

INDICE

ABSTRACT	1
SOMMARIO	2
CAPITOLO 1	3
IL SISTEMA DI ATTIVAZIONE DEL PLASMINOGENO. IL RECETTORE DELL'UROCHINASI	3
1.1 INTRODUZIONE.....	3
1.2 IL SISTEMA DI ATTIVAZIONE DEL PLASMINOGENO	4
1.3 IL RECETTORE DELL'UROCHINASI	6
1.3.1 ORGANIZZAZIONE STRUTTURALE DELL'uPAR	6
1.3.2 ESPRESSIONE DELL' uPAR.....	9
1.4 LIGANDI DELL'uPAR.....	10
1.4.1 LIGANDI EXTRACELLULARI DELL'uPAR.....	10
1.4.2 LIGANDI DI MEMBRANA DELL'uPAR	12
1.5 uPAR E "LIPID RAFTS"	14
1.6 FUNZIONI DELL'uPAR	15
1.6.1 FUNZIONI PROTEOLISI-DIPENDENTI.....	15
1.6.2 FUNZIONI PROTEOLISI-INDIPENDENTI	16
CAPITOLO 2	21
L'uPAR NELLA MIGRAZIONE CELLULARE. RUOLO DI fMLF-Rs E INTEGRINE	21
2.1 INTRODUZIONE.....	21
2.2 RISULTATI	22
2.2.2 L'uPAR RECLUTA FPR1 E INTEGRINE SULLA SUPERFICIE CELLULARE	24
2.2.3 L'uPAR CO-IMMUNOPRECIPITA CON fMLF-Rs	26

2.2.4 L'ESPRESSIONE DELL'αPAR CONTROLLA LA MIGRAZIONE CELLULARE VERSO SIERO	29
2.2.5 fMLF-Rs E INTEGRINE β1 CONTRIBUISCONO ALL'ATTIVITA' DI CONTROLLO ESERCITATA DALL'αPAR SULLA MIGRAZIONE CELLULARE	30
2.2.6 LA MIGRAZIONE αPAR-DIPENDENTE E' MEDIATA DA VIE DI SEGNALAZIONE CHE NON SONO COINVOLTE NELLA MIGRAZIONE αPAR-INDIPENDENTE.....	32
2.2.7 L'ESPRESSIONE DELL'αPAR CONTROLLA LA MIGRAZIONE VERSO EGF	35
2.3 DISCUSSIONE	37
 CAPITOLO 3	 39
L'αPAR REGOLA LA MIGRAZIONE DELLA CELLULA TUMORALE. RUOLO DELL'ÁNCORA GPI.	39
3.1 INTRODUZIONE.....	39
3.2 RISULTATI	39
3.2.1 L'αPAR REGOLA LA MIGRAZIONE DI CELLULE TUMORALI VERSO SIERO.	39
3.2.2 I RECETTORI PER fMLF E LE INTEGRINE SONO COINVOLTI NELLA MIGRAZIONE αPAR-DIPENDENTE DI CELLULE TUMORALI	41
3.2.3 VIE DI SEGNALE COINVOLTE NELLA MIGRAZIONE αPAR-DIPENDENTE DI CELLULE TUMORALI	41
3.2.4 LA DEGRADAZIONE DELL'ÁNCORA GPI DELL'αPAR INIBISCE LA MIGRAZIONE αPAR-DIPENDENTE	42
3.2.5 LA DISGREGAZIONE DEI <i>LIPID RAFTS</i> INIBISCE LA MIGRAZIONE αPAR-DIPENDENTE.....	45
3.3 DISCUSSIONE	48
 CAPITOLO 4	 50
IDENTIFICAZIONE DI INIBITORI DELL'αPAR.....	50
4.1 INTRODUZIONE.....	50
4.2 RISULTATI	51

4.2.1. QUATTRO COMPOSTI SELEZIONATI INIBISCONO L'ADESIONE DI CELLULE ESPRIMENTI uPAR ALLA VITRONECTINA	51
4.2.2 I COMPOSTI 6 E 37 INIBISCONO LA MIGRAZIONE CELLULARE uPAR- DIPENDENTE.....	53
4.2.3 I COMPOSTI 6 E 37 INIBISCONO L'INTERAZIONE DI uPAR CON FPR1	55
4.3 DISCUSSIONE	56
CAPITOLO 5	57
CONCLUSIONI	57
5.1 CONCLUSIONI	57
CAPITOLO 6	60
MATERIALI E METODI	60
6.1 REAGENTI	60
6.2 COLTURE CELLULARI.....	60
6.3 TRASFEZIONI.....	61
6.4 WESTERN BLOT	61
6.5 SAGGI DI IMMUNOFLUORESCENZA	62
6.6 SAGGI DI CO-IMMUNOPRECIPITAZIONE.....	62
6.7 SAGGI DI MIGRAZIONE CELLULARE	63
6.8 SAGGI DI ADESIONE CELLULARE.....	64
6.9 ISOLAMENTO ED ANALISI DEI LIPID RAFTS	64
BIBLIOGRAFIA	65

