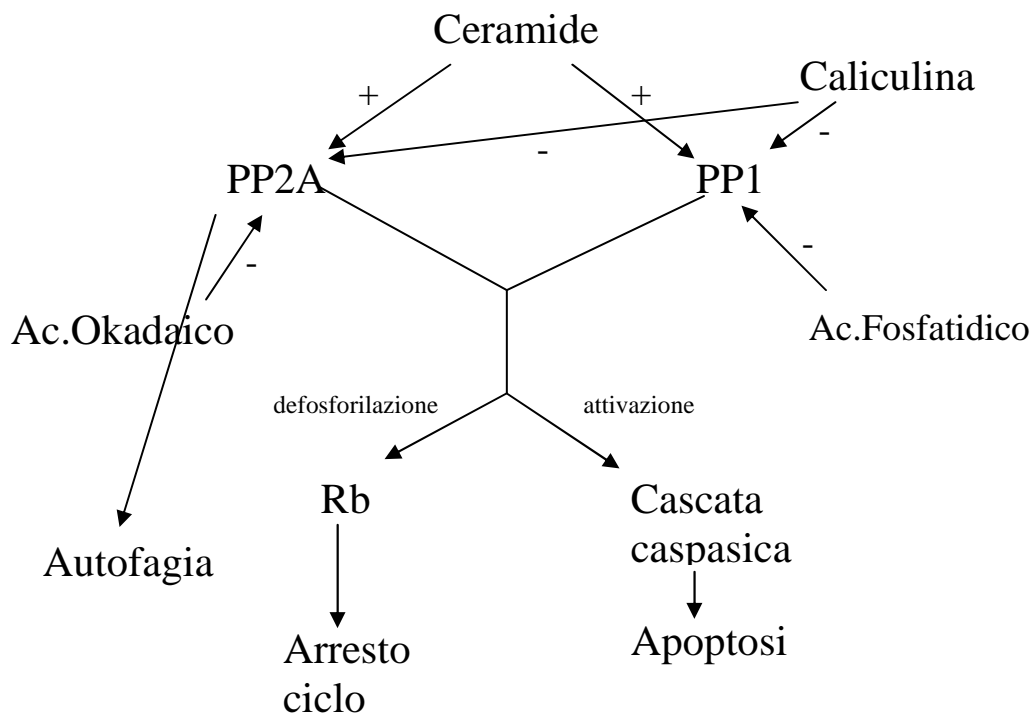


Fig. 9. Interazione tra ceramide e fosfatasi e regolazione della funzione cellulare.

Confronto tra gli effetti indotti dalla ceramide e quelli indotti dall'acido fosfatidico

Ceramide:

- arresto del ciclo cellulare
- inattivazione della PKC- α
- inibizione della sintesi di superossido

Ac.fosfatidico:

- promozione della proliferazione
- attivazione della PKC- α
- attivazione della NADPH perossidasi per la sintesi di superossido

Un'altra proteina effettrice ceramide-dipendente è CAPK, ("ceramide-activated protein kinase"), coinvolta nelle risposte infiammatorie indotte dal TNF- α , promuovendo l'attivazione di Raf, che a sua volta induce la cascata delle MAP chinasi (Yao *et al.*, 1995). CAPK e Raf dovrebbero pertanto mediare gli effetti della ceramide sull'attivazione di MAP chinasi in presenza di citochine infiammatorie.

Una terza chinasi, la proteina chinasi C isoenzima ζ , può legare direttamente la ceramide e modulare la risposta cellulare al TNF- α (Lozano *et al.*, 1994; Muller *et al.*, 1995). Recentemente si è ipotizzato che sia la presenza di un dominio ricco di cisteine, a livello di proteine quali Raf e proteina chinasi C ζ , a permettere il legame diretto con la ceramide (Van Blitterswijk *et al.*, 1998).

La ceramide può infine indurre altre protein chinasi, che vengono attivate da stimoli stressanti extracellulari (Verheij *et al.*, 1996) tra cui JNK/SAPK che, interferendo con il fattore di trascrizione c-Jun, potrebbero essere coinvolte nel processo apoptotico. Recentemente è stato dimostrato il coinvolgimento del recettore CD-95 (APO-1/FAS) nel processo apoptotico indotto da radiazioni e da farmaci antitumorali quali la doxorubicina (Friesen *et al.*, 1996). Tale recettore viene espresso sulla superficie di alcune cellule, tra cui linfociti T e B attivati, cellule epiteliali del colon e cellule epatiche (Krammer *et al.*, 1996), e in molti altri tessuti e tumori (Leithäuser *et al.*, 1993). La più importante funzione sembra quella di indurre apoptosi in cellule sensibili stimulate da CD-95L o da complessi anticorpo-agonista. La proteina CD-95L è una molecola transmembrana di tipo II che si può trovare anche in forma solubile rilasciata dalla membrana cellulare mediante clivaggio proteolitico da parte di metalloproteinasi (Kayagaki *et al.*, 1995). Dal legame di CD-95L con il recettore omonimo si viene a costituire un complesso che si associa alle molecole FADD e FLICE, generando un complesso finale in grado di attivare la cascata caspatica, denominato DISC. La proteina chimerica FLICE contiene un dominio adattatore in grado di legare a FADD un dominio proteolitico simile a quello caspatico. Alcuni studi hanno messo in evidenza una stretta corrispondenza tra l'induzione della sintesi di ceramide indotta da stimoli stressanti ed attivazione del processo apoptotico iniziato dal recettore CD-95 (Haimovitz-Friedman *et al.*, 1994). Infatti, radiazioni ionizzanti o alcuni farmaci antitumorali inducono come detto, una rapida formazione di ceramide, ad opera di una sfingomielinasi, ed apoptosi. Nel fenomeno di apoptosi sembra essere coinvolta una aumentata sintesi di CD-95L a livello nucleare conseguente all'accumulo di ceramide ed all'attivazione ceramide-dipendente di JNK/SAPK. CD-95L trasloca successivamente

nell'ambiente extracellulare per poter interagire con specifici recettori ed attivare la cascata caspatica (Fig. 10).

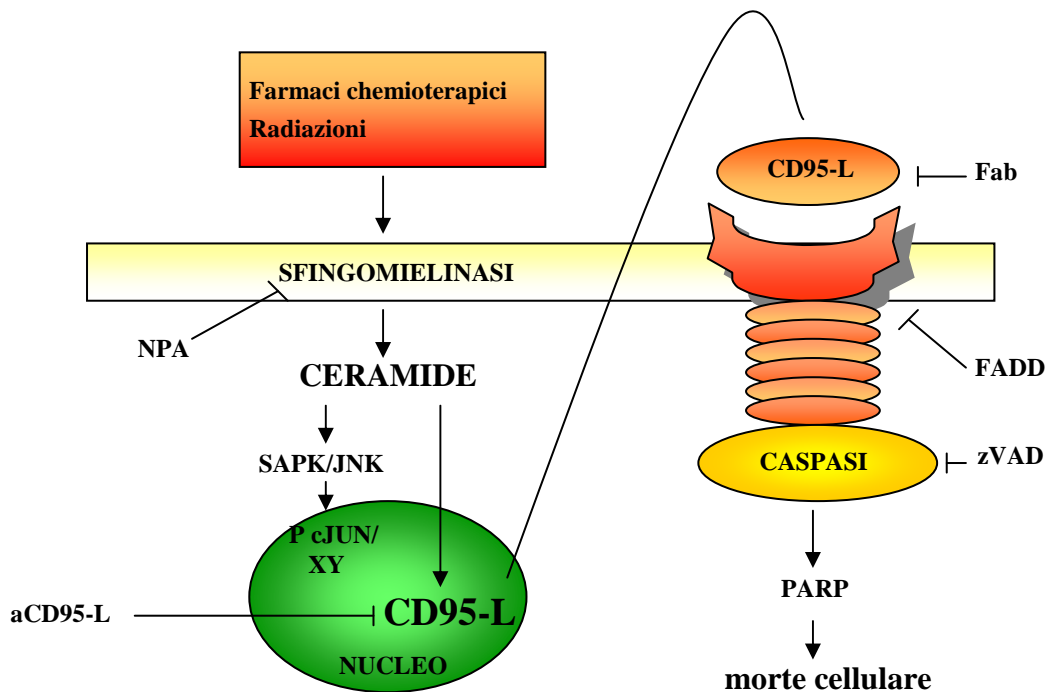


Fig. 10. Schema dell'attivazione del recettore CD95 ceramide-dipendente.

Nei soggetti affetti dalla malattia di Niemann-Pick di tipo A (NPA), carenti del gene che codifica per la sfingomielinasi acida, non si verifica aumento della sintesi di CD-95L, per cui tali soggetti appaiono resistenti alle radiazioni ed ai farmaci antitumorali (Horinouchi *et al.*, 1995). Solo somministrando ceramide esogena si induce aumento del ligando ed attivazione del processo apoptotico CD-95-dipendente. Fattori che possono bloccare questa via apoptotica sono:

- un dominio FADD negativo;
- frammenti anticorpali quali inibitori specifici di CD-95 (Fab);
- inibitori di caspasi quali z-VAD (pan-caspasi inibitore);
- CD95-L antisenso.

Tuttavia, in tali condizioni, il fenomeno apoptotico non è totalmente bloccato, ad indicare come siano coinvolti altri sistemi indipendenti dal recettore CD-95 ed attivati durante lo stimolo che promuove lo stress cellulare. Un altro aspetto interessante è costituito dal fatto che, paradossalmente, l'attivazione di JNK/SAPK è coinvolta tanto

nell'induzione quanto nella pre-venzione dell'apoptosi (Liu *et al.*, 1996). Tale duplicità di effetti è evidenziata dalle modificazioni di alcuni loro substrati, quali (TCF)/ELK-1 e c-Jun, entrambi fattori di trascrizione.

L'attivazione di (TCF)/ELK-1, indotta da JNK/SAPK, promuove a sua volta l'attivazione del gene c-fas in risposta a stress cellulari quali radiazioni UV (Cavigelli *et al.*, 1995). Cellule deficienti del gene c-fas sono sensibili agli UV, promuovendo, qualora sottoposte a radiazione, l'inizio di un processo apoptotico (Schreiber *et al.*, 1995). Molti studi condotti su c-Jun hanno rivelato che è richiesta la sua presenza per entrambi i programmi di apoptosi e di sopravvivenza. Nei fibroblasti c-Jun-deficienti la capacità di indurre morte cellulare per danno al genoma è fortemente ridotta. E' quindi ipotizzabile che c-Jun possa regolare direttamente o indirettamente il sistema CD-95, ma sembra che la sua attivazione non sia sufficiente per indurre apoptosi. Il destino di ogni singola cellula viene dunque deciso da un'azione integrata di vie specifiche variamente attivate in risposta a ben definiti stimoli.

Regolazione delle sfingomielinasi

- Attivazione enzimatica

L'enzima viene attivato da diversi fattori tra cui:

1. Fas
2. TNF- α
3. Agenti chemioterapici
4. Deprivazione da siero

Studi condotti sulla funzione svolta dal recettore TNF- α hanno suggerito un modello teorico che cerca di chiarire come sfingomielinasi differenti possano agire tramite la sintesi di ceramide in differenti vie intracellulari (Wiegmann *et al.*, 1994). Dai risultati sperimentali si è potuto verificare che è la ceramide alla base di entrambi i segnali intracellulari indotti dal TNF- α :

- ✓ pro-infiammatorio
- ✓ apoptotico

Con l'uso di una forma mutata del dominio citoplasmatico del recettore TNF-R1 (TNF-R55) si è dimostrato che ci sono porzioni del dominio specifiche che promuovono l'attivazione distinta delle diverse forme di sfingomielinasi (Fig. 11). La regione del dominio costituita dalla sequenza aminoacidica dalla posizione 310 alla 318 è necessaria e sufficiente per l'attivazione della forma enzimatica neutra (Adam *et al.*, 1996). Questa regione è stata chiamata NSD: "N-SMase-activation-domain". Successivamente, si è dimostrato che è una nuova proteina "WD-repeat", chiamata FAN, a mediare l'attivazione indotta dalla regione NSD dell'enzima. Gli eventi della trasduzione del segnale indotti dall'attivazione enzimatica, tuttavia, rimangono ancora da delucidare (Adam-Klages *et al.*, 1996). L'attivazione della sfingomielinasi acida è indotta invece da una regione carbossi-terminale contenente un dominio denominato "Death Domain" (DD), in grado di legare una proteina adattatrice di nome TRADD. Questa proteina, dopo il legame con il dominio specifico, recluta altre tre proteine: TRAF2, FADD, RIP (Wallach, 1997). TRAF2 media normalmente l'attivazione della proteina chinasi N-terminale c-Jun (JNK) (Yeh *et al.*, 1997). RIP è coinvolto nella via di attivazione di NF- κ B (Kelliher *et al.*, 1998). FADD induce il fenomeno apoptotico intracellulare attraverso l'attivazione di caspasi 8 (Hsu *et al.*, 1996). Di tali proteine quelle realmente coinvolte nell'attivazione dell'enzima sono solo due:

TRADD e FADD che promuovono attivazione senza indurre aumento dei livelli basali dell'enzima. Come, però, questa via di attivazione riesca a passare la membrana endosomica non è stato ancora ben chiarito (Krönke M., 1999).

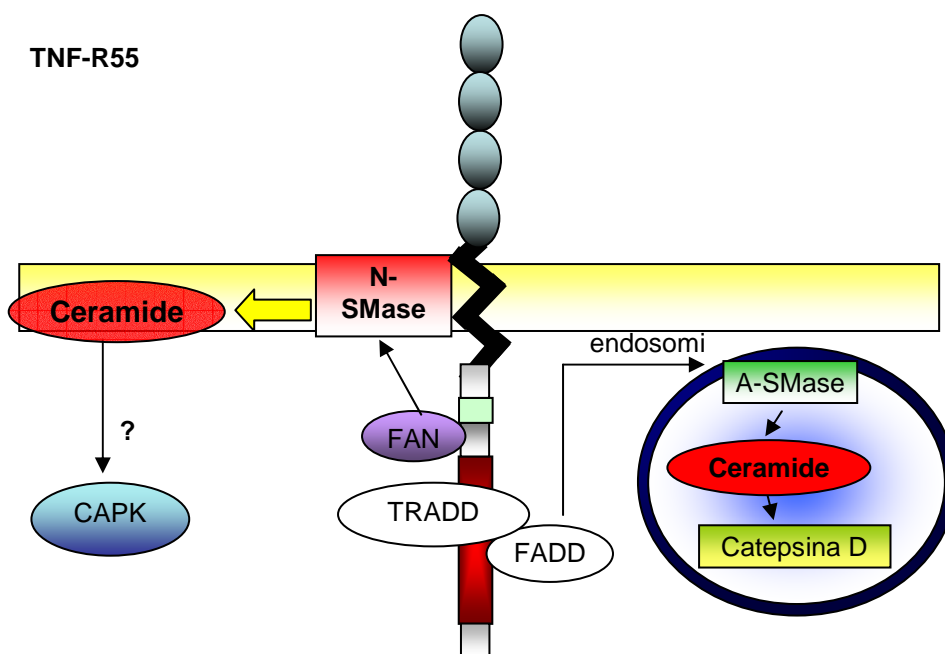


Fig. 11. Regolazione dell'attività enzimatica delle sfingomielinasi mediata dalla stimolazione del recettore TNF-R55.

- *Inibizione enzimatica*

Un importante modulatore negativo degli enzimi N-SMase è il glutatione (GSH). Il glutatione è un tripeptide: L- γ -Glutamyl-L-Cisteinil-Glicina. E' la più piccola ed abbondante molecola non proteica dotata di gruppi tiolici presente nelle cellule di animali. Svolge un ruolo critico nella difesa cellulare verso vari stress di natura ossidativa neutralizzando la formazione di radicali liberi, specie reattive dell'ossigeno ed elementi citotossici quali agenti alchilanti. In condizioni normali le cellule mantengono elevati livelli intracellulare di glutatione intorno a 1-20 mM. Sono sufficienti concentrazioni pari a 4 mM per ottenere il 90-100% dell'inibizione enzimatica. L'attività dell'enzima N-SMasi si recupera pienamente dopo l'eliminazione di glutatione; ciò dimostra che è un'inibizione di tipo reversibile. Da studi più approfonditi si è potuto determinare che la struttura fondamentale per l'inibizione è il complesso γ -Glutamyl-Cisteina e che il glutatione potrebbe agire come un modulatore allosterico specifico per la forma enzimatica neutra. La modulazione dell'enzima provoca inibizione della sintesi di ceramide promovendo alterazioni a livello di fenomeni quali:

- ❖ Morte cellulare apoptotico;
- ❖ Differenziamento;
- ❖ Arresto del ciclo cellulare;
- ❖ Defosforilazione del retinoblastoma;
- ❖ Attivazione di una classe di fosfatasi e chinasi;
- ❖ Inibizione della protein chinasi C, della fosfolipasi D e senescenza cellulare.

Esperimenti condotti ponendo a confronto l'azione inibente del glutatione con quella della sua forma ossidata, GSSG, hanno evidenziato che quest'ultimo è circa tre volte più efficace del glutatione stesso. *In vivo*, tuttavia, il rapporto GSH/GSSG è generalmente considerato in un range di 100-500 per cui in cellule in condizioni normali la sfingomielinasi neutra è preferenzialmente inibita dal GSH, piuttosto che dalla forma ossidata. Nelle cellule con deplezione di glutatione si osserva più facilmente apoptosi in rapporto ad agenti inducenti la morte cellulare. Si può verificare una carenza di glutatione in presenza di:

- ✚ Agenti alchilanti;
- ✚ TNF- α e FAS;
- ✚ Cellule trattate con perossido di idrogeno o inibitori della sintesi proteica;
- ✚ Cellule leucemiche HL-60;
- ✚ Cellule epiteliali polmonari esposte ad elevati livelli di ossigeno (Liu *et al.*, 1997).

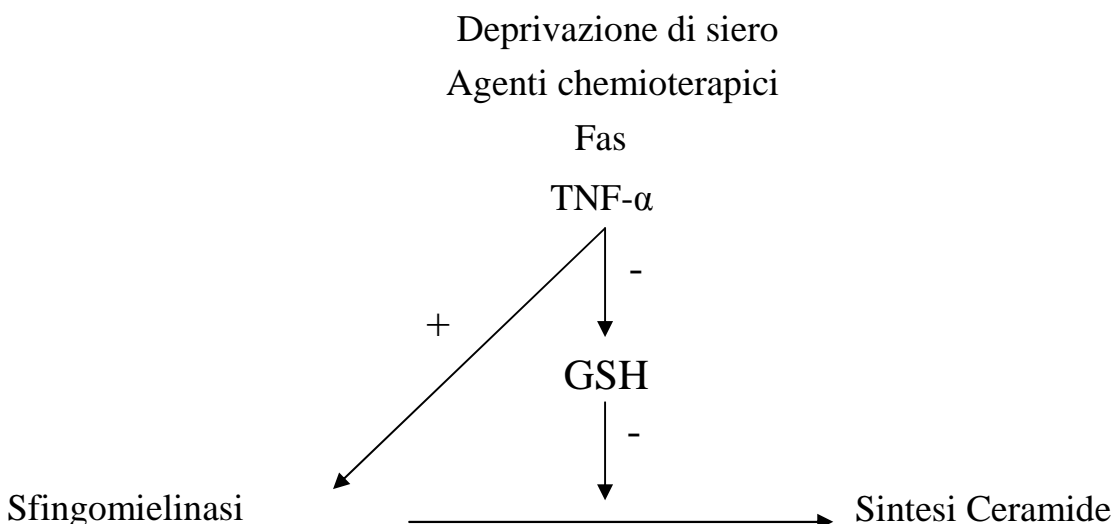


Fig. 12. Fattori che regolano l'attività di GSH nella sintesi di ceramide.

Catabolismo

La ceramide è una molecola soggetta a numerosi destini metabolici indotti da classi di enzimi differenti (Fig.13).

❖ *Sfingomielina sintetasi*

La sfingomielina sintetasi catalizza il trasferimento del gruppo fosforilcolina dalla fosfatidilcolina alla ceramide promovendo la formazione di sfingomielina e di diacilglicerolo (DAG) (Ullman *et al.*, 1974). L'attività di questo enzima è stata rilevata nel reticolo endoplasmico, nell'apparato di Golgi e nella membrana plasmatica. Negli epatociti, l'enzima è localizzato soprattutto nella parte *cis* e *mediale* del Golgi (Futerman *et al.*, 1998) a livello della superficie luminale (Jeckel *et al.*, 1992). L'enzima possiede l'unica caratteristica peculiare di regolare simultaneamente i livelli dei messaggeri lipidici ceramide e DAG, sebbene in maniera inversa.

❖ *Ceramide chinasi*

Ci sono diversi riferimenti che suggeriscono la presenza della ceramide-1-fosfato. Questa molecola sembra essere il risultato della fosforilazione della ceramide da parte dell'enzima ceramide chinasi. Una forma di enzima Ca^{2+} -dipendente è stata riportata essere presente nelle frazioni mitocondriali ottenute da cellule HL-60 e si ritiene che nelle vescicole sinaptiche possa regolare il rilascio di neurotrasmettitore (Kolesnick *et al.*, 1990).

❖ *Glucosilceramide sintetasi (GCS)*

Il primo passaggio nelle sintesi dei glicosfingolipidi è catalizzato dalla glucosilceramide sintetasi che usa ceramide e UDP-glucosio come substrati ed è localizzata sulla superficie citosolica del Golgi (Jeckel *et al.*, 1992). Le diverse classi di glicosfingolipidi, sintetizzati a partire da glucosilceramide, sono presumibilmente coinvolte nella formazione di metastasi tumorali (Inokuchi *et al.*, 1990) e nell'apoptosi (De Maria *et al.*, 1997). L'inibizione dell'attività di GCS in vivo è stata quindi valutata come un possibile trattamento di diverse patologie indotte da immagazzinamento di sfingolipidi (SLSD) e di alcuni tipi di tumori.

❖ *Ceramidasi*

La ceramidasi cliva la ceramide a livello del legame ammidico dando origine ad una molecola di sfingosina e ad un acido grasso libero. Una forma dell'enzima con attività

ottimale a pH acido è localizzata nei lisosomi e la sua carenza comporta l'insorgere della patologia di Farber (Sugita *et al.*, 1972). Una forma alcalina dell'enzima è stata identificata mediante l'impiego di un analogo della ceramide, il D-eritro-2-(N-miristoilamino)-1-fenil-1-propanolo (d-MAPP) (Bielaswka *et al.*, 1996). Cellule HL-60 trattate con tale inibitore hanno rilevato un incremento dei livelli endogeni di ceramide con una conseguente soppressione della crescita ed arresto del ciclo cellulare. La sfingosina prodotta dall'azione della ceramidasi è più comunemente metabolizzata nelle cellule dalla sfingosina chinasi a sfingosina-1-fosfato, un potente mitogeno. La sfingosina-1-fosfato può revertire gli effetti apoptotici della ceramide e si è pensato che la sua azione si svolga prima dell'attivazione caspatica. Questo ha fatto ritenere che il rapporto tra la sfingosina-1-fosfato e la ceramide sia un fattore critico nel determinare il destino cellulare (Cuvillier *et al.*, 1996). La ceramidasi, così come la sfingomielina sintetasi, ha l'unica peculiare caratteristica di catabolizzare un messaggero lipidico per produrne un altro con funzione opposta. Entrambi gli enzimi, pertanto, rappresentano interessanti siti per interventi terapeutici per contrastare patologie indotte da accumuli di sostanze lipidiche con funzioni biologiche opposte (Cuvillier *et al.*, 1996; Obeid *et al.*, 1993; Jarvis *et al.*, 1994).

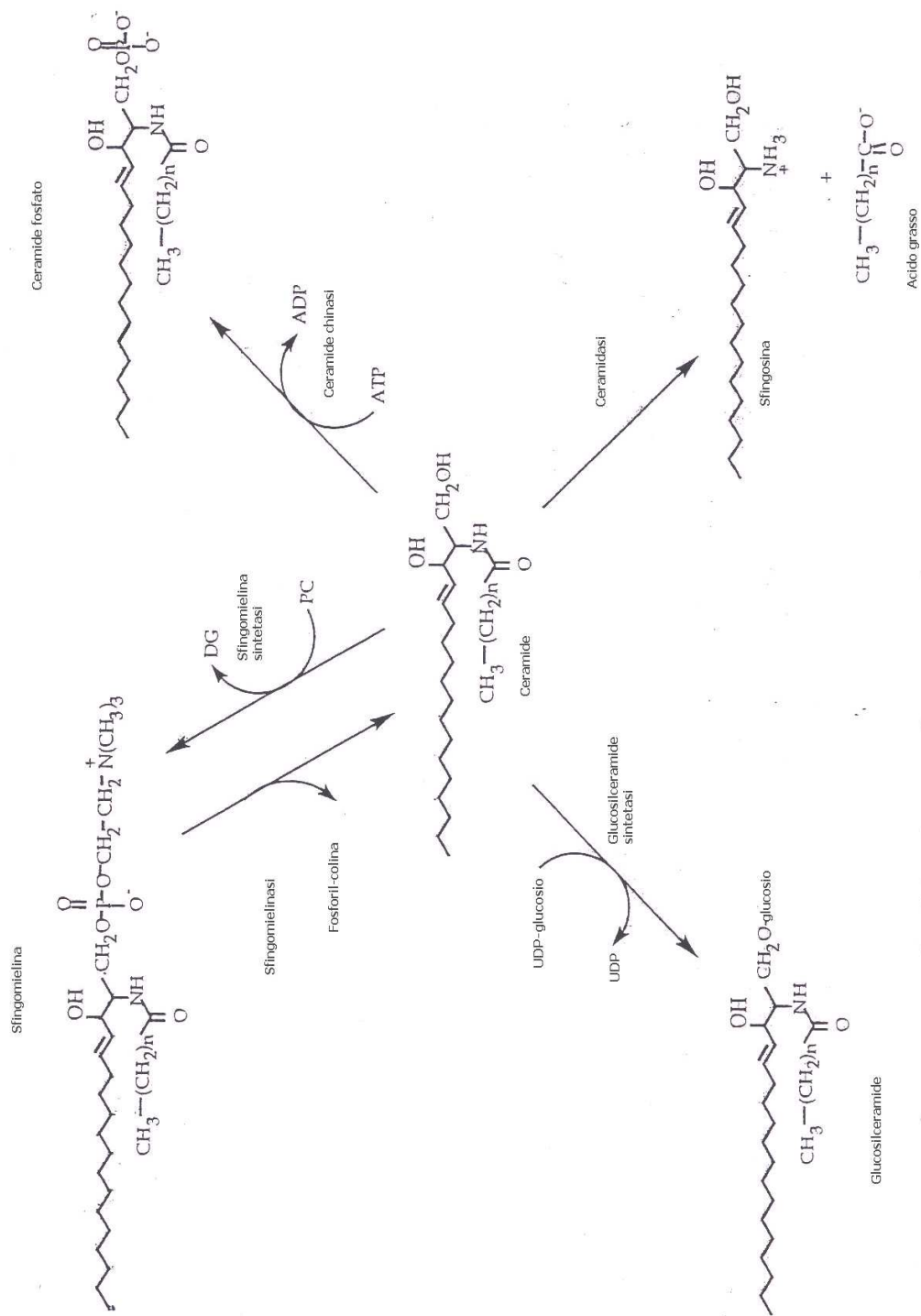


Fig. 16. Schema dei processi metabolici della ceramide.

Ciclo della sfingomieline

Il ciclo della sfingomieline porta alla formazione di sostanze quali ceramide, ceramide 1-fosfato, sfingosina e sfingosina 1-fosfato; si pensa che i livelli quantitativi di tali metaboliti nella cellula, determinino un equilibrio dinamico tra l'apoptosi e la crescita cellulare.

Il primo enzima coinvolto nel catabolismo di tali lipidi, come visto, è la sfingomielinasi; tale enzima può essere attivato da diversi fattori tra cui Fas, TNF- α , agenti chemioterapici o deprivazione di siero. Studi condotti sulla funzione svolta dal recettore TNF- α hanno suggerito un modello teorico che cerca di chiarire come sfingomielinasi differenti possano agire tramite la sintesi di ceramide in varie vie intracellulari (Wiegman et al., 1994). Tali studi hanno dimostrato come sia la ceramide alla base di entrambi i segnali intracellulari indotti dal TNF- α : pro-infiammatorio e apoptotico. Con l'uso di una forma mutata del dominio citoplasmatico del recettore TNF-R1 (TNF-R55) si è dimostrato che ci sono porzioni specifiche del dominio che promuovono l'attivazione distinta delle diverse forme di sfingomielinasi. In particolare la regione del dominio costituita dalla sequenza amminoacidica dalla posizione 310 alla 318 è necessaria e sufficiente per l'attivazione della forma enzimatica neutra. Tale regione è stata chiamata NSD: "*N-Smase-activation-domain*". L'attivazione della sfingomielinasi acida è indotta invece da una regione carbossi-terminale contenente un dominio denominato "*Death Domain*" in grado di legare una proteina adattatrice di nome TRADD. Questa proteina, dopo il legame con il dominio specifico, recluta altre tre proteine: TRAF2, FADD, RIP. In particolare FADD induce il fenomeno apoptotico intracellulare attraverso l'attivazione di caspasi 8 (Hsu et al., 1996).

Le sfingomielinasi sono, inoltre, regolate negativamente dai livelli di glutazione (GSH). Il glutatione è un tripeptide ed è la più piccola ed abbondante molecola non proteica dotata di gruppi tiolici presente nelle cellule di animali. Svolge un ruolo critico nella difesa cellulare verso vari stress, neutralizzando la formazione di radicali liberi ed elementi citotossici quali agenti alchilanti.

L'attività dell'enzima N-Smase viene ripristinata pienamente dopo l'eliminazione del glutatione ad indicare che è un'inibizione di tipo reversibile. Da studi più approfonditi si è potuto determinare che la struttura fondamentale per l'inibizione è il complesso γ -Glutamyl-Cisteina e che il glutatione potrebbe agire come un modulatore allosterico specifico per la forma enzimatica neutra. La modulazione dell'enzima provoca inibizione della sintesi di

ceramide promuovendo alterazioni a livello di fenomeni quali la morte apoptotica e il differenziamento.

La sfingosina è un inibitore endogeno della protein chinasi c ed è in grado di regolare una varietà di enzimi coinvolti nella trasmissione del segnale cellulare. E' responsabile della mobilizzazione del Ca^{2+} a livello intracellulare e dell'apertura di specifici canali Ca^{2+} -dipendenti. La sfingosina influenza la sintesi di DNA e interagisce con il DNA stesso a livello del *binding-site* istonico, nonché tramite alcuni fattori di trascrizione.

