

## REVIEW

# SFINGOSINA I-FOSFATO (SIP): UN PONTE TRA HDL, INFIAMMAZIONE E ATEROSCLEROSI?

## Sphingosine 1-Phosphate (SIP): a bridge between HDL, inflammation and atherosclerosis?

FRANCESCO POTÌ<sup>1,2</sup>, LAVINIA BEATRICE GIVA<sup>1</sup>, MANUELA SIMONI<sup>1,2</sup>,  
JERZY-ROCH NOFER<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento Integrato di Medicina, Endocrinologia, Metabolismo e Geriatria,  
Unità Operativa di Endocrinologia, Azienda USL di Modena;

<sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Biomediche, Metaboliche e Neuroscienze - Sezione Endocrinologia,  
Università di Modena e Reggio Emilia;

<sup>3</sup>Centro per la Medicina di Laboratorio, Ospedale Universitario di Münster, Germania

### SUMMARY

Several epidemiological studies documented an inverse relationship between plasma high density lipoprotein (HDL) cholesterol levels and the extent of atherosclerotic disease. However, recent clinical trials targeting HDL cholesterol failed to show clinical benefits in term of cardiovascular risk reduction, suggesting that other HDL components than cholesterol may account for anti-atherogenic effects attributed to this lipoprotein. Sphingosine 1-phosphate (S1P) - a lysosphingolipid exerting its biological activity via binding to specific G-protein coupled receptors and regulating a wide array of biological responses in a variety of different organs and tissues including the cardiovascular system - has been identified as an integral constituent of HDL particles. In plasma, S1P is present at high nanomolar concentrations, mainly bound to HDL and at less extent to albumin and other lipoproteins. Epidemiological studies suggest that the partitioning of S1P into HDL and non-HDL plasma pool may be relevant to the pathogenesis of coronary artery disease (CAD). *In vitro* experimental approaches identified several intracellular signaling events induced by HDL-associated S1P, located downstream S1P receptors, and producing modulatory effects relevant to atheroprotective action unfolded by this lipoprotein. However, the results of studies addressing the influence of S1P on the development of atherosclerosis under *in vivo* conditions have been less conclusive and both anti- and pro-atherogenic effects have been observed in animal models of atherosclerosis. In the present review we discuss current evidence from epidemiological studies, experimental approaches *in vitro*, and animal models of atherosclerosis suggesting that S1P contributes to atheroprotective effects exerted by HDL particles.

**Keywords:** High density lipoproteins (HDL), sphingosine 1-phosphate (S1P), atherosclerosis, inflammation.

### Indirizzo per la corrispondenza

Francesco Potì  
Dipartimento Integrato di Medicina,  
Endocrinologia, Metabolismo e Geriatria,  
Laboratorio Universitario  
di Endocrinologia Molecolare  
e-mail: f.poti@ausl.mo.it

### Introduzione

Indagini cliniche ed epidemiologiche hanno documentato in modo convincente la relazione inversa tra i livelli plasmatici del colesterolo legato alle lipoproteine ad

alta densità (HDL-C) e le malattie cardiovascolari (CVD). Studi come il Framingham Heart Study (1) ed il Prospective Cardiovascular Munster (PROCAM) (2), hanno dimostrato che bassi livelli di HDL-C rappresentano un fattore di rischio indipendente per CVD, stimando una riduzione del rischio del 2-3% per ogni aumento di 1 mg/dl (0,026 mmol/L) di HDL-C (1, 2). Esperimenti condotti su animali transgenici hanno inoltre provato che lo sviluppo delle lesioni aterosclerotiche può essere ritardato o addirittura bloccato dalla sovraespressione o dalla somministrazione esogena di apolipoproteina (apo)A-I, la proteina più abbondante nelle HDL (3).

Inoltre, l'infusione di HDL ricostituite si è dimostrata efficace nel ridurre il volume della placca aterosclerotica a livello coronarico sia in modelli animali sia nell'uomo (3).

Ad oggi, sono stati compiuti numerosi sforzi per identificare terapie capaci di innalzare i livelli di HDL-C, partendo dal presupposto che un tale effetto potesse tradursi in un rischio CV ridotto. Tuttavia, le evidenze più recenti indicano che il semplice aumento dei livelli plasmatici di HDL-C non sia efficace nella protezione dalle malattie cardiovascolari (4). Ad esempio, gli studi AIM-HIGH e HPS2-THRIVE, nei quali la niacina è stata somministrata in combinazione alle statine proprio con lo scopo di intervenire sui bassi livelli di HDL-C, non hanno dimostrato un ulteriore beneficio clinico in termini di riduzione del rischio cardiovascolare (5, 6). Allo stesso modo, gli studi ILLUMINATE e dal-OUTCOME, nei quali pazienti con sindrome coronarica acuta sono stati randomizzati per il trattamento con placebo o con due inibitori della cholesterol ester transfer protein (CETP), torcetrapib o dalcetrapib rispettivamente, hanno evidenziato una mancanza di efficacia nel

ridurre gli eventi cardiovascolari, nonostante l'aumento imponente del HDL-C (7, 8). Recentemente, un ampio studio di randomizzazione mendeliana (20.913 casi e 95.407 controlli) (9) ha dimostrato che comuni polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) associati esclusivamente con alti livelli di HDL-C non influenzano il rischio di infarto miocardico. Al contrario, è possibile osservare un rischio ridotto nei portatori di SNPs che si associano con bassi livelli di colesterolo legato alle lipoproteine a bassa densità (LDL-C). Complessivamente, i risultati degli studi clinici e degli studi di randomizzazione mendeliana suggeriscono che il semplice contenuto di colesterolo sia una misura poco predittiva degli effetti anti-aterogenici esercitati dalle HDL (4). Infatti, il colesterolo rappresenta solo uno dei numerosi costituenti delle HDL, che risultano composte da più molecole di apoA-I, un guscio di fosfatidilcolina, oltre 80 proteine, centinaia di specie lipidiche e microRNAs (10, 11). Teoricamente, ciascuno di questi componenti può contribuire direttamente o indirettamente al potenziale anti-aterogeno delle HDL. Negli ultimi due decenni, un certo numero di studi (12-14) ha dimostrato che le HDL fungono da vettore per la sfingosina 1-fosfato (S1P), un lisosfingolipide che esercita la sua attività biologica principalmente legandosi a cinque specifici recettori accoppiati a proteine G, denominati S1P1-5 (15, 16). È stato dimostrato che S1P è in grado di regolare una pletera di risposte biologiche in diversi organi, tessuti e cellule, compreso il sistema cardiovascolare (16). Inoltre, S1P si è rivelata un potente regolatore del trafficking dei linfociti T (17) e le vie di trasduzione del segnale attivate da S1P possono controllare la risposta dell'ospite alle infezioni (18, 19) e svolgere un ruolo di primo piano nella progressione tumorale

(20). Alcune review eccellenti hanno trattato ampiamente questi argomenti cui si rimanda per un maggiore approfondimento (15, 16). Nel presente lavoro ci siamo prefissi di riassumere quegli elementi che suggeriscono che S1P associata alle HDL sia rilevante per gli effetti ateroprotettivi esercitati da queste lipoproteine, evidenziando le peculiari attività anti-aterogene mediate da S1P *in vitro* e *in vivo*.

### Distribuzione di S1P nel plasma e nelle lipoproteine

#### S1P nel plasma

S1P viene sintetizzata a partire dalla sfingosina, il suo precursore diretto proveniente dalla via metabolica della ce-

ramide/sfingomielina, per azione delle sfingosina chinasi 1 o 2 (SphK 1 o 2). Al contrario, la sua degradazione avviene tramite specifiche fosfatasi, che la defosforilano generando nuovamente sfingosina, la quale viene ulteriormente degradata in modo irreversibile a fosfoetanolina ed esadecenale tramite l'enzima S1P-liasi (Figura 1) (16, 21). Nel plasma, S1P è presente in concentrazioni nanomolari elevate (200-900 nmol/L) (22), mentre di norma nei tessuti si osservano livelli inferiori (23). Le donne sia in pre- che post-menopausa hanno livelli plasmatici di S1P significativamente più elevati rispetto agli uomini della stessa età (24).

Un fenomeno importante per le azioni biologiche di questo lisosfingolipide è

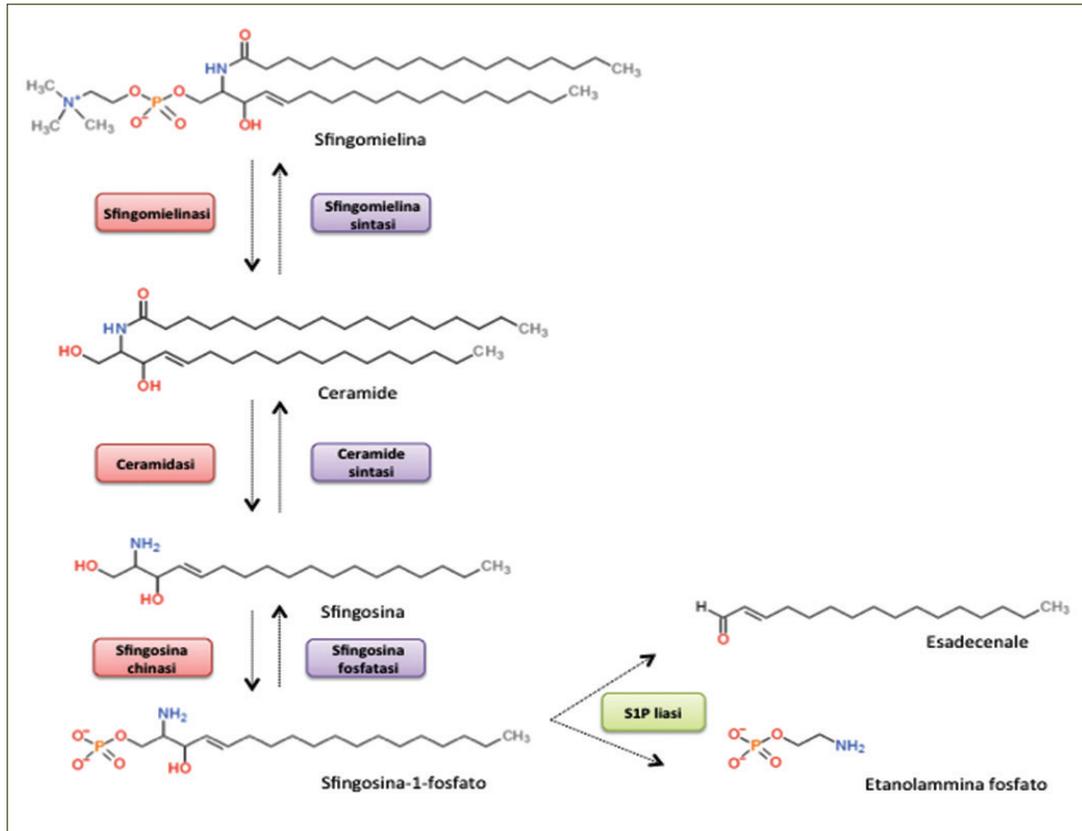


Figura 1 - Via biosintetica della sfingosina 1-fosfato (S1P) e principali enzimi coinvolti.

l'esistenza di un gradiente tissutale molto netto. È stato stimato, infatti, che le concentrazioni di S1P nel sistema linfatico corrispondono a circa il 25% dei livelli plasmatici (25), mentre nel liquido interstiziale S1P si ritrova in quantità ancora inferiori (23). Si ritiene che le elevate concentrazioni di S1P nel sangue derivino da diverse fonti. Le piastrine sono state inizialmente proposte come la fonte principale, poiché a causa di un deficit di S1P-liasi esse riescono ad immagazzinare livelli elevati di S1P (26).