ABSTRACT

The urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) is a GPI-anchored cell-surface receptor; it is involved in cell migration and tissue invasion. uPAR also binds vitronectin (VN) and associates to integrins; it is strongly up-regulated and represents a negative prognostic factor in various cancer types. These considerations prompted us to better elucidate the mechanisms regulating uPAR activities, in order to explore new approaches to inhibit its functions in cancer. This project aims to examine the possible cell-surface uPAR interactions with new molecules, focusing on chemotaxis receptors for formylated peptides (fMLF-Rs). We have shown that uPAR co-localizes at the cell-surface of uPAR-transfected HEK-293 cells and co-immunoprecipitates with the high-affinity fMLF-R, FPR1. uPAR/ β 1 integrin and FPR1/ β 1 integrin co-localization was also observed. Serum or the WKYMVm peptide (W Pep), a FPR1 ligand, strongly increase all observed co-localizations in uPAR-293 cells, including FPR1/ β 1 integrin co-localization. FPR1/ β 1 integrin basal or induced co-localization was not observed in uPAR-negative HEK-293 cells. The role of uPAR interactions in cell migration was then explored. Both uPAR-293 and V-293 control cells efficiently migrate toward serum or purified EGF. Cell treatments impairing uPAR interactions with fMLF-Rs or integrins, or inhibiting specific cell-signaling mediators abrogate uPAR-293 cell migration, without exerting any effect on V-293 control cells. However, the degradation of the uPAR GPI-anchor or the disgregation of lipid rafts, inhibit uPAR-dependent cell migration restoring uPAR-independent mechanisms, indicating a crucial role for the uPAR GPI anchor in uPAR-dependent migration. These cells can migrate according to uPAR-dependent or independent mechanisms. Similar results were obtained in PC3 cells, that express uPAR constitutively, in which only uPAR-dependent migration is observed. In parallel, since uPAR and VN, its non-proteolytic ligand, are overexpressed in cancer, we have selected and characterized two compounds that might target their interaction. These compounds selectively inhibit uPAR-293 cell adhesion to VN and their migration on VN. Since these two compounds target R91 and S88, key residues also for uPAR interaction with fMLF-Rs, we evaluated and showed also their ability to inhibit uPAR-fMLF-Rs association.

SOMMARIO

Il recettore per l'attivatore di tipo urochinasico del plasminogeno (uPAR), è un recettore ad áncora GPI presente sulla superficie della cellula; esso è coinvolto nei processi di migrazione cellulare e di invasione tissutale. L'uPAR lega anche la vitronectina (VN) e si associa alle integrine; è iper-espresso nei tumori ed è considerato un fattore prognostico negativo in vari tipi di cancro. Queste considerazioni ci hanno spinti a chiarire i meccanismi che regolano le attività dell'uPAR, al fine di esplorare nuove strategie in grado di inibire le sue funzioni nel cancro. Questo progetto ha lo scopo di esaminare le possibili interazioni dell'uPAR con nuove molecole di superficie, in particolare con i recettori chemiotattici per il peptide formilato di origine batterica fMLF (fMLF-Rs). Abbiamo dimostrato che l'uPAR co-localizza e co-immunoprecipita con FPR1, il recettore ad alta affinità per fMLF, sulla superficie di cellule HEK-293, trasfettate con cDNA di uPAR (uPAR-293). Abbiamo, inoltre, osservato la co-localizzazione uPAR/Integrine $\beta 1$ e FPR1/Integrine $\beta 1$. La stimolazione con siero o con il peptide WKYMVm (W Pep), ligando di FPR1, incrementa fortemente tutte le co-localizzazioni osservate nelle cellule uPAR-293, inclusa la co-localizzazione FPR1/Integrine $\beta 1$. La co-localizzazione FPR1/Integrine $\beta 1$ non è stata osservata nè in assenza, nè in presenza di stimoli in cellule HEK-293 trasfettate col vettore vuoto (V-293), uPAR-negative. Abbiamo, poi, analizzato il ruolo delle interazioni dell'uPAR nella migrazione cellulare. Sia le cellule uPAR-293 che le cellule V-293 di controllo migrano efficacemente verso siero o verso EGF purificato. I trattamenti effettuati su tali cellule per bloccare le interazioni dell'uPAR con fMLF-Rs o integrine, o per inibire mediatori di segnale specifici, riducono la migrazione cellulare, senza sortire alcun effetto sulle cellule controllo V-293. Tali cellule possono, quindi, migrare utilizzando meccanismi sia uPAR-dipendenti che uPAR-indipendenti. La degradazione dell'áncora GPI dell'uPAR o la disgregazione dei *lipid rafts*, inibisce la migrazione uPAR-dipendente delle cellule uPAR-293, ripristinando i meccanismi di migrazione uPAR-indipendente e indicando un ruolo cruciale dell'áncora GPI nella migrazione uPAR-dipendente. Risultati analoghi sono stati ottenuti in cellule PC3, in cui l'uPAR è espresso costitutivamente. In tali cellule è osservata solo la migrazione uPAR-dipendente. Parallelamente, poichè l'uPAR e il suo ligando non proteolitico (VN) sono iper-espressi nel cancro, abbiamo selezionato e caratterizzato due composti organici in grado di bloccare tale legame. Tali composti inibiscono selettivamente l'adesione di cellule uPAR-293 alla VN e la loro migrazione su VN. Poichè questi due composti bersagliano i residui aminoacidici R91 e S88, residui chiave anche nel legame dell'uPAR con fMLF-Rs, abbiamo esaminato e dimostrato anche la loro capacità di bloccare l'associazione di uPAR a fMLF-Rs.

