

Papel de los esfingolípidos en la señalización celular.

**Ana M. Sánchez
Inés Díaz-Laviada**

Universidad de Alcalá
Departamento de Bioquímica
y Biología Molecular
Campus Universitario
Edificio de Medicina
28871 Alcalá de Henares
(Madrid)

Email: ines.diazlaviada@uah.es

Una de las funciones más interesantes de los lípidos en el contexto de la biología celular es su capacidad de regular numerosos procesos cruciales para la vida de las células. En particular, los esfingolípidos se han revelado recientemente elementos clave en las cascadas de transducción de señales que regulan procesos importantes de la fisiología celular tales como crecimiento, diferenciación y muerte celular. Consecuentemente, la biología de los esfingolípidos se ha convertido en una diana importante para la investigación en la señalización celular. Los esfingolípidos tienen doble papel como moléculas bioactivas: por un lado, actúan como segundos mensajeros en la transducción de señales extracelulares, pero además, regulan la dinámica de las membranas biológicas formando parte de los microdominios de las membranas llamados "lipid rafts".

Los principales esfingolípidos bioactivos incluyen, ceramida, esfingosina, ceramida-1-fosfato y esfingosina-1-fosfato y median respuestas celulares como proliferación, diferenciación y muerte celular. Entre todos ellos destaca la ceramida, que es el centro de la ruta de síntesis y degradación de esfingolípidos y se podría considerar como regulador del destino celular. Por un lado, la generación de ceramida por estímulos de estrés, activa rutas encaminadas a producir la muerte celular, pero por otro lado su transformación en ceramida 1-fosfato (C1P) o en esfingosina y, posteriormente en esfingosina 1-fosfato (S1P) activa vías mitogénicas y regula diferenciación y proliferación. Además, S1P puede actuar como ligando extracelular uniéndose a los recientemente descubiertos receptores S1P₁₋₅ que pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G o GPCRs, lo que amplía el campo de actuación de estos compuestos.

En este trabajo se resumen los hallazgos recientes de la bioquímica y biología celular de los esfingolípidos haciendo especial hincapié en los mecanismos de transducción de señales en los que están implicados.

Estructura y metabolismo de los esfingolípidos

Los esfingolípidos están formados por tres motivos estructurales principales: una base de cadena larga, normalmente la esfingosina, un ácido graso de longitud variable unido al carbono-2 de la cadena base y diversas cabezas polares unidas al carbono-1. En el caso de la esfingomielina el grupo hidrofílico

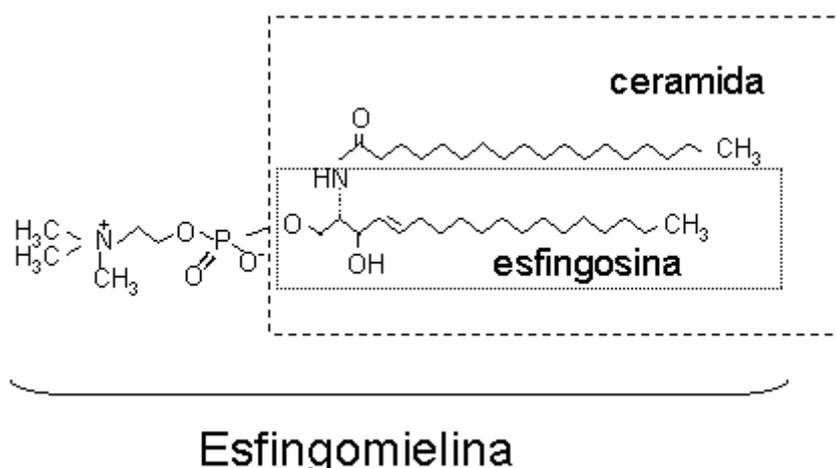


Figura 1. Estructura de la esfingomielina, esfingosina y ceramida.