Tuttavia, si è osservato che i topi knock-out per il gene NF-E2 (nuclear factor-erythroid 2), praticamente privi di piastrine circolanti, hanno concentrazioni plasmatiche di S1P nella norma (25).

Inoltre, finora non è stata rilevata alcuna correlazione tra parametri piastrinici del sangue e livelli plasmatici di S1P (27). Sembra, quindi, che le piastrine non contribuiscano in modo significativo al contenuto plasmatico di S1P, almeno in condizioni di omeostasi, anche se potrebbero aumentarne le concentrazioni locali durante la formazione del trombo. In alternativa, si è ipotizzato che gli eritrociti svolgano un ruolo fondamentale nel generare e mantenere i normali livelli plasmatici di S1P, in quanto capaci di immagazzinare e rilasciare nel plasma S1P in modo efficiente. Inoltre, il trasferimento di eritrociti wild-type in topi knock-out condizionali per entrambe le isoforme SphK1/2, caratterizzati da concentrazioni ematiche di S1P non rilevabili, è in grado di ripristinare i normali livelli di S1P nel plasma (25, 28) e, a differenza delle piastrine, vi è una stretta correlazione tra il numero di eritrociti nel sangue e livelli plasmatici di S1P (27, 28). Attualmente, il ruolo degli eritrociti nella regolazione dei livelli di S1P nel plasma trova sempre maggiori conferme (29), accanto a studi

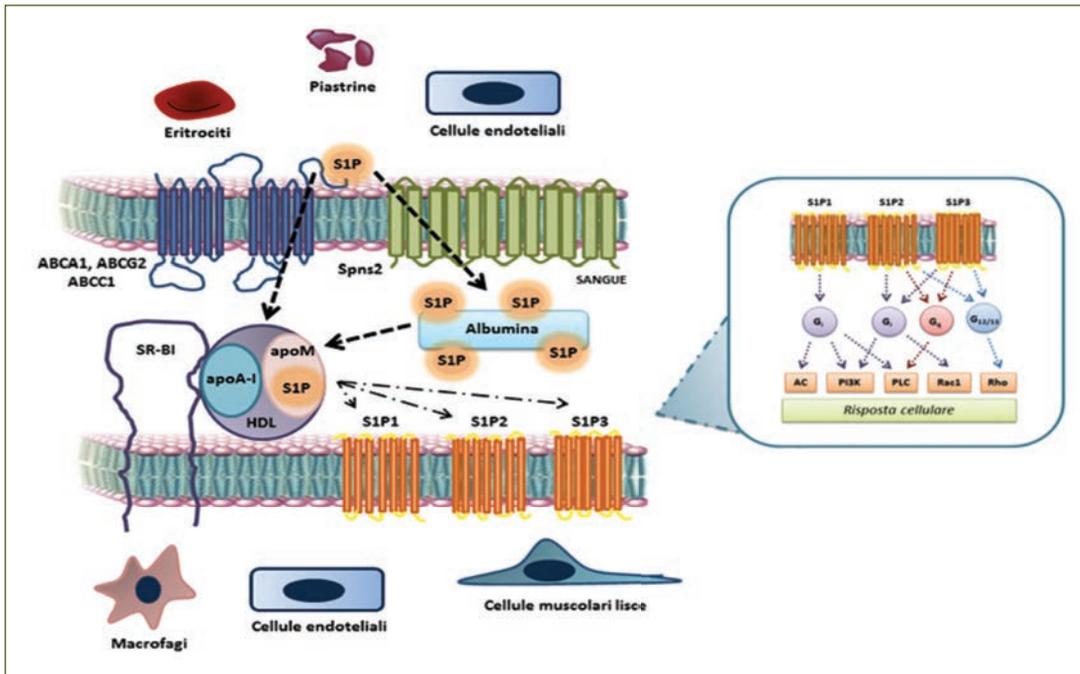
che suggeriscono anche l'endotelio vascolare come un organo importante in tale processo (30).

A fronte dell'elevata concentrazione di S1P nel sangue, da studi *in vitro* è emerso che per l'attivazione dei recettori sia sufficiente una potenza di circa 10-100 nmol/L (31). Di conseguenza, se l'intera quota plasmatica di S1P fosse attiva, i suoi recettori (S1PRs) presenti sulle cellule ematiche ed endoteliali sarebbero costantemente saturi di ligando. Infatti, stimolando cellule in coltura con plasma delipidato, contenente S1P solo in tracce, si è osservato uno spostamento verso destra delle relative curve dose-risposta (22). Basandosi su ciò e dato che, in condizioni fisiologiche, le cellule del sangue e l'endotelio sono in contatto diretto col plasma, si è calcolato che solo il 2% della S1P plasmatica possa essere attiva.

#### *S1P nelle lipoproteine ad alta densità (HDL)*

Nel plasma, S1P è ripartita per circa il 55% nelle HDL, per il 35% nell'albumina, mentre solo per il 10% in altre lipoproteine, soprattutto LDL (22). È molto interessante notare che a questa differente compartimentazione sembra corrispondere anche una diversa funzionalità (*Figura 2*).

Inizialmente, alcuni studi *in vitro* avevano dimostrato come il complesso HDL-S1P (*HDL-bound S1P*) ed il complesso albumina-S1P (*albumin-bound S1P*) fossero equipotenti nello stimolare risposte cellulari a breve termine, quali l'attivazione delle MAP-chinasi (MAPK) e dell'ossido nitrico sintasi endoteliale (eNOS); tuttavia, HDL-S1P risultava decisamente più potente nello stimolare funzioni a lungo termine, come la sopravvivenza cellulare (13, 31, 32). Recentemente, uno studio molto elegante di Wilkerson et al. (33) ha dimostrato che HDL-S1P contribuisce



**Figura 2** - Rappresentazione schematica del trasporto, della distribuzione e del meccanismo d'azione di S1P. S1P è sintetizzata principalmente da piastrine, eritrociti e cellule endoteliali ed è trasportata nel plasma, mediante Spns2 o i trasportatori ATP-binding cassette (ABC) A1, C1 o G2, per il legame con le HDL o l'albumina. S1P, legato specificamente all'apoM, interagisce con i recettori S1P (S1P1, S1P2 o S1P3) presenti sulle cellule del sistema cardiovascolare attivando vie intracellulari che coinvolgono le proteine G trimeriche ( $G_i$ ,  $G_q$  o  $G_{12/13}$ ) e altri enzimi quali l'adenilato ciclasi (AC), la fosfoinositide 3-chinasi (PI3K), la fosfolipasi C (PLC) e le piccole proteine G come Rac1 e Rho. Il legame tra le HDL e il recettore SR-BI, mediato da apoA-I, potrebbe facilitare il signaling dipendente da S1P.

a mantenere integra la barriera endoteliale in modo molto più efficace rispetto al complesso albumina-S1P. Inoltre, gli stessi autori hanno osservato che solo HDL-S1P, e non albumina-S1P, è in grado di ridurre la degradazione del recettore S1P1 e ne favorisce il riciclo sulla superficie cellulare, dimostrando chiaramente che il tipo di *carrier* di S1P è un fattore determinante in questo processo (33). È interessante notare che S1P associata alle HDL possiede un'emivita quattro volte più lunga rispetto a S1P legata all'albumina (31). Complessivamente, queste osservazioni suggeriscono che le HDL rappresentino un serbatoio plasmatico stabile di S1P pienamente attiva, capace di esercita-

re azioni anti-aterogene sia a breve che a lungo termine. Al contrario, a causa della sua alta concentrazione nel plasma, l'albumina può agire sia come riserva sia come trappola molecolare per S1P, impedendo efficacemente l'eccessiva stimolazione dei recettori S1PR.

I meccanismi alla base dell'accumulo di S1P nelle HDL sono ancora ignoti. Alcune evidenze indicano che queste lipoproteine riescano ad estrarre efficacemente S1P dalle membrane degli eritrociti (34). Spns2 (spinster homolog 2) è stato suggerito come un trasportatore specifico coinvolto nella mobilizzazione di S1P dalle cellule (35). Sebbene Spns2 influenzi principalmente i livelli di S1P nel com-

partimento linfatico, esso contribuisce al trasporto di S1P dalle cellule endoteliali; inoltre, topi knock-out per *Spns2* presentano concentrazioni plasmatiche di HDL-S1P inferiori rispetto ai wild-type (36). Tuttavia, fino ad oggi, non vi sono evidenze che il carico di S1P presente nelle HDL sia dovuto univocamente a *Spns2*. Studi recenti indicano che i trasportatori ABC possano svolgere un ruolo cruciale nel mediare il trasporto di S1P dalle cellule. È stato dimostrato che la glibenclamide, un inibitore aspecifico dei trasportatori ABC, è in grado di sopprimere il rilascio di S1P dalle piastrine (37) e dagli eritrociti (38). Altri studi hanno inoltre dimostrato che *ABCC1* è coinvolto nell'efflusso di S1P da mastociti, cellule endoteliali, adipociti, cellule di Langerhans e, insieme con *ABCG2*, nella liberazione di S1P indotta da estradiolo nelle cellule MCF-7 di cancro al seno (39, 40). Quest'ultima osservazione potrebbe anche spiegare gli elevati livelli plasmatici di S1P riscontrati nelle donne (vedi sopra). Analogamente a quanto detto per *Spns2*, non vi sono prove sufficienti che indichino un'interazione diretta tra *ABCC1* e le particelle HDL. Tuttavia, è ben nota l'interazione delle HDL con altri membri della famiglia ABC, quali *ABCA1* e *ABCG1*, così come la loro capacità di promuovere l'efflusso di colesterolo e fosfolipidi dalle cellule attraverso tali trasportatori. Solo due studi hanno finora suggerito che *ABCA1* sia responsabile dell'arricchimento in S1P delle HDL nel sistema nervoso centrale (41). Questo meccanismo, comunque, non è stato ancora dimostrato per quanto riguarda l'accumulo di S1P nelle lipoproteine plasmatiche.

#### *S1P e apolipoproteina M nelle HDL*

Il calcolo del rapporto molare S1P/HDL nel plasma indica che in media ogni dieci

particelle di HDL una sola funge da vettore per S1P. Questa osservazione solleva una questione interessante e cioè che S1P possa essere specificamente associata ad una sottopopolazione distinta di HDL. In effetti, l'apoM - un membro della superfamiglia delle lipocaline - è stata identificata come la proteina che lega S1P nelle HDL plasmatiche (42). La concentrazione di apoM nel plasma è di circa 0,9  $\mu\text{mol/L}$ , ripartita per oltre il 95% nelle HDL, principalmente nella sottoclasse HDL<sub>3</sub>, mentre il resto tra LDL e VLDL (43).

