

Sfingosinfosfat och cellsignalering

NINA BERGELIN OCH KID TÖRNQUIST

Sfingomyelin förekommer i cellmembranet hos alla eukaryotiska celler. Längre antog man att dess funktion närmast var strukturell. De senaste femton åren har vi dock kunnat ta del av ett enormt uppsving i intresset för denna lipid. Speciellt har forskning rörande metaboliterna ceramid, sfingosin och sfingosinfosfat (S1P) visat att dessa utgör synnerligen viktiga intracellulära och extracellulära signalmolekyler. Ceramid och sfingosin har närmast visat sig inhibera cellers proliferation och delta i initieringen av programmerad celldöd (apoptos). Flera olika typer av jonkanaler blockeras också av dessa metaboliter. Effekten av S1P är däremot den diametralt motsatta, och S1P anses allmänt vara en molekyl som stimulerar överlevnad, proliferation och migration. Dessutom är S1P en effektiv reglerare av cellernas kalciumhomeostas. Då dessa metaboliter på ett så markant sätt påverkar cellernas funktion, har de även väckt mycket intresse som mål för läkemedelsutveckling.

Inledning

Sfingomyelin bildas i cellerna genom *de novo*-syntes i det endoplasmatiska nätverket utgående från serin och palmitat med hjälp av flera transferaser, reduktaser och syntaser (1). En viktig mellanprodukt är ceramid, som också kan hydrolyseras till sfingosin med hjälp av ett ceramidase. Sfingomyelin hydrolyseras till ceramid med hjälp av flera olika sfingomyelinaser. Metaboliterna ceramid, sfingosin och sfingosinfosfat (S1P) är mycket bioaktiva lipider som påverkar så gott som alla celler i organismen (1, 2). S1P, som bildas genom att sfingosinkinaser fosforilerar sfingosin, stimulerar cellernas proliferation och modulerar mångsidigt cellers kalciumhomeostas. Förutom detta kan S1P reglera bl. a. neuritretaktion, hjärtats embryonalutveckling samt stimulera angiogenes. Vid ischemi har S1P också en markant kardioprotektiv effekt. Dessutom kan S1P antingen stimulera eller inhibera cellers migration.

S1P utsöndras från trombocyter och erythrocyter till cirkulationen där det binds till albumin och HDL. Utsöndrat S1P uppnår fysiologiskt relevanta koncentrationer i blodet, vilka överskrider EC_{50} -värdena för S1P-receptorerna. De flesta effekterna av S1P medieras troligtvis via aktivering av G-protein-kopplade receptorer. Fem receptorer för S1P (S1P₁₋₅) har klonats (2). Receptorerna

kopplar till olika typer av G-protein (G_{q/11}, G_i eller G_{12/13}), och olika receptorer har en klar preferens för vissa typer av G-protein. Receptor-G-proteinkomplexet kan sedan aktivera olika effektorer i cellerna och leda till t. ex. aktivering av mitogenaktiverande proteinkinaser (MAP-ERK1/2-kinaser) eller inhibering av stress-aktiverade kinaser. Receptorerna kan via aktivering av fosfolipas C och produktionen av inositol 1,4,5-trisfosfat (IP₃) mobilisera intracellulärt bundet kalcium

FÖRFATTARNA

FM **Nina Bergelin** är doktorand vid Turku Graduate School of Biomedical Sciences och vid Åbo Akademi (cellbiologi). Hennes forskning berör betydelsen av sfingolipiders signalering i sköldkörtelcancer, och hon sammanställer för tillfället sin doktorsavhandling vid Medicinska Forskningsinstitutet Minerva.

FD **Kid Törnquist** är professor i fysiologi (cellbiologi) vid Åbo Akademi. Hans forskargrupp undersöker främst cellers kalciumreglering och betydelsen av sfingolipider vid sköldkörtelcancer. Han är verksam både vid Medicinska Forskningsinstitutet Minerva och vid Åbo Akademi.