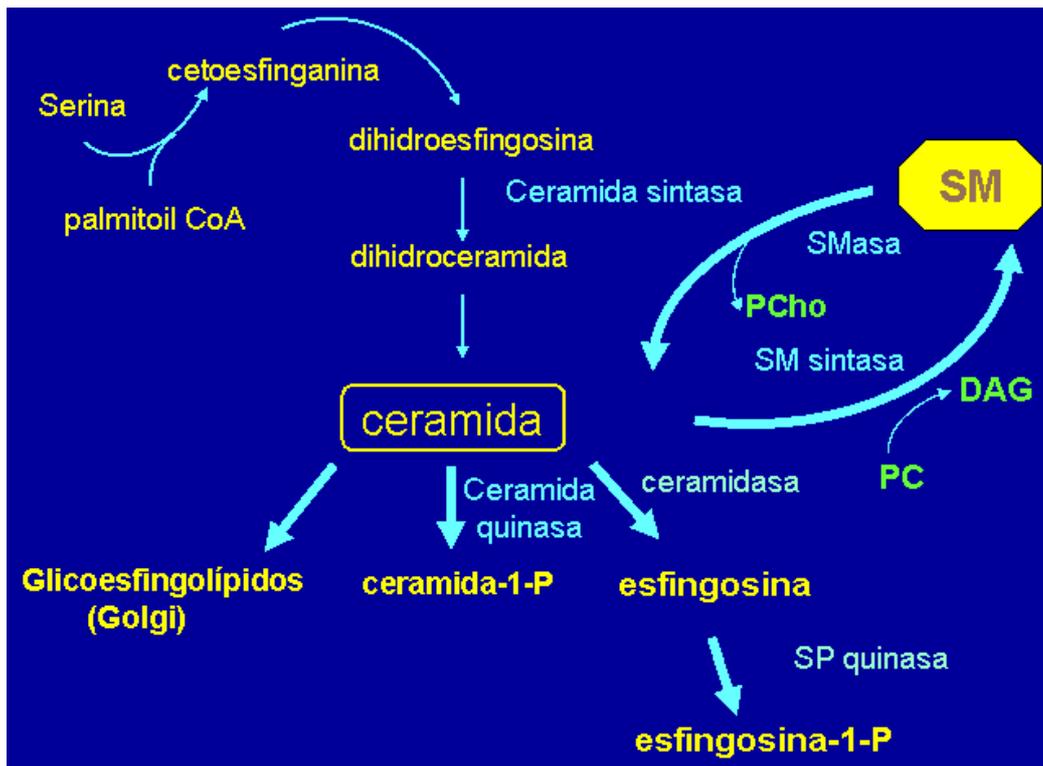


Figura 2. Síntesis y degradación de esfingolípidos.

es la fosforilcolina (Figura 1), mientras que en el caso de los glicoesfingolípidos es un azúcar (Futerman and Hannun, 2004). El ácido graso de longitud variable (2-28 carbonos) unido a la esfingosina o cadena similar forma la familia de ceramida, una molécula hidrofóbica cuya producción es incrementada bajo estímulos de estrés.

Hay dos vías principales por las que se puede generar ceramida: la síntesis *de novo* y mediante la degradación de la esfingomielina de la membrana por las esfingomielinasas. La biosíntesis *de novo* de los esfingolípidos (Figura 2), se lleva a cabo en el retículo endoplásmico y aparato de Golgi y empieza con la condensación de la serina y normalmente el palmitoil CoA, llevada a cabo por la enzima serin palmitoil transferasa (SPT) para dar 3-cetoesfinganina, la cuál es posteriormente reducida a esfinganina y convertida a dihidroceramida por la enzima dihidroceramida sintasa, también llamada ceramida sintasa. El siguiente paso es la desaturación de la dihidroceramida para generar ceramida, la cual sirve como precursor para esfingomielina y otros esfingolípidos complejos como cerebrósidos y gangliósidos, que se forman por la adición de sustituyentes específicos en la posición C1. La síntesis de esfingomielina está catalizada por la esfingomielina sintasa que transfiere fosforilcolina a la ceramida, generando esfingomielina y diacilglicerol. La ceramida también puede ser formada directamente de la esfingosina por la acción de la ceramida sintasa.

La degradación de ceramida incluye una desacilación llevada a cabo por las ceramidases, que rinde un ácido graso y esfingosina. Esta reacción regula los niveles relativos de ceramida y esfingosina y es crucial para regular el destino celular. La esfingosina es rápidamente convertida por la enzima esfingosina quinasa (SphK) a esfingosina-1-fosfato (S1P), que es uno de los esfingolípidos bioactivos más importantes. Por otro