L'analisi cristallografica e gli studi di ligand-binding effettuati su isoforme wild-type o mutanti di apoM hanno dimostrato che S1P lega apoM con una  $IC_{50}$  di 0,9  $\mu\text{mol/L}$ , che è concorde con le concentrazioni fisiologiche di S1P nel plasma (44). Uno studio pionieristico ha rivelato che S1P è assente nelle HDL di topi knock-out per apoM, ma è possibile riscontrarne un aumento significativo nelle HDL di topi transgenici sovraespressanti apoM umana (42). Inoltre, nelle cellule endoteliali, solo le HDL contenenti apoM sono in grado di indurre risposte tipiche dell'asse S1P-S1P1, come l'internalizzazione dello stesso recettore S1P1, l'attivazione delle chinasi MAP e Akt, e la migrazione. Inoltre, i topi knock-out per apoM mostrano una funzionalità alterata della barriera endoteliale con conseguente fuoriuscita di liquido dal letto vascolare nei polmoni (42). Lo stesso studio ha inoltre dimostrato che anche nel plasma umano il contenuto di S1P delle HDL è limitato alle particelle lipoproteiche contenenti apoM. Tuttavia, non è stata trovata alcuna correlazione significativa tra S1P totale e apoM nel plasma umano (45).

Alcune ragioni importanti possono essere alla base di questa apparente discrepanza. In primo luogo, è probabile che la frazione di S1P legata all'albumina con-

tribuisca maggiormente alla variabilità della S1P plasmatica totale piuttosto che di S1P legata alle HDL contenenti apoM. In secondo luogo, l'apoM non è completamente satura di S1P e può legare altri composti lipofili, per esempio fosfolipidi ossidati (46) o retinolo (47), attenuando così la possibile correlazione tra apoM e S1P nel plasma. Di recente, sono stati generati topi transgenici (apoM-Tg) che sovraesprimono apoM specificamente negli epatociti (48). Nel plasma di questi animali si osserva la presenza di HDL grandi e arricchite di S1P, anche se i livelli totali di HDL-C risultano simili negli animali transgenici e nei wild-type. È importante sottolineare che epatociti primari isolati dai topi apoM-Tg mostrano un aumento della sintesi e della secrezione di S1P, suggerendo che il trasporto di S1P dagli epatociti sia in gran parte apoM-dipendente (48).

### **Livelli plasmatici di S1P e malattie cardiovascolari**

Ad oggi, solo poche indagini hanno analizzato sistematicamente la relazione tra livelli plasmatici di S1P e CVD. In un primo studio, che ha coinvolto 308 pazienti sottoposti ad angiografia coronarica per diverse indicazioni, è stato dimostrato che i soggetti con malattia coronarica (CAD) avevano livelli sierici di S1P più alti (49). Inoltre, i livelli di S1P erano in grado di predire la malattia ostruttiva meglio dei classici fattori di rischio cardiovascolare e correlavano strettamente con la sua gravità.

Purtroppo, in questo studio non vi erano dati sulla differente distribuzione di S1P tra HDL e albumina, né su eventuali correlazioni specifiche tra HDL-S1P e CVD. Alcuni anni più tardi, è stato riportato che i livelli plasmatici di HDL-S1P erano più

bassi nei soggetti con infarto miocardico e CAD stabile, mentre i livelli di S1P non legata alle HDL erano più elevati rispetto ai controlli sani (50). In questo studio, i livelli di plasmatici di HDL-S1P erano correlati inversamente con la gravità dei sintomi, mentre i livelli di S1P non legato alle HDL (ad es., albumina-S1P) aumentavano proporzionalmente con la gravità della CAD (50). Un altro studio recente, che ha coinvolto 204 soggetti selezionati all'interno della coorte del Copenhagen City Heart Study (CCHS), ha mostrato che esiste una significativa correlazione inversa tra i livelli di HDL-S1P nel siero e la presenza di CAD (51).

È interessante notare che questa relazione inversa era indipendente dai livelli di HDL-C dopo stratificazione dei soggetti per alti (femmine:  $\geq 73,5$  mg/dL; maschi:  $\geq 61,9$  mg/dL) e bassi (femmine:  $\leq 38,7$  mg/dL; maschi:  $\leq 34,1$  mg/dL) livelli di HDL-C nel siero. Gli stessi autori hanno anche osservato livelli superiori di HDL-S1P in individui senza CAD rispetto a pazienti affetti da CAD, suggerendo che lo stato patologico possa influire in modo determinante sulla ripartizione di S1P, spostando il lisosfingolipide dalle HDL verso l'albumina o altre lipoproteine (51).

Un piccolo studio di Knapp et al. (52) ha mostrato che i pazienti con infarto miocardico acuto avevano livelli significativamente più bassi di S1P plasmatica totale rispetto ai controlli. In linea con i risultati precedenti, lo stesso gruppo ha recentemente scoperto che i pazienti con infarto acuto del miocardio con sopraslivellamento del tratto ST (STEMI) presentano livelli plasmatici di S1P inferiori rispetto ai controlli sani (53). Questo effetto, già presente al momento del ricovero, era mantenuto per almeno 30 giorni dopo l'infarto. È interessante notare che, a distanza di due anni post-infarto, i livelli di S1P nel

plasma venivano ripristinati solo in parte (53). Tuttavia, il calo della concentrazione plasmatica delle HDL di norma riscontrabile dopo un evento ischemico acuto potrebbe essere in parte responsabile della diminuzione dei livelli di S1P evidenziata nei precedenti lavori. Uno studio recente ha esaminato il ruolo degli sfingolipidi plasmatici dopo l'ischemia cardiaca transitoria che si verifica durante l'intervento coronarico percutaneo (PCI) di routine (54). I livelli totali di S1P, così come quelli di sfingosina e sfinganina, sono stati valutati in campioni di sangue prelevati dal seno coronarico e dalla vena femorale di 31 pazienti, al baseline e a tempi diversi dopo il PCI. È stato osservato un aumento significativo dei livelli di S1P rispetto al controllo con un picco massimo 5 minuti dopo PCI e tale incremento era fortemente correlato con i livelli di troponina T, un biomarker di danno miocardico (54).

Altri studi hanno dimostrato che i livelli di S1P nel plasma possono essere modificati in patologie che alterano l'omeostasi vascolare e che contribuiscono allo sviluppo dell'aterosclerosi, come il diabete di tipo 2 e l'obesità. Per esempio, Kowalski et al. hanno osservato elevati livelli di S1P totale in modelli murini di obesità, in cui la patologia era indotta tramite dieta ad alto contenuto di grassi (*high-fat diet*) o geneticamente (*ob/ob*), rispetto ai controlli magri, e questo risultato è stato parallelamente osservato anche negli esseri umani obesi (55).

In questi soggetti, i livelli di S1P correlavano positivamente con la percentuale totale di grasso corporeo, l'indice di massa corporea, la circonferenza vita, l'insulina a digiuno, l'HbA1c ed i livelli di LDL-C. Un altro lavoro ha mostrato che pazienti con diabete di tipo 2 possiedono livelli di HDL-S1P maggiori rispetto agli individui sani, suggerendo che questo

possa rappresentare un meccanismo fisiologico di compensazione messo in atto per contrastare le complicanze vascolari della malattia, attraverso l'induzione della ciclo-ossigenasi 2 (COX-2) ed il rilascio prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) (56).

Complessivamente, questi risultati suggeriscono che la ripartizione di S1P nelle HDL e nei diversi pool non-HDL del plasma può essere rilevante nella patogenesi di CAD, con effetti diversi o addirittura opposti sul sistema cardiovascolare a seconda che S1P sia legata o meno alle HDL. In generale, quando associata alle HDL, S1P è in grado di esercitare effetti benefici e protettivi, mentre al contrario, quando legata principalmente all'albumina si è rivelata un fattore capace di influenzare in modo variabile l'infiammazione a livello tissutale, contribuendo a stimolare reazioni sia pro- che anti-infiammatorie.

### **Effetti anti-aterogeni mediati da S1P: studi *in vitro***

I risultati degli studi epidemiologici che dimostrano la relazione inversa tra i livelli di HDL-C nel plasma e il rischio cardiovascolare hanno stimolato la continua ricerca dei meccanismi molecolari alla base di questo rapporto. Negli ultimi due decenni è divenuto sempre più evidente che le HDL sono in grado di interagire con quasi ogni tipo di cellula coinvolta nella patogenesi dell'aterosclerosi e che le alterazioni funzionali derivanti da tale interazione possono essere direttamente responsabili delle azioni ateroprotettive di queste lipoproteine. Da un punto di vista meccanicistico, l'attracco delle HDL sulla superficie cellulare e la successiva interazione di uno o più componenti di queste particelle con determinati recettori fornisce un quadro molecolare attraverso cui le HDL possono indurre le diverse risposte cellulari.

Tra le diverse proteine capaci di legare ed ancorare le HDL alla superficie cellulare, lo scavenger receptor type BI (SR-BI) è stato identificato come un recettore specifico, capace di avviare la trasduzione del segnale in seguito all'interazione con l'intera lipoproteina (per un approfondimento (57).

Numerose evidenze suggeriscono che il legame delle HDL a SR-BI può fornire la

prossimità spaziale necessaria per l'efficace interazione delle molecole di S1P trasportate dalle lipoproteine ed i rispettivi recettori di membrana.