(2). Receptorerna kan även aktivera små GTPaser. Flera olika S1P-receptorer uttrycks ofta i samma cell, och stimuleringens slutresultat beror på vilka receptorer som uttrycks och vilka G-proteiner som finns i cellerna. Situationen kompliceras av att man även har identifierat även intracellulära effekter av S1P, om än förekomsten av en intracellulär receptor för S1P inte är påvisad. Eftersom de flesta celltyperna i organismen uttrycker receptorer för S1P, är denna metabolit en betydelsefull reglerare av cellernas funktion. Detta antagande stöds även av de resultat som erhållits från S1P-receptor "knock-out" möss: avsaknad av receptorer (eller kombinationer av receptorer) leder till grava störningar i embryogenesen och kan vara embryonalt letala (2). Likaså är "knock-out" av sfingosinkinas embryonalt letal (3).

De två andra metaboliterna, ceramid och sfingosin, inhiberar vanligen cellernas proliferation och medverkar ofta vid initieringen av apoptos. I vissa celltyper blockerar de kaliumkanaler och kalciumkanaler (4). Ceramid har därför ansetts fungera som en endogen tumörsuppressör. Man antar att aktiviteten av sfingosinkinas tillsammans med den relativa förekomsten av ceramid, sfingosin och S1P utgör en "rheostat" i cellerna: ifall sfingosinkinaset är inaktivt, ökar mängderna av sfingosin och ceramid, proliferationen blockeras och cellerna kan bli apoptotiska. Ifall sfingosinkinas aktiveras, produceras S1P som transporteras ut från cellen och stimulerar cellerna, tillväxer och prolifererar. Eventuellt fungerar S1P som en intracellulär budbärarmolekyl, men de flesta effekterna uppstår då S1P transporteras ut från cellen och stimulerar celler via en autokrin eller parakrin mekanism (5).

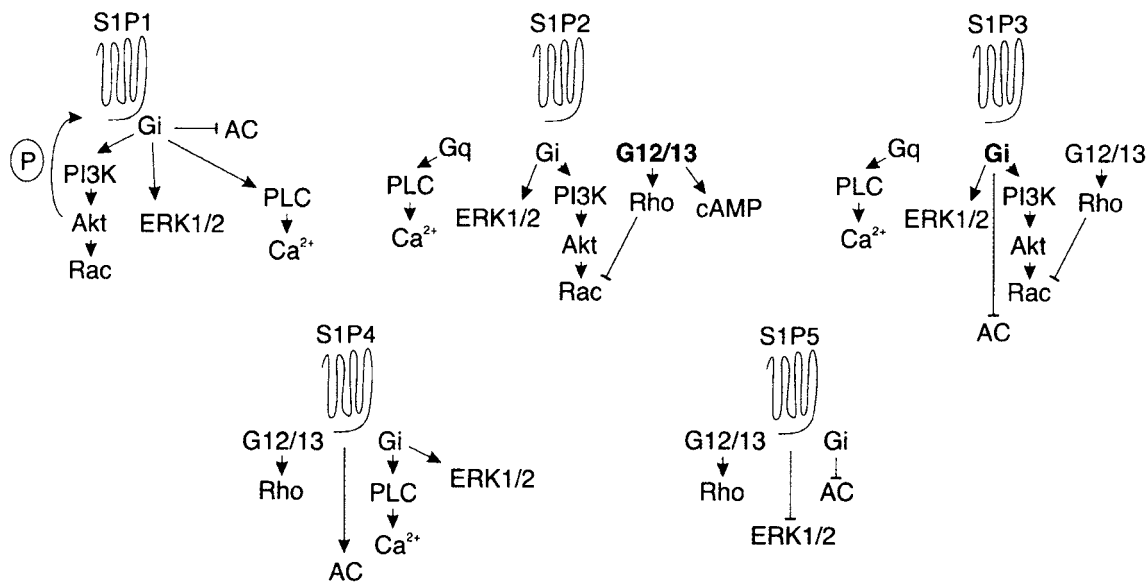
Sfingosinfosfat som intracellulär budbärarmolekyl