CAPITOLO 1

IL SISTEMA DI ATTIVAZIONE DEL PLASMINOGENO. IL RECETTORE DELL'UROCHINASI

1.1 INTRODUZIONE

L'infiltrazione dei tessuti circostanti da parte della cellula tumorale e la formazione delle metastasi implicano migrazione cellulare. Le cellule per poter migrare devono, innanzitutto, aderire dinamicamente alle componenti della matrice extracellulare (ECM) e alle cellule circostanti, attivando nuove interazioni cellula-cellula e cellula-matrice e distruggendone altre. Le cellule devono poi essere in grado di attraversare l'ECM e, per poterlo fare, devono degradarla; a tale scopo usano enzimi proteolitici come cistein-proteasi, metalloproteasi e serin-proteasi, capaci di demolire le sue componenti (Birkedal-Hansen et al., 1993). Uno dei principali sistemi proteolitici responsabili della degradazione dell'ECM è il sistema di attivazione del plasminogeno (PAS), che genera la plasmina, una potente serin-proteasi. Il PAS, oltre che nell'invasione tumorale e nella formazione delle metastasi, è coinvolto in numerosi altri processi, sia fisiologici che patologici, che prevedono migrazione cellulare, come infiammazione, ovulazione, embriogenesi, angiogenesi e rimodellamento tissutale (Blasi e Carmeliet, 2002). Il PAS è, inoltre, cruciale nella trombolisi, essendo la plasmina un potente enzima fibrinolitico.

Il PAS include due attivatori del plasminogeno (PA) che catalizzano la conversione del plasminogeno in plasmina, l'attivatore tissutale (tPA) e l'attivatore di tipo urochinasico (uPA). L'uPA lega uno specifico recettore (uPAR) sulla superficie cellulare, che focalizza la proteolisi extracellulare plasmina-dipendente sulla membrana citoplasmatica. L'uPAR, inoltre, può presentare anche altre funzioni indipendenti dall'attività proteolitica del suo ligando. Esso, infatti, controlla le interazioni fra cellula ed ECM interagendo con le molecole di adesione integriniche espresse sulla superficie cellulare, media l'adesione cellulare alla vitronectina (VN), componente dell'ECM, regola l'attività di recettori di chemochine e recettori di fattori di crescita, attiva vie di segnalazione intracellulari. L'uPA e l'uPAR, quindi, partecipano entrambi al processo di invasione tumorale e formazione delle metastasi pur avendo ruoli a volte complementari e sinergici, a volte distinti.

L'uPAR è stato, quindi, inizialmente considerato cruciale per la concentrazione dell'attività proteolitica associata alla membrana, necessaria per la degradazione localizzata dell'ECM. Successivamente è stato ben compreso che il suo ruolo è molto più ampio. L'uPAR, infatti, cooperando con altre molecole sulla superficie della cellula, è in grado di trasdurre segnali dall'esterno all'interno, modulando in questo modo sopravvivenza, proliferazione, adesione e migrazione cellulare.

1.2 IL SISTEMA DI ATTIVAZIONE DEL PLASMINOGENO

Il plasminogeno è uno zimogeno di 92 KDa, presente nel plasma e nei fluidi extracellulari, e può associarsi alla fibrina attraverso la sua regione non catalitica. È costituito da una singola catena polipeptidica che comprende all'estremità carbossi-terminale il sito catalitico e 5 domini con struttura a triplo loop, chiamati "Kringle" (K1-K5) all'estremità opposta (Fig. 1).