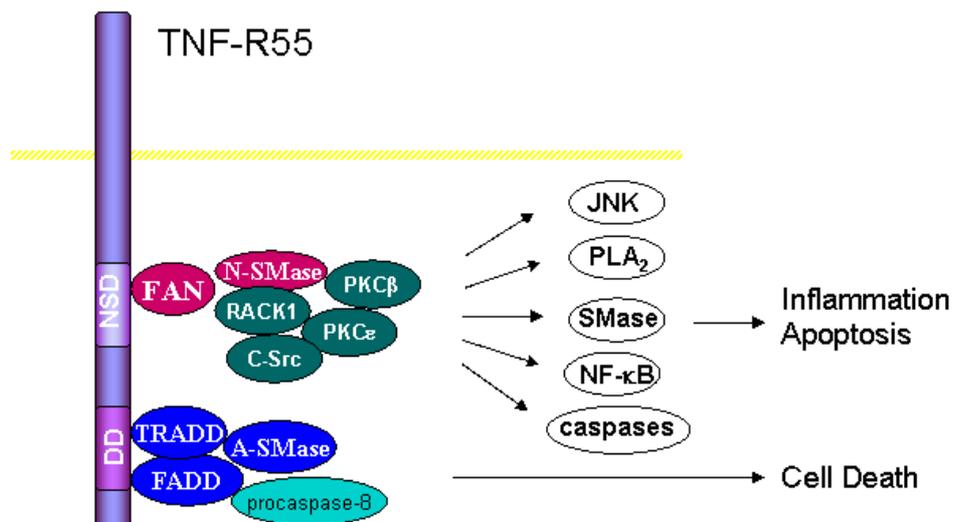


Figura 3. Activación de las esfingomielinas ácida y neutra por el receptor de TNF.

lado, la ceramida también puede ser fosforilada por la enzima ceramida quinasa (CERK) para dar ceramida-1-fosfato (C1P).

La segunda vía para la generación de la ceramida incluye la degradación de la esfingomielina catalizado por la enzima esfinomielinasa (SMasa) la cual rompe la esfingomielina para dar ceramida y fosforilcolina. La hidrólisis de la esfinomielina esta considerada como la principal vía para la producción de ceramida como transductor de señales que regulan la muerte celular (Andrieu-Abadie and Levade, 2002).

Al menos cinco subtipos diferentes de SMasas han sido identificados basándose en su pH óptimo, localización subcelular y dependencia de cationes. Entre ellas se incluyen la Smasa neutra dependiente de magnesio y unida a membrana (N-SMasa), una SMasa neutra independiente de magnesio, la SMasa ácida presente en los lisosomas (A-SMasa), una forma secretada y soluble de SMasa ácida dependiente de zinc y una SMasa alcalina (Marchesini and Hannun, 2004). A pesar de los intensos estudios basados en el mecanismo para la activación de estas SMasas, su papel específico no está todavía claro, siendo la N-SMasa y la A-SMasa las más estudiadas. Ambas enzimas pueden ser activadas por el receptor de 55kDa del factor de necrosis tumoral, TNF, así como por otros estímulos de estrés. La N-SMasa es activada por el receptor de TNF a través de una proteína adaptadora denominada FAN que se asocia al dominio NSD del receptor (Figura 3) (Andreu-Abadie and Levade, 2002). La proteína FAN a su vez puede asociarse con otras proteínas ensambladoras como el receptor de PKC activada RACK1, que sirve de atracción y activación de numerosas proteínas implicadas en rutas de señalización. La A-SMasa, puede ser también activada por el receptor de TNF a través de otras proteínas adaptadoras como FADD y TRADD que se unen al dominio de muerte (DED) del receptor (Figura 3) (Schwandner et al., 1998).

Regulación del destino celular por los esfingolípidos

Uno de los aspectos más interesantes de la función biológica de los esfingolípidos es su papel en la decisión del destino celular. Mientras que la ceramida activa señales de muerte, la ceramida 1-fosfato y la esfingosina 1-fosfato activan señales de supervivencia celular (Figura 4). Por lo tanto los niveles relativos de estos metabolitos son los que determinarán si la célula entra en apoptosis o si prolifera. Es por ello que las reacciones catalizadas por la ceramida quinasa y por la esfingosina quinasa

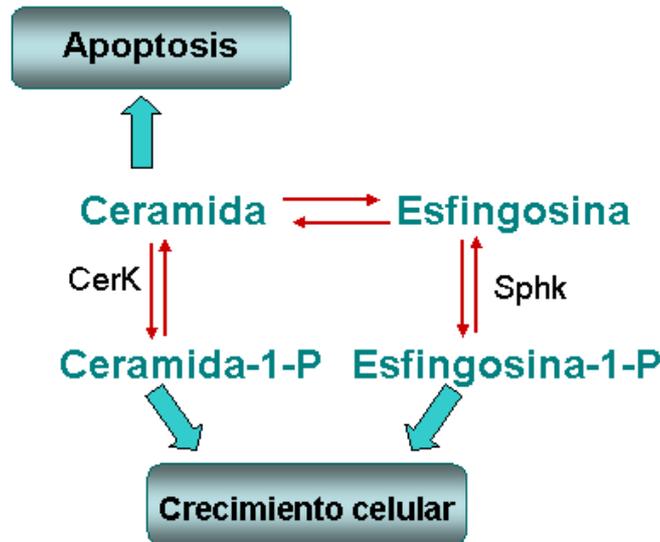


Figura 4. El balance entre ceramida y sus metabolitos rigen el destino celular.

son fundamentales para determinar las funciones vitales de la célula. Ambas reacciones son altamente reguladas.

A continuación se repasarán los principales mecanismos de señalización activados por estos tres metabolitos: ceramida, ceramida 1-fosfato y esfingosina 1-fosfato.