Lo studio di questi secondi messaggeri è stato recentemente ampliato data l'importanza che gli sfingolipidi di membrana ricoprono nei domini di membrana a più alta densità recettoriale. Si è, infatti, osservato che i componenti lipidici di membrana in vicinanza del recettore per il TNF e Fas-L, hanno un ruolo fondamentale nella trasmissione del segnale apoptotico dalla membrana cellulare al nucleo. I fosfolipidi sono una fonte di secondi messaggeri coinvolti nella regolazione degli enzimi apoptotici, come la protein chinasi c, le fosfatasi e le proteasi. Questi enzimi lipolitici vengono immediatamente reclutati in seguito a stimolazione con TNF- α e Fas-L, tuttavia, solo i metaboliti del ciclo della sfingomieline (ceramide e sfingosina), manifestano una pronunciata attività pro-apoptotica a differenza dei prodotti dell'idrolisi enzimatica di altri fosfolipidi, che si dimostrano non citotossici.

Nonostante l'evidenza del possibile coinvolgimento della ceramide nel processo apoptotico, resta ancora poco chiaro il suo ruolo di mediatore di morte. Si pensava inizialmente che fosse riconducibile all'accumulo di ceramide nella cellula, ovvero che l'attivazione del ciclo della sfingomieline fosse pro apoptotico in questo senso. Studi recenti hanno invece evidenziato come non sia il solo accumulo di ceramide a promuovere l'apoptosi ma anche l'accumulo di sfingosina: nel topo, ad esempio, la singola somministrazione di TNF- α si traduce in un accumulo di ceramide e sfingosina a livello epatico, che precede il processo di morte cellulare (Alessenko, 1998).

In aggiunta alla protein chinasi c, l'attivazione dell'apoptosi da parte della sfingosina, sembra dipendere significativamente dalla defosforilazione del gene Rb (retinoblastoma). In dettaglio la defosforilazione di questa proteina rappresenta un forte segnale di blocco proliferativo (G_1/S), che in alcuni casi precede la morte apoptotica (Alessenko, 1997).

Un ruolo altresì importante è ricoperto dalla fosforilazione della sfingosina a dare sfingosina 1-fosfato (SPP) ad opera della sfingosina fosfato chinasi (SPHK). SPP è un secondo messaggero di natura lipidica avente duplice funzione: a livello intracellulare

regola la proliferazione e la sopravvivenza cellulare, a livello extracellulare è il ligando per il recettore Edg-1 (*endothelial-derived receptor-1*) accoppiato alla proteina G. La SPP si forma nella cellula in risposta a stimoli diversi tra i quali i fattori di crescita, le citochine e i complessi antigene-anticorpo; all'interno della cellula è responsabile di diverse funzioni biologiche che coinvolgono il destino della cellula, dal differenziamento alla mitosi. La conversione della sfingosina a sfingosina-1-fosfato indirizza la cellula verso uno stato proliferativo, nonostante il precursore a monte sia la ceramide che è invece pro-apoptotico. L'equilibrio tra la concentrazione intracellulare di ceramide e quella della SPP determina comportamenti opposti della cellula: ceramide è responsabile di morte cellulare mentre SPP promuove la sopravvivenza cellulare (Fig. 17)

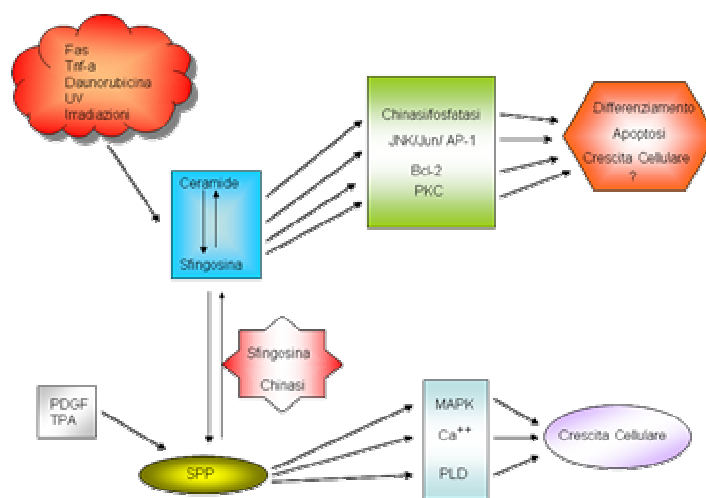


Fig. 17: Relazione tra ceramide e SPP.

Recentemente è stato dimostrato come il programma di morte attivato da ceramide venga meno in seguito ad un aumento della concentrazione di sfingosina-1-fosfato; questa teoria è avvalorata anche da studi che hanno dimostrato come diversi stimoli vadano ad alterare il rapporto ceramide/SPP. Ad esempio, le citochine come TNF- α e IL-1 β attivano le sfingomielinasi ma non le ceramidasi, favorendo così un aumento della concentrazione di ceramide intracellulare. In contrasto, la stimolazione con agonisti di sfingosina chinasi protegge da apoptosi andando ad aumentare la reazione di sintesi della sfingosina a SPP. Alti livelli di SPP sono responsabili della risposta proliferativa della cellula in quanto promuovono il passaggio dalla fase G₁ alla fase S del ciclo cellulare, dato confermato dalla

localizzazione di SPP, ugualmente espressa sia a livello di membrana sia a livello nucleare (Olivera et al., 1999).

Diversamente, ceramide e sfingosina si trovano principalmente localizzate a livello di membrana.

La potenziale azione intracellulare della SPP sarebbe quella di antagonizzare l'apoptosi, è stata recentemente affiancata all'interazione tra la sfingosina-1-fosfato e i recettori EDG-5, EDG-3, EDG-1 accoppiati a proteine G.

Si pensa infatti che questo legame possa in qualche modo potenziare l'azione intrinseca della sfingosina-1-fosfato; a questo proposito si è osservato come la deidro-SPP pur legandosi allo stesso recettore non abbia azione protettiva nei confronti della cellula, altresì, la SPP fosfonata e non idrolizzabile mima gli effetti della SPP sulla proliferazione e sopravvivenza cellulare ma non ha affinità per i recettori EDG (Olivera et Spiegel, 2001).

L'enzima che catalizza la trasformazione della sfingosina in sfingosina-1-fosfato è SPHK che va a fosforilare specificamente la D-eritro-sfingosina ma non la ceramide. E' quindi facilmente intuibile che l'attività della sfingosina-1-fosfato sia dettata dai livelli di questo enzima. La SPHK è espressa ubiquitariamente nell'organismo, con qualche differenza tra il bambino e l'adulto.

E' stata recentemente dimostrata l'esistenza di due isoforme dell'enzima, una a livello di membrana e una citoplasmatica (Stoffel et al., 1973); studi di immunocitochimica hanno tuttavia determinato che la SPHK ha una distribuzione citosolica molto diffusa il che fa supporre che l'attività dell'enzima sia predominante a questo livello. Si è osservato come, somministrando SPHK esogena, non solo aumenti il livello di SPP intracellulare, ma conseguentemente la porzione di cellule nella fase S del ciclo cellulare. Per meglio chiarire la possibilità che la famiglia dei recettori EDG per la SPP sia coinvolta nella risposta proliferativa indotta dalla somministrazione di SPHK, sono stati trattati alcuni fibroblasti con la tossina della pertosse, in quanto questi recettori sono sensibili a tale stimolo (Lee et al., 1998). In contrasto con molti responsi biologici, incluso l'effetto mitogeno della somministrazione di SPP, abitualmente inibita dalla tossina della pertosse (Goodemote et al., 1995), non si è manifestata cessazione dell'aumento della sintesi di DNA indotta dall'espressione di sfingosina chinasi, suggerendo che tale enzima funzioni indipendentemente dalle proteine G (Olivera et al., 1999).

Diversi stimoli possono attivare la sfingosina chinasi favorendo quindi l'aumento intracellulare di SPP. Sicuramente un ruolo predominante è ricoperto da fattori quali PDGF, EGF, TNF- α , acetilcolina e altri agonisti recettoriali accoppiati a proteine G.

Il meccanismo tramite cui si ha attivazione di tale enzima da parte di stimoli diversi, resta tuttavia poco chiaro; in certi tipi cellulari si è visto come un aumento della concentrazione intracellulare di cAMP o l'attivazione della proteina chinasi C, possa essere coinvolto nell'attivazione di tale enzima. Si è dimostrato come la stimolazione dell'enzima indotta da Fc γ RI sia mediata da attivazioni a cascata di tirosine chinasi e fosfolipasi D. A tale proposito, studi condotti sulla stimolazione di sfingosina chinasi da parte PDGF utilizzando recettori *wild-type* o *mutant* PDGF γ , hanno stabilito come la fosforilazione di particolari residui tirosinici sia responsabile dei livelli di SPHK; i recettori utilizzati in tale esperimento vengono trattati in due modi diversi: o privati di specifici residui tirosinici di cui si conosce il *pathway*, o ingegnerizzati in modo da accoppiarsi a valle del segnale a particolari molecole come la fosfolipasi C- γ , il fosfatidilinositolo 3-chinasi, RasGAP, o le tirosine fosfatasi come SHP-2. La fosforilazione del residuo tirosinico del recettore responsabile del legame con PLC- γ (tirosina-1021), è necessaria e sufficiente per indurre l'attivazione di sfingosina chinasi ad opera di PDGF.

Negli stessi studi si è potuto constatare come l'attivazione di SPHK dipenda da una proteina chinasi C responsabile dell'immobilizzazione del Ca²⁺ intracellulare; si è notato infatti, attraverso studi cromatografici, come estratti di sfingosina chinasi di ratto fossero altamente affini a resine contenenti calmodulina in presenza di ione Ca²⁺, suggerendo che la sfingosina chinasi potrebbe essere modulata dal complesso Ca²⁺-calmodulina (Olivera, Spiegel 2001).

La consapevolezza che la concentrazione intracellulare di SPP sia dettata principalmente dall'azione della sfingosina chinasi, ha favorito negli ultimi anni la ricerca di molecole in grado di inibire selettivamente l'enzima. Studi recenti hanno dimostrato come la somministrazione a cellule di carcinoma di Lewis di N-acetil sfingosina (C₂-ceramide) prima del trattamento con radiazioni- γ , porti ad un accumulo significativo nella cellula della ceramide. Tale accumulo può essere mantenuto dopo l'irradiazione grazie alla somministrazione di N,N-dimetilsfingosina (DMS), un inibitore competitivo della sfingosina chinasi; in questo modo l'inibizione dell'enzima diminuisce drasticamente i livelli di SPP portando la cellula verso la morte apoptotica causata dall'accumulo di ceramide (Park et al., 2004) (Fig. 18).

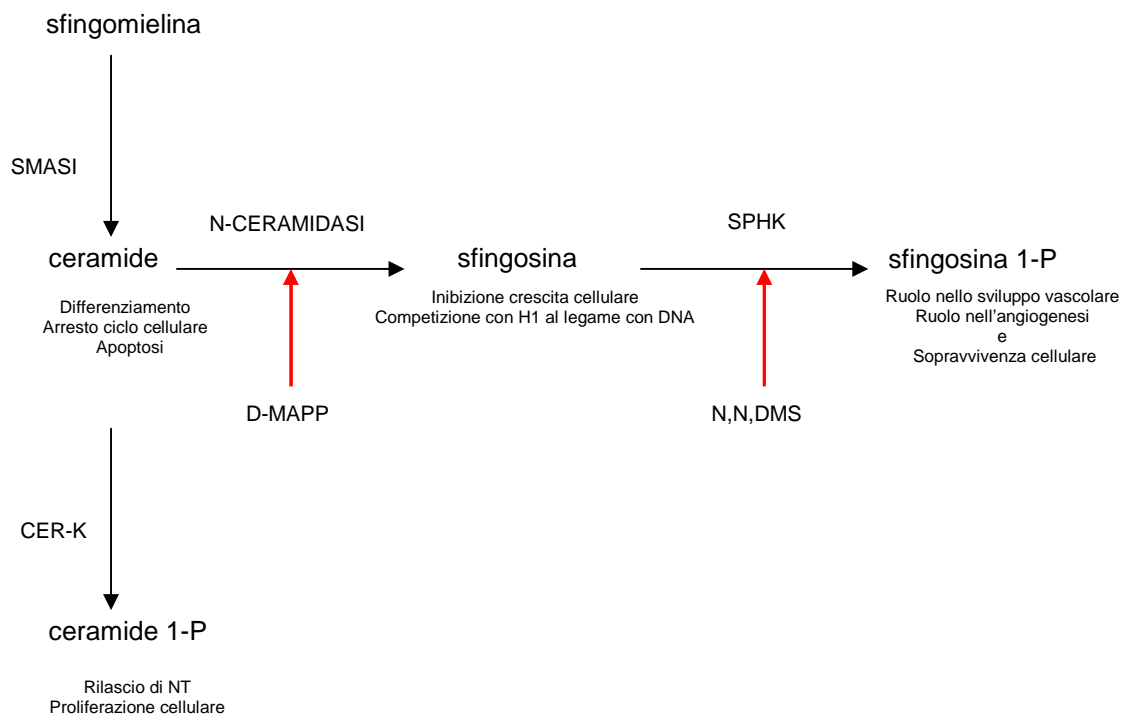


Fig. 18: Catabolismo di ceramide e metaboliti coinvolti

Oltre alla sfingosina e alla sfingosina chinasi il metabolismo della ceramide porta all'attivazione di un altro metabolita, la ceramide1-fosfato (C-1-P) ad opera della ceramide chinasi (CERK). La ceramide1-fosfato è un metabolita di natura sfingolipidica largamente espresso a livello di membrana. Può essere formata da diversi stimoli: a livello dei neutrofili, in seguito alla somministrazione di C₆-ceramide, oppure dalla sfingosina prodotta dal catabolismo dei gangliosidi, in cellule di carcinoma del polmone dopo somministrazione con interleuchina 1-β (Pettus et al., 2003).

Recentemente si è cercato di capire se C-1-P avesse un ruolo nella morte cellulare; si è dimostrato come blocchi il processo apoptotico a livello del midollo spinale in macrofagi incubati in assenza dei fattori per la stimolazione dei macrofagi stessi, condizione che è per eccellenza pro-apoptotica (Gomez Munoz et al., 2004). Infatti la C-1-P blocca sia la frammentazione del DNA, sia la cascata di eventi mediata dalle caspasi, suggerendo che la sua azione proliferativa sia legata all'inibizione apoptotica; a questo proposito, un'osservazione chiave è stata che C-1-P bloccasse completamente le SMase

in macrofagi intatti prevenendo l'accumulo di ceramide e promovendo la sopravvivenza cellulare (Gomez Muñoz et al., 2004). Tali osservazioni supportano la teoria che l'azione di C-1-P non sia mediata da alcuna interazione con recettori. Inoltre l'apoptosi è associata ad un sostanziale decremento dei livelli di C-1-P, associata al contemporaneo aumento di attività della SMase acida. Questo risulterebbe rilevante in quanto la C-1-P potrebbe rappresentare un inibitore fisiologico della sfingomielinasi acida, mantenendone i livelli di attivazione al di sotto di quelli basali.

Alcuni studi hanno dimostrato come a livello delle vescicole sinaptiche si abbia rilascio di C-1-P mediato da meccanismi calcio-dipendenti (Bajjalieh et al., 1989). Ciò suggerisce che la generazione di ceramide 1-fosfato possa giocare un ruolo fondamentale nella regolazione del rilascio di alcuni neurotrasmettitori in quanto andrebbe ad aumentare la sensibilità e le interazioni membrana-membrana.

La ceramide 1-fosfato è stata anche oggetto di studio in quanto si è dimostrato avere effetti mitogeni; infatti l'aggiunta di C-1-P esogena ed endogena a fibroblasti promuove la sintesi di DNA (Gomez Muñoz et al., 1995, Gomez Muñoz et al., 1997). Oltre a partecipare a processi mitogeni e alla divisione cellulare, si è visto come tale molecola partecipi nel processo infiammatorio; la C-1-P ha dimostrato essere un induttore specifico e altrettanto potente dell'acido arachidonico (AA), mediatore cardine nel processo infiammatorio (Pettus et al., 2003). Nonostante sia una molecola dalle molteplici attività, non si conosce altrettanto bene l'attività dell'enzima responsabile della sua sintesi ovvero della ceramide chinasi (CERK).

Questo enzima agisce più efficacemente a pH neutro, compreso tra 6 e 8, con un comportamento ottimale a pH 6.5 e con un crollo drastico di azione a pH più acidi. Tale dipendenza dal pH è stata oggetto di studio su linee cellulari come le HL-60, mettendo in evidenza una certa similitudine tra tali cellule e l'attività ceramide-fosforilativa dei leucociti (Kolesnick et al., 1990, Hinkovska et al., 1998). Si è notato come sia nel cervello, sia a livello leucocitario, l'attività della ceramide chinasi sia calcio-dipendente (Bajjalieh et al. 1989, Hinkovska et al., 1998).

Analisi di *Northern Blotting* hanno stabilito come l'espressione a livello dell'mRNA di CERK sia predominante nel cervello, a livello cardiaco e del muscolo scheletrico ed epatico.

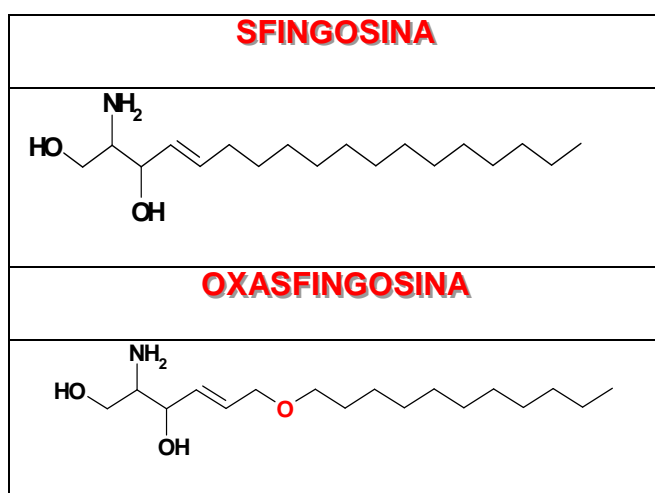
Alcuni ricercatori hanno dimostrato come non solo questo enzima possa attivare la C-1-P con meccanismi ATP-dipendenti, ma analisi filogenetiche hanno stabilito come CERK

appartenga ad una classe nuova di chinasi lipidiche che è fortemente diversa dalla sfingosina chinasi e dal diacilglicerolo chinasi (Sugiura et al., 2002). Infatti, studi condotti su cellule della linea HL-60 hanno dimostrato come l'attività di CERK sia funzionalmente diversa da quella del diacilglicerolo chinasi (Kolesnick et al., 1990); in queste cellule tutta la ceramide 1-fosfato presente deriva dal metabolismo della sfingomieline e non da quello degli glicosfingolipidi (Dressler et al., 1990).

Analoghi strutturali

Nonostante il ruolo della ceramide come componente delle membrane cellulari e come secondo messaggero sia stato oggetto di studio negli ultimi anni, non si conosce molto circa le interazioni chimiche alla base della sua attività. Studi recenti hanno evidenziato come alcuni sostituenti siano necessari per le sue funzioni come gli atomi di carbonio dalla posizione 1 alla 5 appartenenti al residuo di sfingosina, i due gruppi ossidrilici in posizione 1 e 3, il gruppo amminico di legame tra le due subunità strutturali e la stereochimica del doppio legame in posizione 4-5 di tipo trans. E' noto come variazioni nella struttura possano portare ad un crollo dell'attività o ad un aumento della tossicità della molecola come ad esempio l'idrogenazione del doppio legame.

Per meglio valutare l'attività di ceramide sono stati sintetizzati presso il Laboratorio di Chimica Organica dell'università di Zurigo dallo *staff* del Prof. Vasella, degli analoghi strutturali che hanno permesso di valutare le relazioni struttura-attività della molecola. In particolare: l'oxaceramide che presenta un ossigeno a ponte sulla catena tra gli atomi di carbonio 6 e 7, l'oxasfingosina con un atomo di ossigeno a ponte tra gli atomi di carbonio 6 e 7 della sfingosina, la tio-ceramide con un atomo di zolfo al posto dell'ossigeno amidico ed un ossigeno a ponte sulla catena, l'N-metil ceramide con un raggruppamento metilico legato all'azoto amidico ed un atomo di ossigeno a ponte sulla catena (Fig. 19).



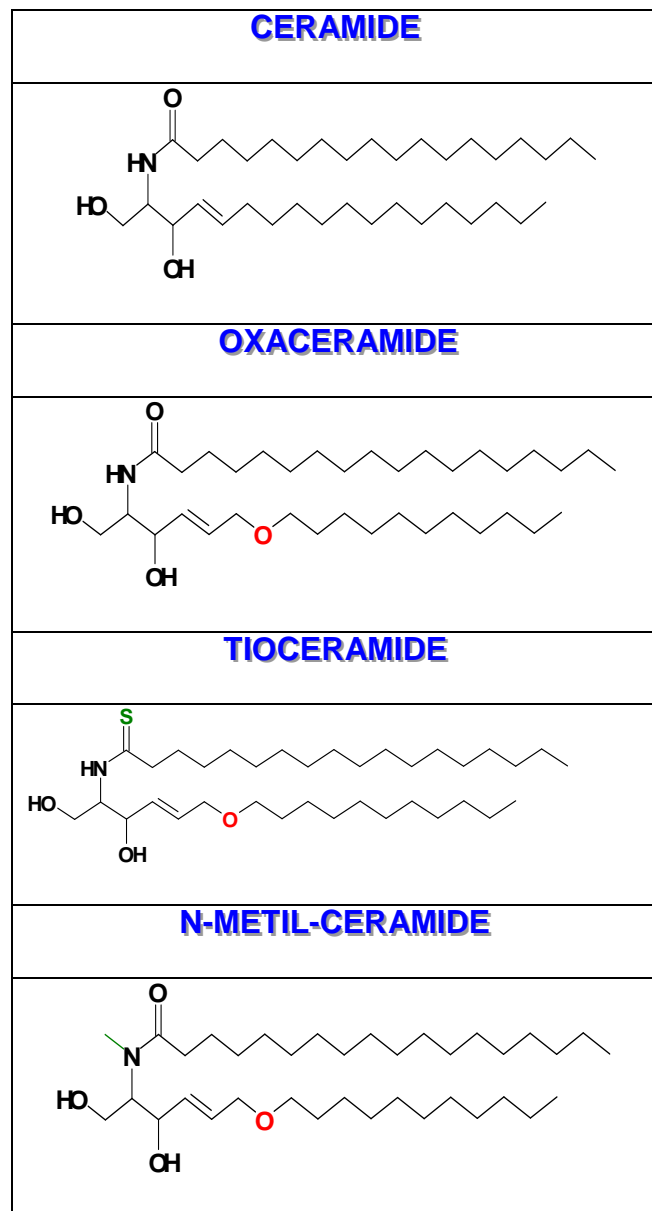


Fig.19 Analoghi strutturali utilizzati in questo lavoro.

Con queste molecole abbiamo condotto esperimenti in parallelo per meglio valutare la differenza di attività con ceramide e sfingosina, al fine di capire se si poteva potenziarne o annullarne l'azione con delle semplici alterazioni della struttura. I ricercatori che hanno strutturato gli analoghi hanno cercato di non variare le caratteristiche di ceramide in termini di polarità e pH, apportando semplicemente delle sostituzioni in grado di determinare se l'attività dipendesse prettamente dalla natura del sostituente o meno. Tutti gli analoghi sintetizzati presentano sulla catena alchilica un atomo di ossigeno a ponte tra tra gli atomi di carbonio 6 e 7 andando a conferire rigidità alla struttura; in questo modo potremmo valutare in termini di ingombro sterico l'interazione tra l'analogo e il substrato. Si pensa

infatti che ceramide vada ad alloggiarsi in particolari tasche proteiche e che quindi la catena alchilica sia in grado di muoversi per meglio accomodarsi in tali siti. Se così fosse, l'irrigidimento della struttura dovrebbe avere conseguenze sull'attività di ceramide. Questa ipotesi è verificabile con l'uso di oxaceramide e oxasfingosina che presentano come unica modificazione della struttura l'ossigeno a ponte sulla catena.

Come detto in precedenza, la ceramide è un residuo di sfingosina a cui è legato un acido grasso tramite N-acetilazione; ci siamo proposti di valutare l'importanza di questo legame andandolo a metilare (N-metil ceramide). Questa modificazione nasce dalla consapevolezza che l'ossidrile sull'atomo di carbonio 1 (in alfa all'azoto) è passibile di fosforilazioni atte a silenziare l'attività di ceramide, quindi la presenza del metile potrebbe, a nostro avviso, interagire allostericamente con il sito di fosforilazione rendendo tale reazione inefficace.

Per quanto riguarda la tio-ceramide è stata fatta un'altra ipotesi: sappiamo che l'attività di ceramide è legata agli atomi di carbonio tra l'uno e il cinque, tuttavia ci siamo chiesti se e come potesse cambiare l'attività della molecola andando a sostituire l'ossigeno con un atomo di zolfo. Tale modificazione conferisce un cambiamento alla molecola in termini di reattività: lo zolfo è molto meno elettronegativo dell'ossigeno, questo significa che non è un buon accettore di legami a idrogeno, questa caratteristica potrebbe quindi rivelarsi significativa e indirizzare l'attività della molecola verso altri *target* biologici.

I segnali di calcio

Il Ca^{2+} è uno tra i più importanti regolatori di numerosi processi cellulari tra i quali la fertilizzazione, la proliferazione, lo sviluppo, l'apoptosi e l'attivazione di fattori di trascrizione sia a livello citoplasmatico che nucleare (Carafoli, 1999; Clapman, 1995).

L'efficienza di questo secondo messaggero come trasduttore di informazioni è regolata da una accurata compartimentalizzazione spazio/temporale del Ca^{2+} stesso a livello cellulare (Berridge, 1997; Berridge and Dupont, 1994; Carafoli, 1999; Clapman 1995).

Il Ca^{2+} ha una concentrazione elevata (μM) sia all'esterno, sia all'interno di alcuni organuli cellulari come il reticolo sarcoendoplasmatico (ER/SR), che funge da vero e proprio deposito di riserva per questo ione (Pozzan *et al.*, 1994). Al contrario la sua concentrazione a livello del citoplasma è bassa (nM). La velocità con la quale i livelli citoplasmatici di Ca^{2+} possono essere innalzati in risposta ad appropriati segnali cellulari, fa in modo che questo ione sia universalmente usato come un efficiente secondo messaggero.

Mentre il rilascio citoplasmatico di Ca^{2+} è un processo che utilizza gradienti favorevoli, l'estrusione del Ca^{2+} dal citosol comporta l'impiego di una fonte di energia (Carafoli, 1999). Le pompe responsabili dell'omeostasi del Ca^{2+} sono principalmente le ATPasi del reticolo sarcoendoplasmatico (SERCA) che accumula ioni Ca^{2+} all'interno del ER/SR e la ATPasi della membrana plasmatica (PMCA) la quale invece trasporta ioni Ca^{2+} attraverso la membrana plasmatica. Tuttavia giocano un importante ruolo nel controllo dei livelli fisiologici di questo ione, anche scambiatori di Ca^{2+} quali la pompa $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e proteine capaci di legare Ca^{2+} ad esempio la calmodulina (Celio, 1996).

E' ormai ben noto in letteratura che le caratteristiche spazio-temporali di rilascio del calcio insieme con l'amplitudine e la durata di tale rilascio, sono in grado di attivare specifici meccanismi, i quali andranno a loro volta ad attivare selettivamente specifici bersagli.

Questi equilibri sono finemente regolati da una serie di eventi che iniziano, propagano e terminano i segnali di calcio. Il controllo spaziale è ottenuto mediante l'attivazione di meccanismi localizzati in ben determinate aree cellulari e mediante l'impiego di depositi intracellulari di calcio presenti in prossimità della zona bersaglio.

Numerosi esempi possono essere fatti per spiegare tale concetto: le cellule acidari pancreatiche sono cellule polarizzate con un dominio apicale ed uno basolaterale. Un aumento della concentrazione di calcio in prossimità della zona apicale, stimola la fusione

dei granuli secretori con la membrana plasmatici, dando il via al processo di esocitosi (Petersen *et al.* 1999).

Un altro modello cellulare nel quale segnali localizzati di calcio svolgono un ruolo determinante sono le cellule muscolari lisce. Il Ca^{2+} può attivare la contrazione del muscolo liscio, ma può anche inibirla mediante una iperpolarizzazione del sarcolemma (Jaggar and Nelson, 2000). La differenza degli effetti esercitati dal Ca^{2+} nel muscolo liscio sono essenzialmente determinati dalle proprietà spaziali di tali segnali: risposte globali inducono vasocostrizione attraverso l'attivazione di enzimi Ca^{2+} /calmodulina dipendenti, mentre aumenti di Ca^{2+} subsarcolemmali localizzati promuovono vasodilatazione mediante l'attivazione di canali ionici della membrana plasmatici (Nelson *et al.*, 1995).

Sebbene innalzamenti nella concentrazione di calcio siano necessari affinché tale ione possa funzionare come messaggero, elevate concentrazioni intracellulari di Ca^{2+} troppo prolungate nel tempo possono essere letali. Le cellule impiegano segnali di Ca^{2+} a bassa amplitudine o più spesso, i segnali vengono rilasciati come brevi transienti. Questo principio è applicato sia ai segnali localizzati che a quelli globali. Transienti singoli sono usati per attivare un certo tipo di processi cellulari, quali ad esempio la secrezione o la contrazione muscolare. Tuttavia per fenomeni che hanno una durata più prolungata nel tempo, ad esempio la fertilizzazione o la divisione cellulare, le cellule usano segnali periodicamente ripetuti, noti come oscillazioni. Informazioni diverse possono anche essere codificate in base all'amplitudine dei segnali di Ca^{2+} . E' infatti stato dimostrato che le cellule sono in grado di interpretare modesti cambiamenti nei livelli di Ca^{2+} . Ad esempio, differenti geni possono essere attivati dalla variazione dell'amplitudine dei segnali di Ca^{2+} (Dolmetsch *et al.*, 1997).

Come precedentemente accennato, le fonti di Ca^{2+} usate dalla cellula possono essere sia intra che extra cellulari. I sistemi che regolano il rilascio di Ca^{2+} dalla membrana plasmatici sono numerosi e vengono regolati da molteplici meccanismi. Infatti la membrana plasmatici della maggior parte delle cellule animali ha almeno un tipo di sistema che facilita l'influsso di Ca^{2+} dall'esterno al compartimento citoplasmatico e diversi tipi di trasportatori che muovono il Ca^{2+} dal citoplasma allo spazio extracellulare.

I canali della membrana plasmatica

L'influsso di calcio all'interno della cellula può essere schematizzato in due processi generali.

Ci sono influssi di calcio indipendenti dagli stimoli esterni, e influssi che vengono invece attivati da segnali esterni. L'influsso di calcio in risposta a stimoli extracellulari è facilitato da numerosi canali del calcio, quali ad esempio i canali voltaggio dipendenti (VOCCs), i sistemi attivati da recettore (RACCs), i SOCs (store-operated channels) e gli SMOC (second-messenger operated Ca^{2+} channel).