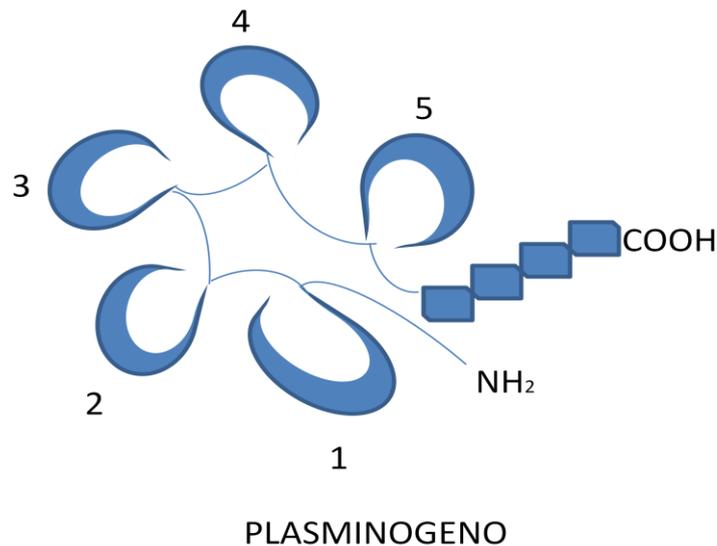


Fig. 1 Organizzazione strutturale del plasminogeno

Il taglio fra l'Arg 561 e la Val 562 converte la singola catena del plasminogeno in plasmina, costituita da due catene polipeptidiche legate da un ponte disolfuro. La plasmina è una serin-proteasi ad ampio spettro che svolge un ruolo chiave nella fibrinolisi, grazie alla sua capacità di legare la fibrina, suo substrato (Castellino e Ploplis, 2005). La plasmina, inoltre, promuove la degradazione dell'ECM, direttamente o indirettamente, degradando varie componenti dell'ECM e attivando metalloproteasi (MMP) come MMP3, MMP9, MMP12 e MMP13, che, a loro volta, degradano l'ECM. La plasmina e le metalloproteasi possono, inoltre, indurre il rilascio dall'ECM di alcuni fattori di crescita, promuovendone l'attivazione. Il plasminogeno può essere convertito in plasmina da numerose proteasi, ma i suoi specifici attivatori fisiologici (PAs) sono l'attivatore di tipo tissutale (tPA) e l'attivatore di tipo urochinasico (uPA). I PAs sono serin-proteasi che presentano un'organizzazione strutturale parzialmente simile. Entrambi sono costituiti da una regione C-terminale contenente il sito catalitico, preceduto da una struttura "kringle" (in singola copia nell'uPA e in doppia copia nel tPA); la regione N-terminale contiene invece il dominio GFD (growth factor domain) (Fig. 2), seguito, nel tPA, da un dominio

"finger" (Fig. 3). Il tPA ha un ruolo fondamentale nella fibrinolisi grazie alla sua capacità di legare la fibrina mediante il kringle (Collen e Lijnen, 2005). L'uPA, invece, non ha un sito di legame per la fibrina pur essendo, comunque, in grado di attivare fibrinolisi. L'attività enzimatica sia della plasmina che dei suoi attivatori è regolata da specifici inibitori come l' α 2-antiplasmina per la plasmina e il PAI-1 e il PAI-2 per l'uPA e il tPA (Ragno, 2006). Sia la plasmina che il tPA possono legare con bassa affinità recettori cellulari; l'uPA, invece, lega con la sua estremità N-terminale (ATF), uno specifico recettore cellulare (uPAR) con elevata affinità, dotando la cellula che lo esprime di un potente macchinario proteolitico sulla sua superficie.

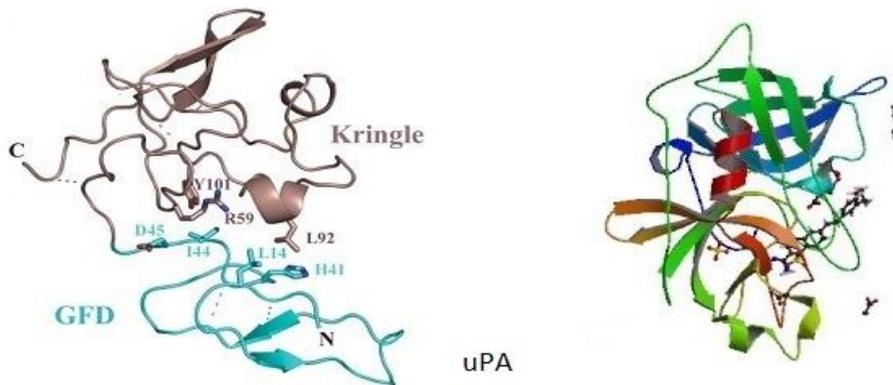


Fig. 2 Struttura 3D dell'uPA (PDB ID: 4FU7)