Flera studier tyder på att S1P kan fungera som en intracellulär budbärare (6, 7). Normalt är koncentrationen av intracellulärt S1P låg i cellerna. Troligen uttrycker alla celltyper sfingosinkinas och enzymet aktiveras av flera mitogener (t.ex. VEGF och PDGF) och G-protein-kopplade receptorer. Aktiveringen ger upphov till en snabb ökning i intracellulärt S1P, som sedan kan frigöra kalcium från det endoplasmatiske nätverket eller stimulera cellernas proliferation. Cellerna uttrycker också ett S1P-fosfat och ett S1P-lyas, som

nedbryter S1P. Dessa enzymer gör att produktionen av S1P vid stimulering enbart är transient (så som det bör vara för en budbärarmolekyl) (2). Två isoformer av sfingosinkinas har klonats och den mera undersökta isoformen (sfingosinkinas-I, SKI) aktiveras via en kalcium-kalmodulin- och protein kinas C-beroende mekanism. Den SKI-inducerade produktionen av S1P har visat sig betydelsefull för regleringen av cellernas proliferation och för inhiberingen av apoptos. SKII har en diametralt motsatt effekt till SKI, emedan den inducerar apoptos då den överuttrycks (se (1)). Mycket tyder på att SKI är av stor betydelse för cellernas kalciumhomeostas och proliferation, och att detta eventuellt regleras via en intracellulär effekt.

Sfingosinfosfat och regleringen av intracellulärt fritt kalcium

Många undersökningar har visat att flera G-proteinkopplade receptorer ökar intracellulärt S1P genom att aktivera sfingosinkinas och att detta S1P mobiliserar kalcium från intracellulära förråd (2). En ökning i intracellulärt fritt kalcium erhöles också då S1P mikroinjicerades i celler. Mekanismen för hur S1P frigör kalcium från intracellulära förråd i det endoplasmatiske nätverket (ER) är för tillfället okänt, men eventuellt samverkar S1P med IP_3 (8). Intracellulärt S1P har visats aktivera inflöde av kalcium över plasmamembranen genom att fungera som en kalcium-influxfaktor (9). Detta är intressant emedan sfingosin, prekursor till S1P, inhiberar de s.k. CRAC-kanalerna (calcium release-activated channels); (10)). Mycket tyder alltså på att S1P kan vara en del av en komplex signal-kaskad som reglerar cellers fria intracellulära kalciumnivå, antingen genom att mobilisera bundet kalcium från ER eller genom att öka inflödet över plasmamembranen. I denna reglering har sfingosinkinas troligen en viktig roll. I vaskulära glatta muskelceller kan S1P däremot aktivera TRPC5-kanalen (en icke-selektiv katjonkanal hörande till TRP-superfamiljen av jonkanaler) via aktivering av en G-proteinkopplad receptor (11). Denna aktivering är nödvändig för cellernas motilitet. Mycket tyder också på att inflöde av kalcium via TRPC-jonkanaler reglerar icke-exciterbara cellers motilitet. Dessa observationer är av klinisk betydelse då flera TRPC-kanaler är överuttryckta i cancerceller. Vi har också resultat som tyder på att S1P kan aktivera



Figur 1. Schematisk framställning av sfingosinfosfat-inducerad signalering via sina olika receptorer. Då de flesta celler uttrycker flera olika receptorer för sfingosinfosfat, blir signaleringsmönstret i cellerna mycket komplicerat. I cancer-celler uttrycks ofta S1P1 och S1P3 starkt, vilket ökar sannolikheten för cellmigration och metastasering.

en medlem av TRPC-familjen av jonkanaler i sköldkörtelceller via en autokrin receptor-reglerad mekanism (12). Denna aktivering är troligen betydelsefull för produktionen av sköldkörtelhormon (Figur 1).