I VOCCs sono canali presenti in quasi tutti i tipi cellulari elettricamente eccitabili e una volta aperti, rimangono in tale stato per un breve periodo di tempo (nell'ordine dei microsecondi) prima di richiudersi come risultato di un meccanismo di inattivazione. I VOCCs sono stati classificati in sei tipi (T, L, N, P, Q, R) in base alle loro caratteristiche biofisiche e alla loro sensibilità ad alcune sostanze e tossine (Birnbaumer *et al.*, 1994). Tutti questi canali con l'eccezione dei canali di tipo T richiedono una ampia depolarizzazione per essere aperti (≥ -30 mV) e pertanto vengono classificati come "canali attivati da alto voltaggio" (HVA); i canali di tipo T, attivati da voltaggi ≥ -60 mV, vengono definiti come "canali attivati da basso voltaggio" (LVA). Studi molecolari hanno mostrato che i VOCCs fanno parte di un'unica famiglia di proteine e che sono strutturalmente simili tra loro. La subunità principale è stata comunemente identificata in una proteina "formante il canale" α_1 ; al momento sono state identificate dieci varianti di tale proteina e numerose varianti di splicing. Questa diversità molecolare tra le subunità α_1 si pensa sia alla base delle differenze biofisiche e farmacologiche osservate tra i vari tipi di canale. La subunità α_1 di per sé funzionale, è solitamente associata e modulata dalla subunità β e dalla subunità $\alpha_2\text{-}\delta$ che hanno funzioni ausiliarie (Birnbaumer *et al.*, 1998). Le caratteristiche principali dei vari tipi di canali sono brevemente schematizzate in figura 20.

TIPO DI CANALE	DISTRIBUZIONE TISSUTALE	INIBITORI
Tipo L	Muscolo scheletrico, cuore, neuroni	DHPs, diltiazem, verapamil
Tipo N	Neuroni	ω -CTx-GVIA Insensibile DHPs
Tipo P	Neuroni, rene, cuore	ω -Aga-IVA Insensibile DHPs
Tipo T	Neuroni, cuore	Amiloride, Flunarizine
Tipo Q	Neuroni, rene	ω -Aga-IVA Insensibile DHPs
Tipo R	Neuroni, cuore	Basse concentrazioni di Ni ²⁺ Insensibile DHPs

Figura 20. Le principali caratteristiche dei canali VOCCs.

Abbreviazioni: DHPs 1,4 diidropiridine; ω -CTx-GVIA: ω -conotossina isolata dalla lumaca di mare *Conus goeographus*; ω -Aga-IVA: ω -Agatossina isolata dal ragno *Agelopsis aperta*.

Un'altra importante classe di canali della membrana plasmatica sono i RACCs; tali canali sono presenti sia in cellule eccitabili che non eccitabili (Putney and Bird, 1993; Berridge, 1995; Fasolato *et al.* 1994). Ci sono numerosi sottotipi di RACCs che si differenziano in base alla selettività per alcuni cationi, al meccanismo di apertura del canale e alla loro funzione fisiologica. La Ca²⁺ selettività dei RACCs è una caratteristica variabile, tant'è vero che ci sono canali che consentono unicamente l'ingresso di Ca²⁺ all'interno del citosol, e canali che invece consentono di attraversare la membrana plasmatici non solo al Ca²⁺, ma anche ad altri cationi, quali ad esempio Na²⁺, Mn²⁺, Ba²⁺, Sr²⁺ (Hallam and Rink, 1985; Kwan and Putney, 1990); questi ultimi canali prendono il nome di "canali per cationi non specifici" (LGCCs). L'impiego di alcuni cationi bivalenti bloccanti l'influsso di Ca²⁺ quali Ni²⁺, Zn²⁺ e Gd²⁺ e trivalenti, ha consentito di individuare e classificare i diversi sottotipi di RACCs tutt'ora noti.

Un importante canale nella categoria dei RACCs è il recettore del NMDA, un sottotipo di recettore del glutammato che ha una struttura eterooligomeric formante un largo poro cationico non selettivo, il quale si apre in conseguenza del legame del legame di

glutammato e glicina (Mayer *et al.*, 1992; Mori and Mishina, 1995). I recettori dell'NMDA, sono importanti canali ionici post-sinaptici che mediano la trasmissione eccitatoria. Affinché questi canali possano aprirsi, il glutammato deve legarsi al recettore e la membrana deve andare incontro ad un fenomeno di depolarizzazione in modo che il Mg^{2+} interposto tra le diverse subunità del recettore possa essere rimosso e sia consentito l'ingresso di Ca^{2+} attraverso il canale. Della stessa famiglia è il recettore ionotropico del glutammato AMPA anche esso avente struttura eterooligomerica. I recettori AMPA si aprono e chiudono rapidamente in risposta al glutammato e una volta aperti, consentono l'ingresso di ioni Na^+ , che portano alla depolarizzazione della membrana.

La cellula ha sviluppato la capacità di utilizzare canali diversi a seconda delle diverse esigenze: infatti, nei casi in cui si rende necessaria una trasmissione rapida di segnali, come ad esempio la comunicazione tra i nervi e il muscolo scheletrico, la cellula impiega canali quali i VOCCs; per altri fenomeni cellulari, quali ad esempio la secrezione degli ormoni, o la risposta proliferativa, dove la rapidità nella trasmissione dei segnali non è una condizione così vitale, la cellula utilizza prevalentemente i SOCs (store-operated-channels)(Berridge, 1995; Putney and Bird, 1993). Questi ultimi sono prevalentemente distribuiti nelle cellule non eccitabili tuttavia la loro presenza è stata dimostrata anche in cellule eccitabili. Questi sono definiti come canali della membrana plasmatici che si aprono in risposta ad una diminuzione della concentrazione di Ca^{2+} nel ER (Putney and Bird, 1993). Sebbene non sia stato totalmente compreso il meccanismo attraverso il quale questi due eventi sono collegati tra loro (diminuzione della concentrazione di Ca^{2+} nel ER-apertura dei SOCs), tuttavia diverse ipotesi sono state recentemente formulate per cercare di spiegare tale fenomeno. Due sembrerebbero essere le più accreditate: la prima teoria è quella dell'"accoppiamento conformazione", secondo la quale ci sarebbe un'interazione proteina-proteina nella membrana plasmatici, tra il recettore dell' IP_3 (inositolo trifosfato) (probabilmente di tipo III) o un'altra proteina del ER e la proteina SOC (Putney, 1997; Putney and Bird, 1993). La seconda ipotesi propone invece l'esistenza di un messaggero mobile intracellulare rilasciato dal ER, il quale sarebbe capace di legarsi alla proteina SOC, provocandone l'apertura (Randriamampita and Tsien, 1993). I messaggeri candidati includono il fattore di influsso del calcio (CIF), metabolici del citocromoP-450 e l'acido arachidonico generato dalla fosfolipasi A_2 (Hoebel *et al.*, 1997).

Infine per concludere questa piccola carrellata sui vari tipi di canali presenti a livello della membrana plasmatica, è importante sottolineare che ciascun tipo di canale rilascia specifiche quantità di calcio e con modalità caratteristiche. Mentre i VOCCs rilasciano

grandi quantità di Ca^{2+} in prossimità dello spazio subplasmalemmale andando quindi ad attivare enzimi target Ca^{2+} -dipendenti, i LGCCs provocano una risposta più ampia in quanto consentono l'ingresso sia di ioni Ca^{2+} che Na^+ , determinando una depolarizzazione della membrana alla quale consegue l'apertura dei VOCCs e quindi un ulteriore influsso di Ca^{2+} (Catterall, 1995; Dunlap *et al.*, 1995). Quale sia l'esatto ruolo dei SOCs non è al momento chiaro. Diverse evidenze sembrano suggerire che il ruolo fisiologico dei SOCs sia quello di segnalare alla cellula carenza di Ca^{2+} da utilizzare per ristabilire le normali concentrazioni all'interno del ER.

Dopo questa panoramica riassuntiva sui vari tipi di canali della membrana plasmatici impiegati dalla cellula per innalzare la concentrazione citoplasmatica di Ca^{2+} , vale la pena chiedersi perché la cellula abbia avuto necessità di sviluppare vie di ingresso del calcio così molteplici e tra loro differenti. Ovviamente la risposta a questa complicata domanda non ha tutt'oggi trovato una risposta unanimemente concorde. Una possibile ipotesi può essere che tali vie di ingresso siano necessarie per la generazione di segnali di Ca^{2+} di differente durata, intensità e localizzazione spaziale o, in altre parole, che una varietà così grande di vie sia necessaria alla cellula per rilasciare Ca^{2+} in maniera appropriata in risposta ai numerosi stimoli ai quali è normalmente sottoposta.

Pompe e uniporti

Come già accennato ci sono due tipi di trasportatori della membrana plasmatici che trasferiscono Ca^{2+} dall'interno all'esterno della cellula: lo scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e il sistema attivo di trasporto del Ca^{2+} , l'ATPasi della membrana plasmatici (PMCA); mentre il ruolo del primo scambiatore è quello di mantenere i livelli di Ca^{2+} vicini a quelli basali per un periodo di tempo prolungato. In particolare, lo scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ è il maggiore sistema di estrusione di tale ione in cellule caratterizzate da oscillazioni di calcio, come i neuroni e i cardiomiociti. Tale scambiatore è infatti in grado di rimuovere rapidamente enormi quantità di calcio dal citosol, esportando 1 ione Ca^{2+} per 3 ioni Na^+ ; recentemente è stato dimostrato che questo scambiatore è anche in grado di promuovere l'influsso di Ca^{2+} dalla spazio extracellulare al citosol a secondo del potenziale di membrana e dei gradienti di Ca^{2+} e Na^+ ; le modalità di funzionamento di questo secondo meccanismo non sono comunque state ancora del tutto chiarite.

Un ulteriore meccanismo di controllo dei livelli citoplasmatici del Ca^{2+} è l'accumulo di tale ione in organuli di deposito, il più importante dei quali è il reticolo endoplasmatico (Pozzan

et al., 1994). Tale accumulo è mediato dall'azione combinata dalla SERCA, la ATPasi del ER/SR e di alcune proteine leganti il calcio del ER/SR quali la calsequestrina e la calreticolina (Celio, 1996; Meldolesi, 1996). Tuttavia anche altri organuli quali il mitocondrio possono giocare un importante ruolo nel mantenimento dell'omeostasi del Ca^{2+} . In particolare quando i livelli citoplasmatici di Ca^{2+} raggiungono la soglia della tossicità, il mitocondrio interviene come ulteriore organo di deposito (Nicholls and Akerman, 1982). Il Ca^{2+} è trasportato dallo spazio citoplasmatico al mitocondrio contro gradiente di concentrazione mediante un uniporto del Ca^{2+} che sfrutta il gradiente elettrochimico della membrana mitocondriale interna. Il movimento elettrogenico del Ca^{2+} nella matrice può essere accompagnato dal movimento di HPO_4^- attraverso lo scambiatore $\text{HPO}_4^-/\text{OH}^-$. Uno scambiatore $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ o $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ facilita invece il movimento degli ioni Ca^{2+} dalla matrice mitocondriale allo spazio citoplasmatico.

I canali intracellulari del calcio

Il rilascio di calcio dagli organuli intracellulari di deposito, avviene principalmente dal reticolo sarcoendoplasmatico ed in misura minore da altri compartimenti cellulari quali mitocondrio (Pozzan *et al.*, 1994), apparato di Golgi (Pinton *et al.*, 1998), involucro perinucleare (Malviya *et al.*, 1990) e da una serie di vescicole di membrana che includono i microsomi (Blondel *et al.*, 1994).

I due canali di rilascio intracellulari del Ca^{2+} più noti sono il recettore dell'inositolo trifosfato (IP_3R) ed il recettore della Ryanodina (RyR) (Sorrentino, 1996). L' IP_3 (inositolo 1, 4, 5 trifosfato) è il ligando del IP_3R e la sua produzione è legata all'attivazione dell'enzima fosfolipasi C (PLC) il quale tagliando il fosfolipide di membrana PIP_2 (fosfatidil inositolo 4, 5 bifosfato), porta alla produzione di IP_3 e diacilglicerolo (DAG). A sua volta il DAG svolge nella cellula un importante ruolo nella traduzione del segnale attraverso l'attivazione della PKC (Berridge, 1993); (Divecha, 1995).

Le due forme di PLC principalmente coinvolte nella formazione dell' IP_3 sono la forma $\beta 1$ e la $\gamma 1$. La prima è attivata da un recettore accoppiato ad una proteina G mentre la seconda è attivata da un recettore accoppiato ad una tirosin chinasi (Berridge, 1993). Una volta che i livelli di IP_3 sono stati innalzati esso viene rapidamente metabolizzato da fosfatasi o da chinasi ed i metaboliti derivanti vengono riciclati come componenti della membrana.

La regolazione dei canali RyR non è a tutt'oggi stata ancora completamente chiarita; le conoscenze attuali indicano che una delle vie di rilascio di Ca^{2+} attraverso questi canali,

viene attivata dal Ca^{2+} stesso, mediante un meccanismo noto come “rilascio di calcio indotto da calcio” (CICR) (Sorrentino, 1996). La cellula è pertanto in grado di usare più di un canale per aumentare i livelli citoplasmatici di Ca^{2+} ; la panoramica dei segnali di calcio viene resa ancora più complessa dal fatto che differenti sottotipi di entrambi i recettori mostrano di essere regolati con modalità diverse (Sorrentino, 1996; Taylor, 1998). In particolare sono noti tre differenti tipi di recettori dell' IP_3 , e altrettante isoforme di recettore della ryanodina (Meissner, 1994). Il recettore dell' IP_3 ha tre differenti sottotipi che differiscono nelle loro proprietà biofisiche (Perez *et al.*, 1997), nella loro suscettibilità alla modulazione da parte di proteine accessorie (Patel *et al.* 1999) e nella loro localizzazione subcellulare in cellule polarizzate (Hagar *et al.*, 1998). Allo stesso modo, sebbene le proprietà biofisiche delle tre isoforme del RyR siano notevolmente simili, la tessuto-specificità (Giannini *et al.*, 1995) e la regolazione sono caratteristiche specifiche per ciascuna isoforma. Le isoforme I e II del RyR, rispettivamente scheletrica e cardiaca, sono le meglio caratterizzate, mentre la isoforma III, largamente presente nei mammiferi, non è ancora stata associata ad una specifica funzione fisiologica. Tra gli agenti regolatori dei RyR, il cADPR (adenosin 5'-difosforibosiociclico), un metabolita del nicotinamide adenin nucleotide (NAD^+), sembra svolgere un ruolo di particolare interesse, in quanto è stato dimostrato essere coinvolto nel rilascio di Ca^{2+} in una grande varietà di sistemi che vanno dagli invertebrati fino ai mammiferi (Galione *et al.* , 1991; Lee, 1997). Ciò nonostante, i meccanismi di azione con i quali il cADPR attiverrebbe i recettori della ryanodina sono largamente dibattuti. Infatti benché sia stato dimostrato che il cADPR sia in grado di rilasciare il Ca^{2+} dal RyR di tipo II e da quello di tipo III (Sonnleitner *et al.*, 1998), i pareri non sono concordanti sul controllo che il cADPR esercita sul rilascio di Ca^{2+} di tipo I (Meszaros *et al.*, 1993; Sitsapesan *et al.*, 1994). Solo recenti evidenze hanno infatti dimostrato che il cADPR è capace di stimolare il rilascio di Ca^{2+} mediato dal RyR di tipo I nel muscolo scheletrico di ratto (Bastide *et al.*, 2002). Il rilascio di calcio mediato dal cADPR è stato descritto per la prima volta da Clipper, il quale dimostrò come NAD^+ fosse in grado di rilasciare Ca^{2+} da omogenati di riccio di mare in seguito alla conversione dell' NAD^+ in cADPR (Lee *et al.*, 1989). Più tardi (Galione *et al.*, 1991) dimostrarono che il cADPR rilascia Ca^{2+} da un *pool* di ryanodina sensibile, suggerendo che tale metabolita del NAD^+ , è un modulatore endogeno del recettore della ryanodina. Nonostante appaia ormai chiaro che il cADPR sia in grado di rilasciare Ca^{2+} attraverso il RyR, sembra invece non ancora del tutto chiarito se ci sia un legame diretto tra cADPR e recettore. Recenti evidenze indicano nella proteina “FK506-binding protein 12.6”, uno strumento necessario

senza il quale il rilascio di Ca^{2+} cADPR-indotto, non possa avvenire (Tange *et al.*, 2002). Sebbene il rilascio di Ca^{2+} mediato da cADPR sia stato originariamente scoperto negli invertebrati, notevoli passi avanti sono stati fatti nella comprensione dei segnali mediati da questo metabolita. Infatti è stato dimostrato che il cADPR è capace di rilasciare Ca^{2+} da depositi intracellulari in numerosi sistemi cellulari che vanno dalle piante (Leckie *et al.*, 1998) fino ai mammiferi (Lee, 1997; Lee, 1998). Ciò nonostante, non è stato ancora completamente delucidato il meccanismo attraverso il quale il cADPR eserciti il suo effetto Ca^{2+} mobilizzante all'interno della cellula.

I messaggeri del rilascio del calcio

Una tra le più complesse e controverse domande nel panorama dei segnali è come differenti stimoli extracellulari siano in grado di generare molteplici risposte intracellulari dato il ristretto numero di secondi messaggeri di cui la cellula dispone.

Tra questi secondi messaggeri il Ca^{2+} svolge come già detto, un ruolo di primaria importanza (Berridge *et al.*, 1998; Clapman, 1995). Alcune sue caratteristiche di rilascio quali quelle spazio-temporali, l'ampiezza e la durata di tale rilascio, fanno in modo che tale secondo messaggero da solo possa attivare una moltitudine di specifici bersagli. Fino a poco tempo fa due secondi messaggeri (IP_3 e cADPR) erano ritenuti i soli responsabili del controllo dei livelli di Ca^{2+} e quindi indirettamente, dell'enorme quantità di informazioni da esso mediate. Recentemente un nuovo ipotetico secondo messaggero, l'NAADP (acido nicotinico adenin dinucleotide fosfato), è stato dimostrato essere in grado di rilasciare Ca^{2+} da numerosi tipi cellulari tramite un nuovo recettore intracellulare (Chini *et al.* 1995; Lee and Aarhus, 1995). L'identificazione di un terzo meccanismo di rilascio di calcio ha aumentato notevolmente il numero di livelli ai quali il rilascio di calcio può essere controllato e ha quindi dato un enorme contributo alla comprensione di uno dei più complessi di segnale nella cellula.

Caratteristiche del rilascio di calcio indotto da NAADP:

Il rilascio di calcio mediato dall'NAADP negli invertebrati

Le uova di riccio di mare sono attualmente uno dei sistemi maggiormente utilizzati nello studio dei segnali mediati da Ca^{2+} . I motivi di tale impiego sono molteplici.

Innanzitutto l'oocita è una cellula di enorme dimensione e di facile reperibilità. C'è poi da considerare che le uova di invertebrato sono state largamente impiegate nello studio di importanti fenomeni biologici quali la fertilizzazione (Hogben *et al.*, 1998) e rappresentano, pertanto, un modello ben conosciuto l'incubazione con il NAD^+ con omogenati di riccio di mare ha portato alla scoperta del cADPR, così come l'incubazione del medesimo modello cellulare con il $\beta\text{-NADP}^+$ (il β -nicotinammide adenin dinucleotide fosfato) ha portato alla scoperta di un nuovo meccanismo di rilascio del Ca^{2+} (Clapper, 1987). Successivi studi di spettrometria di massa e cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC) hanno identificato nell'NAADP, un contaminante commerciale del $\beta\text{-NADP}^+$, il responsabile di tale rilascio di calcio (Chini *et al.*, 1995; Lee and Aarhus, 1995). Sebbene l'NAADP sia stato inizialmente descritto nel riccio di mare, recenti studi hanno dimostrato come tale nucleotide sia capace di rilasciare calcio da numerosi altri sistemi, inclusi vertebrati, piante e mammiferi (Genazzani and Billington, 2002). Gli studi iniziali sul riccio di mare hanno dimostrato come la capacità dell'NAADP nel rilasciare calcio sia maggiore rispetto a quella dell' IP_3 e del cADPR (Genazzani *et al.*, 1996). In questo modello sperimentale, infatti, l'NAADP rilascia calcio con una EC_{50} pari a 25 nM, mentre il cADPR ha un EC_{50} pari a 50 nM e l' IP_3 a 100 nM. Esperimenti di desensibilizzazione dei tre canali di rilascio del calcio, hanno fornito la principale prova sulla quale si basa l'ipotesi che i tre canali rilascino calcio con diverse modalità (Genazzani *et al.*, 1997a). tale ipotesi si basa su dati che indicano come sia l' IP_3 che il cADPR, che l'NAADP rispondono ad esperimenti di desensitizzazione omologa, ma non eterologa; ovvero successive stimolazioni con lo stesso agonista causano una notevole riduzione nel rilascio di calcio, mentre tale riduzione non viene osservata quando viene aggiunto un agonista diverso da quello utilizzato nella prima stimolazione. Il tracciato fluorimetrico in figura 21 riassume graficamente tale peculiare caratteristica.

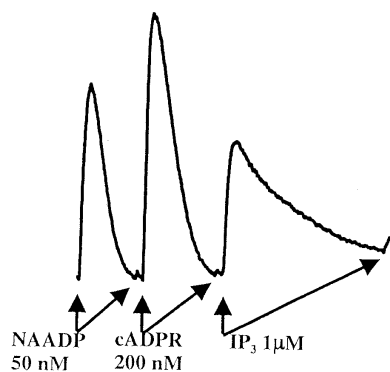


Figura 21. Desensitizzazione omologa ma non eterologa tra NAADP, cADPR e IP_3 nelle uova di riccio di mare.

Allo scopo di caratterizzare i tre canali di rilascio di Ca^{2+} sono state condotte una serie di prove farmacologiche, che hanno evidenziato come IP_3 , cADPR e NAADP rispondano in maniera significamene diversa ad agenti farmacologici differenti. Infatti l'eparina un noto antagonista del rilascio di calcio IP_3 -indotto, non altera in nessun modo il rilascio di calcio NAADP-mediato. Gli stessi risultati si ottengono impiegando noti modulatori del rilascio cADPR-indotto, quali ad esempio procaina, rosso-rutenio, 8- NH_2 -cADPR che bloccano il rilascio attraverso il RyR, ma non quello mediato da NAADP (Lee and Adams, 1995). Inoltre l'NAADP non è coinvolto nel fenomeno del "rilascio di calcio indotto da calcio" e cationi bivalenti quali Ca^{2+} , Sr^{2+} e Mg^{2+} così come cambiamenti di pH non influenzano le capacità di rilascio di questo nucleotide (Chini, 1996; Genazzani *et al.*, 1997a). Infine antagonisti di tipo L, come diltiazem, nifedipina, e verapamil sembrano essere capaci di bloccare selettivamente il rilascio di Ca^{2+} indotto da NAADP, ma non quello indotto da IP_3 e cADPR (Genazzani *et al.*, 1996). Il rilascio di Ca^{2+} indotto da NAADP presenta una singolare caratteristica: esso può essere completamente bloccato da basse concentrazioni di NAADP che di per sé non sono in grado di attivare un rilascio di Ca^{2+} (Genazzani *et al.*, 1996). Questa caratteristica non è condivisa né dall' IP_3 , né dal cADPR e al momento attuale non si conoscono altri esempi in campo farmacologico. L'inattivazione è sia tempo sia concentrazione dipendente; una parziale inibizione del rilascio di Ca^{2+} si verifica a concentrazioni \leq a 100 pM mentre la completa desensitizzazione si verifica a concentrazioni pari a 3 nM e dopo circa 5 minuti. Studi di binding con [^{32}P]NAADP su microsomi di riccio di mare, hanno dimostrato che l'inattivazione avviene a livello del recettore. Pre-trattamenti con concentrazioni non attivanti di NAADP infatti, aboliscono ogni successivo legame del radioligante al recettore. Il meccanismo attraverso quale tale desensitizzazione avvenga non è stato del tutto chiarito, l'ipotesi più probabile è che un iniziale *binding* del radioligante al recettore sia di per sé in grado di indurre cambiamenti conformazionali del recettore nel suo sito di legame.

Un'ulteriore caratteristica della desensitizzazione di questo recettore è che essa avviene con una modalità del tutto o nulla ovvero è dovuta alla totale in attivazione di una porzione dei recettori e non alla parziale in attivazione di tutti i recettori dell'NAADP (Genazzani *et al.*, 1997a). Tale fenomeno di inattivazione è tuttavia peculiare nel riccio di mare per alcune caratteristiche: in alcuni sistemi, infatti, il fenomeno della desensitizzazione si verifica solo a concentrazioni elevate (μM) (Cancela *et al.*, 1999), mentre in altri sistemi come le uova di stella di mare o le ascidie, l'inattivazione non si verifica (Santella *et al.*, 2000). E' comunque vero che che sia i ricci che le ascidie sono lontani, molto lontani nella

scala evolutiva e questa potrebbe essere una spiegazione per tale divergenza di comportamento. Impiegando tecniche di centrifugazione sia su cellule intatte sia omogeneizzate, è stato possibile vedere che l'NAADP mobilizza Ca^{2+} attraverso un compartimento cellulare che è diverso dal ER, utilizzato da IP_3 e cADPR (Lee and Aarhus, 1995). Prove farmacologiche con la tapsigargina, un inibitore del SERCA hanno dimostrato che il rilascio di Ca^{2+} NAADP-mediato non viene alterato in seguito a tale trattamento, a differenza del rilascio di calcio mediato da cADPR e IP_3 , suggerendo che il pool intracellulare di rilascio utilizzato dal NAADP non risiede nel ER (Genazzani and Galione, 1996). Dati recenti hanno identificato un orfanello noto come granulo di riserva, il compartimento utilizzato dall'NAADP nel riccio di mare. In tale modello cellulare, il granulo di riserva è l'analogo funzionale del lisosoma; l'incubazione di uova intatte di riccio di mare con la glicilfenilalanin 2-naftalamide (GPN), un substrato della catepsina C, una esopeptidasi del lisosoma, porta alla lisi osmotica del lisosoma, alla quale consegue una notevole diminuzione dei livelli di Ca^{2+} rilasciati dall'NAADP. Sebbene siano ormai numerosi gli esempi di invertebrati, vertebrati e piante nei quali è stato studiato il rilascio di Ca^{2+} mediato da NAADP, non si è ancora stabilito con fermezza quale sia il ruolo che gioca questo nucleotide nel panorama del Ca^{2+} "signalling".

Diverse evidenze sperimentali dimostrano come NAADP svolga un ruolo attivo durante la fertilizzazione del riccio (Perez-Terzic *et al.*, 1995) ed inoltre studi condotti sulla lumaca di mare *Aplysia californica* (Chameau *et al.*, 2001) e su preparazioni di muscolo di rana hanno suggerito un possibile ruolo di NAADP come mediatore nel processo di neurosecrezione (Brailou *et al.*, 2001).

Rilascio di calcio mediato dall'NAADP nei vertebrati

Fino a poco tempo fa, lo studio sul rilascio di Ca^{2+} indotto dall' NAADP si è concentrato sugli invertebrati; più recentemente comunque è iniziato un intenso studio mirato alla comprensione dei fenomeni NAADP mediati nei mammiferi. Come precedentemente accennato, sono ormai numerosi i tipi cellulari e i tessuti nei quali questo nucleotide si è dimostrato in grado di rilasciare Ca^{2+} . Esempi di tali tessuti sono il cuore (Bak *et al.*, 2001), il cervello (Bak *et al.*, 1999), i linfociti T (Berg *et al.*, 2000), il pancreas (Johnson and Mislser, 2002) (Cancela *et al.*, 1999), le cellule muscolari lisce (Yusufi *et al.*, 2002), ed il rene (Cheng *et al.*, 2001). In alcuni di questi modelli cellulari, il rilascio di Ca^{2+} NAADP-mediato è stato associato ad una specifica funzione fisiologica quale ad esempio l'attivazione dei

linfociti T (Berg *et al.*, 2000) o la regolazione delle cellule β del pancreas attraverso il controllo dei segnali iniziali mediati dall'insulina. (Johnson and Mislner, 2002). Quale sia il ruolo fisiologico dell'NAADP in tessuti quali il cuore, il cervello, il rene, il muscolo liscio al momento non è noto. Tuttavia l'ipotesi emergente dalle attuali evidenze, porta a pensare che l'NAADP possa in qualche modo coordinare il rilascio di Ca^{2+} attraverso una selettiva attivazione e/o sensitizzazione degli altri canali di rilascio (Patel *et al.*, 2001).

Risultati

e

Conclusioni

Sintesi della 7-oxasfingosina e analoghi di ceramide e valutazione dei loro effetti in un modello di apoptosi

Il crescente interesse sugli sfingolipidi e glicosfingolipidi, basato sulla loro capacità di modulare l'apoptosi e le risposte immunitarie ha portato i ricercatori alla sintesi di 7-oxasfingosina e della ceramide corrispondente. Nell'articolo che segue abbiamo valutato gli effetti di 7-oxasfingosina e degli analoghi di ceramide in un modello di apoptosi.

7-oxasfingosina, 7-oxaceramide, tioceramide e N,metil-oxaceramide sono stati sintetizzati a partire dal D-galattosio attraverso la via "*building blocks*". Le caratteristiche pro-apoptotiche dei quattro composti suddetti sono state confrontate con quelle della sfingosina e della ceramide, utilizzando una linea cellulare di neuroblastoma umano (SK-NBE) e una linea cellulare murina derivata da promielociti (32d). Valutando gli effetti sulla vitalità cellulare e sulla proliferazione non si sono riscontrate differenze significative tra 7-oxaceramide, N, metil-oxaceramide e la ceramide. In presenza di N,N,-dimetilsfingosina, un inibitore di sfingosina chinasi, ceramide è risultata essere più potente di tio-oxaceramide nelle cellule 32d. per contro la tio-oxaceramide è più potente ed efficace nelle cellule SK-N-BE, dove si conserva un valore di IC_{50} di 3 nM comparato con i 100 nM della ceramide. In entrambe le linee cellulari la 7-oxa-sfingosina e la sfingosina risultano ugualmente tossiche, anche in presenza di N,N, dimetilsfingosina.