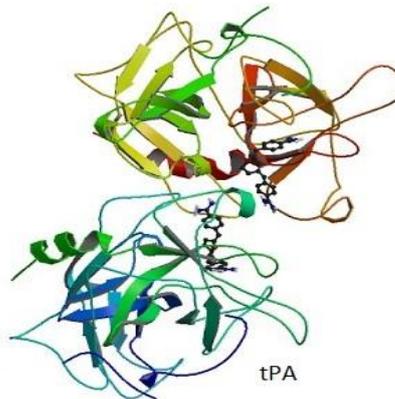


Fig. 3: Struttura 3D del tPA (PDB ID: 1A5H)

1.3 IL RECETTORE DELL'UROCHINASI

L'esistenza di un sito di legame per l'uPA è stato riportato nel 1985 grazie a studi effettuati sui monociti umani (Vassalli et al., 1985; Stoppelli et al., 1985); tuttavia, l'isolamento della proteina purificata e il sequenziamento del suo cDNA non si è avuto fino al 1990 (Behrendt et al., 1990; Roldan et al., 1990).

1.3.1 ORGANIZZAZIONE STRUTTURALE DELL'uPAR

Il gene umano dell'uPAR è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 19 e contiene sette esoni e sei introni (Børghlum et al., 1992). L'uPAR è sintetizzato come una singola catena polipeptidica lunga 313 aminoacidi; in seguito a modifiche post-traduzionali, vengono rimossi 30 residui aminoacidici dall'estremità C-terminale, permettendo l'attacco di una coda glicosil-fosfatidil-inositolica (GPI) al residuo di glicina 283, che ancora il recettore alla superficie cellulare (Ploug et al., 1991). L'uPAR maturo comprende quindi 283 residui aminoacidici ed è privo di una regione trans-membrana e citosolica. L'uPAR può essere rilasciato dalla superficie cellulare tramite lipasi fosfatidil-inositolo specifiche, generando forme solubili; inoltre, la coda GPI conferisce all'uPAR estrema mobilità sulla superficie della cellula, rendendolo capace di associarsi a specifici macro-domini della membrana plasmatica ricchi di colesterolo, "zattere lipidiche" ("*lipid rafts*"), che concentrano mediatori di segnale sul lato citosolico della membrana (Montuori e Ragno., 2009).

L'uPAR maturo, espresso sulla superficie cellulare, è fortemente glicosilato ed ha un peso molecolare di circa 55 KDa. E' costituito da tre domini omologhi di circa 90 aminoacidi ciascuno (DI, DII e DIII), caratterizzati da un pattern particolarmente ricco in cisteine (Sidenius et al., 2000). I tre domini DI, DII e DIII sono connessi da brevi regioni linker e sono assemblati in una struttura concava (Fig. 4A). Il dominio carbossi-terminale DIII ancora il recettore alla membrana tramite la coda GPI e il dominio DII connette il dominio DIII al dominio DI. Il dominio DI contiene il sito che lega l'estremità N-terminale dell'uPA; tuttavia, per un legame efficiente, è necessaria l'intera molecola (Montuori e Ragno, 2009). La struttura dell'uPAR, risolta nel 2005, suggerisce che l'uPA si inserisce nella cavità centrale e che una larga superficie esterna è comunque disponibile per eventuali altri legami (Kjaergaard et al., 2008) (Fig. 4B).

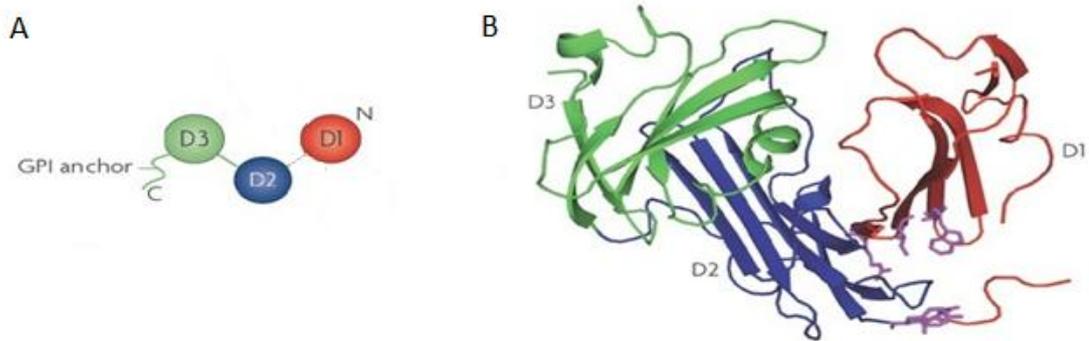


Fig. 4 A) Organizzazione strutturale dell'uPAR; B) Struttura 3D dell'uPAR con i diversi domini marcati con tre diversi colori

Varie proteasi, incluse tripsina, chimotripsina, elastasi, catepsina G, metalloproteasi, plasmina e uPA stessa, possono tagliare l'uPAR nella regione linker che connette i domini DI-DII (Montuori et al., 2005). Tale taglio promuove il rilascio del dominio DI, lasciando sulla superficie della cellula una forma tronca di uPAR, costituita dagli altri due domini (DII-DIII uPAR). Il DII-DIII uPAR, in base al sito di taglio, può esporre o meno una particolare sequenza, SRSRY, corrispondente agli aminoacidi 88-92, che è coinvolta in processi di migrazione cellulare e chemiotassi (Resnati et al., 1996) (Fig. 5).