I exciterbara celler, så som myocyter och hypofysceller, inhiberar sfingosin spännings-reglerade kalciumkanaler (13, 14) och ger i myocyter upphov till en negativ inotrop effekt. Sfingosin förlänger den tid kanalerna hålls stängda via en effekt som är beroende av intracellulärt kalcium (alltså någon form av återkoppling mellan intracellulärt fritt kalcium och kanalproteinet) (14). Vi har också visat, att då vi uttrycker ett inaktivt SKI i GH₄C₁-hypofysceller, minskas inflödet av kalcium via spänningsreglerade kalciumkanaler (15). Det har visats att sfingosin inhiberar ryandinreceptorer i exciterbara celler (16). Därtill kan både ceramid och sfingosin blockera natrium-kalcium utbytarproteinet, och ceramid inducera en internalisering och inaktivering av HERG-kaliumkanaler (17). Sammanfattningsvis tyder resultaten på att aktiviteten av sfingosinkinas är av största betydelse för regleringen av cellernas exciterbarhet, och då det gäller t.ex myocyter, deras kontraktionsförmåga. Detta kan vara av betydelse vid olika patologiska tillstånd. Till exempel har man visat att mängden ceramid ökar i myocyter vid

ischemi, vilket i sin tur kraftigt kan modulera både kalium- och kalciumkanalers funktion. En intressant observation är att S1P har visat sig ha en markant kardioprotektiv effekt vid ischemi. Denna effekt är troligen följden av en autokrin- eller parakrin signalering, då inhibering av sfingosinkinas i myocyter klart försämrar cellernas överlevnad vid ischemi både *in vitro* och *in vivo* (18).

Sfingosinfosfat och cancer

S1P påverkar uppkomsten av cancer-celler och metastasering genom att inducera centrala processer såsom tillväxt, överlevnad, adhesion, migration, samt vaskulogenes och angiogenes till tumörer. Exogent S1P kan stimulera migration via S1P₁- och S1P₅-receptorerna, medan migrationen kan inhiberas via S1P₂-receptorn (1, 5). Verkningsmekanismerna för hur S1P inducerar migration har beskrivits för S1P₁-receptorn. S1P aktiverar via S1P₁-receptorn PI3-kinas, som i sin tur rekryterar Akt till cellmembranen, där Akt aktiveras och vidare aktiverar Rho-kinaset Rac (19). Akt kan via positiv återkoppling aktivera S1P₁-receptorn, och uttrycket av Akt är ofta uppregrerat i t.ex. cancer-celler från sköldkörteln (20). S1P₅-receptorn kan även aktivera Rac via p38 -MAP-kinas (21).

Signalering via S1P₂-receptorn däremot inhiberar cellernas motilitet, antingen genom att stimulera ett Rac-GTPas aktiverande protein eller genom att inhibera Akt (22). S1P-receptorer kopplar även till flera andra nedströms effektormolekyler som förknippas med migration och proliferation, t.e.x. MAP-ERK1/2-kinaskaskaden. Därtill kan S1P-signalering också reglera andra centrala processer som är involverade i migration och metastasering, såsom aktivering av matrix metalloproteinaser vilka bryter ner det extracellulära matrixet, samt aktivering av integriner (23).

I den follikulära sköldkörtelcancer cellinjen ML-1 inducerar S1P (10–100 nM) migration via S1P₁- och S1P₃-receptorerna. Motsvarande koncentrationer av S1P ökar även den kemotaktiska effekten av fetalt kalvserum. Migrationen kan inhiberas av pertussistoxin (Ptx), vilket indikerar att ett G_{i/o}-protein är involverat. S1P-inducerad migration medieras via PI3-kinas och Akt, medan S1P-inducerad migration inhiberas av Rho och ROCK. Migrationen hos ML-1-celler påverkas även av PKC α , ERK1/2 och sfingosinkinas. Däremot påverkar S1P inte migrationen av normala sköldkörtelceller (24).