Señalización celular activada por ceramida

La ceramida actúa como segundo mensajero activando numerosas vías de transducción de señales. La ceramida se genera bien por hidrólisis de la esfingomielina o bien mediante síntesis de novo, como consecuencia de numerosos estímulos tanto apoptóticos como de estrés, incluyendo ligandos de receptores de muerte, drogas quimioterapéuticas, radiación gamma o UV, choque térmico, deprivación de factores de crecimiento, hipoxia (Levade et al., 2002) o exposición a cannabinoides (Carracedo et al, 2006).

Entre las proteínas que interaccionan con la ceramida se incluyen: proteína quinasa activada por ceramida (CAPK), proteína quinasa supresora de Ras (KSR), las fosfatasa PP2A y PP1B, PKCζ, catepsina D, cPLA2 y PKCα (Figura 3) (Heinrich et al., 2000; Ruvolo, 2003; Huwiler et al., 2004).

Una de las primeras enzimas identificadas fue la proteína quinasa activada por ceramida, CAPK/KSR. CAPK es una ser/thr quinasa que ha sido recientemente identificada como la quinasa supresora de Ras. En algunos tipos celulares, la ceramida generada por la N-SMasa en la membrana plasmática activa directamente a KSR, que fosforila y activa la quinasa Raf-1, la cual fosforila y estimula MEK-1, la cual a su vez fosforila y activa ERK.

Se ha demostrado que la ceramida y sus análogos inducen translocación de la PKC atípica PKCζ, desde el citosol a la membrana perinuclear (Galve-Ropeh et al., 1997), y que también aumentan la fosforilación de esta quinasa tanto *in vitro* como *in vivo*. La unión de PKCζ a ceramida, produce un cambio conformacional y activación de PKCζ por fosforilación, lo cual activa otras dianas, en particular la vía de supervivencia de NF-κB (Kajita et al 2004). Además, la ceramida activa múltiples cascadas de señalización que involucran a JNK. Se ha sugerido que la ceramida puede activar JNK via Rac-1, PKCζ y MEKK1 (miembro de la familia de las quinasas activadas por mitógenos), la cual es análogo de c-Raf en la cascada de JNK (Shirakabe et

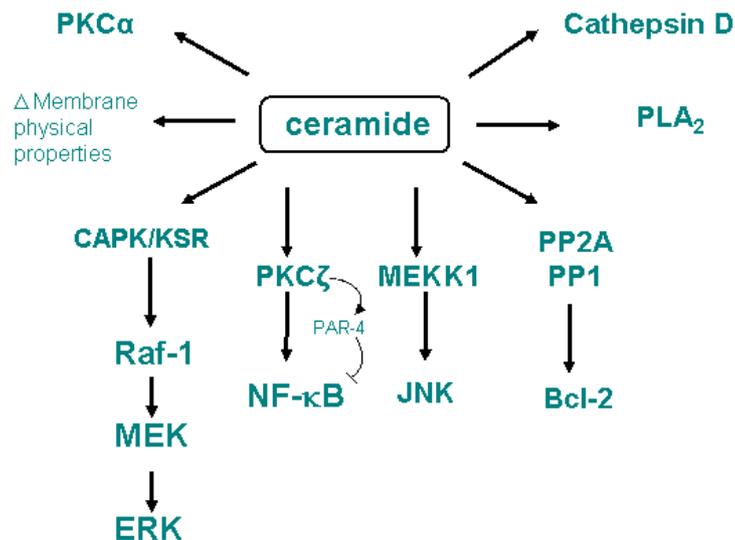


Figura 5. Principales proteínas activadas por ceramidas.

al., 1997). Por ejemplo, el tratamiento de células endoteliales glomerulares con ceramida exógena produce una potente activación de la cascada de JNK, a través de activación directa de MEKK1 por ceramida (Huwiler et al., 2004), provocando apoptosis inducida por ceramida en este tipo celular.

Las fosfatasa activadas por ceramidas mejor caracterizadas son la PP2A y PP1. Estas fosfatasa están formadas por la asociación de una subunidad catalítica ser/thr fosfatasa, una subunidad estructural y una subunidad reguladora. La subunidad catalítica de estas fosfatasa está regulada por ceramida y por tanto estas proteínas son también llamadas fosfatasa activadas por ceramidas (CAPPs). Varios sustratos de CAPPs han sido identificados *in vitro* con posible papel en apoptosis incluyendo Bcl-2, PKC α , c-jun, proteínas SR y Akt (revisión en Pettus et al., 2002). Las proteínas de la familia de Bcl-2 son reguladores cruciales en la muerte celular que controlan la permeabilidad de la membrana externa de la mitocondria. La fosforilación y defosforilación por quinasas y fosfatasa es el principal mecanismo por el que se regula la función de miembros de la familia de Bcl-2 tanto con actividad anti-apoptótica (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1) como pro-apoptótica (Bad, Bax, Bim) (García et al., 2003). Factores de supervivencia inducen fosforilación de Bad, inactivando su función pro-apoptótica. La defosforilación de Bad por PP1 por lo tanto, induce apoptosis (García et al., 2003). Por el contrario PP2A podría defosforilar Bcl-2 convirtiéndolo en una molécula pro-apoptótica (García et al., 2003).