Ad esempio, è stato dimostrato che alcuni effetti potenzialmente anti-aterogeni esercitati dalle HDL su cellule endoteliali o aorte murine isolate sono attenuati dal deficit molecolare di SR-BI o in presenza di anticorpi diretti contro questo recettore

**Tabella I - Effetti anti-aterogeni di S1P osservati negli studi *in vitro*.**

Cellula/tessuto	Effetto (atero)protettivo in vitro	Recettore coinvolto	Via di trasduzione extra-/intra-cellulare	Referenze
Cellule endoteliali (EC)	Proliferazione	S1P1	ERK, Ras	(13)
	Sopravvivenza	S1P1	Akt, ERK8	(69,13)
	Migrazione	S1P1, S1P3	Akt, AMPK, EL, p38MAPK	(62,74)
	Angiogenesi	S1P1	Akt, EL, ERK	(68)
	Vasodilatazione	S1P1, S1P3	Akt, AMPK, Ca <sup>2+</sup> , EL, eNOS, ERK	(58, 60, 67)
	Inibizione dell'adesione dei monociti	S1P1	Akt, NF-κB	(60)
	Incremento dell'effetto barriera	S1P1	Akt, ERK, FAK?	(64,33)
	Espressione di TGF-β	?	Akt, ERK, Smad2/3	(68, 72, 73)
	Espressione di PTX3	S1P1, S1P3	Akt	(72, 73)
Cellule muscolari lisce (SMC)	Proliferazione	S1P2?	ERK, Raf	(86)
	Inibizione della migrazione	S1P2	?	(83, 93)
	Produzione di PGI <sub>2</sub>	S1P2	COX-2, ERK, p38MAPK	(77)
	Inibizione della generazione di ROS	S1P3	NADPH oxidase, Rac1	(59)
	Desensibilizzazione della Guanil ciclasasi B	?	Akt, ERK	(76)
Cardiomiociti	Sopravvivenza	S1P2, S1P3	Akt, ERK, Ras, STAT3	(66,78,79)
	Protezione dal danno da ischemia/riperfusion	S1P2, S1P3	Akt, NO	(66, 78,79)
	Comunicazione intercellulare tramite gap junction	?	Cx43, PKC	(80)
Macrofagi	Inibizione del signaling proinfiammatorio	S1P1, S1P2	Akt, NF-kB, Ras	(82)

Abbreviazioni: Akt - proteina chinasi B; AMPK - chinasi AMP-attivata; COX - ciclossigenasi; Cx - connessina; EL - lipasi endoteliale; ERK - chinasi regolata da segnali extracellulari; FAK - chinasi di adesione focale; eNOS - nitrossido sintasi endoteliale; MAPK - proteine chinasi attivate da mitogeno; NO - ossido nitrico; NF-kB - fattore nucleare kB; PGI<sub>2</sub> - prostaciclina; PKC - proteina chinasi C; STAT - (fattore di trascrizione) trasduttore del segnale e attivatore della trascrizione; TGF - fattore di crescita trasformante.

scavenger (58, 59). Inoltre, l'espressione di molecole di adesione indotta nelle cellule endoteliali da basse concentrazioni di S1P si riduce notevolmente in presenza di concentrazioni fisiologiche di HDL in modo SR-BI-dipendente (60). Viceversa, l'aumento dell'espressione di SR-BI nelle cellule endoteliali potenzia gli effetti delle HDL correlati al loro contenuto di S1P (61).

Tuttavia, è bene considerare che numerosi effetti cellulari indotti dalle HDL (13, 58, 60, 62-66) dipendono strettamente dalla presenza e dalla partecipazione a tali processi delle proteine G trimeriche, partner canonici per le vie di trasduzione associate ai recettori a sette eliche transmembrana. Ciò suggerisce che le cascate di signaling intracellulare innescate dalle HDL dipendano principalmente dai recettori di S1P anziché da SR-BI.

Sempre maggiori evidenze indicano che, attraverso la stimolazione dei suoi recettori, S1P svolge un ruolo primario nell'attivare vie di signaling legate alle azioni ateroprotettive di queste lipoproteine. Qui di seguito si riassumono gli effetti cellulari anti-aterogenici delle HDL sulle cellule endoteliali, muscolari lisce, cardiomiociti e macrofagi, con una particolare attenzione all'attività di S1P (*Tabella 1*).

### *Cellule endoteliali*

Le HDL innescano una serie di eventi nelle cellule endoteliali e molti di essi possono essere attribuiti al loro carico di S1P. In particolare, l'attivazione della chinasi regolata da segnali extracellulari (ERK), della chinasi attivata da AMP (AMPK) e della proteina chinasi B (PKB o Akt) è fondamentale per il signaling S1P-dipendente (13, 67). Come dimostrato da Kimura et al. (13), HDL-S1P modula la proliferazione e la sopravvivenza delle cellule endoteliali attivando ERK. Utilizzando oli-

gonucleotidi antisenso, siRNA e inibitori farmacologici delle proteine G trimeriche, questi autori hanno inoltre dimostrato che entrambi i recettori S1P1 e S1P3 contribuiscono a indurre la migrazione HDL-mediata delle cellule endoteliali, mentre la stimolazione della sopravvivenza endoteliale sembra dovuta principalmente al recettore S1P1 (62).

Due studi successivi hanno rivelato che HDL-S1P agisce sulle cellule endoteliali promuovendo la formazione di strutture tubulari attraverso l'attivazione di MAPK (63) e che l'arricchimento delle HDL con S1P esogena stimola ulteriormente la risposta angiogenica (68).

È stato dimostrato in modo convincente che diverse risposte anti-aterogene indotte da HDL-S1P possono essere attribuite all'attivazione di Akt. Ad esempio, HDL-S1P riesce a "spegnere" la proteina proapoptotica Bad tramite la stimolazione di Akt, inibendo così l'interruzione del potenziale mitocondriale, il rilascio del citocromo C, l'attivazione delle caspasi 3 e 9, ed il conseguente avvio dell'apoptosi (69). Inoltre, HDL-S1P è responsabile, almeno in parte, della stimolazione dell'eNOS, cui seguono generazione di NO e vasodilatazione (58, 60, 67), e questi effetti sembrano essere mediati da S1P1 e/o S1P3.

È interessante notare che nei topi la somministrazione di fenofibrato aumenta i livelli plasmatici di HDL e S1P, così come l'espressione dei recettori S1P1 e S1P3, e questi effetti culminano in una maggiore attivazione di Akt ed eNOS (70). Allo stesso modo, la stimolazione farmacologica di cellule endoteliali con statine, quali simvastatina e pitavastatina, induce l'espressione di S1P1 e aumenta l'attività di eNOS HDL-dipendente (61, 71). Come riportato da Kimura et al. (60), S1P1 media gli effetti inibitori delle HDL sull'espressione endoteliale di molecole di adesione, come

VCAM1 e ICAM1, e questo è legato alla down-regolazione dell'attività di NF-κB. Uno studio di Argraves et al. (64) sostiene fortemente il ruolo dell'asse S1P-S1P1 e la conseguente attivazione di Akt nel mantenere l'integrità della barriera endoteliale. Come sottolineato in precedenza (33), il complesso HDL-S1P media l'effetto barriera a lungo termine in maniera più efficace rispetto al complesso albumina-S1P e ciò è legato all'effetto inibitorio di HDL-S1P sulla degradazione del recettore S1P1.

Sempre nell'endotelio, le HDL inducono un'elevata espressione della pentraxina 3 (PTX3) (72), una proteina della risposta di fase acuta e del fattore di crescita trasformante-β (TGF-β) (73), che esercita funzioni anti-infiammatorie e immuno-modulatorie in maniera Akt-dipendente. Gli autori dello studio hanno attribuito questi effetti alla stimolazione dei recettori S1P1 e S1P3 da parte di S1P associata alle HDL.

Inoltre, la maggiore attivazione di Smad 2/3, un fattore di trascrizione regolato da TGF-β, suggerisce che HDL-S1P possa transattivare le vie di segnalazione TGF-β dipendenti, agendo in modo autocrino (68). Uno studio recente suggerisce che la lipasi endoteliale (EL) sia un fattore fondamentale per lo stimolo da parte delle HDL del signaling S1P-dipendente nelle cellule endoteliali (74).

È stato dimostrato che la migrazione, la risposta angiogenica e l'attivazione di Akt erano difettose nelle cellule endoteliali prive di EL, ma la somministrazione di S1P esogena era in grado di ripristinare queste risposte tipicamente indotte dalle HDL.

Per quanto riguarda gli effetti EL-dipendenti, si pensa che la migrazione delle cellule endoteliali e l'attivazione di Akt siano dovute alla stimolazione del recettore S1P1 da parte delle HDL (74).

### *Cellule muscolari lisce (SMC)*

Le HDL promuovono la proliferazione delle SMC e tale effetto sembra essere influenzato in modo importante da S1P. Inoltre, HDL-S1P modula la migrazione delle SMC, un fenomeno tipico dell'aterosclerosi avanzata. In particolare, la migrazione è inibita dalle HDL attraverso il loro contenuto di S1P. Infatti, tale effetto può essere abrogato dal trattamento delle cellule con siRNA specifici per S1P2 o, al contrario, significativamente indotto in cellule sovraesprimenti S1P2 (65, 75). Inoltre, si ritiene che HDL-S1P possa modulare numerosi fattori vasoattivi che agiscono sulle SMC. Ad esempio, HDL-S1P è in grado di desensibilizzare la guanilciclasi B, un recettore per il peptide natriuretico di tipo C (CNP), bloccando così l'accumulo di cGMP indotto dal peptide nelle SMC vascolari (76). Il trattamento delle SMC vascolari con HDL attiva S1P2, S1P3 e la pathway della p38 MAPK, inducendo l'espressione di COX2 e la produzione di PGI2 (77). Quest'ultimo studio ha anche dimostrato che la simvastatina è in grado di aumentare in modo sinergico l'espressione di COX2 indotta da HDL-S1P attraverso l'incremento del contenuto cellulare di S1P3. Infine, HDL-S1P sopprime l'attivazione pro-infiammatoria delle SMC indotta da trombina, inibendo l'attivazione Rac-1-dipendente della NADPH ossidasi e la conseguente generazione di specie reattive dell'ossigeno (59). S1P3 è stato identificato come il principale recettore capace di mediare gli effetti anti-infiammatori del complesso HDL-S1P nelle SMC.

### *Cardiomiociti*

È stato osservato che i cardiomiociti possono esprimere diversi recettori di S1P e che le HDL esercitano funzioni protettive anche su queste cellule attraverso il loro contenuto di S1P. HDL e S1P pro-

teggono efficacemente i cardiomiociti dai danni derivanti da ipossia/riossigenazione o apoptosi indotta da doxorubicina e questi effetti sono stati attribuiti all'induzione delle chinasi Src, ERK, Akt e del fattore di trascrizione STAT3 (66, 78, 79). Tuttavia, le isoforme recettoriali responsabili di questi effetti protettivi non sono ancora state stabilite con precisione. Uno studio recente ha dimostrato che il trattamento a breve termine di cardiomiociti con HDL o S1P stimola la fosforilazione PKC-dipendente della connessina 43, una proteina delle gap junction coinvolta nella cardio-protezione (80). Questi effetti modulano il preconditionamento ischemico nei cardiomiociti ventricolari e migliorano la comunicazione intercellulare attraverso le gap junction. La rilevanza fisiologica di questi effetti cellulari è stata confermata attraverso metodologie *ex vivo* (cuore isolato), dimostrando che HDL e S1P sono in grado di proteggere contro i danni da ischemia/riperfusion e prevenire la morte cellulare.

### *Macrofagi*

La modulazione delle vie di trasduzione S1P-dipendenti nei macrofagi coinvolge le prime quattro isoforme recettoriali (S1P1-4) e l'attivazione di numerose chinasi e proteine G trimeriche. Sebbene l'attivazione di queste vie nel macrofago abbia un'importanza critica in molte condizioni infiammatorie patologiche, come pancreatite, asma allergica e angiogenesi tumorale (81), l'effetto modulatore di HDL-S1P su queste cellule nel contesto dell'aterogenesi è ancora poco conosciuto.

Uno studio ha dimostrato che HDL e S1P bloccano l'attivazione pro-infiammatoria dei monociti murini stimolati con agonisti dei recettori Toll-like di tipo 2 (TLR2) (82), ma l'attribuzione specifica di questo effetto al contenuto di S1P delle HDL necessita di ulteriori chiarimenti.

### *Considerazioni conclusive sugli studi in vitro*

L'insieme di studi *in vitro* effettuati per valutare gli effetti di S1P sulle principali cellule coinvolte nell'aterogenesi, ha evidenziato chiaramente come questo lisosfingolipide sia in grado di riprodurre le attività anti-aterogene documentate *in vitro* per le HDL, con modalità spesso dipendenti dal recettore e dal tipo di cellula considerata (Tabella 1).