Synthesis of 7-Oxasphingosine and -ceramide Analogues and Their Evaluation in a Model for Apoptosis

by Roshini Rajan, Kurt Wallimann, and Andrea Vasella*

Laboratorium für Organische Chemie, ETH-Hönggerberg, Wolfgang Pauli-Strasse 10, CH-8093 Zürich

and

Deborah Pace, Armando A. Genazzani, Pier Luigi Canonico, and Fabrizio Condorelli†

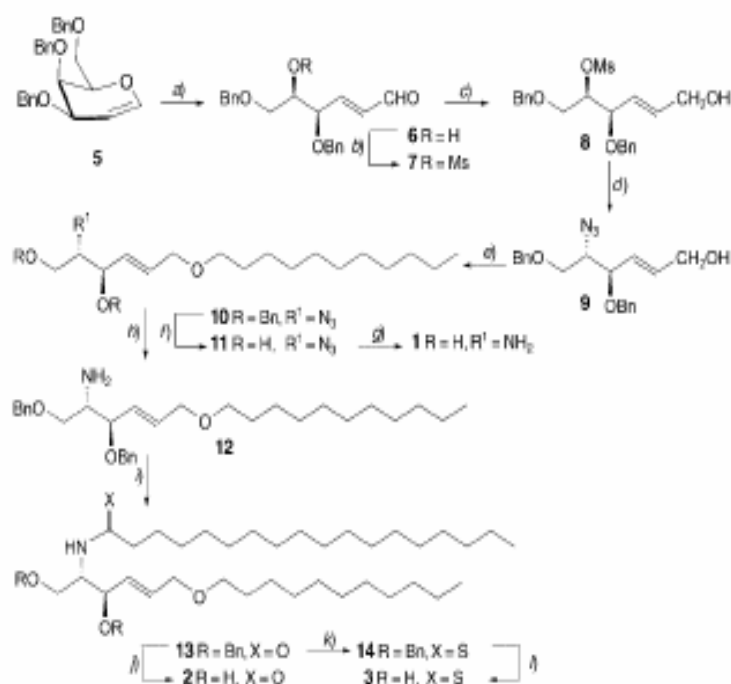
Università del Piemonte Orientale, DISCAFF, Via Bovio 6, I-28100 Novara

The 7-oxasphingosine (**1**), 7-oxaceramide (**2**), the thio-oxaceramide **3**, and *N*-methyloxaceramide **4** were synthesised from *D*-galactose via the building block **9**. The apoptosis-inducing properties of **1–4** were compared to those of sphingosine (Sph) and ceramide (Cer) using a human neuroblastoma (SK-N-BE) and a murine-promyelocyte-derived (32d) cell line. There were no differences between **2–4** and Cer in terms of their effects on the viability of cells and their ability to trigger cell proliferation. However, in the presence of *N,N*-dimethylsphingosine, an inhibitor of sphingosine kinase (SPHK), Cer was more potent than thio-ceramide **3** in 32d cells, while thio-ceramide **3** was more potent and efficacious in SK-N-BE cells, where it showed an IC_{50} value of 3 nM compared to 100 nM for Cer. In both SK-N-BE and 32d cells, 7-oxasphingosine (**1**) and Sph were equally toxic, even in the presence of *N,N*-dimethylsphingosine.

Introduction. – The growing interest in sphingolipids and glycosphingolipids [1–4] based on their ability to modulate apoptotic [5–12] and immune responses [13–16] prompts us to disclose a synthesis of 7-oxasphingosine (**1**) and the corresponding ceramide **2** that we developed in 1985 [17]. We wished to synthesise sphingolipid analogues in a modular way to independently vary the structure of the polar headgroup (including the (*E*)-alkenyl group) and the lipid moiety. Building block **9**, possessing a primary allylic OH group, appeared appropriate; a variety of lipid moieties should be readily attached. We recently turned back to this synthesis with the goal of determining, in a model for apoptosis, first the effect of 7-oxasphingosine (**1**) and the corresponding ceramide **2** as compared to sphingosine (Sph) and ceramide (Cer), and then the effect of two analogues **3** and **4**. These two analogues should allow to evaluate the effect on apoptosis of the H-bond donating and accepting properties of the amide group. *N*-Methylation of ceramide should also lower the energy difference between the conformers, resulting from rotation about the C(2)–N bond and between the (*E*)- and (*Z*)-amide conformers; this is expected to result in a different population of conformers in addition to removing any H-bond from the original amide group. In view of recent interest in 7-oxasphingosine [18], we wish to describe in detail the original synthesis and first biological results.

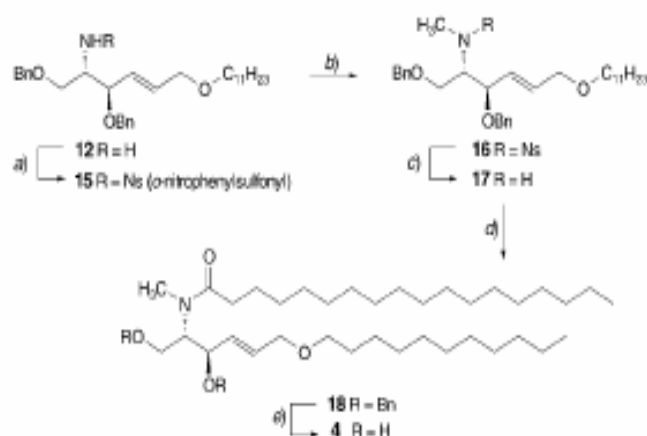
Synthesis. – The synthesis of 7-oxasphingosine is based on the known $HgSO_4$ -promoted transformation of tri-*O*-benzyl-*D*-galactal **5** (available in an overall yield of

Scheme 1



a) HgSO₄, 0.02% H₂SO₄, dioxane; 84%. b) MeCl, Et₃N, CH₂Cl₂; 74%. c) NaBH₄, MeOH; 97%. d) NaN₃, DMF; 71%. e) NaH, C₂₇H₅₅Br, DMF; 87%. f) AlCl₃, anisole, CH₂Cl₂; 65%. g) Me₃P, THF, then NaOH; 74%. h) LiAlH₄, THF. i) C₂₇H₅₅COCl, pyridine, CH₂Cl₂; 83% from **10**. j) AlCl₃, anisole, CICH₂CH₂Cl; 73%. k) Lawesson's reagent, toluene; 84%. l) AlCl₃, anisole, CH₂Cl₂; 70%.

Scheme 2



a) *o*-Nitrobenzenesulfonyl chloride, Et₃N, CH₂Cl₂; 87%. b) MeI, K₂CO₃, DMF; 100%. c) PhSH, KOH, CH₂CN; 95%. d) Stearoyl chloride, pyridine, CH₂Cl₂; 92%. e) AlCl₃, anisole, CICH₂CH₂Cl; 74%.

Table 1. Selected ¹H-NMR Chemical Shifts [ppm] and Coupling Constants [Hz] of Acids 7-couplingoside II, 7-Couplingoside (I), and D-xythro-3-phingoside in CDCl₃.

	II	I	D-xythro-3-phingoside ^{a)}
H-Q(1)	3.82	3.71-3.61	3.67
H-Q(1')	-	3.71-3.61	3.60
H-Q(2)	3.52	2.90	3.87
H-Q(3)	4.34	4.14	4.08
H-Q(4)	5.81	5.76	5.46
H-Q(5)	5.94	5.89	5.73
2H-C(6)	3.99	3.98	3.08
HQ-C(3)	2.34	2.25-1.82	1.95
HQ-C(1)	2.19	2.25-1.82	1.95
NH ₂	-	2.25-1.82	1.95
K(2)	5.4	5.1	5.9
K(3)	-	-	4.5
K(4)	4.5	5.1	5.1
K(6)	6.6	6.3	6.9
K(4,5)	15.6	15.6	15.3
K(4,6)	1.3	-	-
K(5,6)	5.1	5.1	7.0

^{a)} [28].Table 2. Selected ¹H-NMR Chemical Shifts [ppm] and Coupling Constants [Hz] of Coumarins (Co), the 7-Oxocoumarins 1-4, and the Pterocid 7-Oxocoumarins 13, 14, and 16 in CDCl₃.

	Co ^{a)}	1	2	$\delta_{\text{H}_{\text{H}}}$	$\delta_{\text{H}_{\text{H}}}$	13	14	H _H ₁₃	H _H ₁₄
H-Q(1)	3.93	3.96-3.88	4.13	4.07-3.83	^{b)}	3.80	3.86	3.88	3.64
H-Q(1')	3.68	3.74-3.67	3.83	4.07-3.83	^{b)}	3.53	3.67	3.73	3.78
H-Q(2)	3.88	3.96-3.88	4.64-4.56	3.66	^{b)}	4.25	4.96	4.70-4.60	3.90-3.87
H-Q(3)	4.31	4.38	4.74-4.66	4.59	4.36	3.96	4.19	4.07	4.06
H-Q(4)	5.51	5.79	5.87	5.76	^{b)}	5.65	5.73	5.61	5.57
H-Q(5)	5.76	5.91	5.99	5.85	^{b)}	5.79	5.85	5.79	5.82
2H-C(6)	2.03	3.98	4.01	3.95	^{b)}	3.97	3.97	4.00-3.98	4.00-3.98
NH	6.21	6.33	6.07	-	^{b)}	5.72	7.09	-	-
HQ-C(3)	2.70	3.26	3.56	3.57	^{b)}	-	-	-	-
HQ-C(1)	2.70	3.97	3.66-3.52	3.57-3.50	^{b)}	-	-	-	-
K(7,8)	0.2	^{c)}	0.5	^{c)}	-	9.9	10.0	9.6	10.2
K(17)	3.4	^{c)}	3.0	6.4	-	4.5	4.4	8.4	8.4
K(12)	3.4	^{c)}	<1.5	3.8	-	3.9	4.4	3.6	3.3
K(2,5)	3.6	4.0	^{c)}	6.5	-	7.2	6.2	8.1	8.1
K(3,6)	6.5	5.3	5.0	6.3	-	7.5	7.5	8.3	8.3
K(4,5)	15.4	15.6	15.6	15.6	-	15.9	15.9	15.6	15.6
K(5,6)	6.8	5.1	5.4	5.0	-	5.4	5.2	5.7	5.3
K(NH,2)	7.3	7.5	7.2	-	-	9.3	9.0	-	-
KOH(3)	^{c)}	5.4	^{c)}	3.0	-	-	-	-	-
KOH(1)	3.6	7.2	^{c)}	^{c)}	-	-	-	-	-
KOH(1')	7.5	3.6	^{c)}	^{c)}	-	-	-	-	-

^{a)} [28]. ^{b)} Not observed as a separate signal. ^{c)} Not assigned.

compared to ceramide and to **2**, may reflect a rotation about the C(2)–N bond, and a (partial) C(1)– or C(3)–OH...O=C H-bond, in keeping with a downfield shift for C(1)–OH and to a smaller extent for C(3)–OH.

Biological Studies. – The behaviour of 7-oxasphingosine (**1**) and 7-oxaceramide (**2**) was compared to that of Sph and Cer using a human neuroblastoma (SK-N-BE) cell line and a murine-promyelocyte-derived (32d) cell line; the thioceramide **3** and the *N*-methylceramide **4** were tested in the same models. These cell lines were used because of their different ability to respond to Cer, as observed in a preliminary screening (see Fig. 1). Thus, Cer is not toxic in SK-N-BE cells, while it induces cell death in 32d cells (Fig. 1, a and b). To quantitatively analyse the differences between the synthesised compounds in the two cell lines, we investigated the viability and proliferation triggered by Cer, Sph, and the analogues **1**–**4** in concentration/response curves by means of the MTT (tetrazolium salt conversion) metabolic assay [32].

A 72-h treatment with Cer induced a decrease in viability in 32d cells, with the maximal effect observed at 10 μM ($37 \pm 3\%$ of control; Fig. 1, a). In contrast, the same concentration of Cer reduced the viability in SK-N-BE cells by only $6 \pm 2\%$ (Fig. 1, b). We speculated that the relative Cer resistance might depend on differential expression or differential activity of the ceramide kinase (CERK) and/or sphingosine kinase (SPHK) in the two cell lines. To show that, in principle, this hypothesis is well-founded, we performed exploratory RT-PCR experiments. These experiments suggest that different CERK splice variants are present in the two cell lines (Fig. 2). To test the hypothesis functionally, both cell lines were treated with Cer in the presence of *N,N*-dimethylsphingosine (*N,N*-DMS), a synthetic inhibitor of SPHK that blocks the conversion of Sph to the anti-apoptotic sphingosine-1-phosphate (Sph-1-P) [33]. Inhibition of CERK could not be performed, since no valid inhibitors were reported in the literature. In agreement with our hypothesis, *N,N*-DMS (5 μM) potentiated the cytotoxicity of Cer, although to different extents in the two cell lines. *N,N*-DMS, at a concentration that *per se* is ineffective, brought the maximal toxicity of Cer from $6 \pm 2\%$ to $45 \pm 2.8\%$ (Fig. 1, b). Such treatment also increased the potency of Cer. In the 32d cells, co-treatment with *N,N*-DMS did not alter the efficacy as incisively (from $37 \pm 3\%$ to $55 \pm 2\%$), but greatly increased its potency (IC_{50} 3 μM vs. 100 nM) (Fig. 1, a). The effect of *N,N*-DMS on both cell lines suggests that conversion of Cer to Sph-1-P plays an important part in rendering cells less sensitive to Cer-induced toxicity. When Sph was tested (Fig. 1, c and d), a higher degree of toxicity as compared to Cer (measured both in potency and efficacy) was evident in both cell lines. 7-Oxasphingosine (**1**) behaved similarly to Sph (Fig. 1, c and d). This suggests that, at high Sph concentrations, SPHK activity is limiting, and the Sph/Sph-1-P ratio favours toxicity rather than protection. This hypothesis also assumes that ceramidase does not convert all exogenous Cer to Sph, and that other pathways (including CERK) are active. 32d Cells behaved differently in response to Sph. As with SK-N-BE cells, Sph proved toxic, but its potency was increased by the addition of *N,N*-DMS (IC_{50} 3 μM in the absence; 100 nM in the presence of *N,N*-DMS). These data suggest that the pathways utilising and metabolising sphingolipids in 32d and SK-N-BE are different.

In this case, it is possible that the synthetic analogues in this study elicit different effects in the two cell lines. All of the Cer analogues grossly recapitulated the effects

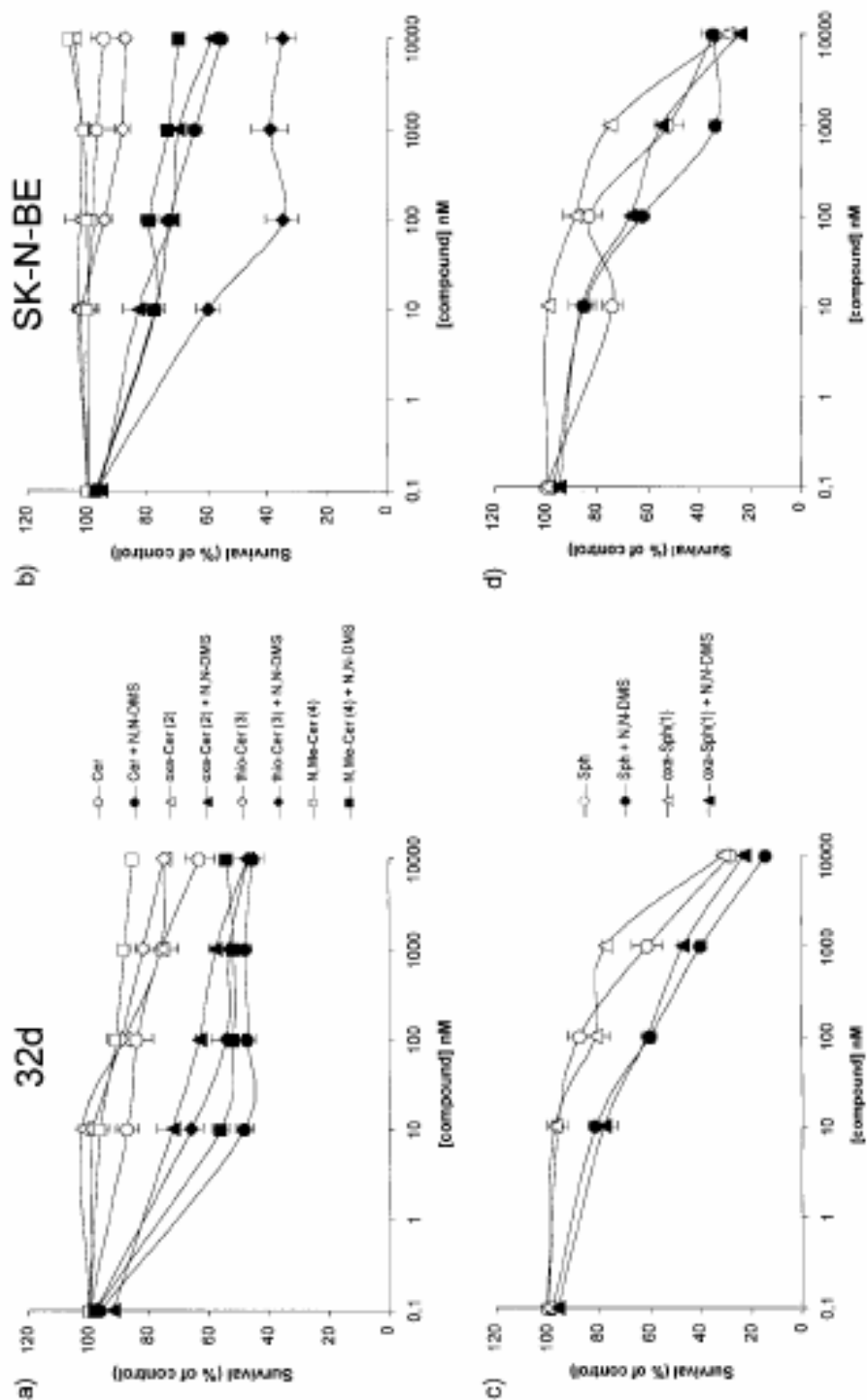


Fig. 1. Effect of Cer, Sph, and their analogues on cell viability. Left panels refer to experiments on 32d and right panels refer to experiments performed on SK-N-BE cells. Values are mean \pm S.E.M. of at least 32 replicates in four experiments.

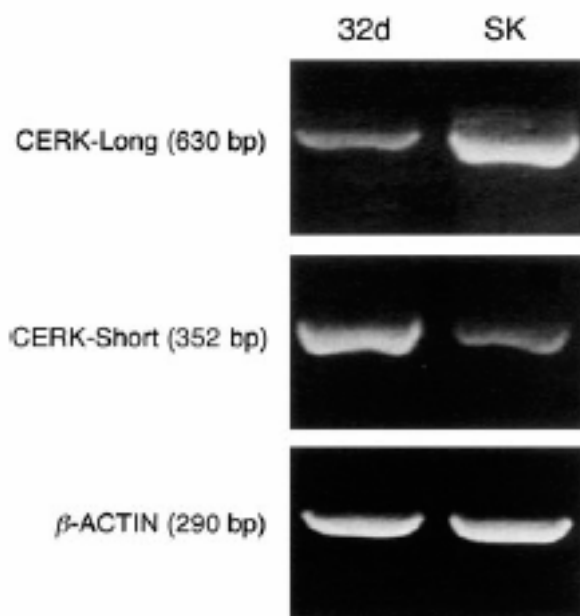


Fig. 2. Presence of different isoforms of CERK in 32d and SK-N-BE cells. The figure is representative of three separate experiments (SK = SK-N-BE).

induced by commercial Cer (*C2-Ceramide*, Sigma) in both cell lines, with 32d cells more susceptible to the treatment, as expected (Fig. 1, a and b). The difference between 32d and SK-N-BE cells was more evident when the relative rank order of potency of these analogues was evaluated. Testing compounds on their own showed no statistically significant difference as compared to Cer. However, in the presence of *N,N*-DMS, where effects were more pronounced, the rank order of potency was significantly different. In particular, Cer was more potent than thio-ceramide 3 in 32d cells, while thio-ceramide 3 was more potent and efficacious in SK-N-BE cells. Indeed, in SK-N-BE cells 3 was by far the most lethal compound according to the MTT assay. In this system, the apparent IC_{50} value of 3 was 3 nM and that for Cer 100 nM (Fig. 1, b). Furthermore, evaluating the maximal effects induced, 3 killed $65 \pm 6.0\%$ of cells compared to the $45 \pm 2.8\%$ killed by Cer.

One of the major concerns about the role of Cer and Sph as second messengers in cell-death programs derives from the consideration that such lipophilic molecules may physically impair cell-membrane function, rather than activating a well-defined apoptotic pathway [5]. In view of this consideration, we studied apoptotic death by testing for nuclear chromatin condensation and fragmentation, two well-known markers of programmed cell death [34]. After treating the cell lines as described above, nuclear chromatin was labelled with a fluorescent DNA dye (*Hoechst 33258*) and visualised with a fluorescent microscope under UV light. As shown in Fig. 3, all of the compounds found to be cytotoxic in the presence of *N,N*-DMS (Cer, thio-ceramide, Sph, 7-oxasphingosine) induced nuclear condensation and fragmentation at concen-

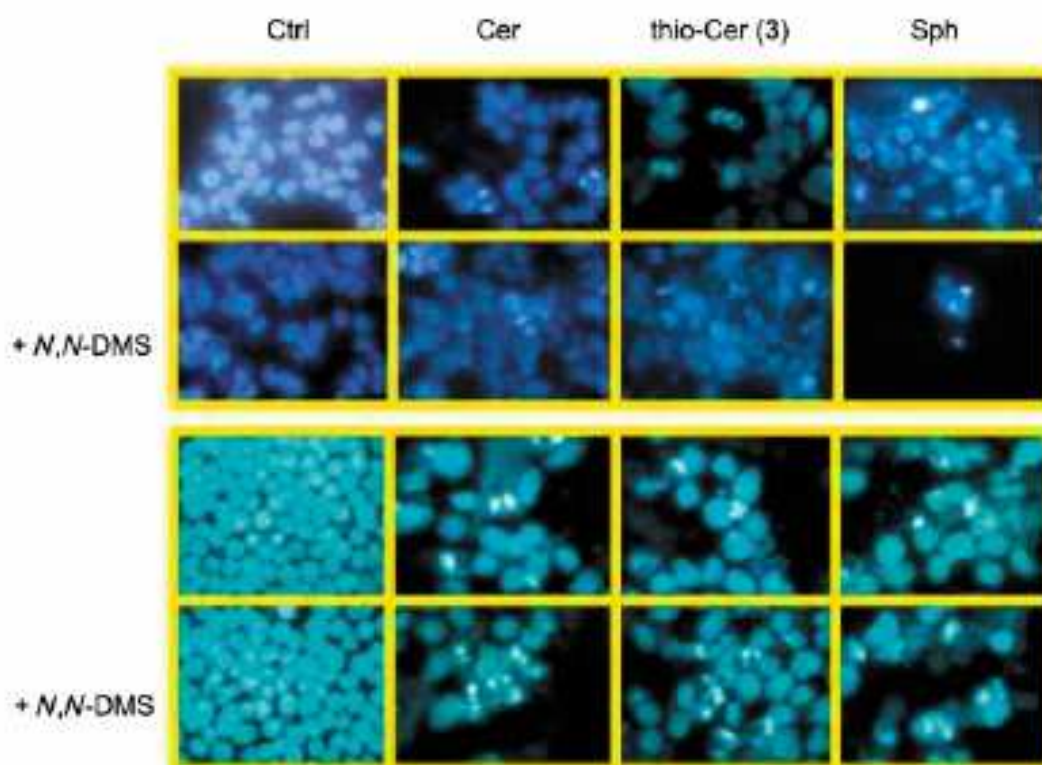


Fig. 3. Hoechst staining of cells treated for 72 h with Cer, Sph, thio-ceramide, and 7-oxasphingosine in 32d and SK-N-BE cells. Images are representative of at least ten fields in three separate experiments.

trations consistent with those suggested by MTT assays, further evidencing the specificity of Cer and its analogues in triggering apoptotic death.

These data sustain the relevance of SPHK in disabling, in part, the cytotoxic effect of Cer by phosphorylation and highlight the importance in this respect of either the absolute levels of Sph, or of the sphingosine/sphingosine 1-phosphate ratio. Our data also suggest that there are no major differences in the way in which Cer and its oxa and *N*-Me analogues are metabolised to the Sph derivative, and in the way that the resulting Sph and oxasphingosine are recognised by SPHK. On the other hand, the greater potency showed by thio-ceramide 3 in SK-N-BE cells devoid of SPHK activity (as the result of *N,N*-DMS treatment) strongly supports the idea that the thio group changes the biological characteristics of this compound. Although, at present, it is difficult to speculate on the reasons of such a difference, thio-ceramide 3 might have a higher affinity than Cer to death effectors (ion channels, protein kinases, phosphatases, *etc.*) or a decreased capacity to be phosphorylated by either CERK or SPHK.

Experimental Part

1. Synthesis. – *General.* Solvents were distilled: THF from Na and benzophenone, CH_2Cl_2 from P_2O_5 , MeOH from CaH_2 . Reactions were carried out under Ar, unless stated otherwise. Qual. TLC: precoated silica-gel plates (Merck silica gel 60 F_{254}); detection by heating with 'mossain' (400 ml of 10% H_2SO_4 soln., 20 g of

$(\text{NH}_4)_2\text{Mo}_2\text{O}_7 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 0.4 g of $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$. Flash chromatography (FC): silica gel *Fluka 60* (0.04–0.063 mm). Optical rotations: 1-dm cell at 25°, 589 nm. FT-IR Spectra: KBr or ca 2% soln. in CHCl_3 , absorption in cm^{-1} . ^1H - and ^{13}C -NMR spectra: chemical shifts δ in ppm rel. to TMS as external standard, and coupling constants J in Hz. HR-MALDI-MS: in gentisic acid (=2,5-dihydroxybenzoic acid, DHB) matrix.

(E)-4,6-Di-O-benzyl-2,3-dideoxy-n-threo-hex-2-ene (6) [22]. Prepared from tri-O-benzyl-n-galactal 5 according to [22]. R_f (AcOEt/hexane 2:3) 0.22. IR (CHCl_3): 3574w, 3089w, 3067w, 3027w, 3015w, 2904w, 2869w, 2824w, 2737w, 1692s, 1603w, 1496w, 1454w, 1388w, 1364w, 1259w, 1164w, 1102s, 1028w, 1007w, 981w, 911w, 877w. ^1H -NMR (CDCl_3 , 300 MHz): 9.56 (d, $J = 7.8$, H-C(1)); 7.39–7.26 (m, 10 arom. H); 6.78 (dd, $J = 15.9$, 6.0, H-C(3)); 6.34 (ddd, $J = 15.9$, 7.8, 1.2, H-C(2)); 4.63 (d, $J = 11.7$, PhCH); 4.54 (d, $J = 11.7$, PhCH); 4.48 (d, $J = 11.7$, PhCH); 4.43 (d, $J = 11.4$, PhCH); 4.29 (t, $J \approx 5.6$, H-C(4)); 3.91–3.82 (m, H-C(5)); 3.39 (dd, $J = 9.6$, 4.8, H-C(6)); 3.51 (dd, $J = 9.9$, 5.4, H-C(6)); 2.62 (br. s, OH). ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 75 MHz): 192.95 (d, C(1)); 153.09 (d, C(3)); 137.48, 137.02 (2s); 133.66 (d, C(2)); 128.51 (2d); 128.43 (2d); 128.12 (d); 127.96 (2d); 127.89 (d); 127.85 (2d); 78.51 (d, C(4)); 73.58 (t, PhCH₂); 72.30 (d, C(5)); 72.24 (t, PhCH₂); 70.02 (t, C(6)). HR-MALDI-MS: 349.1407 (100, $[M + \text{Na}]^+$, $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{NaO}_7$; calc. 349.1410).

(E)-4,6-Di-O-benzyl-2,3-dideoxy-5-O-(methylsulfonyl)-n-threo-hex-2-ene (7). An ice-cold soln. of 6 (13.16 g, 40.32 mmol) in dry CH_2Cl_2 was treated with Et_3N (8.14 g, 80.64 mmol) and MsCl (13.86 g, 120.96 mmol), stirred for 4 h at rt., and then treated with H_2O . After extraction with CH_2Cl_2 (4×200 ml), the combined org. layers were washed with brine, dried (Na_2SO_4), and evaporated. FC (silica gel; AcOEt/hexane 2:8) gave solid 7 (12.06 g, 74%), which was recrystallized in Et₂O-hexane. White crystals. R_f (AcOEt/hexane 2:3) 0.38. M.p. 71–73°. $[\alpha]_D^{25} = +21.9$ ($c = 2.00$, CHCl_3). IR (KBr): 3361w, 3066w, 3062w, 3028w, 2934w, 2905w, 2875w, 2774w, 1669s, 1603w, 1494w, 1469w, 1453w, 1396w, 1354w, 1328s, 1275w, 1245w, 1204w, 1176s, 1156w, 1113s, 1090s, 1076s, 1062s, 1043s, 1025s, 977s, 969w, 931s. ^1H -NMR (CDCl_3 , 300 MHz): 9.57 (d, $J = 7.8$, H-C(1)); 7.39–7.26 (m, 10 arom. H); 6.74 (dd, $J = 15.9$, 5.1, H-C(3)); 6.40 (ddd, $J = 15.9$, 7.8, 1.2, H-C(2)); 4.84 (ddd, $J = 6.5$, 5.6, 3.1, H-C(5)); 4.64 (d, $J = 11.5$, PhCH); 4.56 (d, $J = 11.8$, PhCH); 4.49 (d, $J = 11.5$, PhCH); 4.47 (d, $J = 11.8$, PhCH); 4.47–4.44 (m, H-C(4)); 3.74 (dd, $J = 10.9$, 3.1, H-C(6)); 3.63 (dd, $J = 11.2$, 6.5, H-C(6)); 2.99 (s, MsO). ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 75 MHz): 192.53 (d, C(1)); 150.13 (d, C(3)); 136.94, 136.55 (2s); 134.30 (d, C(2)); 128.55 (2d); 128.51 (2d); 128.26 (d); 128.06 (d); 127.95 (2d); 127.84 (2d); 81.05 (d, C(5)); 76.94 (d, C(4)); 73.66, 72.54 (2t, 2 PhCH₂); 68.57 (t, C(6)); 38.57 (q, MsO). HR-ESI-MS: 427.1181 (40, $[M + \text{Na}]^+$, $\text{C}_{27}\text{H}_{24}\text{NaO}_8\text{S}$; calc. 427.1186). Anal. calc. for $\text{C}_{27}\text{H}_{24}\text{O}_8\text{S}$ (404.48): C 62.36, H 5.98, S 7.99; found: C 62.20, H 5.73, S 7.84.