Otro mecanismo por el cuál la ceramida puede inducir apoptosis es la regulación del potencial redox. Se ha demostrado que tanto la ceramida como sus derivados glicosilados pueden inducir estrés oxidativo celular a través de disfunción mitocondrial, sobrerregulación de la NO sintasa, activación de la NADPH oxidasa y desregulación de enzimas antioxidantes. Recientemente ha sido demostrado que la activación de la NADPH oxidasa asociada a membrana mediada por ceramida es dependiente de la activación de PKC ζ (Reinher et al., 2005).

Datos recientes indican que la ceramida puede inducir apoptosis, al menos en parte, a través de un efecto directo en la mitocondria que induce la salida de proteínas desde el espacio intermembrana de la mitocondria al citoplasma. A

concentraciones fisiológicas, la ceramida puede formar auténticos poros de membrana permeables a proteínas que han sido visualizados mediante microscopía electrónica (Siskind, 2005; Siskind et al., 2006).

Además, la ceramida también actúa como mensajero en la respuesta inflamatoria. Recientemente se ha observado que se produce interacción directa de la ceramida con la fosfolipasa A2 citosólica (cPLA2) incrementando su actividad (Huwiler et al., 2001).

Señalización activada por ceramida -1-fosfato.

La ceramida-1-fosfato puede ser producida por una ceramida quinasa dependiente de ATP (CERK), que fue clonada por Sugiura y representa una nueva clase de quinasas (Sugiura et al., 2002). Esta quinasa es altamente específica para la ceramida y su actividad es dependiente de iones Mg^{2+} (Wijesinghe et al., 2005) y de iones Ca^{2+} a través de su unión a calmodulina.

C1P generada por CERK, ha sido implicada en diferentes procesos celulares como respuesta inflamatoria, fagocitosis, inhibición de apoptosis, mitogénesis (Gomez-Muñoz A, 2004) y mecanismos de patogenia inducidos por agentes infecciosos. C1P media la liberación de ácido araquidónico por PLA2, que es el primer paso para la biosíntesis de eicosanoides. Estos compuestos son mediadores de la respuesta inflamatoria y están implicados en la patogénesis de numerosas enfermedades incluyendo cáncer, enfermedades cardiovasculares o asma. Recientemente se ha observado como C1P produce la translocación de cPLA2 a las membranas intracelulares y activa cPLA2 directamente a través de su interacción con el dominio CaLB/C2 (Pettus et al., 2004), lo que convierte a cPLA2 en una enzima diana de la acción de C1P.

Otras acciones biológicas de C1P incluyen la inhibición de la apoptosis y la inducción de la supervivencia celular. El mecanismo por el cual C1P ejerce este efecto probablemente sea la inhibición directa de la esfingomielinasa ácida (aSMase) ya que se ha demostrado que la ceramida puede inhibir *in vitro* a esta enzima (Gómez.-Muñoz et al., 2004). La bajada de niveles de ceramida llevaría a promover la activación de otras señales celulares inductoras de la supervivencia celular. En este sentido, se ha demostrado que la C1P induce activación de la vía PI3K/PKB, la cual es el principal mecanismo por el que promueven supervivencia celular los factores de crecimiento (Gómez.-Muñoz et al., 2005). El mismo grupo ha mostrado que la C1P estimula la síntesis de ADN y la división celular en fibroblastos (Gómez.-Muñoz et al., 1997).

Por otro lado, descubrimientos recientes muestran que C1P inhibe la lecitin-colesterol acil transferasa (LCAT) *in vitro*, la cual es responsable de la síntesis de muchos ésteres de colesterol presentes en el plasma humano que son componentes críticos del transporte reverso del colesterol (Subbaiah et al., 2006). Como los niveles de ceramida en plasma se incrementan durante la inflamación, los autores concluyen que la actividad de la LCAT podría estar alterada durante el proceso inflamatorio lo que posiblemente podría posiblemente modificar las propiedades aterogénicas de las lipoproteínas (Subbaiah et al. 2006).

Señalización activada por esfingosina-1-fosfato.