Per queste ragioni S1P può essere considerato realmente un potenziale mediatore delle azioni ateroprotettive legate alle HDL.

### **Effetti anti-aterogeni mediati da S1P: studi *in vivo***

Come abbiamo visto, le indagini *in vitro* hanno permesso di correlare chiaramente numerosi effetti anti-aterogeni delle HDL con il loro carico di S1P. Tuttavia, le evidenze *in vivo* sul ruolo ateroprotettivo di questo lisosfingolipide sono molto più limitate e, in parte, ambivalenti.

Gli effetti di S1P sull'aterogenesi *in vivo* sono stati esaminati tramite diversi approcci, ad esempio utilizzando modelli murini knock-out per specifici recettori di S1P o topi in cui i livelli plasmatici di S1P risultano aumentati o diminuiti in seguito a manipolazione genetica o farmacologica.

### *Asse S1P-S1P3*

Uno dei primi studi (69) aveva suggerito che S1P3 potesse essere un target importante nel mediare gli effetti di HDL-S1P *in vivo*, poiché il rilascio di NO e la successiva vasodilatazione, normalmente indotti dalle HDL, erano parzialmente aboliti nei topi knock-out per questo recettore. Questa teoria era stata ulteriormente sostenuta da altri risultati, in base ai quali l'infusione endovenosa di HDL o S1P attenuava in modo significativo le dimensioni dell'in-

farto in un modello murino di ischemia-riperfusion e gli effetti benefici sia delle HDL sia di S1P erano completamente assenti in topi S1P3 knock-out (83). Tuttavia, uno studio successivo (84) ha dimostrato che l'assenza di S1P3 non influenzava lo sviluppo dell'aterosclerosi, sebbene il contenuto di monociti/macrofagi nelle lesioni dei topi S1P3/apoE doppio-knock-out fosse drasticamente ridotto.

Inoltre, i monociti privi di S1P3 mostravano una ridotta migrazione verso il sito infiammato e una diminuzione della secrezione di proteina chemiotattica dei monociti-1 (MCP-1).

Allo stesso tempo, tuttavia, la carenza di S1P3 aumentava il contenuto di SMC e la formazione di neointima vascolare nel modello murino di legatura dell'arteria carotidea (84). Complessivamente, queste evidenze suggeriscono che S1P3 possa esercitare effetti pro- e anti-aterogeni nei macrofagi e nelle SMC, portando ad un effetto neutro sullo sviluppo dell'aterosclerosi *in vivo*.

#### Asse S1P-S1P2

Il lavoro di Skoura et al. (85), invece, ha puntato l'attenzione sul ruolo dell'asse S1P-S1P2. Nel loro studio, i topi S1P2/apoE doppio-knock-out sviluppavano lesioni aterosclerotiche significativamente meno estese rispetto ai controlli. Inoltre, il numero di cellule schiumose nelle placche era ridotto, suggerendo che il recettore S1P2 possa favorire il reclutamento e la ritenzione dei macrofagi nella parete arteriosa affetta.

Sempre lo stesso studio ha evidenziato che la secrezione di citochine pro-infiammatorie (IL-1 $\beta$ , IL-18) nel siero, indotta da endotossina, era profondamente ridotta nei topi knock-out per S1P2 (85).

Questi risultati sottolineano che il recettore S1P2, se espresso nelle cellule

ematopoietiche, può esercitare un effetto pro-aterogeno e pro-infiammatorio. Al contrario, l'attivazione di S1P2 è in grado di sopprimere la crescita delle SMC nelle arterie e di promuovere l'espressione dei geni che controllano il differenziamento di queste cellule, identificando così S1P come un modulatore negativo dello sviluppo neointimale (86). Quindi, in modo simile a S1P3, anche il recettore S1P2 può evocare effetti opposti sullo sviluppo dell'aterosclerosi a seconda del sito di espressione.

#### S1P liasi

Analogamente agli studi con modelli animali knock-out per i vari recettori, anche l'utilizzo di approcci sperimentali capaci di modulare i livelli plasmatici di S1P endogena ha portato a risultati contrastanti. Ad esempio, Bot et al. (87) hanno studiato l'impatto del deficit ematopoietico di S1P-liasi (Sgpl1<sup>-/-</sup>) su sottoinsiemi di leucociti rilevanti per l'aterosclerosi. Lo studio ha evidenziato che il trapianto del midollo osseo di topi Sgpl1<sup>-/-</sup> in topi knock-out per il recettore delle LDL (LDLR<sup>-/-</sup>), inclini all'aterosclerosi, è in grado di alterare il gradiente tissutale di S1P e generare livelli plasmatici di S1P significativamente elevati.

Le chimere Sgpl1<sup>-/-</sup> mostravano linfopenia, perdita del potenziale mitogeno e perdita della capacità di secernere citochine tipiche da parte delle cellule T, rispetto ai controlli. Le chimere presentavano anche monocitosi ed un pattern di espressione di citochine compatibile con l'attivazione macrofagica classica.

Nonostante queste caratteristiche apparentemente pro-infiammatorie, il deficit di S1P-liasi a livello ematopoietico generava una risposta aterogena ridotta, suggerendo che l'aumento della concentrazione di S1P nel plasma possa, in ultima

analisi, produrre effetti anti-aterogeni nei topi LDLR<sup>-/-</sup>.

Tuttavia, l'accumulo di precursori di S1P, quali la sfingosina, nelle chimere Sgpl1<sup>-/-</sup> aggrava ulteriormente l'impatto della carenza di S1P-liasi sulla distribuzione e la funzione delle cellule ematopoietiche. A causa di ciò, l'azione apparentemente ateroprotettiva degli elevati livelli di S1P in questo modello deve essere interpretata con cautela.

#### *Approccio farmacologico al ruolo di S1P e suoi recettori*

##### *Inibitori delle sfingosina chinasi*

Di recente, il nostro gruppo ha utilizzato un approccio opposto, mirato a valutare gli effetti di una diminuzione dei livelli plasmatici di S1P sullo sviluppo dell'aterosclerosi in topi LDLR<sup>-/-</sup> nutriti con dieta ricca di colesterolo. Nello studio, sebbene il trattamento con ABC294640, un inibitore sintetico delle sfingosina chinasi, riducesse i livelli di S1P nel plasma di circa il 30%, non è stato evidenziato alcun cambiamento nelle dimensioni delle placche aterosclerotiche e nel contenuto di macrofagi (88).

Le ragioni di questo effetto neutro non sono del tutto chiare, ma è bene notare che l'inibizione di questo enzima non riduce solo le concentrazioni plasmatiche di S1P, ma interferisce anche con il signaling intracellulare mediato da S1P. In linea con tutto ciò, nel plasma dei topi trattati con ABC294640 abbiamo osservato un aumento delle concentrazioni di citochine pro-infiammatorie (IL-12p70, RANTES) e una maggiore attivazione delle cellule dendritiche e dei linfociti T, attribuendo tali effetti alla riduzione dei livelli extracellulari di S1P.

Al contrario, gli effetti pro-infiammatori mediati da S1P intracellulare sulle

cellule endoteliali sono stati soppressi nei topi LDLR<sup>-/-</sup> dopo il trattamento con ABC294640, come dimostrato dalla diminuzione dei livelli plasmatici di marcatori di attivazione endoteliale (VCAM-1, ICAM-1), dalla riduzione dell'adesione dei leucociti all'endotelio *in vivo* e dalla ridotta penetrazione di cellule T nel peritoneo dopo stimolo chemiotattico con CCL19 (88).

##### *Analoghi sintetici di S1P: FTY720 (fingolimod)*

La recente disponibilità di composti S1P-mimetici capaci di interagire con diversi sottotipi di S1PR in modo specifico, ha aperto nuove strade alla possibilità di identificare i meccanismi ateroprotettivi mediati da S1P.

Nei primi due studi effettuati, Nofer et al. (89) e Keul et al. (90) hanno dimostrato che FTY720 (fingolimod), un analogo sintetico di S1P capace di attivare tutti i suoi recettori tranne S1P2, è in grado di ridurre significativamente l'aterosclerosi quando somministrato a topi LDLR<sup>-/-</sup> o apoE<sup>-/-</sup> nutriti con dieta "Western type" ricca di colesterolo.

In questi studi, gli effetti ateroprotettivi di FTY720 potevano essere attribuiti principalmente alla capacità di questo composto di modulare la distribuzione e l'attivazione delle cellule T e dei macrofagi, sia a livello periferico sia nella placca, e di inibire i processi infiammatori sistemici, come evidenziato dalla riduzione dei livelli plasmatici di citochine proinfiammatorie.

Tuttavia, non è stato osservato alcun effetto di FTY720 sullo sviluppo dell'aterosclerosi e sui marcatori di infiammazione in topi apoE<sup>-/-</sup> alimentati con una dieta normale, nonostante il trattamento avesse ridotto significativamente il numero di cellule T nel sangue e negli organi linfoidi periferici (91).

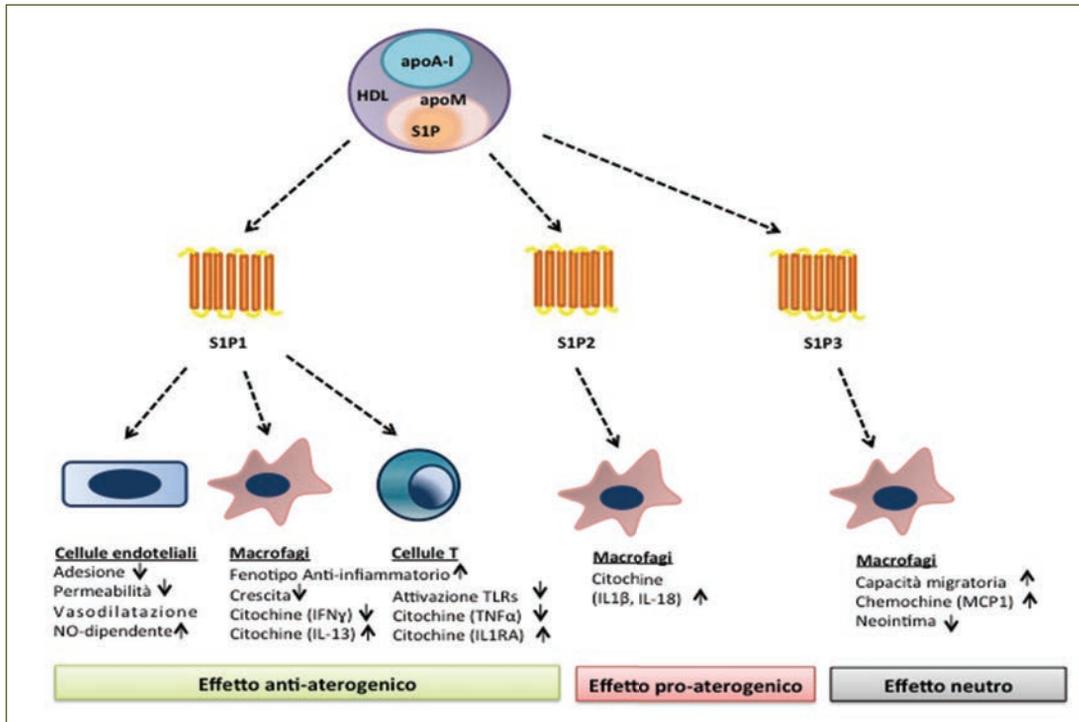
Inoltre, il nostro gruppo ha osservato che, in topi LDLR<sup>-/-</sup> moderatamente ipercolesterolemici, FTY720 non riesce a influenzare l'aterosclerosi, nonostante induca un'inibizione della funzione dei macrofagi, un miglioramento del controllo metabolico e una persistente alterazione della distribuzione dei linfociti (92). Sembra, quindi, che gli effetti ateroprotettivi di FTY720 siano evidenti solo in un quadro di infiammazione cronica preesistente, che può essere potenziato da una ipercolesterolemia sostenuta.