Såsom tidigare nämnts upprätthålls normalt en balans mellan de pro-apoptotiska molekylerna ceramid och sfingosin, och S1P genom enzymet sfingosinkinas. Ett ökat uttryck av sfingosinkinas i MCF7 bröstcancer celler har kopplats till ökad proliferation och migration, och i NIH 3T3-celler, i vilka sfingosinkinas överuttrycks, stimuleras en snabbare övergång från G1-fasen till S-fasen i cellcykeln (25), vilket stimulerar cellproliferationen. Ökat uttryck av sfingosinkinas är också en markör för försämrad prognos vid bröstcancer (26), och sfingosinkinas har därmed klassats som en onkogen (25). Sfingosinkinas påverkar migrationen och proliferationen av ML-1 celler. I SKI-överuttryckande ML-1 celler utsöndras S1P via transportören ABCC1 och cellerna har en uppreglad basal migration (samt en ökad basal fosforylering av ERK1/2), vilket indikerar att SKI har en central roll i progressionen av cancer (27).

Sfingosinfosfat och tillväxtfaktorer

S1P:s roll i den vaskulära utvecklingen har fastställts med hjälp av S1P₁-receptor "knock-out"- möss (28). Eftersom den optimala tillväxten av en tumör är beroende av tillförsel av syre och näringsämnen är det av intresse att undersöka mekanismerna bakom angiogene-

sen. S1P har föreslagits delta i bildningen och mognaden av blodkärl. Kapillärer i tumörer och större blodkärl på tumörer uttrycker S1P₁-receptorn, och en optimal tillväxt av tumören är beroende av S1P₁-receptorn (29). Studier som gjorts i endotelceller och glatta muskelceller visar att S1P stimulerar proliferationen, migrationen och bildningen av blodkärl. S1P kan tillsammans med vaskulär endotelcelltillväxtfaktor (VEGF) bidra till bildningen av nya blodkärl till tumörer. En samverkan mellan aktiverade S1P-receptorer och tyrosinkinaserreceptorer, t.ex. VEGF-receptor-2 har föreslagits för aktiveringen av intracellulära signalkaskader (30).

Flera typer av sköldkörtelcancer cellinjer producerar VEGF. S1P har tidigare visats stimulera cellmotilitet i samverkan med PDGF (31) och i andra cellinjer i samverkan med VEGF (32). Det är därför troligt att S1P i samverkan med VEGF inducerar angiogenes vid metastasering. I ML-1-sköldkörtelcancer celler modulerar VEGF-receptor-2 uttrycket av mRNA för S1P₁- och S1P₃-receptorerna (33), vilket kan öka cellers sensitivitet för S1P-signalering. ML-1-cellerna både utsöndrar VEGF och uttrycker receptorer för VEGF, och S1P stimulerar utsöndring av VEGF-A (33) och expressionen av VEGF-receptor-2 i dessa celler (Bergelin et al., manus). Både S1P-inducerad aktivering av Akt och ERK1/2 är beroende av VEGF-receptor-2, vilket tyder på att både Akt och ERK1/2 spelar en roll i samverkan mellan receptorerna. Mycket tyder på att migrationen av sköldkörtelcancer celler regleras via ett komplext samspel mellan S1P- och VEGF-receptorer, möjligtvis via en autokrin signalering. Förutom att sköldkörtelcancer cellers migration minskar, erhålls också en minskad proliferation då VEGF-receptor-2 inhiberas.