La esfingosina-1-fosfato se genera a partir de la esfingosina por la acción de las esfingosina kinasas 1 y 2 (SphK1 y SphK2). SphK1 es una enzima de supervivencia cuya expresión está aumentada en muchas células malignas. La inhibición de la actividad de estas enzimas conlleva un bloqueo de la proliferación e inducción de la apoptosis en células cancerígenas, por lo que los inhibidores de SphK1 podrían tener un importante potencial terapéutico (French et al., 2006). Sin embargo, SphK2

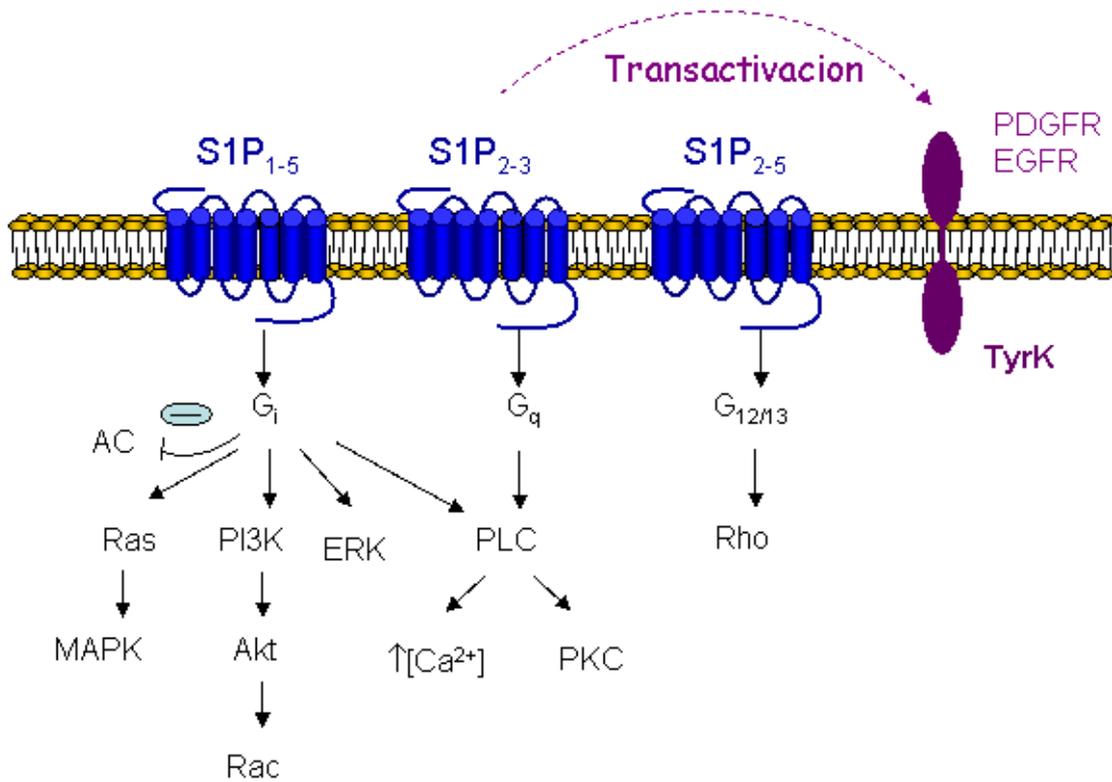


Figura 6. Mecanismos de transducción activados por los receptores de S1P.

parece tener un papel opuesto, ya que su sobreexpresión inhibe el crecimiento celular (Maceyka et al., 2005).

Una vez generada, la S1P puede actuar tanto intracelularmente como segundo mensajero, como extracelularmente, uniéndose a receptores de membrana de los que es un ligando específico. Se han descubierto transportadores específicos que podrían exportar la S1P desde el interior celular al medio extracelular. Se han caracterizado 5 subtipos de receptores de S1p que pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas g (GPCR) y que se han denominado: S1P₁, S1P₂, S1P₃, S1P₄ y S1P₅ (Sánchez and Hla, 2004; Rosen and Goetzl, 2005). Las vías de señalización intracelular activadas por estos receptores son diversas ya que están acoplados a diferentes subtipos de proteínas G (Figura 6).

Una de las vías de señalización más estudiadas es el aumento de calcio intracelular que se produce tanto por acoplamiento a fosfolipasa C (PLC) a través de G_q como de forma independiente de PLC (Coussin et al., 2003; Zhou and Murthy., 2004).

Además los receptores de S1P acoplados a G_{12/13} pueden activar la GTPasa monomérica Rho, la cuál es un importante regulador del citoesqueleto y de la movilidad celular (Lepley D et al., 2005). Las respuestas mitogénicas y de supervivencia de S1P son principalmente activadas por los receptores S1P acoplados a proteínas G_i que regulan las vías de PI3K/Akt y Ras/ERK.