Di recente, è stato visto che il trattamento a lungo termine con FTY720 migliora la funzione ventricolare sinistra e aumenta la longevità nei topi affetti da aterosclerosi e scompenso cardiaco (93).

Tuttavia, questi benefici potevano essere attribuiti principalmente agli effetti immunosoppressori sistemici e ad una moderata riduzione dell'infiammazione cardiaca, piuttosto che a meccanismi propri dell'ateroprotezione.

#### Asse S1P-S1P1

Sebbene ampiamente sostenuto da risultati *in vitro* (vedi sopra), il ruolo dell'asse S1P-S1P1 nell'aterogenesi non è stato ancora esplorato in modelli *in vivo*. La generazione di topi S1P1 knock-out ha rivelato che il deficit di S1P1 è letale per l'embrione nel periodo di sviluppo compreso tra E12.5 e E14.5 DPC (94), ostacolando così il possibile utilizzo di questi modelli per lo studio dell'aterogenesi.



**Figura 3** - Illustrazione degli effetti anti- e pro-aterogeni di S1P associata alle HDL. Gli studi effettuati nei modelli animali di aterosclerosi hanno evidenziato che gli effetti anti- e pro-aterogeni mediati da S1P dipendono dall'isoforma recettoriale (S1P1, S1P2 o S1P3) e dal tipo di cellula/tessuto coinvolto. Abbreviazioni: IFN, interferone; IL, interleuchina; IL1RA, antagonista del recettore di IL-1; MCP, proteina chemotattica per i monociti; NO, ossido nitrico; TLR, recettori Toll-like; TNF, fattore di necrosi tumorale.

Tuttavia, utilizzando l'agonista KRP203, selettivo per il recettore S1P1, il nostro gruppo ha recentemente fornito la prima prova che tale recettore possa svolgere un ruolo di primo piano nella modulazione di meccanismi ateroprotettivi *in vivo* (95).

Nei topi LDLR<sup>-/-</sup>, il trattamento con KRP203 era in grado di ridurre significativamente lo sviluppo delle lesioni sia precoci che avanzate, rispetto al controllo.

Negli organi linfoidi periferici, KRP203 riduceva il numero totale dei linfociti T e la loro attivazione, così come i livelli di cito- e chemochine pro-infiammatorie nel plasma e nell'aorta.

Inoltre, i macrofagi isolati dagli animali trattati con KRP203 mostravano una minore espressione del marcatore di attivazione MHC-II, nonché una ridotta secrezione di citochine pro-infiammatorie in risposta alla stimolazione di TLR4 e TLR3.

Inoltre, le concentrazioni plasmatiche dei marcatori di attivazione endoteliale (VCAM-1, ICAM-1) erano ridotte dal trattamento con KRP203, così come la loro espressione cellulare e l'adesione monocitaria.

Questi risultati supportano in modo consistente l'effetto ateroprotettivo dell'asse S1P-S1P1 anche *in vivo*.

Il potenziale contributo dei vari sottotipi recettoriali di S1P alla progressione o alla regressione dell'aterosclerosi è schematicamente illustrato in *Figura 3*.

## Conclusioni e prospettive future

Le ricerche effettuate negli ultimi due decenni hanno stabilito con certezza che S1P è un componente fondamentale delle HDL.

Grazie al suo spettro di attività biologiche straordinariamente ampio e alla vasta espressione dei suoi recettori, questo lisosfingolipide è stato considerato fin

da subito un potenziale mediatore delle azioni ateroprotettive legate alle HDL. In effetti, diverse attività potenzialmente anti-aterogene esercitate *in vitro* dalle HDL possono essere totalmente o parzialmente attribuite al loro carico di S1P.

Tuttavia, i risultati degli studi *in vivo* relativi all'influenza di S1P sullo sviluppo dell'aterosclerosi sono stati meno conclusivi. Nei modelli animali di aterosclerosi, l'aumento o la diminuzione del signaling dei recettori di S1P ha prodotto effetti sia anti-aterogeni che pro-aterogeni.

Gli studi volti a chiarire il ruolo delle singole isoforme recettoriali in questi processi, hanno evidenziato che ogni S1PR potrebbe promuovere o ritardare lo sviluppo delle lesioni aterosclerotiche a seconda del sito e del livello di espressione, del modello sperimentale scelto e del relativo trattamento farmacologico.

Inoltre, gli studi epidemiologici capaci di documentare in modo univoco gli effetti ateroprotettivi di HDL-S1P sono ancora scarsi, hanno incluso popolazioni poco numerose e sono stati condotti secondo un disegno trasversale.

Fino ad oggi, nessuno studio ha indagato in modo prospettico la questione fondamentale, cioè se S1P associata alle HDL contribuisca alla riduzione del rischio cardiovascolare.

A nostro avviso, lo stato attuale delle conoscenze non consente ancora di considerare S1P o i suoi mimetici come potenziali strumenti terapeutici per le malattie cardiovascolari.

Questo, tuttavia, impone ulteriori sforzi nel continuare a ricercare, per migliorare la nostra comprensione di come il complesso HDL-S1P possa modulare il rischio cardiovascolare e di come le vie di trasduzione attivate da S1P possano influenzare lo sviluppo della placca aterosclerotica.

## Glossario

**Sfingosina-1-fosfato (S1P):** è un lisosfingolipide che regola molteplici funzioni biologiche (proliferazione, sopravvivenza, migrazione e differenziamento cellulare) tramite l'interazione con i propri recettori transmembrana; nel plasma, S1P è principalmente associata alle HDL, come componente bioattiva, ed in particolare all'apolipoproteina M (apoM).

**Recettori di S1P (S1PR):** recettori specifici per S1P appartenenti alla superfamiglia dei recettori accoppiati a proteine G e classificati in 5 diverse isoforme (S1P1-5).

**Lipoproteine ad alta densità (HDL):** lipoproteine caratterizzate dalla massima densità, compresa tra 1,063 e 1,210 g/ml e da un diametro di circa 8-11 nm; si formano per aggregazione di vari componenti come colesterolo, trigliceridi, apolipoproteine (es., apoA-I, apoA-II, apoM) e fosfolipidi.

**HDL-S1P:** frazione della S1P plasmatica associata alle HDL; rappresenta la quota maggiormente attiva nell'innescare risposte cellulari che sfociano in effetti ateroprotettivi.

**Albumina-S1P:** frazione della S1P plasmatica legata all'albumina; funge da serbatoio plasmatico di S1P e spesso è stata associata ad effetti negativi o neutri per quanto riguarda la patologia aterosclerotica.

**Trasportatori ABC (ATP-binding cassette):** famiglia di proteine trasportatrici transmembrana, che accoppiano l'idrolisi dell'ATP al trasferimento unidirezionale e contro-gradiente di concentrazione di numerose molecole. In ambito cardiovascolare sono molto note le isoforme ABCA1 e ABCG1, che svolgono un ruolo cruciale nel trasporto inverso del colesterolo, trasferendo colesterolo libero ed altre specie lipidiche rispettivamente verso accettori poveri di lipidi (apoA-I) e HDL mature.

**Topo chimera:** animale caratterizzato dalla presenza di più popolazioni cellulari geneticamente distinte, poiché originate da differenti zigoti.

**Topo knock-out:** animale in cui viene eliminato o inattivato uno specifico gene tramite la tecnologia del DNA ricombinante. In letteratura, accanto al nome del gene si possono trovare le seguenti grafie, tutte indicanti knock-out genico: (gene)-KO, (gene)-/-, (gene)-null, (gene)-deficient.

**Topo knock-out condizionale:** topo in cui l'inattivazione di uno specifico gene è conseguente

(“condizionale”) all'incrocio di due topi transgenici denominati “flox” e “Cre”, grazie alla tecnologia Cre-LoxP. Nel topo “flox” il gene da silenziare viene fiancheggiato da determinate sequenze nucleotidiche dette LoxP, che hanno la peculiarità di essere riconosciute e tagliate dall'enzima Cre-ricombinasi, espresso dal topo “Cre”. Dall'incrocio del topo “flox” con il topo “Cre”, si ottiene una prole in cui la sequenza d'interesse compresa tra i due siti LoxP viene escissa dal genoma, determinando knock-out genico. Se la Cre-ricombinasi è espressa sotto il controllo di un promotore tessuto specifico, il gene sarà “spento” solo nel tessuto d'interesse.

**Topi apoE knock-out:** topo in cui è stato inattivato il gene dell'apolipoproteina E, caratterizzato da marcata ipercolesterolemia e tendenza a sviluppare lesioni aterosclerotiche sia spontaneamente (grado lieve) sia in seguito alla somministrazione di diete ricche in colesterolo (lesioni avanzate). Tale ceppo, sviluppato nella prima metà degli anni novanta, è ampiamente utilizzato come modello sperimentale di aterosclerosi in vivo.

**Topi LDLR knock-out:** topo in cui è stato inattivato il gene del recettore per le lipoproteine a bassa densità (LDL). Anche questo ceppo è ampiamente utilizzato come modello sperimentale di aterosclerosi in vivo. A differenza del topo knock-out per l'apoE, il topo LDLR knock-out sviluppa marcata ipercolesterolemia ed aterosclerosi solo in seguito a somministrazione di diete ricche in colesterolo.

**Recettori Toll-like (TLR):** proteine a singolo dominio transmembrana espresse soprattutto su cellule della linea monocito/macrofagica. Sono recettori specializzati nel riconoscere profili molecolari distinti (Pattern Recognition Receptors, PRR) ed hanno un ruolo rilevante nell'immunità innata, generando risposte di tipo infiammatorio. All'interno di questa famiglia di recettori, sono molto note le isoforme TLR2, TLR3 e TLR4, specifiche rispettivamente per peptidoglicano batterico, RNA virale a doppio filamento e lipopolisaccaride batterico (LPS).

**Recettori Scavenger:** proteine di membrana espresse principalmente da cellule della linea mieloide e classificate in dieci famiglie differenti, tra cui le più note sono la A (es. SR-A1) e la B (es., SR-B1). I recettori scavenger (letteralmente, “spazzini”) legano sostanze di degradazione e di accumulo metabolico come LDL ossidate/acetilate, prodotti terminali della glicosilazione avanzata, agenti infettivi ed endotossine batteriche.