Korsaktivering mellan S1P-receptorer och tillväxtfaktorreceptorer kan antingen ske sekventiellt eller integrativt. Sekventiell aktivering innebär att en tillväxtfaktorreceptor binder sin ligand varpå receptorn kan aktivera sfingosinkinas. Kinaset fosforylerar sfingosin till S1P som utsöndras och kan därmed aktivera S1P-receptorer och nedströmssignalering. Vid integrativ aktivering befinner sig receptorerna i ett komplex på cellmembranet och aktiveringen av nedströmssignalering initieras från komplexet, antagligen genom bidirektionell signalering, så att vardera receptorn kan aktivera den andra. Den ena mekanismen utesluter dock inte den andra, och båda formerna av korsaktivering förekommer

antagligen samtidigt i cellen (34). I ML-1 -celler bildar S1P₁-receptorn tillsammans med VEGF -receptor- 2 ett signaleringskomplex på cellmembranen. Via detta komplex regleras både aktiveringen av effektormolekyler och cellernas migration. Liksom S1P-inducerad migration och aktivering av Akt- och ERK1/2-kaskaderna är beroende av VEGF -receptor- 2, är också VEGF- A- inducerad fosforylering av ERK1/2 och migration (haptotaxis) beroende av S1P₁-receptorn. Därtill är både migrationen och fosforyleringen av ERK1/2 beroende av G_{i/o}-protein. Det är därför troligt att korsaktiveringen mellan S1P₁-receptorn och VEGF -receptor- 2 i ML-1 -celler är integrativ och bidirektionell (opublicerat rön).

Förutom ett uppregerat uttryck av sfingosinkinas, har även ökade koncentrationer av fosfolipider i vissa cancertyper påvisats (35). Ett ökat intresse för S1P-signaleringen har därför under det senaste årtiondet resulterat i utvecklingen av inhibitorer för sfingosinkinas (35) och en antikropp som är specifik för S1P (36). Dessa har föreslagits vara kandidater för en mer specifik cancerbehandling. Trots lovande *in vitro* -resultat är sfingosinkinas-inhibitorerna fortfarande i den pre-kliniska fasen. S1P-antikroppen (ASONEP™) har däremot framskridit till fas 1 -kliniska studier. Antikroppen torde fungera genom att med hög affinitet binda det S1P som cirkulerar i blodet, vilket hindrar S1P-receptorerna från att aktiveras. Detta förväntas minska både tumörvolymen och mängden metastaserande celler, samtidigt som inga nya blodkärl kan bildas till tumören. Potentiellt kunde antikroppen även motverka S1P-stimuleringens anti-apoptotiska effekt och därmed även öka effekten av de pro-apoptotiska kemoterapeutika som normalt används vid cancerbehandling (37).

FM Nina Bergelin
Medicinska Forskningsinstitutet Minerva
Biomedicum 2U
Stockholmsgatan 8
00290 Helsingfors
nbergeli@abo.fi

FD Kid Törnquist
Medicinska Forskningsinstitutet Minerva
Biomedicum 2U
Stockholmsgatan 8
00290 Helsingfors
ktornqvi@abo.fi