Otro posible mecanismos de actuación de los receptores S1P es la transactivación de receptores de factores de crecimiento. Por ejemplo, ha sido recientemente demostrado que el receptor S1P₃ está involucrado en la transactivación del receptor EGFR inducida por estrógenos (Sukocheva et al., 2006).

Agrupación de receptores en dominios de membrana ricos en ceramida

Además de estas vías, S1p también actúa de forma intracelular modulando varias cascadas de transducción entre las que se encuentran Ras/Raf/MEK/ERK y PI3K/Akt.

Por último, es necesario citar, el papel biológico que ejerce la ceramida modificando las propiedades físicoquímicas de las membranas biológicas. La esfingomielina está principalmente localizada en la cara externa de la membrana plasmática y forma parte de los microdominios de membrana denominados *lipid rafts*. La A-SMasa secretada, actuaría sobre la esfingomielina de membrana generando ceramida. La formación de ceramida por la activación de A-SMasa ha sido recientemente relacionada con la activación de señales de muerte, ya que puede inducir la agrupación de numerosos receptores de membrana (Bollinger et al., 2005). Muchos receptores activan la liberación de ceramida que transforma pequeñas balsas de membrana, *lipid rafts*, en grandes plataformas que median la agrupación de receptores los cuáles se activan y transmiten señales al interior celular. Recientes estudios indican que la activación y consiguiente translocación a la membrana de la A-SMasa es lo que produce generación de ceramidas en la cara externa de la membrana celular. La generación de ceramidas dentro de los *rafts* altera las propiedades biofísicas de esos microdominios de membrana y promueve su la agregación en dominios mayores que son críticos para la oligomerización de receptores y el ensamblaje de estructuras más complejas (Bollinger et al., 2005).

Agradecimientos

Los autores agradecen la financiación del Ministerio de Educación y Ciencia (SAF-2005-00602).

Bibliografía

- Andrieu-Abadie N; Levade T (2002) Sphingomyelin hydrolysis during apoptosis. *Biochim. Biophys Acta* 1585, 126-134.
- Bollinger CR; Teichgräber V; Gulbins E (2005) Ceramide-enriched membrane domains. *Biochim. Biophys. Acta* 1746, 284-294.
- Carracedo A; Lorente M; Egia A; Blazquez C; Garcia S; Giroux V; Malicet C; Villuendas R; Gironella M; Gonzalez-Feria L; Piris MA; Iovanna JL; Guzman M; Velasco G (2006) The stress-regulated protein p8 mediates cannabinoid-induced apoptosis of tumor cells. *Cancer Cell* 9, 301-312.
- Coussin F; Scott RH; Nixon GF (2003) Sphingosine 1-phosphate induces CREB activation in rat cerebral artery via a protein kinase C-mediated inhibition of voltage-gated K⁺ channels. *Biochem. Pharmacol.* 66, 1861-1870.
- French KJ; Upson JJ; Keller SN; Zhuang Y; Yun JK; Smith CD (2006) Antitumor activity of sphingosine kinase inhibitors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*
- Furtherman AH; Hannun YA (2004) The complex life of simple sphingolipids. *EMBO reports.* 5, 777-782.
- Futherford, AH; Riezman H (2005). The ins and outs of sphingolipid synthesis. *Trends Cell Biol.* 15, 312-318.
- Galve-Roperh I; Haro A; Díaz-Laviada I (1997) Ceramide-induced translocation of protein kinase C zeta in primary cultures of astrocytes. *FEBS Lett.* 415, 271-274.
- García A; Cayla X; Guergnon J; Dessauge F; Hospital V; Rebollo MP; Fleischer A; Rebollo A (2003) Serine/Threonine phosphatases PP1 and PP2A are key players in apoptosis. *Biochimie* 85, 721-726.
- Gómez-Muñoz A; Frago LM; Alvarez L; Varela-Nieto I (1997) Stimulation of DNA síntesis by natural ceramide 1-phosphate. *Biochem. J.* 325, 435-440.
- Gómez-Muñoz A (2004) Ceramide-1-phosphate: a novel regulator of cell activation. *FEBS Lett.* 562, 5-10.
- Gómez-Muñoz A; Kong JY; Steinbrecher UP (2004) Ceramide 1-phosphate blocks apoptosis through inhibition of acid sphingomyelinase in macrophages. *J. Lipid Res.* 45, 99-105.

Gómez-Muñoz A; Kong JY; Parhar K; Wang SW; Gangoiti P; Gonzalez M; Eivemark S; Salh B; Duronino V; Steinbrecher UP (2005) Ceramide 1-phosphate promotes cell survival through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *FEBS Lett.* 579, 3744-3750.

Heinrich M; Wickel M; Winoto-Morbach S; Schneider-Brachert W; Weber T; Brunner J Saftig P; Peters C; Kronke M; Schutze S (2000) Ceramide as an activator lipid of cathepsin D. *Adv. Exp. Med. Biol.* 477, 305-315.