(E)-4,6-Di-O-benzyl-2,3-dideoxy-5-O-(methylsulfonyl)-n-threo-hex-2-enol (8). An ice-cold soln. of 7 (12.06 g, 29.82 mmol) in CH_2Cl_2 (75 ml) and MeOH (300 ml) was treated with NaBH_4 (1.13 g, 29.82 mmol). The mixture was stirred for 5 min, diluted with H_2O (2 ml), and evaporated. A soln. of the residue in CHCl_3 was washed with H_2O . The combined org. layers were dried (Na_2SO_4) and evaporated. Crystallisation from Et₂O gave 8 (11.76 g, 97%). Colourless crystals. R_f (AcOEt/hexane 3:2) 0.24. M.p. 88–89.5°. $[\alpha]_D^{25} = -7.7$ ($c = 2.00$, CHCl_3). IR (KBr): 3434w (br.), 3088w, 3060w, 3037w, 3006w, 2941w, 2924w, 2881w, 2861w, 1666w, 1498w, 1454w, 1397w, 1363s, 1349s, 1277w, 1260w, 1252w, 1238w, 1209w, 1174w, 1143w, 1096w, 1068s, 1038w, 1030w, 1021w, 981s, 968s, 931s. ^1H -NMR (CDCl_3 , 300 MHz): 7.38–7.26 (m, 10 arom. H); 5.99 (dd, $J = 15.6$, 5.3, 0.9, H-C(2)); 5.65 (dd, $J = 15.5$, 7.4, 1.8, H-C(3)); 4.76 (dd, $J = 5.6$, 4.0, H-C(5)); 4.63 (d, $J = 12.0$, PhCH); 4.57 (d, $J = 11.7$, PhCH); 4.47 (d, $J = 12.0$, PhCH); 4.38 (d, $J = 11.7$, PhCH); 4.18–4.14 (m, H-C(4), 2 H-C(1)); 3.73 (dd, $J = 11.2$, 4.2, H-C(6)); 3.69 (dd, $J = 11.2$, 4.1, H-C(6)); 2.97 (s, MsO); 1.80 (br. s, OH). ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 75 MHz): 137.52, 137.32 (2s); 135.29 (d, C(3)); 128.40 (2d); 128.36 (2d); 127.85 (3d); 127.79 (3d); 125.58 (d, C(2)); 83.06 (d, C(5)); 77.89 (d, C(4)); 73.30, 70.97 (2t, 2 PhCH₂); 69.22 (t, C(6)); 62.57 (t, C(1)); 38.67 (q, MsO). HR-ESI-MS: 429.1336 (58, $[M + \text{Na}]^+$, $\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{NaO}_8\text{S}$; calc. 429.1342). Anal. calc. for $\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{O}_8\text{S}$ (406.49): C 62.05, H 6.45, S 7.89; found: C 61.86, H 6.37, S 7.75.

(E)-2-Azido-1,3-di-O-benzyl-2,4,5-trideoxy-n-erythro-hex-4-enol (9). A soln. of NaN_3 (11.28 g, 173.58 mmol) and 8 (11.76 g, 28.93 mmol) in dry DMF (300 ml) was heated to 140° for 6 h, cooled to rt., diluted with H_2O (100 ml), and extracted with Et₂O (2×200 ml). The combined org. layers were dried (Na_2SO_4) and evaporated. FC (silica gel; AcOEt/hexane 3:7) gave 9 (7.26 g, 71%). Colourless oil. R_f (AcOEt/hexane 2:3) 0.22. $[\alpha]_D^{25} = -32.4$ ($c = 2.00$, CHCl_3). IR (CHCl_3): 3446w (br.), 3091w, 3066w, 3014w, 2920w, 2867w, 2102s, 1998w, 1496w, 1454w, 1384w, 1363w, 1311w, 1269w, 1168w, 1092s, 1028w, 978w, 910w. ^1H -NMR (CDCl_3 , 300 MHz): 7.39–7.25 (m, 10 arom. H); 5.92 (dd, $J = 15.6$, 4.8, 0.6, H-C(5)); 5.70 (dd, $J = 15.6$, 8.1, 1.5, H-C(4)); 4.61 (d, $J = 12.0$, PhCH); 4.57 (d, $J = 12.0$, PhCH); 4.51 (d, $J = 12.0$, PhCH); 4.39 (d, $J = 12.0$, PhCH); 4.20 (br. t, $J \approx 5.0$, 2 H-C(6)); 4.01 (ddd, $J = 8.4$, 5.1, 0.6, H-C(3)); 3.69 (ddd, $J = 6.8$, 5.2, 4.1, H-C(2)); 3.65 (dd, $J = 9.9$, 4.2, H-C(1)); 3.59 (dd, $J = 9.9$, 6.8, H-C(1)); 1.59 (t, $J = 5.7$, OH). ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 75 MHz): 137.83, 137.66 (2s); 135.28 (d, C(4)); 128.39 (2d); 128.35 (2d); 127.74 (d); 127.64 (5d); 127.00 (d, C(5)); 78.83 (d,

C(3)); 73.44, 70.61 (2t, 2 PhCH₂); 69.28 (t, C(1)); 64.29 (d, C(2)); 62.68 (q, C(6)). HR-ESI-MS: 376.1626 (100, [M+Na]⁺, C₂₇H₃₇N₃NaO₇; calc. 376.1632). Anal. calc. for C₂₇H₃₇N₃O₇ (353.41): C 67.97, H 6.56, N 11.89; found: C 67.74, H 6.76, N 11.89.

(E)-2-Azido-1,3-di-O-benzyl-2,4,5-trideoxy-6-O-undecyl-D-erythro-hex-4-enitol (10). A suspension of 9 (500 mg, 1.41 mmol) and 60% NaH in oil (101 mg, 3.00 mmol) in dry DMF (10 ml) was stirred for 15 min, treated dropwise with 1-bromoundecane (499 mg, 2.12 mmol), stirred for 12 h, and treated dropwise with MeOH until complete consumption of NaH. After dilution with H₂O, the mixture was extracted with Et₂O (3 × 100 ml). The combined org. layers were dried (Na₂SO₄) and evaporated. FC (silica gel; AcOEt/hexane 1:19) gave 10 (630 mg, 88%). Colourless oil. R_f (AcOEt/hexane 1:9) 0.25. [α]_D²⁵ = -26.7 (c = 2.00, CHCl₃). IR (CHCl₃): 3089w, 3066w, 3022w, 3011w, 2928s, 2856s, 2102s, 1602w, 1496w, 1454w, 1365w, 1310w, 1265w, 1098s, 1072m, 1028w, 976w. ¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): 7.38–7.22 (m, 10 arom. H); 5.85 (dt, J = 15.6, 5.4, H-C(5)); 5.68 (dd, J = 15.6, 7.8, H-C(4)); 4.62 (d, J = 11.7, PhCH); 4.56 (d, J = 12.0, PhCH); 4.51 (d, J = 12.3, PhCH); 4.36 (d, J = 11.7, PhCH); 4.02 (d, J = 4.8, 2 H-C(6)); 3.99 (dd, J = 7.8, 5.4, H-C(3)); 3.69 (ddd, J = 6.8, 5.1, 3.9, H-C(2)); 3.64 (dd, J = 9.6, 4.2, H-C(1)); 3.59 (dd, J = 9.6, 6.9, H'-C(1)); 3.43 (t, J = 6.8, 2 H-C(1)); 1.64–1.53 (m, 2 H-C(2)); 1.38–1.22 (m, 16 H); 0.88 (t, J = 6.6, Me). ¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): 13775, 13761 (2t); 133.18 (d, C(4)); 128.28 (2d); 128.24 (2d); 128.06 (d, C(5)); 12761 (d); 12749 (5d); 78.86 (d, C(3)); 73.35, 70.61 (2t, 2 PhCH₂); 70.46, 70.38 (2t, C(6), C(1)); 69.29 (t, C(1)); 64.27 (d, C(2)); 31.97, 29.81 (2t); 29.69 (3t); 29.99, 29.40, 26.28, 22.76 (4t); 14.22 (q, Me). HR-ESI-MS: 530.3344 (100, [M+Na]⁺, C₃₈H₄₆N₃NaO₇; calc. 530.3353). Anal. calc. for C₃₈H₄₆N₃O₇ (507.71): C 73.34, H 8.95, N 8.28; found: C 73.46, H 8.73, N 8.16.

(E)-2-Amino-1,3-di-O-benzyl-2,4,5-trideoxy-6-O-undecyl-D-erythro-hex-4-enitol (12). A suspension of LiAlH₄ (94 mg, 2.48 mmol) in dry Et₂O (20 ml) was cooled to 0°, treated dropwise with a soln. of 10 (690 mg, 1.24 mmol) in dry Et₂O (10 ml), stirred for 1 h, warmed to r.t., stirred for 6 h, cooled to 0°, and treated dropwise with H₂O (1 ml), br NaOH (2 ml), and H₂O (3 ml). The suspension was filtered through Celite, and the filtrate was extracted with AcOEt (3 × 100 ml). The combined org. layers were dried (Na₂SO₄) and evaporated affording crude 12 (667 mg), which was used for the next step without further purification. IR (CHCl₃): 3379w, 3089w, 3067w, 2951w, 2928s, 2856s, 1602w, 1586w, 1496w, 1465w, 1454w, 1364w, 1264w, 1097s, 1026w, 1014w, 911w. ¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): 7.37–7.23 (m, 10 arom. H); 5.85 (dt, J = 15.6, 5.3, H-C(5)); 5.67 (dd, J = 15.6, 8.1, 1.2, H-C(4)); 4.59 (d, J = 12.0, PhCH); 4.49 (s, PhCH₂); 4.34 (d, J = 12.0, PhCH); 4.02 (dd, J = 5.3, 1.2, 2 H-C(6)); 3.84 (dd, J = 7.8, 6.3, H-C(3)); 3.61 (dd, J = 9.2, 4.1, H-C(1)); 3.49 (dd, J = 9.3, 6.6, H'-C(1)); 3.42 (t, J = 6.7, 2 H-C(1)); 3.13 (q, J = 6.3, 3.9, H-C(2)); 1.89 (br. s, NH₂); 1.65–1.52 (m, 2 H-C(2)); 1.38–1.22 (m, 16 H); 0.88 (t, J = 6.9, Me). ¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): 138.27, 138.15 (2s); 132.62 (d, C(4)); 129.46 (d, C(5)); 128.23 (2d); 128.20 (2d); 127.99 (4d); 127.48, 127.40 (2d); 80.93 (d, C(3)); 73.29, 71.69 (2t, 2 PhCH₂); 70.63, 70.56 (2t, C(6), C(1)); 70.46 (t, C(1)); 54.44 (d, C(2)); 31.97, 29.82 (2t); 29.69 (3t); 29.60, 29.41, 26.30, 22.76 (4t); 14.21 (q, Me). HR-ESI-MS: 482.3623 (100, [M+H]⁺, C₃₀H₄₆NO₇; calc. 482.3629).

(E)-1,3-Di-O-benzyl-2,4,5-trideoxy-2-(octadecanoyl)amino-6-O-undecyl-D-erythro-hex-4-enitol (13). A soln. of crude 12 (667 mg, ca. 1.38 mmol) in dry CH₂Cl₂ (20 ml) was treated with pyridine (0.22 ml, 2.76 mmol) and stearyl chloride (690 mg, 2.08 mmol), stirred at r.t. for 3 h, diluted with H₂O, and extracted with CH₂Cl₂ (3 × 100 ml). The combined org. layers were dried (Na₂SO₄) and evaporated. Residual pyridine was removed by azeotropic distillation with toluene. FC (silica gel; AcOEt/hexane 2:8) gave 13 (744 mg, 80%). White crystalline solid. R_f (AcOEt/hexane 1:4) 0.20. M.p. 90.5–61.5°. [α]_D²⁵ = -20.2 (c = 2.00, CHCl₃). IR (KBr): 3450w (br.), 3306m, 3087w, 3062w, 3033w, 2954s, 2918s, 2850s, 1704w, 1645s, 1541m, 1495w, 1470m, 1453m, 1417w, 1386w, 1374s, 1359w, 1297w, 1255w, 1239w, 1221w, 1205w, 1098m, 1056m, 1026m, 987w, 929w, 901w. ¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): 7.35–7.24 (m, 10 arom. H); 5.79 (dt, J = 15.9, 5.4, H-C(5)); 5.72 (d, J = 9.3, NH); 5.65 (br. dd, J = 15.6, 7.9, H-C(4)); 4.60 (d, J = 12.0, PhCH); 4.49 (d, J = 11.7, PhCH); 4.43 (d, J = 11.7, PhCH); 4.30 (d, J = 12.0, PhCH); 4.25 (dd, J = 9.0, 7.2, 4.2, H-C(2)); 3.97 (br. d, J = 5.4, 2 H-C(6)); 3.96 (t, J = 7.5, H-C(3)); 3.80 (dd, J = 9.9, 4.5, H-C(1)); 3.53 (dd, J = 9.6, 3.9, H'-C(1)); 3.45–3.33 (AB, 2 H-C(1)); 2.15–1.99 (AB, 2 H-C(2)); 1.64–1.48 (m, 2 H-C(2'), 2 H-C(3'')); 1.38–1.22 (m, 44 H); 0.88 (t, J = 7.0, 2 Me). ¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): 172.38 (s, C(1'')); 138.15, 137.97 (2s); 132.26 (d, C(4)); 129.95 (d, C(5)); 128.29 (2d); 128.27 (2d); 127.72 (2d); 127.65 (3d); 127.52 (d); 78.95 (d, C(3)); 73.13, 70.66 (2t, 2 PhCH₂); 70.61, 70.55 (2t, C(6), C(1)); 68.41 (q, C(1)); 51.51 (d, C(2)); 37.05 (t); 32.04 (2t); 29.90 (t); 29.83–29.76 (several t); 29.68, 29.65, 29.52 (3t); 29.48 (2t); 29.43, 26.36, 25.85 (3t); 22.83 (2t); 14.28 (q, 2 Me). HR-MALDI-MS: 770.6056 (100, [M+Na]⁺, C₄₆H₆₆NNaO₇; calc. 770.6058). Anal. calc. for C₄₆H₆₆NO₇ (748.17): C 78.66, H 10.91, N 1.87; found: C 78.81, H 11.07, N 1.75.

(E)-2,4,5-Trideoxy-2-(octadecanoyl)amino-6-O-undecyl-D-erythro-hex-4-enitol (2). A soln. of 13 (300 mg, 0.40 mmol) in dry ClCH₂CH₂Cl (20 ml), was treated with anisole (518 mg, 4.80 mmol) and AlCl₃ (400 mg, 3.60 mmol), stirred at 60° for 18 h, cooled to 0°, treated dropwise with 10% aq. HCl (3 ml), and

extracted with AcOEt (5 × 100 ml). The combined org. layers were dried (Na₂SO₄), evaporated, and purified by FC (silica gel; MeOH/CH₂Cl₂ 2:8) to give **2** (166 mg, 73%). White crystals. *R*_f (AcOEt) 0.26. Mp. 84–87°. $[\alpha]_D^{25} = -2.3$ (*c* = 2.00, CHCl₃). IR (KBr): 3367*m*, 3284*s*, 3081*w*, 2954*s*, 2919*s*, 2849*s*, 2797*m*, 1639*s*, 1551*s*, 1466*m*, 1416*w*, 1370*m*, 1340*w*, 1276*w*, 1204*w*, 1136*m*, 1118*w*, 1094*m*, 1057*m*, 1039*w*, 985*w*, 961*w*, 894*w*. ¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): 6.33 (*d*, *J* = 7.5, NH); 5.91 (*br. dt*, *J* = 15.6, 5.1, H-C(5)); 5.79 (*br. dd*, *J* = 15.6, 5.3, H-C(4)); 4.38 (*br. q*, *J* ≈ 4.0, addn. of D₂O → *br. t*, *J* ≈ 4.0, H-C(3)); 3.98 (*d*, *J* = 5.4, 2 H-C(6)); 3.96–3.88 (*m*, addn. of D₂O → change, H-C(1), H-C(2)); 3.74–3.65 (*m*, addn. of D₂O → change, H-C(1)); 3.41 (*q*, *J* = 6.6, 2 H-C(7)); 3.26 (*d*, *J* = 5.4, exchange with D₂O, HO-C(3)); 2.97 (*dd*, *J* = 7.2, 3.6, exchange with D₂O, HO-C(1)); 2.22 (*t*, *J* = 7.6, 2 H-C(2'')); 1.66–1.50 (*m*, 2 H-C(2''), 2 H-C(3'')); 1.38–1.28 (*m*, 44 H); 0.87 (*t*, *J* ≈ 6.8, 2 Me). ¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): 174.17 (*s*, C(1'')); 131.55 (*d*, C(4)); 129.58 (*d*, C(5)); 74.19 (*d*, C(3)); 71.08 (*t*, C(6)); 70.67 (*t*, C(7)); 62.45 (*t*, C(1)); 54.28 (*d*, C(2)); 37.00 (*t*); 32.10 (*2r*); 29.96–29.68 (*several t*); 29.54 (*2r*); 29.48, 26.35, 25.93 (*3t*); 22.87 (*2t*); 14.30 (*q*, 2 Me). HR-MALDI-MS: 590.5113 (100, [M + Na]⁺, C₂₉H₄₈NNaO₇); calc. 590.5119. Anal. calc. for C₂₉H₄₈NO₇ (567.98): C 74.02, H 12.25, N 2.47; found: C 73.99, H 11.98, N 2.45.

(*E*)-2-*Azido-2,4,5-trideoxy-6-O-undecyl-D-erythro-hex-4-enitol* (**11**). A soln. of **10** (475 mg, 0.977 mmol) in CH₂Cl₂ (20 ml) was treated with anisole (810 mg, 7.49 mmol) and AlCl₃ (749 mg, 5.62 mmol), stirred for 18 h, cooled to 0°, treated dropwise with 10% aq. HCl (3 ml), and extracted with AcOEt (5 × 100 ml). The combined org. layers were dried (Na₂SO₄) and evaporated. FC (silica gel; AcOEt/hexane 1:1) gave **11** (200 mg, 65%). Colourless oil. *R*_f (AcOEt/hexane 3:2) 0.33. $[\alpha]_D^{25} = -17.2$ (*c* = 0.84, CHCl₃). IR (CHCl₃): 3336*w* (*br.*), 2923*s*, 2853*s*, 2096*s*, 1465*w*, 1365*w*, 1266*m*, 1110*m*, 1064*m*, 1012*m*, 972*m*, 852*w*. ¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): 5.94 (*br. dt*, *J* = 16.2, 5.4, H-C(5)); 5.81 (*ddt*, *J* = 15.6, 6.6, 1.3, H-C(4)); 4.34 (*br. q*, *J* = 4.5, H-C(3)); 3.99 (*d*, *J* = 5.1, 2 H-C(6)); 3.82 (*t*, *J* ≈ 5.4, 2 H-C(1)); 3.52 (*q*, *J* = 5.1, H-C(2)); 3.43 (*t*, *J* = 6.8, 2 H-C(1'')); 2.34 (*d*, *J* = 4.2, exchange with D₂O, HO-C(3)); 2.19 (*t*, *J* ≈ 5.8, exchange with D₂O, HO-C(1)); 1.66–1.50 (*m*, 2 H-C(2'')); 1.38–1.20 (*m*, 16 H); 0.88 (*t*, *J* ≈ 6.8, Me). ¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): 130.79 (*d*, C(4)); 130.27 (*d*, C(5)); 72.98 (*d*, C(3)); 71.00 (*t*, C(6)); 70.41 (*t*, C(1'')); 66.40 (*d*, C(2'')); 62.47 (*t*, C(1)); 32.02, 29.79 (*2r*); 29.74 (*3t*); 29.62, 29.45, 26.27, 22.82 (*4t*); 14.27 (*q*, Me). HR-ESI-MS: 350.2405 (67, [M + Na]⁺, C₂₉H₄₈N₃NaO₇); calc. 350.2414. Anal. calc. for C₂₉H₄₈N₃O₇ (327.46): C 62.35, H 10.16, N 12.83; found: C 62.60, H 10.24, N 12.55.

(*E*)-2-*Amino-2,4,5-trideoxy-6-O-undecyl-D-erythro-hex-4-enitol* (**1**). A soln. of **11** (190 mg, 0.58 mmol) in dry THF (15 ml) was treated with *tert*-Bu₃P (2.9 ml, 2.9 mmol), stirred for 16 h, treated with aq. *tert*-BuOH (5.8 ml, 5.8 mmol), stirred for 2 h, and evaporated. A soln. of the residue in H₂O was extracted with AcOEt (5 × 100 ml). The combined org. layers were dried (Na₂SO₄) and evaporated. FC (silica gel; AcOEt/hexane 1:1) gave **1** (130 mg, 74%). White crystals. *R*_f (MeOH/CH₂Cl₂ 1:4) 0.12. Mp. 52–57°. $[\alpha]_D^{25} = +3.5$ (*c* = 1.00, CHCl₃). IR (CHCl₃): 3352*w* (*br.*), 3301*w* (*br.*), 2955*m*, 2922*s*, 2852*s*, 1587*w*, 1466*w*, 1364*w*, 1261*w*, 1105*w*, 1042*m*, 972*m*. ¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): 5.89 (*br. dt*, *J* = 15.9, 5.7, H-C(5)); 5.76 (*br. dd*, *J* = 15.6, 6.3, H-C(4)); 4.14 (*br. t*, *J* ≈ 5.7, H-C(3)); 3.98 (*br. d*, *J* = 5.1, 2 H-C(6)); 3.71–3.61 (*AB*, 2 H-C(1)); 3.42 (*dd*, *J* = 6.8, 0.9, 2 H-C(1'')); 2.90 (*quint*, *J* ≈ 5.1, H-C(2'')); 2.25–1.82 (2 *br. s*, exchange with D₂O, NH₂, 2 OH); 1.63–1.50 (*m*, 2 H-C(2'')); 1.38–1.16 (*m*, 16 H); 0.88 (*t*, *J* ≈ 6.8, Me). ¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): 132.24 (*d*, C(4)); 129.70 (*d*, C(5)); 74.59 (*d*, C(3)); 71.09 (*t*, C(6)); 70.79 (*t*, C(1'')); 63.84 (*t*, C(1)); 56.16 (*d*, C(2)); 32.08, 29.87 (*2r*); 29.80 (*3r*); 29.69, 29.52, 26.34, 22.86 (*4t*); 14.27 (*q*, Me). HR-ESI-MS: 302.2685 (100, [M + H]⁺, C₂₉H₄₈NO₇); calc. 302.2690.

(*E*)-1,3-*Di-O-benzyl-2,4,5-trideoxy-2-(octadecanethioyl)aminol-6-O-undecyl-D-erythro-hex-4-enitol* (**14**). A mixture of **13** (100 mg, 0.13 mmol) and Lawesson's reagent (38 mg, 0.09 mmol) in toluene was stirred for 90 min at 75° and then evaporated. The residue was diluted with H₂O (20 ml) and extracted with CH₂Cl₂ (2 × 50 ml). The combined org. layers were washed with sat. NaHCO₃ soln. and brine, dried (Na₂SO₄), and evaporated. FC (silica gel; AcOEt/hexane 1:9) gave **14** (86 mg, 84%). Colourless oil. *R*_f (AcOEt/hexane 1:9) 0.15. $[\alpha]_D^{25} = -26.6$ (*c* = 2.00, CHCl₃). IR (CHCl₃): 3387*w*, 3089*w*, 3066*w*, 3017*w*, 2927*s*, 2855*s*, 1601*w*, 1513*w*, 1465*w*, 1455*w*, 1405*w*, 1364*w*, 1263*w*, 1217*m*, 1097*m*, 1028*w*, 974*w*. ¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): 7.39 (*d*, *J* = 9.0, NH); 7.35–7.24 (*m*, 10 arom. H); 5.85 (*br. dt*, *J* = 15.9, 5.2, H-C(5)); 5.73 (*br. dd*, *J* = 15.9, 7.5, H-C(4)); 4.96 (*ddt*, *J* = 9.0, 6.2, 4.4, H-C(2)); 4.62 (*d*, *J* = 11.8, PhCH); 4.50 (*d*, *J* = 11.8, PhCH); 4.45 (*d*, *J* = 11.8, PhCH); 4.30 (*d*, *J* = 11.8, PhCH); 4.19 (*br. t*, *J* ≈ 6.9, H-C(3)); 3.97 (*br. d*, *J* = 5.0, 2 H-C(6)); 3.86 (*dd*, *J* = 10.0, 4.4, H-C(1)); 3.67 (*dd*, *J* = 10.0, 4.4, H-C(1)); 3.45–3.35 (*AB*, *J* = 6.6, 1.7, 2 H-C(7)); 2.60–2.46 (*AB*, 2 H-C(2'')); 1.73–1.61 (*m*, 2 H-C(3'')); 1.60–1.51 (*m*, 2 H-C(2'')); 1.35–1.21 (*m*, 44 H); 0.88 (*t*, *J* = 6.6, 2 Me). ¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): 205.79 (*s*, C(1'')); 138.27, 138.07 (*2s*); 132.64 (*d*, C(4)); 129.29 (*d*, C(5)); 128.60 (*4d*); 128.01 (*3d*); 127.97 (*3d*); 127.90 (*d*); 78.32 (*d*, C(3)); 73.33, 70.94 (*2r*, 2 PhCH₂); 70.84, 70.71 (*2r*, C(6), C(1'')); 67.18 (*t*, C(1)); 57.55 (*d*, C(2)); 47.82 (*t*, C(2'')); 32.12 (*2r*); 29.98–29.55 (*several t*); 29.10, 26.43 (*2r*); 22.89

(2r); 14.33 (q, 2 Me). HR-MALDI-MS: 786.5840 (100, $[M+Na]^+$, $C_{40}H_{62}NNaO_5S^+$; calc. 786.5829). Anal. calc. for $C_{40}H_{62}NO_5S$ (764.24): C 77.01, H 10.68, N 1.83; found: C 77.01, H 10.85, N 1.99.

(E)-2,4,5-Trideoxy-2-((octaloxanethioyl)amino)-6-O-undecyl-D-erythro-hex-4-enitol (3). A soln. of 14 (86 mg, 0.11 mmol) in CH_2Cl_2 (10 ml) was treated with anisole (90 mg, 0.68 mmol) and $AlCl_3$ (97 mg, 0.90 mmol), stirred at r.t. for 16 h, cooled to 0°, treated with 10% aq. HCl (1 ml), diluted with H_2O and extracted with CH_2Cl_2 (3 × 100 ml). The combined org. layers were dried (Na_2SO_4) and evaporated. FC (silica gel; AcOEt/hexane 1:1) gave 3 (46 mg, 70%). White solid. M.p. 73–75°. R_f (AcOEt) 0.63. $[\alpha]_D^{25} = -4.4$ (c = 0.63, $CHCl_3$). IR (KBr): 3214w, 3054w, 2955w, 2918s, 2850s, 1545w, 1467w, 1409w, 1366w, 1244w, 1172w, 1114w, 1096w, 1073w, 1037w, 1024w, 1004w, 974w. 1H -NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): 8.07 (d, J = 7.2, NH); 5.99 (br. dt, J = 15.6, 5.4, H-C(5)); 5.87 (br. dd, J = 15.6, 5.0, H-C(4)); 4.74–4.66 (m, H-C(3)); 4.64–4.56 (m, H-C(2)); 4.13 (dd, J = 11.6, 2.0, H-C(1)); 4.01 (d, J = 5.4, 2 H-C(6)); 3.83 (br. d, J = 10.5, H-C(1)); 3.43 (t, J = 6.8, 2 H-C(7)); 2.71 (t, J = 7.2, 2 H-C(2')); 2.56 (br. s, exchange with D_2O , OH); 1.86–1.72 (m, 2 H-C(3')); 1.66–1.52 (m, 2 H-C(2'), OH); 1.38–1.22 (m, 44 H); 0.88 (t, J = 6.5, 2 Me). ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 75 MHz): 206.23 (s, C(1')); 131.01 (d, C(4)); 129.77 (d, C(5)); 73.90 (d, C(3)); 71.16 (t, C(6)); 70.55 (t, C(1)); 61.13 (t, C(1)); 58.29 (d, C(2)); 47.65 (t, C(2')); 32.10 (2t); 29.88–29.54 (several t); 29.10, 26.35 (2t); 22.87 (2t); 14.30 (q, 2 Me). HR-MALDI-MS: 606.4883 (100, $[M+Na]^+$, $C_{39}H_{59}NNaO_5S^+$; calc. 606.4890). Anal. calc. for $C_{39}H_{59}NO_5S$ (583.49): C 71.98, H 11.91, N 2.40, S 5.49; found: C 71.90, H 11.98, N 2.45, S 5.31.

(E)-1,3-Di-O-benzyl-2,4,5-trideoxy-2-((2-nitrophenyl)sulfonyl)amino)-6-O-undecyl-D-erythro-hex-4-enitol (15). A soln. of 12 (250 mg, 0.52 mmol) in dry CH_2Cl_2 (20 ml) was treated with $NaCl$ (126 mg, 0.57 mmol) and Et_3N (0.09 ml, 0.62 mmol), stirred for 16 h at r.t., diluted with H_2O and extracted with CH_2Cl_2 (3 × 100 ml). The combined org. layers were dried (Na_2SO_4) and evaporated. FC (silica gel; AcOEt/hexane 2:8) gave 15 (300 mg, 87%). Yellow oil. R_f (AcOEt/hexane 1:4) 0.18. $[\alpha]_D^{25} = -4.7$ (c = 2.00, $CHCl_3$). IR ($CHCl_3$): 3382w, 3089w, 3066w, 3029w, 3018w, 2928s, 2856s, 1596w, 1541s, 1496w, 1454w, 1442w, 1418w, 1357s, 1263w, 1217w, 1168w, 1098s, 1027w, 1017w, 855w. 1H -NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): 8.03 (dd, J = 7.3, 1.8, H-C(2')); 7.63 (dd, J = 7.2, 2.1, H-C(6')); 7.51 (q, J = 7.3, 1.8, H-C(4')); 7.46 (td, J = 7.2, 1.8, H-C(5')); 7.32–7.25 (m, 6 arom. H); 7.17–7.10 (m, 4 arom. H); 5.83 (br. dt, J = 15.0, 6.3, H-C(5)); 5.82 (d, J = 8.7, NH); 5.59 (ddd, J = 15.6, 7.2, 1.1, H-C(4)); 4.43 (d, J = 11.1, PhCH); 4.30 (br. s, PhCH₂); 4.19 (d, J = 11.7, PhCH); 4.08 (br. t, J = 6.1, H-C(3)); 3.95 (dd, J = 4.8, 0.8, 2 H-C(6)); 3.75 (dq, J = 8.0, 5.6, H-C(2)); 3.64 (dd, J = 9.9, 5.7, H-C(1)); 3.41 (dd, J = 9.8, 5.7, H-C(1)); 3.40 (t, J = 6.8, 2 H-C(1')); 1.63–1.53 (m, 2 H-C(2')); 1.37–1.22 (m, 16 H); 0.88 (t, J = 6.9, Me). ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 75 MHz): 14756 (s, C(2')); 13764, 13741 (2s); 134.79 (s, C(1')); 132.98, 132.74, 132.42 (3d, C(4'), C(5'), C(4)); 130.56 (d, C(5)); 128.25 (4d); 127.73 (4d); 127.67, 127.58 (2d); 127.42 (d, C(6')); 125.16 (d, C(3')); 78.84 (d, C(3)); 73.32, 70.94 (2s, 2 PhCH₂); 70.75 (t, C(6)); 70.37 (t, C(1')); 69.06 (t, C(1)); 57.89 (d, C(2)); 32.03, 29.87 (2t); 29.75 (3t); 29.66, 29.46, 26.33, 22.83 (4t); 14.27 (q, Me). HR-ESI-MS: 689.3240 (100, $[M+Na]^+$, $C_{39}H_{59}N_2NaO_5S^+$; calc. 689.3231). Anal. calc. for $C_{39}H_{59}N_2O_5S$ (666.87): C 66.64, H 7.56, N 4.20; found: C 66.83, H 7.66, N 4.18.