Referenser

- Hait NC, Oskeritzian CA, Paugh SW, Milstein S, Spiegel S. Sphingosine kinase, sphingosine 1-phosphate, apoptosis and diseases. *Biochem. Biophys. Acta* 2006;1758:2016–26.
- Spiegel S, Milstein S. Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2003;4:397–407.
- Mizugishi K, Li C, Olivera A, Bielawski J, Bielawska A, Deng C-X, et al. Maternal disturbance in activated sphingolipid metabolism causes pregnancy loss in mice. *J. Clin. Invest.* 2007;117:2993–3006.
- Ogretmen B, Hannun YA. Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. *Nat. Rev. Cancer.* 2004;4:604–616.
- Alvarez J, Milstein S, Spiegel S. Autocrine and paracrine roles of sphingosine-1-phosphate. *TRENDS Endocrinol. Metab.* 2007;18:300–307.
- Olivera A, Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens. *Nature* 1993;365:557–560.
- Choi OH, Kim J-H, Kinet J-P. Calcium mobilization via sphingosine kinase in signalling by the FcεRI antigen receptor. *Nature* 1996;380:634–636.
- Blom T, Slotte JP, Pitson SM, Törnquist K. Enhancement of intracellular sphingosine-1-phosphate production by inositol 1,4,5-trisphosphate-evoked calcium mobilisation in HEK-293 cells: Endogenous sphingosine-1-phosphate as a modulator of the calcium response. *Cell. Signal.* 2005;17:827–836.
- Itagaki K, Hauser CJ. Sphingosine 1-phosphate, a diffusible calcium influx factor mediating store-operated calcium entry. *J. Biol. Chem.* 2003;278:27540–47.
- Mathes C, Fleig A, Penner R. Calcium release-activated calcium current (ICRAC) is a direct target for sphingosine. *J. Biol. Chem.* 1998;273:25020–30.
- Xu S-Z, Muraki K, Zeng F, Li J, Sukumar P, Shah S, et al. A sphingosine-1-phosphate-activated calcium channel controlling vascular smooth muscle cell motility. *Circ. Res.* 2006;98:1381–89.
- Gratschew D, Löf C, Heikkilä J, Björkbom A, Sukumaran P, Hinkkanen A, et al. Sphingosine kinase as a regulator of calcium entry through autocrine sphingosine 1-phosphate signalling in thyroid FRTL-5 cell. *Endocrinology* 2009; i tryck.
- McDonough PM, Yasui K, Betto R, Salvati G, Glembotski CC, Palade PT, et al. Control of cardiac Ca²⁺ levels. Inhibitory actions of sphingosine on Ca²⁺ transients and L-type Ca²⁺ channel conductance. *Circ. Res.* 1994;75:981–989.
- Titievsky A, Titievskaya I, Pasternack M, Kaila K, Törnquist K. Sphingosine inhibits voltage-operated calcium channels in GH4C1 pituitary cells. *J. Biol. Chem.* 1998;273:242–247.
- Blom T, Bergelin N, Slotte JP, Törnquist K. Sphingosine kinase regulates voltage operated calcium channels in GH₄C₁ rat pituitary cells. *Cell. Signal.* 2006;18:1366–73.
- Sabbadini RA, Betto R, Teresi A, Fachechi-Cassano G, Salvati G. The effect of sphingosine on sarcoplasmic reticulum membrane calcium release. *J. Biol. Chem.* 1992;267:15475–84.
- Chapman H, Ramström C, Korhonen L, Laine M, Wann KT, Lindholm D, et al. Down-regulation of the HERG (KCNH2) K⁺ channel by ceramide: Evidence for ubiquitin-mediated lysosomal degradation. *J. Cell Sci.* 2005;118: 5325–34.
- Karliner JS. Sphingosine kinase and sphingosine 1-phosphate in cardioprotection. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2009;53:189–197.
- Lee M-J, Thangada S, Paik JH, Sapkota GP, Ancellin N, Chae S-S et al. Akt-mediated phosphorylation of the G protein-coupled receptor EDG-1 is required for endothelial cell chemotaxis. *Molecular Cell* 2001;8:693–704.
- Ringel MD, Hayre N, Saito J, Saunier B, Scuppert F, Burch H et al. Overexpression and overactivation of Akt in thyroid carcinoma. *Cancer Res.* 2001;61:6105–11.
- Liu F, Verin AD, Wang P, Day R, Wersto RP, Chrest FJ et al. Differential regulation of sphingosine-1-phosphate- and VEGF-induced endothelial cell chemotaxis. Involvement of G(α₁₂)-linked Rho kinase activity. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2001;24:711–719.
- Okamoto H, Takuwa N, Yokomizo T, Sugimoto N, Sakurada S, Shigematsu H et al. Inhibitory regulation of Rac activation, membrane ruffling, and cell migration by the G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptor EDG5 but not EDG1 or EDG3. *Mol. Cell. Biol.* 2000;20:9247–61.