Huwiler A; Johansen B; Skarstad A; Pfeilschifter J (2001) Ceramide binds to the CaLB domain of cytosolic phospholipase A2 and facilitates its membrane docking and arachidonic acid release. *FASEB J.* 1636, 159-168.

Huwiler A; Xin C; Brust AK; Briner VA; Pfeilschifter J (2004) Differential binding of ceramide to MEKK1 in glomerular endothelial and mesangial cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1636, 159-168.

Kajita K; Mune T; Kanoh Y; Natsume Y; Ishizawa M; Kawai Y; Yasuda K; Sugiyama C; Ishizuka T (2004) TNF alpha reduces the expression of peroxisome-proliferator activated receptor gamma (PPARgamma) via the production of ceramide and activation of atypical PKC. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 66, S79-S83.

Maceyka M; Sankala H; Hait NC; Le Stunff H; Liu H; Toman R; Collier C; Zhang M; Satin LS; Merrill Jr AH; Milstien S; Spiegel S (2005) SphK1 and SphK2, sphingosine kinase isoenzymes with opposing functions in sphingolipid metabolism. *J. Biol. Chem.* 280, 37118-37129.

Marchesini N; Hannun YA (2004) Acid and neutral sphingomyelinases: roles and mechanism of regulation. *Biochem. Cell Biol.* 82, 27-44.

Nakamura H; Hirabayashi T; Shimizu M; Murayama T (2006) Ceramide-1-phosphate activates cytosolic phospholipase A2 α directly and by a PKC pathway. *Biochem. Pharmacol.* 71, 850-857.

Pettus BJ; Chalfant CE; Hannun Y (2002) Ceramide in apoptosis: an overview and current perspectives. *Biochim. Biophys. Acta* 1585, 114-125.

Pettus BJ; Bielawska A; Subramanian P; Wijesinghe DS; Maceyka M; Leslie CC; Evans JH; Freiberg J; Roddy P; Hannun YA; Chalfant CE (2004) Ceramide 1-phosphate is a direct activator of cytosolic phospholipase A2. *J. Biol. Chem.* 279, 11320-11326.

Rosen H; Goetzl EJ (2005) Sphingosine 1-phosphate and its receptors: an autocrine and paracrine network. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 560-570.

Ruvolo PP (2003) Intracellular signal transduction pathways activated by ceramide and its metabolites. *Pharmacol. Res.* 47, 383-392.

Sanchez T; Hla T; (2004) Structural and functional characteristics of S1P receptors. *J. Cell Biochem.* 92, 13-22.

Schwandner R; Wiegmann K; Bernardo K; Kreder D; Krönke M (1998) TNF receptor death domain-associated proteins TRADD and FADD signal activation of acid sphingomyelinase. *J. Biol. Chem.* 273, 5916-5922.

Siskind LJ (2005) Mitochondrial ceramide and the induction of apoptosis. *J. Bioenerg. Biomembr.* 37, 143-152.

Siskind LJ; Kolesnick RN; Colombini M (2006) Ceramide forms channels in mitochondrial outer membranes at physiologically relevant concentrations. *Mitochondrion* ,1-8.

Subbaiah PV; Horvath P; Achar SB (2006) Regulation of the activity and fatty acid specificity of lecithin-cholesterol acyltransferase by sphingomyelin and its metabolites, ceramide and ceramide 1-phosphate. *Biochemistry* 45, 5029-5038.

Shirakabe K; Yamaguchi K; Shibuya H; Ire K; Matsuda S; Moriguchi T; Gotoh Y; Matsumoto K; Nishida E (1997) TAK1 mediates the ceramide signaling to stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase. *J. Biol. Chem.* 272, 8141-8144.

Sugiura M; Kono K; Shimizugawa T; Minekura H; Spiegel S; Kohama T (2002) Ceramide kinase, a novel lipid kinase. Molecular cloning and functional characterization. *J. Biol. Chem.* 277, 23294-23300.

Sukocheva O; Wadham C; Holmes A; Albanese N; Verrier E; Feng F; Bernal A; Derian CK; Ullrich A; Vadas MA; Xia P (2006) Estrogen transactivates EGFR via the sphingosine 1-phosphate receptor Edg-3: the role of sphingosine kinase-1. *J. Cell. Biol.* 173, 301-310.

Wijesinghe DS; Massiello A; Subramanian P; Szulc Z; Bielawska A; Chalfant CE (2005) Substrate specificity of human ceramide kinase. *J. Lipid Res.* 46, 2706-2716.

Zhou H; Murthy KS (2004) Distinctive G protein-dependent signalling in smooth muscle by sphingosine 1-phosphate receptors S1P1 and S1P2. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 286, C1130-1138.