(E)-1,3-Di-O-benzyl-2,4,5-trideoxy-2-((2-nitrophenyl)sulfonyl)met(hyl)amino)-6-O-undecyl-D-erythro-hex-4-enitol (16). A soln. of 15 (300 mg, 0.45 mmol) in dry DMF (10 ml) was treated with K_2CO_3 (124 mg, 0.90 mmol), heated to 60°, stirred for 5 min, treated with MeI (0.05 ml, 0.90 mmol), stirred for 1 h, cooled to r.t., diluted with H_2O and extracted with Et_2O (4 × 50 ml). The combined org. layers were dried (Na_2SO_4) and evaporated. FC (silica gel; AcOEt/hexane 2:8) gave 16 (306 mg, 100%). Yellow oil. R_f (AcOEt/hexane 1:4) 0.18. $[\alpha]_D^{25} = -9.7$ (c = 2.00, $CHCl_3$). IR ($CHCl_3$): 3089w, 3066w, 3031w, 3011w, 2928s, 2856s, 1594w, 1541s, 1496w, 1465w, 1455w, 1441w, 1371w, 1330w, 1265w, 1217w, 1157w, 1102w, 1059w, 1027w, 984w, 911w. 1H -NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): 7.98 (d, J = 8.1, H-C(2')); 7.43 (d, J = 3.9, 2 arom. H); 7.35–7.23 (m, 9 arom. H); 7.14–7.09 (m, 2 arom. H); 5.85 (br. dt, J = 15.6, 5.4, H-C(5)); 5.65 (br. dd, J = 15.6, 7.5, H-C(4)); 4.57 (d, J = 11.4, PhCH); 4.34 (d, J = 11.4, PhCH); 4.30 (d, J = 11.7, PhCH); 4.26 (d, J = 11.7, PhCH); 4.19 (ddd, J = 7.8, 6.0, 4.2, H-C(2)); 4.13 (t, J = 6.8, H-C(3)); 4.03–3.91 (AB, 2 H-C(6)); 3.76 (dd, J = 10.5, 7.5, H-C(1)); 3.74 (dd, J = 10.8, 4.5, H-C(1)); 3.41 (t, J = 6.6, 2 H-C(1')); 2.97 (s, MeN); 1.64–1.53 (m, 2 H-C(2')); 1.37–1.22 (m, 16 H); 0.88 (q, J = 6.9, Me). ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 75 MHz): 147.97 (s, C(2')); 137.78, 137.57 (2s); 133.27 (s, C(1')); 132.64, 132.51, 130.98, 130.81 (4d, C(4'), C(5'), C(4), C(5)); 128.95 (d, C(6')); 128.32 (2d); 128.23 (2d); 127.83 (2d); 127.68 (2d); 127.62 (d); 127.59 (d); 123.54 (d, C(3')); 80.65 (d, C(3)); 73.27, 71.06 (2t, 2 PhCH₂); 70.69 (t, C(6)); 70.43 (t, C(1')); 66.78 (t, C(1)); 60.41 (d, C(2)); 32.03, 31.71 (2t); 31.17 (q, MeN); 29.87 (t); 29.75 (2t); 29.66, 29.46, 26.33, 22.82 (4t); 14.27 (q, Me). HR-ESI-MS: 703.3390 (100, $[M+Na]^+$, $C_{39}H_{59}N_2NaO_5S^+$; calc. 703.3387). Anal. calc. for $C_{39}H_{59}N_2O_5S$ (680.89): C 67.03, H 7.70, N 4.11; found: C 67.23, H 7.73, N 4.10.

(E)-1,3-Di-O-benzyl-2,4,5-trideoxy-2-(methylanino)-6-O-undecyl-D-erythro-hex-4-enitol (17). A mixture of 16 (306 mg, 0.45 mmol) and 5.0w aq. KOH soln. (0.45 ml, 2.25 mmol) in dry MeCN was heated to 60°, treated with PhSH (0.23 ml, 2.25 mmol), stirred for 48 h, cooled to r.t., and evaporated. An emulsion of the residue in

H₂O was extracted with AcOEt (4 × 50 ml). The combined org. layers were dried (Na₂SO₄) and evaporated. FC (silica gel; MeOH/CH₂Cl₂ 1:49) gave 17 (212 mg, 95%). Colourless oil. *R*_f (MeOH/CH₂Cl₂ 1:19) 0.20. $[\alpha]_D^{25} = -5.6$ (*c* = 2.00, CHCl₃). IR (CHCl₃): 3390w (br.), 3089w, 3066w, 3031w, 3009w, 2928x, 2856x, 2802w, 1599w, 1541x, 1496w, 1463w, 1454w, 1365w, 1263w, 1097x, 1027w, 978w, 911w. ¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): 7.36–7.24 (m, 10 arom. H); 5.83 (br. dt, *J* = 15.6, 5.3, H–C(5)); 5.70 (br. dd, *J* = 15.6, 7.6, H–C(4)); 4.60 (d, *J* = 11.7, PhCH); 4.53 (d, *J* = 12.0, PhCH); 4.47 (d, *J* = 12.0, PhCH); 4.37 (d, *J* = 11.7, PhCH); 4.06 (br. dd, *J* = 7.8, 5.0, H–C(3)); 4.00 (br. d, *J* = 5.3, 2 H–C(6)); 3.61 (dd, *J* = 9.7, 5.6, H–C(1)); 3.57 (dd, *J* = 9.7, 5.3, H'–C(1)); 3.42 (t, *J* ≈ 6.7, 2 H–C(1')); 2.88 (q, *J* ≈ 5.3, H–C(2)); 2.76 (br. s, NH); 2.45 (s, MeN); 1.63–1.54 (m, 2 H–C(2')); 1.38–1.22 (m, 16 H); 0.88 (t, *J* = 6.9, Me). ¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): 138.25, 138.06 (2x); 132.14 (d, C(4)); 129.42 (d, C(5)); 128.22 (2d); 128.19 (2d); 127.64 (2d); 127.59 (2d); 127.50, 127.38 (2d); 79.05 (d, C(3)); 73.28, 70.63 (2t, 2 PhCH₂); 70.57, 70.51 (2t, C(6), C(1')); 68.48 (t, C(1)); 62.91 (d, C(2)); 34.70 (q, MeN); 31.98, 29.84 (2t); 29.71 (3t); 29.62, 29.42, 26.31, 22.78 (4t); 14.24 (q, Me). HR-ESI-MS: 496.3779 (100, [M+H]⁺, C₂₃H₂₆NO₄); calc. 496.3785). Anal. calc. for C₂₃H₂₆NO₄ (495.74): C 77.53, H 9.96, N 2.83; found: C 77.49, H 9.95, N 2.96.

(*E*)-1,3-Di-*O*-benzyl-2,4,5-trideoxy-2-(*o*-octadecanoyl)(methylamino)-6-*O*-undecyl-D-erythro-hex-4-enitol (18). A soln. of 17 (212 mg, 0.43 mmol) in dry CH₂Cl₂ (10 ml) was treated with pyridine (0.05 ml, 0.65 mmol) and stearyl chloride (0.19 ml, 0.56 mmol) at r.t. for 3 h, diluted with H₂O, and extracted with CH₂Cl₂ (3 × 100 ml). The combined org. layers were dried (Na₂SO₄) and evaporated. Residual pyridine was removed by azeotropic distillation with toluene. FC (silica gel; AcOEt/hexane 2:8) gave 18 (302 mg, 92%). Colourless oil. *R*_f (AcOEt/hexane 1:4) 0.20. $[\alpha]_D^{25} = -25.0$ (*c* = 2.00, CHCl₃). IR (CHCl₃): 3448w, 3087w, 3066w, 3015w, 2927x, 2855x, 1630w, 1494w, 1465w, 1455w, 1405w, 1364w, 1308w, 1218w, 1100w, 1071w, 1028w, 975w, 907w. ¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz, 2:1 mixture of diastereoisomers): 7.36–7.22 (m, 10 arom. H); 5.82 (br. dt, *J* = 15.6, 5.3, 0.37 H), 5.79 (dt, *J* = 15.6, 5.3, 0.63 H) (H–C(5)); 5.61 (br. dd, *J* = 15.6, 8.3, 0.63 H), 5.57 (dd, *J* = 15.6, 8.3, 0.37 H) (H–C(4)); 4.70–4.60 (br. s, 0.63 H–C(2)); 4.59 (d, *J* = 11.7, 0.37 H), 4.57 (d, *J* = 11.7, 0.63 H) (PhCH); 4.52 (d, *J* = 12.3, PhCH); 4.45 (d, *J* = 11.4, 0.37 H), 4.41 (d, *J* = 12.0, 0.63 H) (PhCH); 4.28 (d, *J* = 12.0, PhCH); 4.07 (t, *J* = 8.1, 0.63 H), 4.06 (t, *J* ≈ 8.1, 0.37 H) (H–C(3)); 4.00–3.93 (AB, 2 H–C(6)); 3.88 (dd, *J* = 9.6, 8.4, 0.63, H–C(1)); 3.90–3.87 (m, 0.37 H–C(2)); 3.78 (dd, *J* ≈ 10.2, 3.3, 0.37 H), 3.75 (dd, *J* ≈ 10.8, 3.6, 0.63 H) (H–C(1)); 3.64 (dd, *J* = 10.2, 8.4, 0.37 H'–C(1)); 3.43–3.32 (AB, 2 H–C(1')); 2.91 (s, 1.89 H), 2.75 (s, 1.11 H) (MeN); 2.46–2.32 (m, 0.63 H), 2.32–2.15 (m, 1.37 H) (2 H–C(2')); 1.74–1.50 (m, 2 H–C(2'), 2 H–C(3')); 1.36–1.22 (m, 44 H); 0.88 (t, *J* ≈ 6.5, 2 Me). ¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz, 2:1 mixture of diastereoisomers): signals of major isomer: 173.74 (s, C(1')); 138.22, 138.12 (2x); 131.79 (d, C(4)); 130.21 (d, C(5)); 128.48–127.31 (several d); 78.77 (d, C(3)); 72.74 (t, PhCH₂); 70.67, 70.53, 70.41 (3t, PhCH₂, C(6), C(1')); 67.66 (t, C(1)); 58.20 (br. d, C(2)); 34.10 (t); 31.99 (2t); 29.90–29.10 (several t); 28.62 (q, MeN); 26.32, 25.15 (2t); 22.77 (2t); 14.21 (q, 2 Me); signals of minor isomer: 173.91 (s, C(1')); 137.87, 137.57 (2x); 132.75 (d, C(4)); 130.21 (d, C(5)); 128.48–127.31 (several d); 78.67 (d, C(3)); 73.21, 70.75 (2t, 2 PhCH₂); 70.67 (t, C(6)); 70.22 (t, C(1)); 67.72 (t, C(1)); 60.39 (d, C(2)); 33.71 (t); 31.97 (2t); 29.90–29.10 (several t); 29.21 (q, MeN); 26.32, 25.48 (2t); 22.77 (2t); 14.21 (q, 2 Me). HR-MALDI-MS: 784.6205 (100, [M+Na]⁺, C₃₈H₅₀NNaO₄); calc. 784.6214). Anal. calc. for C₃₈H₅₀NO₄ (762.20): C 78.79, H 10.98, N 1.84; found: C 78.88, H 11.06, N 2.07.

(*E*)-2,4,5-Trideoxy-2-(*o*-octadecanoyl)(methylamino)-6-*O*-undecyl-D-erythro-hex-4-enitol (4). A soln. of 18 (302 mg, 0.40 mmol) in CCl₄/CH₂Cl₂ (20 ml) was treated with anisole (0.52 ml, 4.80 mmol) and AlCl₃ (480 mg, 3.6 mmol), stirred at 60° for 18 h, cooled to 0°, treated dropwise with 10% aq. HCl (3 ml), diluted with H₂O, and extracted with AcOEt (3 × 100 ml). The combined org. layers were dried (Na₂SO₄) and evaporated. FC (silica gel; MeOH/CH₂Cl₂ 2:8) gave 4 (172 mg, 74%). White solid. *R*_f (AcOEt) 0.24. $[\alpha]_D^{25} = +3.0$ (*c* = 1.00, CHCl₃). IR (KBr): 3391w, 2956x, 2918x, 2850x, 1712w, 1607x, 1468w, 1408w, 1374w, 1268w, 1115w, 1088w, 1025w, 1000w, 970w. ¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz 7:1 mixture of diastereoisomers): 5.85 (br. dt, *J* = 15.6, 5.0, H–C(5)); 5.76 (br. dd, *J* = 15.6, 6.0, H–C(4)); 4.59 (br. t, *J* ≈ 6.3, 0.87 H), 4.40–4.32 (m, 0.13 H) (H–C(3)); 4.07–3.89 (m, 2 H–C(1)); 3.95 (d, *J* = 4.5, 2 H–C(6)); 3.66 (br. dd, *J* ≈ 6.5, 3.8, H–C(2)); 3.57 (d, *J* = 3.0, exchange with D₂O, HO–C(3)); 3.57–3.50 (br. s, exchange with D₂O, HO–C(1)); 3.40 (t, *J* ≈ 6.8, 2 H–C(1')); 3.02 (s, 2.61 H), 2.82 (s, 0.39 H) (MeN); 2.30 (t, *J* ≈ 7.8, 2 H–C(2')); 1.65–1.50 (m, 2 H–C(2'), 2 H–C(3')); 1.36–1.22 (m, 44 H); 0.88 (t, *J* ≈ 6.8, 2 Me). ¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz 7:1 mixture of diastereoisomers): signals of major isomer: 175.10 (s, C(1')); 132.10 (d, C(4)); 129.33 (d, C(5)); 71.38 (d, C(3)); 70.70 (t, C(6)); 70.53 (t, C(1')); 64.91 (t, C(1)); 61.51 (d, C(2)); 36.30 (q, MeN); 34.52 (t); 31.98 (2t); 29.80–29.35 (several t); 26.27, 25.05 (2t); 22.75 (2t); 14.20 (q, 2 Me); signals of minor isomer: 174.02 (s, C(1')); 131.34 (d, C(4)); 130.09 (d, C(5)); 72.23 (d, C(3)); 70.92 (t, C(6)); 70.26 (t, C(1)); 62.21 (t, C(1)); 62.02 (d, C(2)); 33.79 (t); 31.98 (2t); 29.80–29.35 (several t); 28.58 (q, MeN); 26.27, 25.46 (2t); 22.75 (2t); 14.20 (q, 2 Me). HR-MALDI-MS: 604.5267 (100, [M+Na]⁺, C₂₆H₃₈NNaO₄); calc. 604.5275). Anal. calc. for C₂₆H₃₈NO₄ (581.95): C 74.30, H 12.30, N 2.41; found: C 74.03, H 12.24, N 2.42.

2. Biological Tests. – Materials and Methods. Cell Lines. The SK-N-BE human neuroblastoma cell lines were obtained from the *European Collection of Cell Cultures* (ECACC; England) and cultured in 50% *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) and 50% F-12 supplemented with 10% foetal bovine serum, 2 mmol/l L-glutamine, penicillin (100 µg/ml), and streptomycin (100 µg/ml). The 32d mouse promyelocytic cell line was obtained from ECACC and cultured in *Iscove's modified Dulbecco's medium* supplemented with 10% foetal bovine serum, 2 mmol/l L-glutamine, penicillin (100 µg/ml), and streptomycin (100 µg/ml).

Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT) Assay. Experiments were performed in *Locke's soln.* (134 mmol/l NaCl, 5 mmol/l KCl, 4 mmol/l NaHCO₃, 10 mmol/l HEPES (pH 7.6), 2.3 mmol/l CaCl₂, 1 mmol/l MgCl₂, 5 mmol/l sucrose) with a final MTT (1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenylformazan) concentration of 250 µg/ml. Cells were washed twice with *Locke's soln.* and then grown for 1 h with MTT at 37. Reactions were then stopped, and the crystals were solubilised in 1-ProH/HCl before being read at 570 nm in a spectrophotometer [32].

Nuclear DNA Staining. For fluorescence-microscopy analysis of DNA integrity, SK-N-BE or 32d cells (cytospun with a *Shannon* cytocentrifuge, Shannon, USA) were plated on 12-mm glass cover slips and maintained for 24 h with different sphingosine or ceramide analogues at different concentrations. Bisbenzimidide (*Hoechst 33258; Roche Diagnostic Sp.A, Milan, Italy*) DNA staining was used to detect nuclear condensation as apoptotic marker. Briefly, cells were washed once in PBS and fixed with a soln. of paraformaldehyde 4% for 30 min at 4°. Cells were permeabilised with PBS/TRITON X-100 0.1% for 5 min. Following PBS washing, cells were stained with a soln. (0.8 mg/ml) of bisbenzimidide in PBS (2 mg/ml in water) for 30 min at 37°. Cells were washed twice with H₂O, and mounted onto a cover slip to be visualised with a UV filter (360/395 nm) [35].

Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). Total RNA was isolated from cells using *TRI REAGENT* (Sigma), and cDNA was made using the *Stratagript* amplification system (*Stratagene*) according to the manufacturer's protocol. PCR using specific primers for CERK was carried out in a volume of 25 µl of the reaction mixture supplemented with 10 × reaction buffer, 0.5 mM of each dNTP, 1.5 mM MgCl₂, and 0.5 µl of Taq polymerase. Three µg of template and 0.5 µM of each primer were used. Samples were amplified with an initial denaturation at 94° for 2 min, followed by 30 cycles of denaturation at 94° for 30 s, annealing at 56° for 30 s, and extension at 72° for 1 min.

Primer sequences (all 5' → 3') were: CERKshort forward GTTTCTGGCCATCAATGCCAC, CERKshort reverse CTGGCAGTGGACTCTGACCTC; CERKlong forward TGTCACTTGTGGCTGCAGACC, CERKlong reverse GTTTGTGGCATTGATGGCCAG. The amplification of a single-size product was further verified by gel electrophoresis. The expression levels of CERK were compared to actin as an internal standard.

Data Analysis. Results are expressed as mean ± SE. Statistical analysis was performed by analysis of variance (ANOVA). A *p*-value of ≤ 0.05 was considered to be statistically significant.

REFERENCES

- [1] R. X. Tan, I. H. Chen, *Nat. Prod. Rep.* 2003, 20, 509.
- [2] S. Brodesser, P. Sawatzki, T. Kolter, *Eur. J. Org. Chem.* 2003, 2021.
- [3] N. S. Radin, *Bioorg. Med. Chem.* 2003, 11, 2123.
- [4] Y. D. Vankar, R. R. Schmidt, *Chem. Soc. Rev.* 2000, 29, 201.
- [5] M. Maceyka, S. G. Payne, S. Milstien, S. Spiegel, *Biochim. Biophys. Acta* 2002, 1585, 193.
- [6] O. Cavillier, *Biochim. Biophys. Acta* 2002, 1585, 153.
- [7] L. M. Obeid, C. M. Linardic, L. A. Karolak, Y. A. Hannun, *Science* 1993, 259, 1769.
- [8] M. Kawase, M. Watanabe, T. Kondo, T. Yabu, Y. Taguchi, H. Umehara, T. Uchiyama, K. Mizuno, T. Okazaki, *Biochim. Biophys. Acta* 2002, 1584, 104.
- [9] R. J. Bleicher, M. C. Cabor, *Biochim. Biophys. Acta* 2002, 1585, 172.
- [10] B. J. Pentus, C. E. Chalfant, Y. A. Hannun, *Biochim. Biophys. Acta* 2002, 1585, 114.
- [11] E. Gulbins, H. Grassme, *Biochim. Biophys. Acta* 2002, 1585, 139.
- [12] K. Shikata, H. Niino, H. Azuma, K. Ogino, T. Tachibana, *Bioorg. Med. Chem.* 2003, 11, 2723.
- [13] G. L. Yang, J. Schmieg, M. Tsuji, R. W. Franck, *Angew. Chem., Int. Ed.* 2004, 43, 3818.
- [14] V. Costantino, E. Fattorusso, C. Imperatore, A. Mangoni, *Tetrahedron* 2002, 58, 369.
- [15] L. Babieri, V. Costantino, E. Fattorusso, A. Mangoni, E. Ara, S. Parapini, D. Taramelli, *Eur. J. Org. Chem.* 2004, 468.
- [16] O. Plettenburg, V. Bodmer-Narkevitch, C. H. Wong, *J. Org. Chem.* 2002, 67, 4559.
- [17] K. Wallimann, Diplomarbeit, Universität Zürich, 1985.

- [18] A. Hemmetter, J. Spreitz, F.K. Sprenger, A.E. Stütz, 'Synthesis of 7-oxa derivatives of sphingosine and ceramides', in 'Abstracts of the International Carbohydrate Symposium', Glasgow, 2004, p. P.321.
- [19] J. Broddefalk, U. Nilsson, I. Kihlberg, *J. Carbohydr. Chem.* 1994, 13, 129.
- [20] W. Szeja, I. Fokt, G. Grynkiewicz, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* 1989, 108, 224.
- [21] F. González, S. Lenage, A. S. Perlin, *Carbohydr. Res.* 1975, 42, 267.
- [22] N. Hinata, Y. Yamagawa, T. Kamikawa, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* 1991, 2279.
- [23] T. Akiyama, H. Hirofujii, S. Ozaki, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1992, 65, 1932.
- [24] T. Kan, T. Fukuyama, *Chem. Commun.* 2004, 353.
- [25] W. Kurosawa, T. Kan, T. Fukuyama, *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 8112.
- [26] P. Garner, J. M. Park, E. Malecki, *J. Org. Chem.* 1988, 53, 4395.
- [27] P. Tkaczuk, E. R. Thornton, *J. Org. Chem.* 1981, 46, 4398.
- [28] R. Julina, T. Henzig, B. Bernet, A. Vasella, *Helv. Chim. Acta* 1986, 69, 368.
- [29] I. Pascher, *Biochim. Biophys. Acta* 1976, 455, 433.
- [30] P. Fowler, B. Bernet, A. Vasella, *Helv. Chim. Acta* 1996, 79, 269.
- [31] M. Avalos, R. Babiano, C. J. Duran, I. L. Jimenez, J. C. Palacios, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* 1992, 2205.
- [32] T. Mosmann, *J. Immunol. Methods* 1983, 65, 55.
- [33] O. Cavillier, G. Pirianov, B. Kleuser, P. G. Vanek, O. A. Coso, J. S. Gutkind, S. Spiegel, *Nature* 1996, 381, 800.
- [34] S. Gupta, *Adv. Exp. Med. Biol.* 1996, 406, 1.
- [35] P. Fischer, M. A. Kim, *Exp. Pathol. (Jena)* 1975, 10, 216.

Received October 13, 2003

La sfingosina determina il rilascio di calcio dai depositi intracellulari attraverso il recettore della ryanodina in omogenati di uova di riccio di mare

Numerosi studi hanno dimostrato che sfingosina e sfingosina 1 fosfato sono in grado di indurre rilascio dai depositi intracellulari in un modo analogo ai secondi messaggeri.

Nel lavoro che segue, abbiamo utilizzato l'omogenato di uova di riccio di mare come modello per lo studio dei meccanismi del rilascio intracellulare di calcio, per valutare gli effetti di questi sfingolipidi. Mentre ceramide e sfingosina 1 fosfato non alterano la capacità di rilasciare il calcio, sfingosina stimola il rilascio del calcio dai depositi intracellulari tapsigargina sensibili.

Questo rilascio di calcio è inibito da sostanze che bloccano il recettore per la ryanodina (alte concentrazioni di ryanodina, magnesio e procaina), ma non dal trattamento degli omogenati con cADPR 8Br- cADPR o bloccanti di altri canali del calcio intracellulare. La sfingosina rende il recettore per ryanodina insensibile al cADPR. Abbiamo proposto che nell'omogenato di uova di riccio di mare la sfingosina sia in grado di attivare il recettore per la ryanodina attraverso un meccanismo diverso da quello utilizzato dal cADPR.

Sphingosine releases Ca²⁺ from intracellular stores via the ryanodine receptor in sea urchin egg homogenates

E.M. Floriddia^{a,1}, D. Pace^{a,1}, A.A. Genazzani^{a,b,*}, P.L. Canonico^{a,b},
F. Condorelli^a, R.A. Billington^{a,b}

^a DISCAFF, Università del Piemonte Orientale, Via Bona 6, 28100 Novara, Italy

^b Center for Drug and Food Biotechnology, Novara, Italy

Received 12 October 2005

Available online 25 October 2005

Abstract

Various reports have demonstrated that the sphingolipids sphingosine and sphingosine-1-phosphate are able to induce Ca²⁺ release from intracellular stores in a similar way to second messengers. Here, we have used the sea urchin egg homogenate, a model system for the study of intracellular Ca²⁺ release mechanisms, to investigate the effect of these sphingolipids. While ceramide and sphingosine-1-phosphate did not display the ability to release Ca²⁺, sphingosine stimulated transient Ca²⁺ release from thapsigargin-sensitive intracellular stores. This release was inhibited by ryanodine receptor blockers (high concentrations of ryanodine, Mg²⁺, and procaine) but not by pre-treatment of homogenates with cADPR, 8-bromo-cADPR or blockers of other intracellular Ca²⁺ channels. However, sphingosine rendered the ryanodine receptor refractory to cADPR. We propose that, in the sea urchin egg, sphingosine is able to activate the ryanodine receptor via a mechanism distinct from that used by cADPR.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Calcium signalling; Sea urchin egg; Sphingosine; Ryanodine receptor; cADPR

The transduction of extracellular stimuli to intracellular responses by means of Ca²⁺ signalling is a vitally important mechanism for a wide range of cellular processes. In using rises in intracellular Ca²⁺ concentrations, the cell plays a dangerous game as sustained high Ca²⁺ concentrations are lethal to the cell [1]. Therefore, the cell has developed intricate and highly regulated mechanisms for the induction and termination of stimulus-induced Ca²⁺ rises [2]. While many factors and proteins are involved in the influx and extrusion of Ca²⁺ across the plasma membrane, just a small number of channels, pumps, and factors regulate the movement of Ca²⁺ in and out of the intracellular organelles [2].

Second messengers regulate the release of Ca²⁺ from intracellular stores such as the endoplasmic reticulum (ER), the Golgi and vesicular compartments [3]. The sea urchin egg has long been used as a tool for the investigation

of Ca²⁺ release from intracellular stores due to its ease of use in live Ca²⁺ imaging and homogenate experiments and experimental robustness. In this system, three second messengers have been well characterized to date and are; IP₃ (inositol-1,4,5-trisphosphate), a small phosphorylated inositol sugar produced by cleavage of membrane phospholipids which acts on IP₃ receptors in the ER [2]; cyclic adenosine diphosphate ribose (cADPR) [4], a cyclic derivative of NAD that activates ryanodine receptors; and nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) [5,6], an NADP metabolite that acts on an as yet unidentified receptor located on an acidic vesicular compartment that probably corresponds to lysosomes [7,8]. These three messengers are able to act in concert along with Ca²⁺ influx pathways to encode Ca²⁺ rises that, due to their exact spatial, temporal, and amplitude characteristics, are unique and activate only the desired targets in response to a specific stimulus.

These three second messengers have been shown to exist and act also in other models, including mammalian cells

* Corresponding author. Fax: +39 0321 375821.

E-mail address: genazzani@pharm.unipmn.it (A.A. Genazzani).

¹ These authors contributed equally.

where evidence suggests that a fourth mechanism may exist to add an extra level of complexity to the encoding of signals. Sphingosine (Sph) is a major sphingolipid that is involved in a large number of cellular functions in many cells [9]. It is the simplest, with respect to its structure, of the sphingolipid family, which includes ceramide (Cer), sphingosine-1-phosphate (S-1-P), and sphingomyelin, and is produced by the deacylation of Cer (by ceramidase) or the dephosphorylation of S-1-P (by sphingosine-1-phosphate phosphatase) [10]. The classical functions of these molecules are in the regulation of apoptosis, with Cer and Sph being anti-proliferative and pro-apoptotic while S-1-P is a proliferative and anti-apoptotic agent [10]. Therefore, the relative levels of each of these molecules in the cell (the “sphingolipid thermostat”) are able to determine cell fate, and this has led, among other lines of research, to intense study of these lipids in relation to cancer [11]. It has been shown that the actions of Sph are mediated by direct interactions with protein kinase C (PKC) and a number of other protein kinase families, meaning that the effects of Sph are wide ranging [12].

In addition to these functions, Sph has been shown to mediate intracellular Ca^{2+} release in a number of cell types including T-cells, parotid and pancreatic acinar cells, skeletal muscle, neutrophils, and thyroid cells, and also Ca^{2+} influx in a number of models [13–18] however, in several of these models, it has been suggested that Sph metabolites are ultimately responsible for the activity [14,17]. Data in mammalian cells suggest that the Sph-sensitive Ca^{2+} store is the same as that sensitive to IP_3 , i.e., the ER. However, the molecular target of Sph for Ca^{2+} release is not known although a putative sphingosyl choline receptor has been identified [19,20]. These data have led to the hypothesis that Sph can act as a second messenger despite being located largely in intracellular membranes due to its hydrophobic tail. Indeed, it is thought that it is sufficiently soluble in aqueous media to shuttle between membranes crossing the cytosol [21]. Furthermore, the monophosphorylated derivative of sphingosine, S-1-P, has also been shown to induce Ca^{2+} release from stores in a number of cell models [22,23]. Again, the S-1-P-sensitive store is thapsigargin sensitive and interactions with the IP_3 receptor have been proposed although the mechanism of this interaction is unclear as heparin is unable to block the effects of S-1-P [13,24].

In the present contribution, we have investigated the effect of Sph on Ca^{2+} release in sea urchin egg homogenates. Sph released Ca^{2+} in a dose-dependent manner from a thapsigargin-sensitive store and was extensively blocked by ryanodine, procaine, and Mg^{2+} but not by heparin or low concentrations of NAADP. Furthermore, cADPR-induced Ca^{2+} release was almost completely abrogated following Sph-induced Ca^{2+} release, suggesting that release occurs via the ryanodine receptor (RyR). Surprisingly, though, pre-treatment with cADPR had little effect on subsequent Sph-induced Ca^{2+} release and [^{32}P]cADPR binding was unaffected by Sph.

Materials and methods

Preparation of sea urchin egg homogenates and fluorescence. *Lytechinus pictus* (Paine d'Uchita) were collected from the Pacific during the breeding season (Marine Scientific, CA, USA). Homogenates were prepared using a protocol largely similar to that used by Dargie et al. [25,26].

Ca^{2+} loading was achieved by sequential dilution of 30% homogenate in intracellular medium (IM) consisting of 230 mM potassium gluconate, 250 mM *N*-methylglucamine, 25 mM Heps, pH 7.2, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM ATP, 10 mM phosphocreatine, 10 U/ml creatine phosphokinase, and 3 μ M fluo-3. Dilutions were carried out at 17 °C and the final homogenate concentration was 2–5%. Fluorescence was performed at 17 °C using a stirred cuvette containing 750 μ l of homogenate in a Perkin-Elmer LS-50B fluorimeter. All experiments are referred to an appropriate control for the vehicle in which the Sph was dissolved (DMSO).