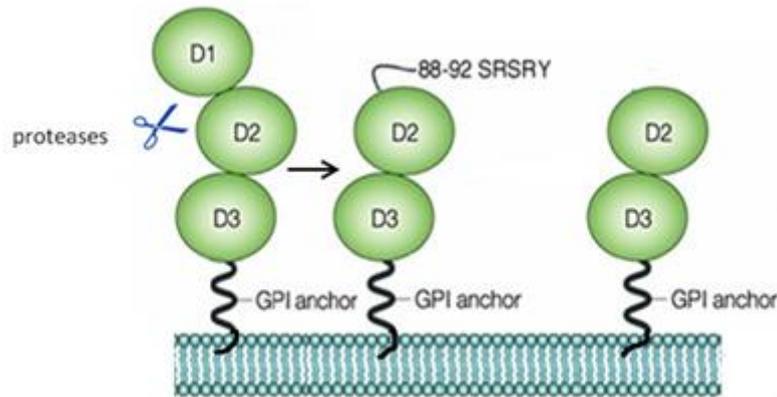


Fig. 5 Generazione delle forme tronche dell'uPAR

Oltre alla forma di membrana dell'uPAR, esiste anche una forma solubile (suPAR), generata dall'azione delle fosfolipasi C o D (Ploug et al., 1991; Wilhelm et al., 1999), che tagliano l'ancora GPI, causando così il rilascio del recettore dalla membrana. La forma solubile dell'uPAR è stata identificata sia in vitro che in vivo (nel sangue e nelle urine). Aumentati livelli di suPAR sono stati osservati in pazienti affetti da varie patologie, incluse patologie tumorali (Montuori e Ragno, 2009) (Fig. 6)

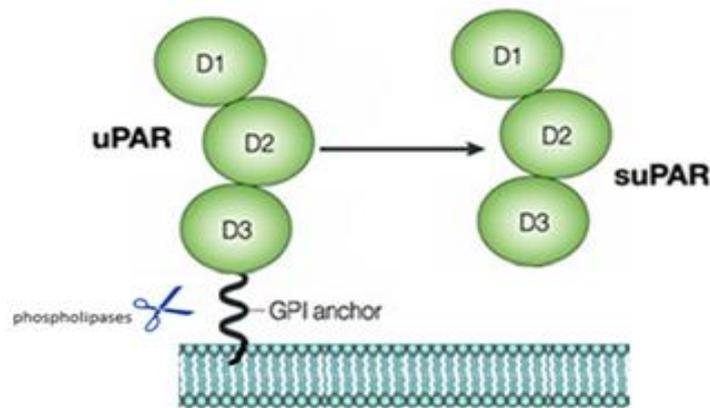


Fig. 6 Generazione dell'uPAR solubile

Anche la forma tronca di membrana può essere rilasciata dalla superficie cellulare, generando così una forma tronca solubile costituita dai domini DII e DIII (DII-DIII suPAR) che può esporre o meno, all'estremità N-terminale, la sequenza SRSRY. Tale forma tronca e solubile di uPAR è in grado di stimolare la migrazione cellulare attivando particolari recettori, ovvero i recettori per il peptide formilato di origine batterica fMLF (fMLF-Rs) (Fig. 7) (Resnati et al., 2002).