## RIASSUNTO

Diversi studi epidemiologici hanno documentato una relazione inversa tra i livelli plasmatici di colesterolo legato alle lipoproteine ad alta densità (HDL-C) e la gravità della malattia aterosclerotica. Tuttavia, studi clinici recenti, mirati a valutare gli effetti dell'incremento del colesterolo HDL, non sono riusciti a dimostrare dei benefici clinici in termini di riduzione del rischio cardiovascolare, suggerendo che altri componenti delle HDL potrebbero essere alla base degli effetti anti-aterogeni attribuiti a queste lipoproteine. La sfingosina 1-fosfato (S1P) - un lisosfingolipide che esercita la sua attività biologica legandosi a specifici recettori accoppiati alle proteine G e regola una vasta gamma di risposte biologiche in vari organi e tessuti, compreso il sistema cardiovascolare - è stata identificata come un costituente importante delle HDL. Nel plasma, S1P è presente in concentrazioni nanomolari elevate, legata principalmente alle HDL e in misura minore all'albumina e ad altre lipoproteine. Studi epidemiologici suggeriscono che la ripartizione di S1P nelle HDL o in pool plasmatici non-HDL sia rilevante per la patogenesi della malattia coronarica (CAD). Approcci sperimentali *in vitro* hanno permesso di individuare numerosi eventi di segnalazione intracellulare indotti da S1P associata alle HDL, rilevanti per le azioni ateroprotettive svolte da queste lipoproteine. Tuttavia, i risultati degli studi *in vivo* relativi all'influenza di S1P sullo sviluppo dell'aterosclerosi sono stati meno conclusivi, poiché nei modelli animali di aterosclerosi si sono osservati effetti sia anti- che pro-aterogenici. Nel presente lavoro abbiamo raccolto le attuali evidenze di studi epidemiologici, approcci sperimentali *in vitro* e su modelli animali di aterosclerosi, indicative del contributo di S1P riguardo agli effetti ateroprotettivi esercitati dalle HDL.

**Parole chiave:** *lipoproteine ad alta densità (HDL), sfingosina 1-fosfato (S1P), aterosclerosi, infiammazione.*

## Bibliografia

- Castelli WP, Garrison RJ, Wilson PW, et al. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham Study. *JAMA J Am Med Assoc.* 1986; 256: 2835-2838.
- Assmann G, Cullen P, Schulte H. The Münster Heart Study (PROCAM). Results of follow-up at 8 years. *Eur Heart J.* 1998; 19 (Suppl. A): A2-11.
- Feig JE, Hewing B, Smith JD, et al. High-Density Lipoprotein and Atherosclerosis Regression evidence from preclinical and clinical studies. *Circ Res.* 2014; 114: 205-213.
- Nofer J-R. Hyperlipidaemia and cardiovascular disease: the quantity does not turn into quality! *Curr Opin Lipidol.* 2013; 24: 366-368.
- AIM-HIGH Investigators, Boden WE, Probstfield JL, et al. Niacin in patients with low HDL cholesterol levels receiving intensive statin therapy. *N Engl J Med.* 2011; 365: 2255-2267.
- HPS2-THRIVE Collaborative Group. HPS2-THRIVE randomized placebo-controlled trial in 25 673 high-risk patients of ER niacin/laropiprant: trial design, pre-specified muscle and liver outcomes, and reasons for stopping study treatment. *Eur Heart J.* 2013; 34: 1279-1291.
- Barter PJ, Caulfield M, Eriksson M, et al. ILLUMINATE Investigators. Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. *N Engl J Med.* 2007; 357: 2109-2122.
- Schwartz GG, Olsson AG, Abt M, et al. dal-OUTCOMES Investigators. Effects of dalcetrapib in patients with a recent acute coronary syndrome. *N Engl J Med.* 2012; 367: 2089-2099.
- Voight BF, Peloso GM, Orho-Melander M, et al. Plasma HDL cholesterol and risk of myocardial infarction: a mendelian randomisation study. *Lancet.* 2012; 380: 572-580.
- Rye K-A, Barter PJ. Regulation of high-density lipoprotein metabolism. *Circ Res.* 2014; 114: 143-156.
- Huang R, Silva RAGD, Jerome WG, et al. Apolipoprotein A-I structural organization in high-density lipoproteins isolated from human plasma. *Nat Struct Mol Biol.* 2011; 18: 416-422.
- Sachinidis A, Kettenhofen R, et al. Evidence that lipoproteins are carriers of bioactive factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 2412-2421.
- Kimura T, Sato K, Kuwabara A, et al. Sphingosine 1-phosphate may be a major component of plasma lipoproteins responsible for the cytoprotective actions in human umbilical vein endothelial cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 31780-31785.
- Zhang B, Tomura H, Kuwabara A, et al. Correlation of high density lipoprotein (HDL)-associated sphingosine 1-phosphate with serum levels of HDL-cholesterol and apolipoproteins. *Atherosclerosis.* 2005; 178: 199-205.
- Blaho VA, Hla T. An update on the biology of sphingosine 1-phosphate receptors. *J Lipid Res.* 2014; 55(8): 1596-1608.
- Maceyka M, Harikumar KB, Milstien S, et al. Sphingosine-1-phosphate signaling and its role in disease. *Trends Cell Biol.* 2012; 22: 50-60.
- Cyster JG, Schwab SR. Sphingosine-1-phosphate and lymphocyte egress from lymphoid organs *Annu Rev Immunol.* 2012; 30: 69-94.

18. Carr JM, Mahalingam S, Bonder CS, Pitson SM. Sphingosine kinase 1 in viral infections. *Rev Med Virol.* 2013; 23: 73-84.
19. Finney CA, Hawkes CA, et al. S1P is associated with protection in human and experimental cerebral malaria. *Mol Med.* 2011; 17: 717-725.
20. Pyne NJ, Tonelli F, Lim KG, et al. Sphingosine 1-phosphate signalling in cancer. *Biochem Soc Trans.* 2012; 40: 94-100.
21. Takabe K, Paugh SW, Milstien S, et al. 'Inside-out' signaling of sphingosine-1-phosphate: therapeutic targets. *Pharmacol Rev.* 2008; 60: 181-195.
22. Murata N, Sato K, et al. Interaction of sphingosine 1-phosphate with plasma components, including lipoproteins, regulates the lipid receptor-mediated actions. *Biochem J.* 2000; 809-815.
23. Schwab SR, Pereira JP, Matloubian M, et al. Lymphocyte sequestration through S1P lyase inhibition and disruption of S1P gradients. *Science.* 2005; 309: 1735-1739.
24. Guo S, Yu Y, Zhang N, et al. Higher level of plasma bioactive molecule sphingosine 1-phosphate in women is associated with estrogen. *Biochim Biophys Acta.* 2014 [Epub ahead of print].
25. Pappu R, Schwab SR, Cornelissen I, et al. Promotion of lymphocyte egress into blood and lymph by distinct sources of sphingosine-1-phosphate. *Science.* 2007; 316: 295-298.
26. Yatomi Y. Sphingosine 1-phosphate in vascular biology: possible therapeutic strategies to control vascular diseases. *Curr Pharm Des.* 2006; 12: 575-587.
27. Ohkawa R, Nakamura K, Okubo S, et al. Plasma sphingosine-1-phosphate measurement in healthy subjects: close correlation with red blood cell parameters. *Ann Clin Biochem.* 2008; 45: 356-363.
28. Hänel P, Andréani P, Gräler MH. Erythrocytes store and release sphingosine 1-phosphate in blood. *FASEB J* 2007; 21: 1202-1209.
29. Sensken SC, Bode C, Nagarajan M, et al. Redistribution of sphingosine 1-phosphate by sphingosine kinase 2 contributes to lymphopenia. *J Immunol.* 2010; 184: 4133-4142.
30. Venkataraman K, Lee Y-M, Michaud J, et al. Vascular endothelium as a contributor of plasma sphingosine 1-phosphate. *Circ Res.* 2008; 102: 669-676.
31. Sato K, Okajima F. Role of sphingosine 1-phosphate in anti-atherogenic actions of high-density lipoprotein. *World J Biol Chem.* 2010; 1: 327-337.
32. Kimura T, Tomura H, Mogi C, et al. Sphingosine 1-phosphate receptors mediate stimulatory and inhibitory signalings for expression of adhesion molecules in endothelial cells. *Cell Signal.* 2006; 18: 841-850.
33. Wilkerson BA, Grass GD, Wing SB, et al. Sphingosine 1-phosphate (S1P) carrier-dependent regulation of endothelial barrier: high density lipoprotein (HDL)-S1P prolongs endothelial barrier enhancement as compared with albumin-S1P via effects on levels, trafficking, and signaling of S1P1. *J Biol Chem.* 2012; 287: 44645-44653.
34. Bode C, Sensken SC, Peest U, et al. Erythrocytes serve as a reservoir for cellular and extracellular sphingosine 1-phosphate. *J Cell Biochem.* 2010; 109: 1232-1243.
35. Nishi T, Kobayashi N, Hisano Y, et al. Molecular and physiological functions of sphingosine 1-phosphate transporters. *Biochim Biophys Acta.* 2013; [Epub ahead of print].
36. Mendoza A, Bréart B, Ramos-Perez WD, et al. The transporter Spns2 is required for secretion of lymph but not plasma sphingosine-1-phosphate. *Cell Rep.* 2012; 2: 1104-1110.
37. Kobayashi N, Nishi T, Hirata T, et al. Sphingosine 1-phosphate is released from the cytosol of rat platelets in a carrier-mediated manner. *J Lipid Res.* 2006; 47: 614-621.
38. Kobayashi N, Kobayashi N, Yamaguchi A, Nishi T. Characterization of the ATP-dependent sphingosine 1-phosphate transporter in rat erythrocytes. *J Biol Chem.* 2009; 284: 21192-21200.
39. Mitra P, Oskeritzian CA, Payne SG, et al. Role of ABCC1 in export of sphingosine-1-phosphate from mast cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; 103: 16394-16399.
40. Takabe K, Kim RH, Allegood JC, et al. Estradiol induces export of sphingosine 1-phosphate from breast cancer cells via ABCC1 and ABCG2. *J Biol Chem.* 2010; 285: 10477-10486.
41. Sato K, Malchinkhuu E, Horiuchi Y, et al. Critical role of ABCA1 transporter in sphingosine 1-phosphate release from astrocytes. *J Neurochem.* 2007; 103: 2610-2619.
42. Christoffersen C, Obinata H, Kumaraswamy SB, et al. Endothelium-protective sphingosine-1-phosphate provided by HDL-associated apolipoprotein M. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011; 108: 9613-9618.
43. Christoffersen C, Nielsen LB, Axler O, et al. Isolation and characterization of human apolipoprotein M-containing lipoproteins. *J Lipid Res.* 2006; 47: 1833-1843.
44. Sevvana M, Ahnström J, Egerer-Sieber C, et al. Serendipitous fatty acid binding reveals the structural determinants for ligand recognition in apolipoprotein M. *J Mol Biol.* 2009; 393: 920-936.
45. Karuna R, Park R, Othman A, et al. Plasma levels of sphingosine-1-phosphate and apolipoprotein M in patients with monogenic disorders of HDL metabolism. *Atherosclerosis.* 2011; 219: 855-863.
46. Elsoe S, Ahnström J, Christoffersen C, et al. Apolipoprotein M binds oxidized phospholipids