Radioligand binding. [^{32}P]cADPR was prepared as previously described [27]. For binding assays, [^{32}P]cADPR (200 pM) was incubated with 200 μ g sea urchin egg homogenate in IM buffer for 20 min at 4 °C with 100 μ M Sph or DMSO. Alternatively, 200 μ g of homogenate was pre-incubated at 17 °C for 10 min with 100 μ M Sph or DMSO before being added to the binding reaction. Reactions were terminated by the addition of 500 μ g of γ -globulin and 1% polyethylene glycol. Reactions were vortexed and centrifuged at 20,000g for 5 min at 4 °C. The supernatant was aspirated and the pellet was washed once in 1 ml IM buffer before the addition of 1 ml scintillation fluid and standard scintillation counting.

Results and discussion

The sea urchin egg and the sea urchin egg homogenate have long been used for the study of Ca^{2+} signalling [26]. While the intact egg has been pivotal for those studying the signalling and physiology of fertilization and cell division, the homogenate has proved invaluable as a model for the study of second messenger-induced Ca^{2+} release [28]. Several reports have suggested that Sph is able to stimulate Ca^{2+} release from intracellular stores in mammalian cells and we therefore attempted to confirm this finding in the sea urchin egg homogenate [12].

Application of micromolar concentrations of Sph to sea urchin egg homogenates induced a dose-dependent Ca^{2+} transient (Figs. 1A and B). Although Sph released Ca^{2+} on all experimental days, large variability in the extent and kinetic parameters of release was observed. Furthermore, loss of activity was noted when Sph was kept at room temperature for longer than 1 h, possibly due to oxidation. The increase in fluo-3 fluorescence observed was indeed due to Ca^{2+} release since addition of identical amounts of Sph to fluo-3 in IM buffer alone did not elicit fluorescence changes (data not shown). The Sph-induced Ca^{2+} transient in homogenates was markedly different from that elicited by NAADP or cADPR since the rising phase of the release was significantly slower resulting in a long time to peak (7.6 ± 1.9 min at 100 μ M Sph compared to ~ 1 min for cADPR or NAADP) and the re-uptake was also significantly slower. A second addition of 100 μ M after the trace had returned to baseline induced a Ca^{2+} transient essentially identical to the first (second response $106.5 \pm 30.8\%$ of the first; $n = 5$; Fig. 1A). Ca^{2+} -re-uptake was not observed after the second addition of Sph. Sph

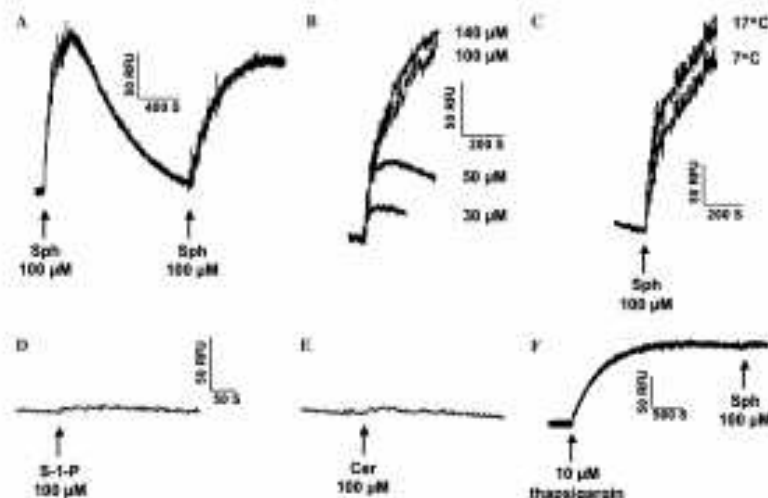


Fig. 1. (A) Ca^{2+} release induced by Sph ($100 \mu\text{M}$) in sea urchin egg homogenates. (B) Dose dependence of Sph-induced Ca^{2+} release. (C) Temperature dependence of Sph-induced Ca^{2+} release. Lack of effect of S-1-P (D) and ceramide (E) on Ca^{2+} release from sea urchin egg homogenates. (F) Inhibitory effect of thapsigargin on Sph-induced Ca^{2+} release. Traces are representative of at least three independent experiments and were performed with appropriate vehicle (DMSO) controls. RFU, relative fluorescence units.

therefore appears to activate Ca^{2+} release and may interact with Ca^{2+} uptake mechanisms as well.

In the intact sea urchin egg, the formation of the fertilization envelope is due to the cortical reaction which is a highly Ca^{2+} -dependent process [29]. Indeed, a rise in the intracellular Ca^{2+} concentration in the egg is sufficient to activate this process even in the absence of sperm-egg fusion [29]. To investigate whether Sph could elicit a Ca^{2+} rise also in the intact egg, we therefore incubated Sph ($200 \mu\text{M}$) with intact dejellied sea urchin eggs and used the formation of the fertilization envelope as a read out. After 20 min incubation with Sph, 17.6% of eggs (27/153 eggs) had raised the envelope compared to 4% (4/100 eggs) for the vehicle control (DMSO), suggesting that extracellular Sph is able to raise Ca^{2+} concentrations in the intact egg and that the effects observed in the homogenate are not artefactual.

In the homogenate system, the apparent EC_{50} ($70.9 \pm 3.5 \mu\text{M}$, Fig. 1B) of this release correlates with the effective concentrations observed in mammalian cells (low micromolar). Furthermore, the concentrations inducing the minimal detectable response ($30 \mu\text{M}$) and maximal response ($140 \mu\text{M}$) are less than one log unit apart, suggesting a steep Hill slope as was seen previously in Jurkat T-cells [13], Fig. 1B).

Previous work in rat pancreatic cells has suggested that Sph-induced Ca^{2+} release is dependent on the metabolism of Sph to another compound, possibly sphingosylcholine or S-1-P [14,17]. In the sea urchin egg homogenate, we

did not observe a lag phase of several minutes as reported in pancreatic cells. However, we did observe a long rising phase of the release which could be indicative of metabolism to an active compound. In order to verify that the Ca^{2+} transient was not due to a Sph metabolite, experiments were performed at 7°C to reduce enzymatic activity. Under these conditions, the transient observed in response to $100 \mu\text{M}$ Sph was grossly similar in both extent and rate to that at 17°C , suggesting that Sph itself is likely to be responsible for the release observed (Fig. 1C). Furthermore, neither S-1-P (Fig. 1D) nor Cer (Fig. 1E) was able to induce Ca^{2+} release at $100 \mu\text{M}$, strengthening the idea that the effects seen are not due to metabolism of Sph. Nonetheless, pre-treatment with S-1-P partially antagonized Sph release (Table 1), suggesting a possible competitive receptor interaction between the two sphingolipids.

Table 1
Effect of pre-treatment of homogenates with various agents on Sph-induced Ca^{2+} release

Pre-treatment	Response (% of $100 \mu\text{M}$ Sph control release)
None	100
MgCl_2 ($50 \mu\text{M}$)	-8.1 ± 10.7
Thapsigargin ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$)	75.2 ± 2.1
NAADP ($5 \mu\text{M}$)	54.6 ± 11.9
S-1-P ($100 \mu\text{M}$)	76.9 ± 3.4
ceramide ($100 \mu\text{M}$)	83.9 ± 15.6
S-1-P ($100 \mu\text{M}$)	64.9 ± 5.1

Data are expressed as mean \pm SEM of at least four determinations.

Pre-treatment for 1 min with 20 mM MgCl₂ caused a complete inhibition of the Sph response (Table 1). This evidence would suggest that the increase in Ca²⁺ observed occurs via a Ca²⁺ channel and not via the inhibition of pumps or via an increase in membrane leak.

Release was from intracellular stores expressing the SERCA pump as release was completely blocked by pre-treatment with thapsigargin (10 μM), suggesting that Sph released Ca²⁺ from the endoplasmic reticulum (Fig. 1F). As reported previously, NAADP-induced Ca²⁺ release was insensitive to thapsigargin (data not shown, [30]). Furthermore, pre-treatment of homogenates with GPN (glycyl-L-phenylalanine 2-naphthylamide), which causes osmotic lysis of lysosomes and blocks NAADP-induced Ca²⁺ release [8], had no effect on Sph-induced Ca²⁺ release (data not shown).

These data led us to investigate whether Sph was able to induce Ca²⁺ release via one of the already characterized release mechanisms. Ryanodine is the classical blocker of the RyR and at high concentrations (>100 μM) exerts its action by locking the receptor in a closed conformation leaving it refractory to stimulation by cADPR, Ca²⁺, and other RyR modulators. Ryanodine (200 μM) completely inhibited release by 100 μM Sph (104.6 ± 10.8% inhibition, Fig. 2A). Furthermore, the local anesthetic and RyR inhibitor, procaine (1 mM), was able to inhibit Sph-induced Ca²⁺ release by 75.7 ± 8.9% (Fig. 2B), indicating that the pharmacology of Sph-induced Ca²⁺ release overlaps with that of the RyR. Surprisingly, though, pre-treatment of homogenates with the cADPR antagonist

8-Br-cADPR (100 μM), a concentration able to inhibit cADPR-induced Ca²⁺ release (data not shown; [31]), had only a small effect on Sph-induced Ca²⁺ release (Table 1).

Heparin (300 μg/ml), the IP₃ receptor antagonist, inhibited Sph-induced Ca²⁺ release by 25 ± 2.5%, suggesting that the IP₃ receptors are not key to Sph-induced release (Table 1). Furthermore, pre-treatment of homogenates with 5 nM NAADP, a concentration sufficient to completely inhibit NAADP-induced Ca²⁺ release [32,33], was unable to inhibit Sph-induced Ca²⁺ release significantly (Table 1). Several reports have shown that redundancy exists between intracellular Ca²⁺ release mechanisms in that physiological responses cannot be blocked by the addition of an inhibitor of one mechanism alone but that they can be blocked by the addition of inhibitors of two mechanisms simultaneously [34,35]. This suggests that mechanisms may be able to compensate for each other. In order to discount this possibility, we pre-treated homogenates with a cocktail of heparin (300 μg/ml), 8-Br-cADPR (100 μM), and NAADP (5 nM) for 5 min, and then added Sph (100 μM, Fig. 2C). Release was not significantly affected by the pre-treatment with this inhibitor cocktail.

Our data would suggest that the ryanodine receptor is the main effector of sphingosine-induced Ca²⁺ release in the sea urchin egg homogenate. Yet, it is possible that the competitive antagonist of cADPR did not display a profound inhibition on this behavior. To elucidate this, we investigated heterologous desensitization between cADPR and Sph. This phenomenon manifests itself by the inability of a substance to release Ca²⁺ after an initial stimulation with a maximal

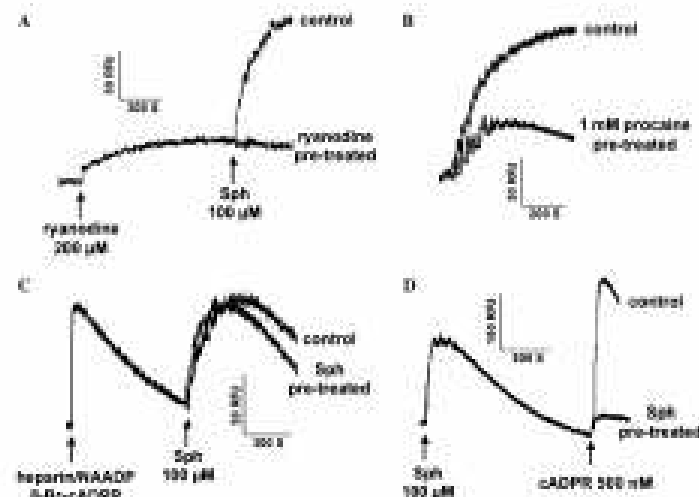


Fig. 2. (A) Inhibition of Sph-induced Ca²⁺ release by ryanodine. The control shows the release by Sph in the absence of ryanodine pre-treatment. (B) Inhibition of Sph-induced Ca²⁺ release by procaine. (C) Lack of inhibition of Sph-induced Ca²⁺ release by an inhibitor cocktail containing heparin (300 μg/ml), 8-Br-cADPR (100 μM) and NAADP (5 nM). (D) Inhibition of cADPR-induced Ca²⁺ release by pre-treatment with Sph. Traces are representative of at least three independent experiments. RPU, relative fluorescence units.

dose with another substance. Usually, the presence of such phenomenon has been considered indicative of an interaction of the two substances with the same receptor. We first induced Ca^{2+} release with cADPR (500 nM) and, when the trace returned to baseline, we added Sph (100 μM). Ca^{2+} release by Sph after release by cADPR was only slightly reduced compared to control ($\sim 1.4\%$ reduction, Table 1). In control experiments with two sequential additions of cADPR we always observed $>90\%$ inhibition of the second response (data not shown; [32,36]). Strikingly, when similar experiments were performed with addition of Sph (100 μM) followed by subsequent addition of cADPR (500 nM), we observed a large inhibition of the cADPR response (Fig. 2D; $73.3 \pm 6.8\%$ inhibition, $n = 6$).

Finally, when radioligand binding experiments were carried out using [^{32}P]ADPR, 100 μM Sph was unable to compete for the cADPR binding site on sea urchin egg membranes. This was true for homogenates pre-treated with Sph for 30 min and homogenates where Sph was co-incubated with [^{32}P]ADPR (specific binding after Sph pre-treatment $91.6 \pm 3.9\%$ of control, specific binding after Sph co-incubation $98.8 \pm 2.5\%$ of control).

Our data therefore indicate that Sph releases Ca^{2+} via the RyR, and that this effect is not mediated by the same mechanism used by cADPR. At present, it is difficult to reconcile collectively that (i) Sph release does not display homolegous desensitization; (ii) that Sph release is unaffected by prior stimulation of the receptor by cADPR; and (iii) that cADPR is unable to activate the receptor after Sph. It has been shown that cADPR-induced Ca^{2+} release requires calmodulin [37] and that desensitization is mediated by calmodulin dissociating from the receptor complex [36]. It is possible, therefore, that Sph release does not require calmodulin but induces its dissociation. Although this possibility is plausible, it would be expected that cADPR binding should be significantly affected by the dissociation of calmodulin [27], while this was not observed. It may be that other, as yet unidentified proteins are required for cADPR-induced Ca^{2+} release and desensitization which are affected by Sph. Intriguingly, in mammalian cardiac and skeletal muscle, Sph has been shown to inhibit [^3H]ryanodine binding and RyR Ca^{2+} -release activity [38,39], and this may represent a late evolutionary development in the RyR or a difference between RyR subtypes.

Taken together, these data suggest that Sph can act as a Ca^{2+} release agent in both the intact sea urchin egg and in sea urchin egg homogenates. Release is from a thapsigargin-sensitive store that most likely relates to the endoplasmic reticulum. Last, Sph appears to release Ca^{2+} via the RyR by a mechanism distinct from that sensitive to cADPR. It would be interesting to speculate that sphingosine itself or similar sphingolipids may participate in the physiology of echinoderms. Our contribution demonstrates that if another sphingolipid is responsible for these effects, it is not S-1-P or ceramide, the two main lipids thought to be involved in Ca^{2+} signaling in mammalian cells.

References

- [1] M. Berridge, P. Lipp, M. Bootman, Calcium signalling. *Curr. Biol.* 9 (1999) R117–R129.
- [2] M. Berridge, P. Lipp, M. Bootman, The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Mol. Cell Biol. Rev.* 1 (2000) 11–21.
- [3] T. Pozzan, R. Rizzuto, P. Volpe, J. Meldolesi, Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol. Rev.* 74 (1994) 591–616.
- [4] D.L. Clapper, T.F. Walath, P.J. Dargatzis, H.C. Lee, Pyridine nucleotide metabolites stimulate calcium release from sea urchin egg microsomes desensitized to inositol triphosphate. *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 9361–9368.
- [5] H.C. Lee, R. Aarhus, A derivative of NAADP mobilizes calcium stores insensitive to inositol triphosphate and cyclic ADP-ribose. *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 2122–2127.
- [6] E.N. Chiel, K.W. Bern, T.P. Deas, Nicotinate adenine dinucleotide phosphate (NAADP) triggers a specific calcium release system in sea urchin eggs. *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 326–323.
- [7] H.C. Lee, Calcium signaling: NAADP stands as a new messenger. *Curr. Biol.* 11 (2001) R106–R110.
- [8] G.C. Churchill, Y. Okada, J.M. Thomas, A.A. Graziani, S. Patel, A. Galione, NAADP mobilizes Ca^{2+} from neurogranules, a lysosome-related organelle, in sea urchin eggs. *Cell* 111 (2002) 701–708.
- [9] O. Cavillier, Sphingosine in apoptosis signaling. *Biochim. Biophys. Acta* 1515 (2002) 151–162.
- [10] M. Maciejka, S.G. Payne, S. Milstein, S. Spiegel, Sphingosine kinase, sphingosine-1-phosphate, and apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1515 (2002) 193–201.
- [11] O. Cavillier, G. Prkancev, B. Kleuser, P.G. Vancik, O.A. Coso, S. Gutkind, S. Spiegel, Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature* 381 (1998) 400–405.
- [12] D. Meyer, Zu Heringdorf, Lysophospholipid receptor-dependent and -independent calcium signaling. *J. Cell Biochem. SE* (2000) 917–940.
- [13] S. Sakano, H. Takemura, K. Yamada, K. Imoto, M. Kaneko, H. Ohshika, Ca^{2+} mobilizing action of sphingosine in Jurkat human leukemia T cells: Evidence that sphingosine releases Ca^{2+} from inositol triphosphate- and phosphatidic acid-sensitive intracellular stores through a mechanism independent of inositol triphosphate. *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 11140–11145.
- [14] T.K. Ghosh, J. Bao, D.L. Gil, Intracellular calcium release mediated by sphingosine derivatives generated in cells. *Science* 248 (1990) 1621–1624.
- [15] H. Sugita, S. Furuyama, Sphingosine stimulates calcium mobilization in rat parotid acinar cells. *FEBS Lett.* 236 (1991) 111–116.
- [16] R.A. Sabbadini, R. Betto, A. Tressi, G. Fachetti-Cassano, G. Salvini, The effects of sphingosine on sarcoplasmic reticulum membrane calcium release. *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 15473–15478.
- [17] D.L. Yale, D. Wu, T.E. Estroff, J.A. Shayman, J.A. Williams, Sphingosine metabolism induces Ca^{2+} oscillations in rat pancreatic acinar cells. *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 12351–12355.
- [18] K. Wong, L. Kwan-Yung, Sphingosine mobilizes intracellular calcium in human neutrophils. *Cell Calcium* 14 (1993) 493–505.
- [19] A.L. Cavalli, N.W. O'Brien, S.B. Barlow, R. Betto, C.C. Glenzinski, P.T. Palade, R.A. Sabbadini, Expression and functional characterization of SCAMPER: a sphingolipid-activated calcium channel of cardiac myocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 284 (2003) C761–C770.
- [20] C. Mao, S.H. Kim, J.S. Abramoff, X.L. Rubin, D.M. Kearney, L.A. Kindman, Molecular cloning and characterization of SCAMPER, a sphingolipid Ca^{2+} release-mediating protein from endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996) 1981–1986.
- [21] A.H. Furrman, Y.A. Hannun, The complex life of simple sphingolipids. *EMBO Rep.* 5 (2004) 777–782.

- [22] S. Pyne, N.J. Pyne, Sphingosine 1-phosphate signaling in mammalian cells, *Biochem. J.* 349 (2000) 385–402.
- [23] S. Spiegel, S. Milsten, Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4 (2003) 397–407.
- [24] K.W. Young, S.R. Nahonik, Sphingosine 1-phosphate: a Ca^{2+} release mediator in the balance, *Gf Calcium* 12 (2002) 335–341.
- [25] P.J. Dargie, M.C. Agre, H.C. Lee, Comparison of Ca^{2+} mobilizing activities of cyclic ADP-ribose and inositoltriphosphate, *Cell Regul.* 1 (1990) 279–290.
- [26] A. Galione, J.-M. Casade, G. Churchil, A. Genazzani, C. Lad, J. Thomas, H.L. Wilson, D. Turner, Methods in cADPR and NAADP research, in: J.J. Putney (Ed.), *Methods in Calcium Signaling*, CRC Press, Boca Raton, FL, 2000, pp. 249–266.
- [27] J.M. Thomas, R. Maggias, G.C. Churchill, A. Galione, Pharmacological characterization of the putative cADP-ribose receptor, *Biochem. J.* 359 (2001) 451–457.
- [28] A.A. Genazzani, A. Galione, A Ca^{2+} release mechanism gated by the novel pyridine nucleotide, NAADP, *Trends Pharmacol. Sci.* 8 (1987) 108–110.
- [29] P.F. Baker, M.J. Whitaker, Influence of ATP and calcium on the cortical reaction in sea urchin eggs, *Nature* 276 (1978) 513–515.
- [30] A.A. Genazzani, A. Galione, Nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate mobilizes Ca^{2+} from a thapsigargin-insensitive pool, *Biochem. J.* 315 (1996) 721–725.
- [31] T.F. Wiseth, H.C. Lee, Synthesis and characterization of antagonists of cyclic-ADP-ribose-induced Ca^{2+} release, *Biochim. Biophys. Acta* 117 (1990) 235–242.
- [32] A.A. Genazzani, R.M. Ripston, A. Galione, Unique inactivation properties of NAADP-sensitive Ca^{2+} release, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 11559–11602.
- [33] R. Aarhus, D.M. DeKey, R.M. Graeff, K.R. Ge, T.F. Wiseth, H.C. Lee, Activation and inactivation of Ca^{2+} release by NAADP⁺, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 8511–8516.
- [34] A. Galione, A. McDougall, W.B. Ross, N. Willmore, I. Gillet, M. Whitaker, Redundant mechanisms of calcium-induced calcium release underlying calcium waves during fertilization of sea urchin eggs, *Science* 261 (1998) 149–152.
- [35] J.M. Casade, F. Van Goppenotk, A. Galione, A.V. Tepikin, O.H. Petersen, Transformation of local Ca^{2+} spikes to global Ca^{2+} transients: the combinatorial roles of multiple Ca^{2+} releasing messengers, *EMBO J.* 21 (2002) 969–978.
- [36] J.M. Thomas, R.J. Sammelil, B.R. Posen, G.C. Churchill, A. Galione, Calretinin dissociation mediates desensitization of the cADPR-induced Ca^{2+} release mechanism, *Curr. Biol.* 12 (2002) 2018–2022.
- [37] H.C. Lee, R. Aarhus, R.M. Graeff, Sensitization of calcium-induced calcium release by cyclic ADP-ribose and calmodulin, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 5660–5666.
- [38] C. Sharma, T. Smith, S. Li, G.J. Schropfer, D.H. Nedergan, Inhibition of Ca^{2+} release channel (ryanodine receptor) activity by sphingolipid base: mechanism of action, *Chem. Phys. Lipids* 86 (2000) 1–11.
- [39] R.A. Sabbadini, D. Daniels-Betz, R. Betz, The role of sphingolipids in the control of skeletal muscle function: a review, *Int. J. Neurol. Sci.* 20 (1998) 423–430.

Bibliografia

Adam, D., Wiegmann, K., Adams-Klages, S., Ruff, A., Kronke, M., A novel cytoplasmic domain of the p55 Tumor Necrosis Factor receptor initiates the neutral sphingomyelinase pathway. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 14617-14622.

Adam-Klages, S., Adam, D., Wiegmann, K., Struve, S., Kolanus, W., Schneider-Mergener, J., Kronke, M., FAN, a novel WD-repeat protein, couples the p55 TNF-receptor to neutral sphingomyelinase. *Cell.* **1996**, 86, 937-947.

Alessenko A.V., Functions of Sphingosine in Cell Proliferation and Death. *Bioch* **1998**, 63(1): 62-8.

Allen R.W., Ogden B., Bentley F.L., Jung A.L. Fetal hydantoin syndrome, neuroblastoma, hemorrhagic disease in a neonate. *JAMA.* **1980**, 244: 1464-1465.

Brodeur G.M. Molecular basis for heterogeneity in human neuroblastomas. *Eur. J. Cancer* **1993**, 14: 5957-5964.

Bak J., Billington R. A., Timar G., Dutton A. C., Genazzani A. A. NAADP receptors are present and functional in the heart. *Curr. Biol.* **2001**, 11: 987-990.

Bak J., White P., Timar G., Missiaen L., Genazzani A. A., Galione A. Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate triggers Ca^{2+} release from brain microsomes. *Curr. Biol.* **1999**, 9:751-754.

Bastide B., Snoeckx K., Mounier Y. ADP-ribose stimulates the calcium release channel RyR1 in skeletal muscle of rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, 296: 1267-1271.

Berg I., Potter B.V., Mayr G. W., Guse A. H. Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP+) is an essential regulator of T-lymphocyte Ca^{2+} -signaling. *J. Cell Biol.* **2000**, 150: 581-588.

Berridge M. J. Inositol triphosphate and calcium signalling. *Nature.* **1993**, 361: 315-325

Berridge M. J. Capacitative calcium entry. *Biochem J.* **1995**, 312: 1-11.

Berridge M. J. Elementary and global aspect of calcium signalling. *J. Physiol. (Lon)*. **1997**, 499: 291-306.

Berridge M. J, Dupont G. Spatial and temporal signalling by calcium. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **1994**, 6: 267-274.

Birnbaumer L., Campbell K. P., Catterall W.A., Harpold M. M., Hofmann F., Horne W. A. Mori Y., Schwartz A., Snutch T. P., Tanabe T., and et al. The naming of the voltage-gated calcium channels. *Neuron*. **1994**, 13: 505-506.

Birnbaumer L., Qin N., Olcese R., Tareilus E., Platano D., Costantin J., Stefani E. Structures and functions of calcium channel beta subunits. *J. Bioenerg. Biomembr.* **1998**, 30: 357-375.

Brailou E., Miyamoto M. D. Dun N. J. Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate enhances quantal neurosecretion at the frog neuromuscular junction: possible action on synaptic vesicles in the releasable pool. *Mol. Pharmacol.* **2001**, 60: 718-724.

Brodeur G.M., Seeger R.C., Barretta A., Castleberry R.P., D'Angio G., De Bernardi B., Evans A.E., Favrot M., Freeman A.I., Haase G. et al. International criteria for diagnosis, staging and response to treatment in patients with Neuroblastoma. *Prog. Clin. Biol. Res.* **1988**, 271: 509-524.

Cancela J. M., Van Coppenolle F., Galione A., Tepikin A. V., Petersen O. H. transformation of local Ca^{2+} spikes to global Ca^{2+} transients: the combinatorial roles of multiple Ca^{2+} releasing messengers. *EMBO*. **2002**, 21: 909-919.

Carafoli E., Klee C. Calcium as a cellular regulator. *Oxford University press*. **1999**.

Catterall W. A. Structure and function of voltage-gated ion channel. *Ann. Rev. Biochem.* **1995**, 64: 493-531.

Cavigelli M., Dolfi F., Claret F.X., Karin M. Induction of c-fos expression through JNK-mediated TCF/Elk-1 phosphorylation. *EMBO J.* **1995**, 14: 5957-5964.

Celio M. R., Guidebook to the Calcium-Binding Proteins. *Oxford University Press.* **1996**.

Chameau P., Van de Vrede Y., Fossier P., Baux G. ryanodune-, IP3- and NAADP-dependent calcium store control acetylcholine release. *Pflugers Arch.* **2001**, 443: 289-296.

Chen F.E., Ghosh G. Regulation of DNA binding by Rel/NF-kappaB transcription factors: structural views. *Onc.* **1999**, 18: 6845-6852

Cheng J., Yusufi A. N., Thompson M.A., Chini E. N, Grande J. P. Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate: A New Ca^{2+} Releasing Agent in Kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2001**, 12: 54-60.

Chini E. N., Dousa T. P. Enzymatic synthesis and degradation of nicotinate adenine dinucleotide phosphate (NAADP), a Ca^{2+} -releasing agonist, in rat tissues. *Biochem Biophys Res. Commun.* **1995**, 209: 167-174.

Chu Y., Lee E.Y.C., Schlender K.K. Activation of protein phosphatase 1. Formation of a metalloenzyme. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271: 2574-2577.

Clapman D. E. Calcium signalling. *Cell.* **1995**, 80: 259-268.

Clapper D. L., Walseth T. F., Dargie P. J., Lee H. C. Pyridine nucleotide metabolites stimulate calcium release from sea urchin egg microsomes desensitized to inositol triphosphate. *J. Biol. Chem.* **1987**, 262: 9561-9568.

Cuvillier O., Pirianov G., Kleuser B., Vanek P.G., Coso O.A., Gutkind J.S., Spiegel S. Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature* **1996**, 381: 800-803.

Dargie P. J., Agre M. C., Lee H. C. Comparison of Ca²⁺ mobilizing activities of cyclic ADP-ribose and inositol triphosphate. *Cell Regul.* **1990**, 1: 279-290.

De Maria R., Lenti L., Malisan G., D'Agostino F., Tomassini B., Zeuner A., Rippo M.R., Testi R. Requirement for GD3 ganglioside in CD95- and ceramide-induced apoptosis. *Science* **1997**, 277: 1652-1655.

Divecha N., Irvine R. F. Phospholipid signaling. *Cell.* **1995**, 80: 269-278.

Dolmetsch R. E., Lewis R. S., Goodnow C. C., Healy J. I. differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration. *Nature.* **1997**, 386: 855-858.

Dressler K.A., Kolesnick R.N. Ceramide 1-phosphate, a novel phospholipid in human leukaemia (HL60) cells. Synthesis via ceramide from sphingomyelin. *J. Biol. Chem.* **1990**, 265: 14917-14921.

Dunlap K., Luebke J. I. Turner T. J. exocytotic Ca²⁺ channels in mammalian central neurons. *Trends Neurosci.* **1995**, 18: 89-98.

Eggert A., Grotzer M.A., Ikegaki N., Liu X.G., Evans A.E., Brodeur G.M. Expression of the neurotrophin receptor TrkA down-regulates expression and function of angiogenic stimulators in SH-SY5 neuroblastoma cells. *Cancer Res.* **2002**; 62:1802-1808.

Fasolato C., Innocenti B., Pozzan T. Receptor-activated Ca²⁺ influx: how many mechanisms for how many channels? *Trends Pharmacol. Sci.* **1994**, 15: 77-83.

Ferri K.F., Kroemer G. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nature Cell Biol.* **2001**, 3: 255-263.

Friesen C., Herr I., Krammer P.H., Debatin K.M. Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor-ligand system in drug-induced apoptosis in leukaemia cells. *Nature Med.* **1996**, 2: 574-577.

Futerman A.H., Stieger B., Hubbard A.L., Pagano R.E. Sphingomyelin synthesis in rat liver occurs predominantly at the cis and medial cisternae of the Golgi apparatus. *J. Biol. Chem.* **1998**, 265: 8650-8657.

Galione A., Cancela J-M., Churchill G. C. Genazzani A. A. Lad C., Thomas J., Wilson H., Terrar D. methods in cyclic ADP- ribose and NAADP research. In Putney, J. W. (ed.) *Calcium signalling*. **2000**, CRC Press.