-
22. Bayless KJ, Davis GE. Sphingosine-1-phosphate markedly induces matrix metalloproteinase and integrin-dependent human endothelial cell invasion and lumen formation in three-dimensional collagen and fibrin matrices. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003;312:903–913.
 23. Balthasar S, Samulin J, Ahlgren H, Bergelin N, Lundqvist M et al. Sphingosine 1-phosphate receptor expression profile and regulation of migration in human thyroid cancer cells. *Biochem. J.* 2006;398:547–556.
 24. Xia P, Gamble JR, Wang L, Pitson SM, Moretti PA, Wattenberg BW et al. An oncogenic role of sphingosine kinase. *Curr. Biol.* 2000;10:1527–30.
 25. Ruckhäberle E, Rody A, Engels K, Gaetje R, von Minckwitz G, Schiffmann S et al. Microarray analysis of altered sphingolipid metabolism reveals prognostic significance of sphingosine kinase 1 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2008;112:41–52.
 26. Bergelin N, Blom T, Heikkilä J, Löf C, Alam C, Balthasar S et al. Sphingosine kinase as an oncogene: autocrine sphingosine 1-phosphate modulates ML-1 thyroid carcinoma cell migration by a mechanism dependent on protein kinase C- α and ERK1/2. *Endocrinology.* 2009;150:2055–63.
 27. Liu Y, Wada R, Yamashita T, Mi Y, Deng CX, Hobson JP 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.
 28. Chae SS, Paik JH, Furneaux H, Hla T. Requirement for sphingosine 1-phosphate receptor-1 in tumor angiogenesis demonstrated by in vivo RNA interference. *J Clin Invest.* 2004;114:1082–89.
 29. Igarashi J, Erwin PA, Dantas APV, Chen H, Michel T. VEGF induces S1P1 receptors in endothelial cells: Implications for cross-talk between sphingolipid and growth factor receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003;100:10664–69.
 30. Hobson JP, Rosenfeldt HM, Poulton S, Caron MC, Milstein S, Spiegel S. Role of the sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1 in PDGF-induced cell motility. *Science.* 2001;291:1800–03.
 31. Endo A, Nagashima K-I, Kurose H, Mochizuki S, Matsuda M, Mochizuki N. Sphingosine 1-phosphate induces membrane ruffling and increases motility of human umbilical vein endothelial cells via vascular endothelial growth factor receptor and CrkII. *J. Biol. Chem.* 2002;277:23747–54.
 32. Balthasar S, Bergelin N, Löf C, Vainio M, Andersson S, Törnquist K. Interactions between sphingosine-1-phosphate and vascular endothelial growth factor signalling in ML-1 follicular thyroid carcinoma cells. *Endocr. Relat. Cancer.* 2008;15:521–534.
 33. Pyne NJ, Pyne S. Sphingosine 1-phosphate, lysophosphatidic acid and growth factor signaling and termination. *Biochim. Biophys. Acta.* 2008;1781:467–476.
 34. Westermann AM, Havik E, Postma FR, Beijnen JH, Daleo O, Moolenaar WH et al. Malignant effusions contain lysophosphatidic acid (LPA)-like activity. *Ann Oncol.* 1998;9:437–442.
 35. French KJ, Upson JJ, Keller SN, Zhuang Y, Yun JK, Smith CD. Antitumor activity of sphingosine kinase inhibitors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2006;318:596–603.
 36. Visentin B, Vekich JA, Sibbald BJ, Cavalli AL, Moreno KM, Matteo RG et al. Validation of an anti-sphingosine-1-phosphate antibody as a potential therapeutic in reducing growth, invasion, and angiogenesis in multiple tumor lineages. *Cancer Cell.* 2006;3:225–238.
 37. O'Brien N, Jones ST, Williams DG, Cunningham HB, Moreno K, Visentin B et al. Production and characterization of monoclonal anti-sphingosine-1-phosphate antibodies. *J Lipid Res.* i tryck.