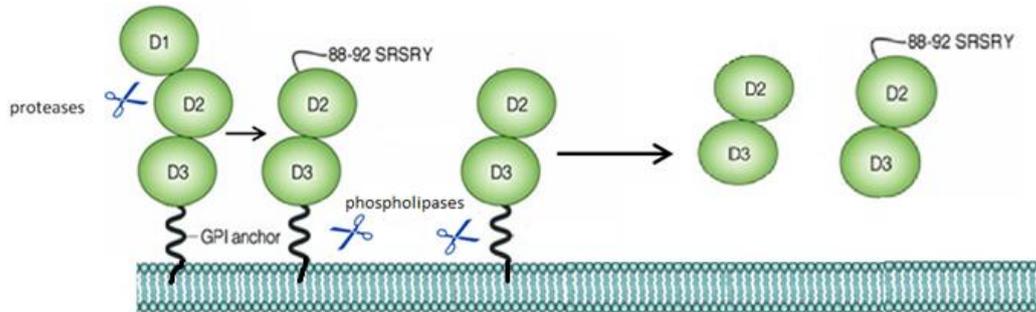


Fig. 7 Generazione della forma solubile dell'uPAR tronco

1.3.2 ESPRESSIONE DELL' uPAR

Nelle normali condizioni fisiologiche, l'espressione di uPAR è piuttosto ridotta nei vari tessuti pur essendo quasi ubiquitaria. Studi effettuati su topi e su campioni umani hanno messo in evidenza che stress, lesioni e infiammazione provocano una maggiore espressione del recettore. Una iper-espressione di uPAR si verifica, ad esempio, nel sistema nervoso centrale in seguito ad un'ischemia o ad un trauma (Beschoner et al., 2000) oppure in patologie come la malattia cronica renale (Wei et al., 2008). L'espressione di uPAR è fortemente incrementata, inoltre, durante l'attivazione e la differenziazione dei leucociti, suggerendo un suo coinvolgimento nella risposta immunitaria.

Numerosi studi hanno evidenziato che in molti tumori si verifica un aumento dei livelli dell'uPA e dell'uPAR e che tale aumento, in molti casi, rappresenta un fattore prognostico negativo (Sidenius e Blasi, 2003). L'espressione di uPAR nel cancro si osserva sia nelle cellule tumorali che in quelle dello stroma associate al tumore, come nei fibroblasti (Dublin et al., 2000) e nei macrofagi (Pyke et al., 1994). E' stato documentato, inoltre, che anche i livelli dell'uPAR solubile sono più elevati nel siero di pazienti affetti da vari tipi di tumore come leucemie, cancro alle ovaie, al colon retto (Riisbro et al., 2001), al polmone (Stephens et al., 1997), alla testa-collo (Schmidt e Hoppe, 1999). Dagli studi effettuati, si ritiene che l'eccesso di uPAR solubile nel siero derivi dalle cellule tumorali e/o da quelle dello stroma circostante; a supporto di questa ipotesi è stato dimostrato che in topi in cui sono state impiantate cellule umane di tumore mammario, si osservano maggiori livelli di uPAR solubile umano nel sangue (Holst-Hansen et al., 1999). L'uPAR solubile è presente anche nelle urine in forma intera e tronca (Sidenius et al., 2000). Molte vie di segnalazione attivano fattori trascrizionali che regolano l'espressione dell'uPAR nel cancro agendo sul suo promotore. Lengyel e colleghi (1996) hanno documentato la regolazione della trascrizione dell'uPAR da parte di ERK attraverso il fattore di trascrizione AP1; anche NFκB può regolare l'espressione di uPAR, direttamente o indirettamente, attraverso il fattore 1 α indotto da ipossia (HIF1A) (Wang et al., 2000). L'espressione di uPAR può essere regolata anche a livello post-trascrizionale da proteine in grado di legare il suo

mRNA, regolandone la stabilità. L'mRNA di uPAR, infatti, presenta nella sua 3' UTR (untranslated region), le ARE (AU rich regions), che possono essere legate da varie proteine che stabilizzano o destabilizzano l'mRNA, proteggendo o promuovendo la sua degradazione (Tran et al., 2003). La proteina p53, ad esempio, meglio conosciuta come il "guardiano del genoma", accelera la degradazione dell'mRNA di uPAR attraverso un'interazione diretta con la sua 3'UTR (Shetty et al., 2007).

1.4 LIGANDI DELL'uPAR

1.4.1 LIGANDI EXTRACELLULARI DELL'uPAR

L'uPAR è stato identificato inizialmente come recettore ad alta affinità per l'uPA; tuttavia, è stato dimostrato che esso è capace di legare con alta affinità anche la vitronectina (VN), una componente dell'ECM particolarmente abbondante nei tumori.