Galione A., Lee H. C., Busa W. B. Ca²⁺ -induced Ca²⁺ release in sea urchin egg homogenates: modulation by cyclic ADP- ribose. *Science*. **1991**, 253: 1143-1146.

Genazzani A. A., Billington R. A. NAADP: an atypical Ca²⁺ release messenger? *Trends Pharmacol. Sci.* **2002**, 23: 165-167.

Genazzani A. A., Empson R. M., Galione A. Unique inactivation properties of NAADP-sensitive Ca²⁺ release. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271: 11599-11602.

Genazzani A. A., Mezna M., Summerhill R. J., Gallione A., Michelangeli F. Kinetic Properties of nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate- induced Ca²⁺ release. *J. Biol. Chem.* **1997 a**, 272: 7669-7675.

Genazzani A. A., Galione A. Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate mobilizes Ca²⁺ from a thapsigargin- inventive pool. *Biochem J.* **1996**, 315: 721-725.

Genazzani A. A., Mezna M., Dickey D. M., Michelangeli F., Walseth T. F., Galione A. Pharmacological properties of the Ca²⁺ release mechanism sensitive to NAADP in the sea urchin egg. *Br. J. Pharmacol.* **1997**, 121: 1489-1495.

Giannini G., Conti A., Mammarella S., Scobogna M., Sorrentino V. The ryanodine receptor/calcium channel genes are widely and differentially expressed in murine brain and peripheral tissues. *J. Cell. Biol.* **1995**, 128: 893-904.

Grimm S., Bauer M.K.A., Baeuerle P.A., Schulze-Osthoff K. Bcl-2 down-regulates the activity of transcription factor NF-kappaB induced upon apoptosis. *J. Cell. Biol.* 1996, 134: 13-23.

Gomez-Munoz A. Ceramide-1-phosphate: a novel regulator of cell activation. *FEBS.* **2004**,562: 5-10.

Gomez-Munoz A., Duffy P. A., Martin A., O'Brian L., Byun H. S. Bittman, R., Brindley D.N. Short-chain ceramide-1-phosphate are novel stimulators of DNA synthesis and cell division: antagonism by cell-permeable ceramides. *Mol. Pharmacol.* **1995**, 273: 833-839.

Gomez-Munoz, A., Frago L. M., Alvarez L., Varala-Nieto I. Stimulation of DNA synthesis by natural ceramide-1-phosphate. *Biochem. J.* **1997**, 325: 435-440.

Green, D.R. Reed, C.J.,. Mitochondria and apoptosi. *Science* **1998**, 281, 1309-1312.

Gupta S. Molecular steps of death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. *Life Sci.* **2001**, 69: 2957-2964.

Jaggar J. H., Nelson M. T. differential regulation of Ca²⁺ sparks and Ca²⁺ waves by UTP in rat cerebral artery smooth muscle cells. *Am. J. Cell Physiol.* **2000**, 279: 1529-1539.

Jarvis W.D., Fornari F.A., Browning J.L., Gewirtz D.A., Kolesnick R.N., Grant S. Attenuation of ceramide-induced apoptosis by diglyceride in human myeloid leukaemia cells. *J. Biol. Chem.* **1994**, 269: 31685-31692

Jayadev , S., Linardic, C.M., Hannun, Y.A.,. Identification of arachidonic acid as a mediator of sphingomyelin hydrolysis in response to tumor necrosis factor alpha. *J. Biol. Chem.* **1994**, 296, 5757-5763

Jeckel D., Karrenbauer A., Burger K.N., van Meer G., Wielnd F. Glucosylceramide is synthesized at the cytosolic surface of various Golgi subfractions. *J. Biol. Chem.* **1992**, 117: 259-267.

Johnson J. D., Misler S. nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate-sensitive calcium stores initiate insulin signalling in human beta cells. *Prot. Natl. Acad. Sci U. S. A.* **2002**, 261: 1330-1333.

Johnstone R.W., Ruefli A.A., Lowe S.W. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell.* **2002**, 108: 153-164.

Haase G.M., Perez C., Atkinso J.B. Current aspects of biology, risk assessment, and treatment of neuroblastoma. *Semin. Surg. Oncol.* **1999**; 16:91-104.

Hagar R. E. Burgstahler A .D., Nathanson M .H., Ehrlich B. E. Type III InsP₃ receptor channel stays open in the presence of increased calcium. *Nature.* **1998**, 396: 81-84.

Haimovitz-Friedman A., Kan C., Ehleiter D., Persaud R., McLoughlin M., Fuks Z., Kolesnick R.N. Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis. *J. Exp. Med.* **1994**, 180: 525-535.

Hinkovska-Galcheva V.T., Boxer L.A., Mansfield P.J., Harsh D., Blackwood A., Shavman J.A. The formation of ceramide 1-phosphate during neutrophil phagocytosis and its role in liposome fusion. *J. Biol. Chem.* **1998**, 273: 33203-33209.

Hoebel B. G., Kostner G. M., Graier W. F. Activation of microsomal cytochrome P450 mono-oxygenase by Ca²⁺ store depletion and its contribution to Ca²⁺ entry in porcine aortic endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.* **1997**, 121: 1579-1588.

Hogben M., Parrington J., Shevchenko V., Swann K., Lai F. A. Calcium oscillations, sperms factors and egg activation at fertilisation. *J. Mol. Med.* **1998**, 76: 548-554.

Horinouchi K., Erlich S., Perl D.P., Ferlinz K., Bisgaier S.L., Sandhoff K., Desnick R.J., Stewart C.L., Schuchman E.H. Acid sphingomyelinase deficient mice: a model of types A and B Niemann-Pick disease. *Nature Genet.* **1995**, 10: 288-293.

Hsu H., Shu H.B., Pan M.G., Goeddel D.V. TRADD-TRAF-2, and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell*. **1996**, 84: 299-308.

Kayagaki N., Kawasaki A., Ebata T., Ohmoto H., Ikeda S., Inoue S., Yoshino K., Okumura K., Yagita H. Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand. *J. Exp. Med.* **1995**, 182: 1777-1783.

Karasavvas N., Erukulla R.K., Bittman R., Lockshin R., Zakeri Z. Stereospecific induction of apoptosis in U937 cells by N-octyl-sphingosine. The ceramide amide group is not required for apoptosis. *Eur. J. Biochem.* **1996**, 236: 729-737.

Kelliher M.A., Grimm S., Ishida Y., Kuo F., Stanger B.Z., Leder P. The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF- κ B signal. *Immunity* **1998**, 8: 297-303.

Kishida E., Kasahara Y., Takagi Y., Matsumura M., Hayashi T., Kobayashi S., Masuzawa Y. Lipid Mediators. *Cell. Sign.* **1997**, 16: 127-137.

Kishikawa K., Chalfant C.E., Perry D.K., Bielawska A., Hannun Y.A. Phosphatidic acid is a potent and selective inhibitor of ceramide-mediated responses. *J. Biol. Chem.* **1999**, 274: 21335-21341.

Kolesnick R.N., Hemer M.R. Characterization of a ceramide kinase activity from human leukaemia (HL60) cells. Separation from diacylglycerol kinase activity. *J. Biol. Chem.* **1990**, 265: 18803-18808.

Kronke, M. Involvement of sphingomyelinases in TNF signaling pathways. *Chem. Phys. Lipids* **1999**, 102, 157-166.

Inokuchi J., Jimbo M., Momosaki K., Shimeno H., Nagamatsu A., Radin N.S. *Cancer Res.* **1990**, 50: 6731-6737

Israel M.A. Disordered differentiation as a target for novel approaches to the treatment of neuroblastoma. *Cancer* **1993**; 71(10 Suppl.):3310-3313.

Lanzowskj P. Neuroblastoma. In: Manual of Pediatric Hematology and Oncology, 2nd Ed. Churchill Livingstone. **1994**, 419-421.

Leckie C. P. Mc Ainsh M. R., Allen G. J., Sanders D., Hetherington A. M. Abscisic acid-induced stomatal closure mediated by cyclic ADP-ribose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, 95: 15837-15842.

Lee H. C. Mechanism of calcium signalling by cyclic ADP-ribose and NAADP. *Physiol. Rev.* **1997**, 77: 1133-1164.

Lee H. C. Mechanism of calcium signalling by cyclic ADP-ribose and NAADP. A decade of exploration. *Cell. Biochem. Biophys.* **1998**, 28: 1-17.

Lee H. C., Aarhus R. A derivative of NADP mobilizes calcium stores insensitive to inositol triphosphate and cyclic ADP-ribose. *J. Biol. Chem.* **1995**, 270: 2152-2157.

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

Leithäuser F. *et al.* Constitutive and induced expression of APO-1, a new member of the NGF/TNF receptor superfamily, in normal and neoplastic cells. *Lab. Invest.* **1993**, 69: 415-429.

Liu Y., Lee M.O., Wang H.G., Li Y., Hashimoto Y., Klaus M., Reed J.C., Zhang X.K. Retinoic acid receptor β mediates the growth-inhibitory effect of retinoic acid by promoting apoptosis in human breast cancer cells. *Mol. Cell. Biol.* **1996**; 16:1138-1149

Lucarelli E., Kaplan D., Thiele C.J. Activation of trkA but not trkB signal transduction pathway inhibits growth of neuroblastoma cells. *Eur. J. Cancer* **1997**; 33:2068-2070.

Lozano J., Barre E., Municio M.M., Diaz-Meco M.T., Dominguez I., Sanz L., Moscat J. Protein kinase C zeta isoform is critical for kappa-B dependent promoter activation by sphingomyelinase. *J. Biol. Chem.* **1994**, 269: 19200-19202.

Maris J.M., Kyemba S.M., Rebbeck T.R., White P.S., Sulman E.P., Jensen S.J., Allen C., Biegel J.A., Brodeur G.M. Molecular genetic analysis of familiar neuroblastoma. *Eur. J. Cancer* **1997**; 33:1923-1928.

Malviya A. N. Rogue P., Vincendon G. Stereospecific inositol 1, 4, 5-[³²P] triphosphate binding to isolated rat liver nuclei: evidence for inositol triphosphate receptor-mediated calcium release from nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1990**, 87:9270-9274.

Mayer M. L., Benveniste M., Patneau D. K., Vyklicky L. Jr. Pharmacologic properties of NMDA receptors. *Ann. N Y Acad. Sci.* **1992**, 648: 194-204.

Meissner G. Ryanodine receptor/Ca²⁺ release channel and their regulation by endogenous effectors. *Annu. Rev. Physiol.* **1994**, 56: 485-508.

Meldolesi J., Krause K. H., Michalak M. Calreticulin: how many function in how many cellular compartments? *Cell. Calcium.* **1996**, 20: 83-86.

Melino G., Thiele C.J., Knight R.A., Piacentini M. Retinoids and the control of growth/death decisions in human neuroblastoma cell lines. *J. Neurooncol.* **1997**; 31:65-83.

Merrill A.H. Jr., Wang E. Biosynthesis of long-chain (sphingoid) bases from serine by LM cells. Evidence for introduction of the 4-trans-double bond after de novo biosynthesis of N-acylsphinganine. *J. Biol. Chem.* **1986**, 261: 3764-3769.

Meszaros L. G., Bak J., Chu A. Cyclic ADP-ribose as an endogenous regulator of the non skeletal type ryanodine receptor Ca²⁺ channel. *Nature.* **1993**, 364: 76-79.

Michel C., Van Echten-Deckert G., Rother J., Sandhoff K., Wang E., A.H. Merrill Jr. Characterization of ceramide synthesis. A dihydroceramide desaturase introduces the

4,5-trans-double bond of sphingosine at level of dihydroceramide. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272: 22432-22437.

Mori H., Mishina M. Structure and function of NMDA receptor channel. *Neuropharmacology.* **1995**, 34: 1219-1237.

Muller G., Ayoub M., Storz P., Rennecke J., Fabbro D., Pfizenmaier K. PKC zeta is a molecular switch in signal transduction of TNF-alpha, bifunctionally regulated by ceramide and arachidonic acid. *EMBO J.* **1995**, 14: 1961-1969

Nelson M. T., Cheng H., Rubart M., Santana L. F., Bonev A. D., Knot H. J., Lederer W.J. Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks. *Science.* **1995**, 270: 633-637.

Nicholls D., Akerman K. Mitochondrial calcium transport. *Biochim. Biophys Acta.* **1982**, 683: 57-88.

Niethammer D., Handgretinger R. Clinical strategies for the treatment of neuroblastoma. *Eur. J. Cancer* **1995**; 31A:568-571

Obeid L.M., Linardic C.M., Karolak L.A., Hannun Y.A. Programmed cell death induced by ceramide. *Science* **1993**, 259: 1769-1771.

Okazaki T., Bell R.M., Hannun Y.A. Sphingomyelin turnover induced by vitamin D3 in HL-60 cell. Role in cell differentiation. *J. Biol. Chem.* **1989**, 264: 19076-19080.

Olivera A., Kohama T., Edsall L., Nava V., Cullivier O., Poulton S., Spiegel S. Sphingosine kinase expression increases intracellular sphingosine-1-phosphate and promotes cell growth and survival. *J. Cell Biol.* **1999**, 147: 545-558.

Olivera A., Spiegel S. Sphingosine kinase: a mediator of vital cellular functions. *Prostaglandins and other Lipid Mediators.* **2001**, 64: 123-134.

Ong D.E., Brady R.N. In vivo studies on the introduction of the 4-t-double bond of the sphingenine moiety of rat brain ceramides. *J. Biol. Chem.* **1973**, 248:3884-3888.

Park H.W., Song J.Y., Han Y., Kim C.W., Yi S.Y., Yun Y.S. Enhancement of radiosensitivity by combined and dimethylsphingosine treatment in lung cancer cells. *Exp. Mol. Med.* **2004**, 36: 411-419.

Patel S., Joseph S. K., Thomas A. P. Molecular properties of inositol 1, 4, 5- triphosphate receptors. *Cell Calcium.* **1999**, 25: 247-264.

Perez P. J., Ramos-Franco J., Fill M., Mignery G. A. Identification and functional reconstitution of the type 2 inositol 1, 4, 5 triphosphate receptor from ventricular cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272: 23961-23969.

Perz-Terzic C. M., Chini E. N., Shen S. S., Dousa T. P., Clapman D. E. Ca²⁺ release triggered by nicotinate adenite dinucleotide phosphate in intact sea urchin egg. *Biochem J.* **1995**, 312: 955-959.

Perry D.K., Hannun Y.A. The role of ceramide in cell signalling. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, 1436:233-243.

Petersen O. H., Burdakov D., Tepikin A. V. Polarity in intracellular calcium signalling. *Bioessays.* **1999**, 21: 851-860.

Pettus B.J., Bielawska A., Spiegel S., Roddy P., Hannun Y.A., Chalfant C. Ceramide kinase mediates cytokine- and Calcium ionophore-induced arachidonic acid release. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278: 38206-38213.

Ping Z., Bin L., Jenkins G.M., Hannun Y.A., Obeid L. M. Expression of Neutral Sphingomyelinase Identifies a Distinct Pool of Sphingomyelin Involved in Apoptosis. *J. Biol. Chem.* **1997**, 15(272): 9609-9612.

Pinton P., Pozzan T., Rizzuto R. The Golgi apparatus is an inositol 1, 4, 5,- triphosphate-sensitive Ca²⁺ Store, with functional properties distinct from those of the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* **1998**, 17: 5298-5308.

Pozzan T., Rizzuto R., Volpe P., Meldolesi J. Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol. Rev.* **1994**, 74: 595-636.

Putney J. W. Jr. Type 3 inositol 1, 4, 5-triphosphate receptor and capacitative calcium entry. *Cell Calcium.* **1997**, 21: 257-261.

Putney J. W. Jr., Bird G. S. The inositol phosphate-calcium signalling system in nonexcitable cells. *Endocr. Rev.* **1993**, 14: 610-631.

Randriamampita C. Tsien R. Y. Emptying of intracellular Ca^{2+} store releases a novel small messenger that stimulates Ca^{2+} influx. *Nature.* **1993**, 364: 809-814.

Rayet B., Gelinas C. Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene* **1999**, 18: 6938-6947.

Reed J.C. Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* **1997**, 387: 773-776.

Santella L., Kyozuka K., Genazzani A. A., De Riiso L., Carafoli E. Nicotinic Acid Adenin Dinucleotide Phosphate-induced Ca^{2+} release. Interactions among distinct Ca^{2+} mobilizing mechanism in starfish oocytes. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275: 8301-8306.

Schreiber M., Baumann B., Cotton M., Angel P., Wagner E.F. Fos is an essential component of the mammalian UV response. *EMBO J.* **1995**, 14: 5338-5349.

Shimana H., Chatten J., Newton W.A.. Histopathologic prognostic factors in neuroblastic tumors: Definition of subtype of ganglioneuroblastoma and an age-linked classification of neuroblastomas. *J. Natl. Cancer Inst.* **1984**; 73(2):405-416.

Schissel S.L., Schchman E.H., Williams K.J., Tabas I., *J. Biol. Chem.* **1996**, 31, 18431-18436

Sitsapesan R., McGarry S. J., Williams A. j. Cyclic ADP-ribose competes with ATP for the adenine nucleotide binding site on the cardiac ryanodine receptor Ca^{2+} -release channel. *Circ. Res.* **1994**, 75: 596-600.

Smyth, M.L., Obeid, L.M., Hannun, Y.A. Sphingolipid metabolism and cell growth regulation. *Adv Pharm.* **1997**, 41, 133-154.

Sonnleitneitner A., Conti A., Bertocchini F., Schindler H., Sorrentino V. Functional properties of the ryanodine receptor type 3 (RyR 3) Ca²⁺ release channel. *EMBO J.* **1998**, 17: 2790-2798.

Sorrentino V. Ryanodine receptors. *CRC Press.* **1996**, Boca Raton.

Sugita M., Dulaney J.T., Moser H.W. Ceramidase deficiency in Faber's disease. *Science* **1972**, 178: 100-1102.

Taylor C. W. Inositol triphosphate receptors: Ca²⁺-modulated intracellular Ca²⁺ channel. *Biochim. Biophys. Acta.* **1998**, 1436: 19-33.

Ullman M.D., Radin N.S. The enzymatic formation of sphingomyelin from ceramide and lecithin in mouse liver. *J. Biol. Chem.* **1974**, 249: 1506-1512.

Van Blitterswijk W.J. Hypothesis: ceramide conditionally activates atypical protein kinase C, Raf-1 and KSR through binding to their cysteine-rich domains. *J. Biochem.* **1998**, 331: 679-680

Venable M.E., Lee J.Y., Bielawska A., Obeid L.M. Role of ceramide in cellular senescence. *J.Biol.Chem.* **1995**, 270: 30701-30708.

Verheij M., Bose R., Lin X.H., Yao B., Jarvis W.D., Grant S., Birrer M.J., Szabo E., Zon L.I., Kyriakis J.M., Haimovitz-Friedman A., Fuks Z., Kolesnick R.N. Requirement for ceramide initiated JNK/SAPKs signalling in stress-induced apoptosis. Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature* **1996**, 380: 75-79.

Voute P.A. Neuroblastoma. In: Sutton WW, Fernbach DJ, Vietti TJ (eds). *Clinical Pediatric Oncology, Mosby, St.Louis, 1984*, p.559

Yeh, W.C., Shahinian, A., Spieser, D., Kraunus, J., Billia, F., Wackeham, A., de la Palma, J. I., Ferrick, D., Hum, B., Iscove, N., Ohashi, P., Rothe, M., Goeddel, D.V., Mak, T.W., Early lethality, Functional NF-kappaB activation and increased sensitivity to TNF-induced cell death in TRAF2-deficient mice. *Immunity* **1997**, 7, 641-652.

Yusufi A. N., Cheng J., Thompson M. A., Chini E. N., Grande J. P. Differential mechanism of Ca²⁺ release from vascular smooth muscle cell microsomes. *Exp. Biol. Med.* **2002**, 227: 36-44.

Wallach D. Cell death induction by TNF: a matter of self control. *Trends Biochem. Sci.* **1997**, 22: 107-109.

Wiegmann K., Shutze S., Machleidt T., Witte D., Krone M. Functional dichotomy of neutral and acidic sphingomyelinases in tumor necrosis factor signalling. *Cell* **1994**, 78: 1005-1015.

Wolff R.A., Dobrowsky R.T., Bielawska A., Obeid L.M., Hannun Y.A. Role of ceramide-activated protein phosphatase in ceramide-mediated signal transduction. *J. Biol. Chem.* **1994**, 269: 19605-19609.

PARTECIPAZIONE A CONGRESSI

CNB5- 5° Congresso Nazionale Biotecnologie, L'Aquila , Italia, 13-15 settembre 2001

4th International Meeting on Metabotropic Glutamate Receptors, Taormina, Italia, 15-20 settembre 2002

32th Annual Meeting Society for Neuroscience, Orlando- Florida, U.S.A., 2-8 novembre 2002

1st Molecular strategies for understanding neurological and psychiatric disorder, Brescia, Italia 19-20 dicembre. 2002

31° Congresso Nazionale della Società Italiana di Farmacologia, Trieste, Italia, 26-29 giugno 2003

4th Forum of European Neuroscience, Lisbona, 10-14 luglio 2004

International Conference Role of pharmacogenetics in rational development and personalization of drug treatment, Pisa, Italia, 28-29 ottobre 2004

3rd Molecular strategies for understanding neurological and psychiatric disorder, Novara, Italia 19-20 maggio. 2005

32° Congresso Nazionale della Società Italiana di Farmacologia, Napoli, Italia, 1-4 giugno 2005

PUBBLICAZIONI

Lysosomal proteases as potential targets for the induction of apoptotic cell death in human neuroblastomas.

Castino R.¹, **Pace D.**¹, Démoz M.¹, Gargiulo M.¹, Ariatta C.¹, Raiteri E.¹, Isidoro C.¹

¹Dipartimento di Scienze Mediche, Laboratorio di Patologia Molecolare, Università "A. Avogadro" 28100 – Novara (Italy).

Int J Cancer., 97(6):775-779; 2002PMID: 11857353.

Synthesis of Sphingosine and Ceramide Analogues and their Evaluation in a model for Apoptosis.

Roshini Rajan¹, Kurt Wallimann¹ and Andrea Vasella¹ and *Deborah Pace*², Armando A. Genazzani², Pier Luigi Canonico² and Fabrizio Condorelli².

1. Laboratorium für Organische Chemie, ETH-Honggerberg, Wolfgang-Pauli Strasse 10, CH-8093 Zurich

2. Università del Piemonte Orientale "A. Avogadro", DISCAFF, via Bovio, 6 28100 Novara
Chemistry and Biodiversity, 1 (11), 1785-1799; 2004

Sphingosine releases Ca²⁺ from intracellular stores via the ryanodine receptor in sea urchin egg homogenates.

[Floriddia EM, Pace D, Genazzani AA, Canonico PL, Condorelli F, Billington RA.](#)

Biochem Biophys Res Commun. 2005 Dec 23;338(3):1316-21. Epub 2005 Oct 25. PMID: 16259943 [PubMed - indexed for MEDLINE]

POSTER E COMUNICAZIONI ORALI

- ***VIIth International Symposium on Proteinase Inhibitors and Biological Control - Brdo, Slovenia, 16-20 giugno 2001***

Inhibition of lysosomal function induces Caspase-dependent cell death in human neuroblastoma cells.

Castino R.¹, Démoz M.¹, Raiteri E.¹, Pace D.¹, Gargiulo M.¹, Ariatta C.¹, Ponzoni M.², Isidoro C.¹

¹Dipartimento di Scienze Mediche, Università del Piemonte Orientale, via Solaroli 17, 28100 – Novara (Italy).

²Istituto di ricerca “G. Gaslini”, Genova (Italy).

Differential role of cathepsin B and D in TNF α -and etoposide-mediated signalling of apoptosis in L929 fibrosarcoma cells.

Démoz M.¹, Cesaro P.¹, Castino R.¹, Raiteri E.¹, Ariatta C.¹, Gargiulo M.¹, Pace D.¹, Baccino F.², Bonelli G.², Isidoro C.²

¹Dipartimento di Scienze Mediche, Università del Piemonte Orientale, via Solaroli 17, 28100 – Novara (Italy).

²Dipartimento di Medicina ed Oncologia Sperimentale, Università di Torino (Italy).

- ***2th General meeting of international proteolysis society (IPS) associated with international conference on protease inhibitions (ICPI), Freising-Munich, Germany, 31 ottobre– 4 novembre 2001***

[P.122] Inhibitors of lysosomal Cathepsins as apoptotic inducers in human neuroblastomas.

Castino R.¹, Démoz M.¹, Raiteri E.¹, Pace D.¹, Gargiulo M.¹, Ariatta C.¹, Isidoro C.¹

¹Dipartimento di Scienze Mediche, Università del Piemonte Orientale, via Solaroli 17, 28100 Novara (Italy).

- ***CNB5- 5^o Congresso Nazionale Biotecnologie, L'Aquila, Italia, 13-15 settembre 2001***

[P.124] Lysosomes as potential targets for neuroblastoma chemotherapy.

Castino R.¹, Démoz M.¹, Raiteri E.¹, Pace D.¹, Gargiulo M.¹, Ariatta C.¹, Ponzoni M.², Isidoro C.¹

¹Dipartimento di Scienze Mediche, Università del Piemonte Orientale, via Solaroli 17, 28100 – Novara (Italy).

²Istituto di ricerca “G. Gaslini”, Genova (Italy).

[P.73] Death signalling by TNF α , not by etoposide follows an endocytic pathway: evidence that the lysosomal protease cathepsin D as a dominant executioner.

Démoz M.¹, Cesaro P.¹, Castino R.¹, Raiteri E.¹, Ariatta C.¹, Gargiulo M.¹, Pace D.¹, Baccino F.², Monelli G.², Isidoro C.¹

¹Dipartimento di Scienze Mediche, Università del Piemonte Orientale, via Solaroli 17, 28100 – Novara (Italy).

²Dipartimento di Medicina ed Oncologia Sperimentale, Università di Torino (Italy)

- *32th Annual Meeting Society for Neuroscience, Orlando- Florida, U.S.A., 2-8 novembre 2002*

[Abs.526.15] Integration of ceramide-induced death program and retinoic acid differentiative pathway.

D. Pace, R. Picco, F. Condorelli and P.L. Canonico.

D.I.S.C.A.F.F. Università del Piemonte Orientale, Novara (Italy).

[Abs.818.2] Expression of hematopoiesis-related non-receptor tyrosine kinase Fes in neuroblastoma cell lines.

R. Picco¹, D. Barbone¹, S. Ferrari¹, **D. Pace**¹, M. Missale², P.L. Canonico¹ and F. Condorelli¹.

1.D.I.S.C.A.F.F. Università del Piemonte Orientale, Novara (Italy).

2. Università di Brescia (Italy)

- *Molecular strategies for understanding neurological and psychiatric disorder, Brescia 19-20 Dicembre 2002*

[Abs.21] Differentiation and cell signalling: ceramide-dependent modulation of neuroblastoma cell viability

D.Pace¹, R. Picco¹, F. Condorelli¹, P.L. Canonico¹

1.D.I.S.C.A.F.F. Università del Piemonte Orientale, Novara (Italy).

- *Camillo Golgi Program for brain research IIInd meeting on molecular strategies for understanding neurological and psychiatric disorders, Pavia 7, aprile 2004*

[P.15] HDAC inhibitors and valproic acid (VPA): histone deacetylation in neuronal differentiation and apoptosis

Gargiulo M.1, **Pace D.**1, Condorelli F.1, Canonico P.L.1

¹ D.I.S.C.A.F.F., Università del Piemonte Orientale, via Bovio,6 28100 - Novara (Italy).

- *4th Forum of European Neuroscience, Lisbona, 10-14 luglio 2004*

[A.145.10] Valproic acid (VPA) differentially affects viability and differentiation of neuroblastoma cells

Gargiulo M.¹, **Pace D.**¹, Condorelli F.¹, Canonico P.L.¹

¹D.I.S.C.A.F.F., Università del Piemonte Orientale, via Bovio,6 28100 - Novara (Italy).

- *III Meeting Molecular Strategies for Understanding Neurological and Psychiatric Disorders, Novara, 19-20 maggio, 2005*

Imatinib (Glivec) decreases cell proliferation and increases steep decline of AKT protein and phosphorylation levels.

Pace, D.; Genazzani, A.A.; Canonico, P.L.; Condorelli, F.

D.I.S.C.A.F.F., Università del Piemonte Orientale, via Bovio,6 28100 - Novara (Italy).

- *32° Congresso Nazionale della Società Italiana di Farmacologia, Napoli, Italia, 1-4 giugno 2005*

Effects of imatinib(Glivec) on human neuroblastoma cell lines

Pace D.1, Condorelli F.1, Canonico P.L.1

¹D.I.S.C.A.F.F., Università del Piemonte Orientale, via Bovio,6 28100 - Novara (Italy).

Alla fine di questa bellissima esperienza non rimane altro che ringraziare le persone, e sono tante, che mi sono state vicine, mi hanno aiutato, incoraggiato e perché no fatta rinsavire quando ce n'è stato bisogno!

Incominciamo da chi mi ha dato questa possibilità il Prof. Ciro Isidoro, sempre presente quando serviva, nonostante io non fossi più ufficialmente nel suo labo, anche per "mazzeolare" !! La dott.sa Roberta "Bettina" Castino ma mi chiedo come avrei fatto senza di te! Un'amica insostituibile è grazie a lei che ho potuto apprezzare le sfaccettature di questo piccolo grande mondo,

Passando al DISCAFF sicuramente il primo della lista è lui il Chiar. mo Prof. Pier Luigi Canonico ormai diventato "Lo Zio" uno di famiglia per averci adottato a suo rischio e pericolo e che rischi!!

Il dott. Condorelli Fabrizio il piccolo Diogene della farmacologia che cerca disperatamente la verità in ciò che fa e che si è messo a disposizione e in gioco più volte, per i suoi discepoli, abbiamo avuto tutto sommato poche occasioni di scambio di idee in modo tranquillo in questi anni, ma la mia stima per lui non è mai venuta meno.

Il prof. Genazzani Armando, dal suo arrivo ha portato una ventata di novità nei laboratori di via Bovio e sicuramente una grande risorsa il dott. Billington Richard che oltre ad aiutarmi concretamente per questo lavoro di tesi, si è rivelata una persona molto speciale.

I ragazzi del laboratorio di farmacologia hanno giocato tutti un ruolo molto importante, a partire dalle ragazze che ho seguito più da vicino in tesi in questi anni: Alessandra, Silvia, Sara, Cristina a quelli che sono tutt'oggi in labo e con cui è rimasto un feeling speciale: Elisa B., Elisa F., Daniela, Francesca, Stefania e Jumpy.

Un grazie sincero va ai miei familiari tutti, e ad oggi le famiglie sono due, perché gliene ho fatte passare tante grazie mamma, papà, Luciana, Ezio, nonni Maria, Francesco e Antonietta

In particolare l'ultimo grazie va ad Alberto che in tutto questo marasma ha trovato il coraggio anche di sposarmi!!