- and increases the antioxidant effect of HDL. *Atherosclerosis*. 2012; 221: 91-97.
47. Ahnström J, Faber K, et al. Hydrophobic ligand binding properties of the human lipocalin apolipoprotein M. *J Lipid Res*. 2007; 48: 1754-1762.
  48. Liu M, Seo J, Allegood J, et al. Hepatic Apolipoprotein M (ApoM) Overexpression Stimulates Formation of Larger ApoM/Sphingosine 1-Phosphate-enriched Plasma High Density Lipoprotein. *J Biol Chem*. 2014; 289: 2801-2814.
  49. Deutschman DH, Carstens JS, Klepper RL, et al. Predicting obstructive coronary artery disease with serum sphingosine-1-phosphate. *Am Heart J*. 2003; 146: 62-68.
  50. Sattler KJE, Elbasan S, Keul P, et al. Sphingosine 1-phosphate levels in plasma and HDL are altered in coronary artery disease. *Basic Res Cardiol*. 2010; 105: 821-832.
  51. Argraves K, Sethi A, Gazzolo P, et al. S1P, dihydro-S1P and C24:1-ceramide levels in the HDL-containing fraction of serum inversely correlate with occurrence of ischemic heart disease. *Lipids Health Dis*. 2011; 10: 70.
  52. Knapp M, Baranowski M, Czarnowski D, et al. Plasma sphingosine-1-phosphate concentration is reduced in patients with myocardial infarction. *Med Sci Monit*. 2009; 15: CR490-493.
  53. Knapp M, Lisowska A, Zabielski P, et al. Sustained decrease in plasma sphingosine-1-phosphate concentration and its accumulation in blood cells in acute myocardial infarction. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2013; 106: 53-61.
  54. Egom EE, Mamas MA, Chacko S, et al. Serum sphingolipids level as a novel potential marker for early detection of human myocardial ischaemic injury. *Front Physiol*. 2013; 4: 130.
  55. Kowalski GM, Carey AL, Selathurai A, et al. Plasma sphingosine-1-phosphate is elevated in obesity. *PLoS One*. 2013; 8: e72449.
  56. Tong X, Peng H, Liu D, et al. High-density lipoprotein of patients with type 2 diabetes mellitus upregulates cyclooxygenase-2 expression and prostacyclin I-2 release in endothelial cells: relationship with HDL-associated sphingosine-1-phosphate. *Cardiovasc Diabetol*. 2013; 12: 27.
  57. Mineo C, Shaul PW. Function of scavenger receptor class B type I in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 2012; 23: 487-93.
  58. Nofer J-R, Giet M van der, Tölle M, et al. HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3. *J Clin Invest*. 2004; 113: 569-581.
  59. Tölle M, Pawlak A, Schuchardt M, et al. HDL-associated lysosphingolipids inhibit NAD(P)H oxidase-dependent monocyte chemoattractant protein-1 production. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008; 28: 1542-1548.
  60. Kimura T, Tomura H, Mogi C, et al. Role of scavenger receptor class B type I and sphingosine 1-phosphate receptors in high density lipoprotein-induced inhibition of adhesion molecule expression in endothelial cells. *J Biol Chem*. 2006; 281: 37457-37467.
  61. Kimura T, Mogi C, Tomura H, et al. Induction of scavenger receptor class B type I is critical for simvastatin enhancement of high-density lipoprotein-induced anti-inflammatory actions in endothelial cells. *J Immunol*. 2008; 181: 7332-7340.
  62. Kimura T, Sato K, Malchinkhuu E, et al. High-density lipoprotein stimulates endothelial cell migration and survival through sphingosine 1-phosphate and its receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23: 1283-1288.
  63. Miura S, Fujino M, Matsuo Y, et al. High density lipoprotein-induced angiogenesis requires the activation of Ras/MAP kinase in human coronary artery endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23: 802-808.
  64. Argraves KM, Gazzolo PJ, Groh EM, et al. High density lipoprotein-associated sphingosine 1-phosphate promotes endothelial barrier function. *J Biol Chem*. 2008; 283: 25074-25081.
  65. Damirin A, Tomura H, Komachi M, et al. Role of lipoprotein-associated lysophospholipids in migratory activity of coronary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007; 292: H2513-2522.
  66. Tao R, Hoover HE, et al. High-density lipoprotein determines adult mouse cardiomyocyte fate after hypoxia-reoxygenation through lipoprotein-associated sphingosine 1-phosphate. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010; 298: H1022-8.
  67. Kimura T, Tomura H, Sato K, et al. Mechanism and role of high density lipoprotein-induced activation of AMP-activated protein kinase in endothelial cells. *J Biol Chem*. 2010; 285: 4387-4397.
  68. Matsuo Y, Miura S, Kawamura A, et al. Newly developed reconstituted high-density lipoprotein containing sphingosine-1-phosphate induces endothelial tube formation. *Atherosclerosis*. 2007; 194: 159-168.
  69. Nofer JR, Levkau B, et al. Suppression of endothelial cell apoptosis by high density lipoproteins (HDL) and HDL-associated lysosphingolipids. *J Biol Chem*. 2001; 276: 34480-34485.
  70. Krishna SM, Seto SW, Moxon JV, et al. Fenofibrate increases high-density lipoprotein and sphingosine 1 phosphate concentrations limiting abdominal aortic aneurysm progression in a mouse model. *Am J Pathol*. 2012; 181: 706-718.
  71. Igarashi J, Miyoshi M, et al. Statins induce S1P1 receptors and enhance endothelial nitric oxide production in response to high-density lipoproteins. *Br J Pharmacol*. 2007; 150: 470-479.

72. Norata GD, Marchesi P, Pirillo A, et al. Long pentraxin 3, a key component of innate immunity, is modulated by high-density lipoproteins in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 28: 925-931.
73. Norata GD, Callegari E, Marchesi M, et al. High-density lipoproteins induce transforming growth factor-beta2 expression in endothelial cells. *Circulation.* 2005; 111: 2805-2811.
74. Tatematsu S, Francis SA, Natarajan P, et al. Endothelial lipase is a critical determinant of high-density lipoprotein-stimulated sphingosine 1-phosphate-dependent signaling in vascular endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013; 33: 1788-1794.
75. Tamama K, Tomura H, Sato K, et al. High-density lipoprotein inhibits migration of vascular smooth muscle cells through its sphingosine 1-phosphate component. *Atherosclerosis.* 2005; 178: 19-23.
76. Chrisman TD, Perkins DT, Garbers DL. Identification of a potent serum factor that causes desensitization of the receptor for C-Type natriuretic peptide. *Cell Commun Signal.* 2003; 1: 4.
77. González-Díez M, Rodríguez C, Badimon L, et al. Prostacyclin induction by high-density lipoprotein (HDL) in vascular smooth muscle cells depends on sphingosine 1-phosphate receptors: effect of simvastatin. *Thromb Haemost.* 2008; 100: 119-126.
78. Frias MA, James RW, Lang U et al. Native and reconstituted HDL activate Stat3 in ventricular cardiomyocytes via ERK1/2: role of sphingosine-1-phosphate. *Cardiovasc Res.* 2009; 82: 313-323.
79. Frias MA, Lang U, Gerber-Wicht C, James RW. Native and reconstituted HDL protect cardiomyocytes from doxorubicin-induced apoptosis. *Cardiovasc Res.* 2010; 85: 118-126.
80. Morel S, Frias MA, Rosker C, et al. The natural cardioprotective particle HDL modulates connexin43 gap junction channels. *Cardiovasc Res.* 2012; 93: 41-49.
81. Weigert A, Weis N, Brüne B. Regulation of macrophage function by sphingosine-1-phosphate. *Immunobiology.* 2009; 214: 748-760.
82. Dueñas AI, Aceves M, Fernández-Pisonero I, et al. Selective attenuation of Toll-like receptor 2 signalling may explain the atheroprotective effect of sphingosine 1-phosphate. *Cardiovasc Res.* 2008; 79: 537-544.
83. Theilmeyer G, Schmidt C, Herrmann J, et al. High-density lipoproteins and their constituent, sphingosine-1-phosphate, directly protect the heart against ischemia/reperfusion injury in vivo via the S1P3 lysophospholipid receptor. *Circulation.* 2006; 114: 1403-1409.
84. Keul P, Lucke S, Wnuck Lipinski K von, et al. Sphingosine-1-phosphate receptor 3 promotes recruitment of monocyte/macrophages in inflammation and atherosclerosis. *Circ Res.* 2011; 108: 314-323.
85. Skoura A, Michaud J, Im D-S, et al. Sphingosine-1-phosphate receptor-2 function in myeloid cells regulates vascular inflammation and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011; 31: 81-85.
86. Shimizu T, Nakazawa T, Cho A, et al. Sphingosine 1-phosphate receptor 2 negatively regulates neointimal formation in mouse arteries. *Circ Res.* 2007; 101: 995-1000.
87. Bot M, Veldhoven PP Van, Jager SCA de, Johnson J, et al. Hematopoietic Sphingosine 1-Phosphate Lyase Deficiency Decreases Atherosclerotic Lesion Development in LDL-Receptor Deficient Mice. *PLoS ONE.* 2013; 8: e63360.
88. Poti F, Bot M, Costa S, et al. Sphingosine kinase inhibition exerts both pro- and anti-atherogenic effects in low-density lipoprotein receptor-deficient (LDL-R(-/-)) mice. *Thromb Haemost.* 2012; 107: 552-561.
89. Nofer J-R, Bot M, Brodde M, et al. FTY720, a synthetic sphingosine 1 phosphate analogue, inhibits development of atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation.* 2007; 115: 501-508.
90. Keul P, Tölle M, Lucke S, et al. The sphingosine-1-phosphate analogue FTY720 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; 27: 607-613.
91. Klingenberg R, Nofer J-R, Rudling M, et al. Sphingosine-1-phosphate analogue FTY720 causes lymphocyte redistribution and hypercholesterolemia in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; 27: 2392-2399.
92. Poti F, Costa S, Bergonzini V, et al. Effect of sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor agonists FTY720 and CYM5442 on atherosclerosis development in LDL receptor deficient (LDL-R(-/-)) mice. *Vascul Pharmacol.* 2012; 57: 56-64.
93. Wang G, Kim RY, Imhof I, et al. The Immunosuppressant FTY720 Prolongs Survival in a Mouse Model of Diet-induced Coronary Atherosclerosis and Myocardial Infarction. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2014; 63: 132-143.
94. Liu Y, Wada R, Yamashita T, et al. Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. *J Clin Invest.* 2000; 106: 951-961.
95. Poti F, Gualtieri F, Sacchi S, et al. KRP-203, Sphingosine 1-Phosphate Receptor Type 1 Agonist, Ameliorates Atherosclerosis in LDL-R(-/-) Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013; 33: 1505-1512.