➤ uPA

L'uPA è sintetizzata come pro-enzima inattivo a singola catena di 411 aminoacidi ed è convertita ad uPA attiva nello spazio extracellulare ad opera di varie proteasi come plasmina, callicreina, catepsine B e L. Le proteasi operano un taglio proteolitico tra la lisina 158 e l'isoleucina 159 che determina la formazione di due subunità, tenute insieme da un ponte disolfuro: la catena A, costituita dalla porzione amino-terminale della pro-uPA e la catena B, che contiene il sito catalitico. Il sito di legame per l'uPAR risiede nella catena A e corrisponde ai residui aminoacidici 18-32 (Reuning et al., 2003). Un ulteriore taglio proteolitico tra i residui di lisina-135 e lisina-136 può determinare il rilascio di una forma di uPA a basso peso molecolare (33 kDa), enzimaticamente attiva ma non più in grado di legare il recettore cellulare, e di un frammento amino-terminale (ATF), privo di attività catalitica ma in grado di legare il recettore (Blasi e Verde, 1990). Nel complesso, l'uPA risulta costituita da una serie di domini distinti: il dominio "epidermal growth factor-like" (o EGF-like) (aa 9-45), responsabile del legame all'uPAR; il dominio "Kring" (aa 46-135); il dominio catalitico (aa 159-411) dotato dell'attività proteolitica, separato dal dominio kring dal cosiddetto "dominio di connessione" (aa 136-158), che contiene il sito di taglio per l'attivazione del pro-enzima (Carriero e Stoppelli, 2011). L'uPAR lega l'uPA con il dominio DI, tuttavia siti secondari di legame sono presenti anche negli altri due domini, quindi è necessaria l'intera molecola di uPAR per avere un legame uPA-uPAR efficiente. Il principale inibitore dell'uPA è il PAI-1, appartenente alla famiglia delle serpine (serine-protease inhibitors). Esso può inibire l'uPA sia in soluzione, sia legata al recettore. Il complesso uPA/PAI-1 legato all'uPAR smaschera un sito di legame per un recettore che ne promuove l'internalizzazione, l'LRP (LDL-receptor related protein). Dopo l'internalizzazione, uPA e PAI-1 vengono degradati, mentre uPAR e

LRP vengono riciclati sulla superficie cellulare (Noh et al., 2013). In tal modo, il PAI-1 regola non solo l'attività proteolitica dell'uPA sulla membrana ma anche l'espressione del suo recettore (Myohanen et al., 1993).

➤ VITRONECTINA

L'uPAR, oltre a legare l'uPA, è anche un recettore non integrinico per la vitronectina (VN), una glicoproteina prodotta nel fegato, presente in abbondanza nel plasma e nell'ECM. Sia la forma intera che quella solubile di uPAR interagiscono con la VN (Wei et al., 1994), e, in particolare, con il dominio somatomedina B (SMB) della porzione aminotermine della VN. SMB lega anche il PAI-1 e l'integrina $\alpha\beta_3$, perciò l'integrina, l'uPAR e il PAI-1 competono per il legame alla VN. Il sito di legame dell'uPAR per la VN è un sito composito, che include gli amminoacidi W32, R58, e I63 presenti nel dominio DI e gli amminoacidi R91 e Y92 presenti nella regione di connessione DI-DII. Il legame alla VN richiede come il legame all'uPA, che l'uPAR sia nella sua forma intera (Madsen and Sidenius, 2008) (Fig. 8).

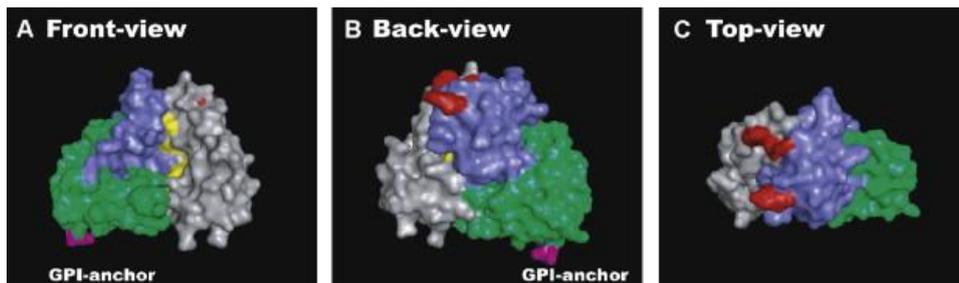


Fig. 8 Rappresentazione dei tre domini dell'uPAR colorati con tre diversi colori (DI: grigio; DII: blu; DIII: verde). **A)** La vista frontale mostra la cavità centrale che ospita il sito di legame per l'uPA (i residui coinvolti, R53, A55, Y57 e T66 sono indicati in giallo). **B, C)** La vista posteriore e quella dall'alto mostrano l'epitopo che lega la VN (i residui coinvolti, W32, R58, I63 e Y93, sono indicati in rosso). Le immagini sono state create usando il programma PyMol (coordinate:2FD6).

L'uPA regola positivamente il legame dell'uPAR alla VN, probabilmente inducendo la formazione di dimeri di uPAR che hanno maggiore affinità per la VN rispetto ai monomeri (Sidenius et al., 2002). La VN, a sua volta, concentra i dimeri di uPAR e rallenta la diffusione del recettore a livello della membrana basale (Caiolfa et al., 2007); è da sottolineare che l'oligomerizzazione delle proteine con áncora GPI contribuisce a regolare la loro associazione ai "*lipid rafts*" e la conseguente segnalazione intracellulare (Mayor e Riezman, 2004).

1.4.2 LIGANDI DI MEMBRANA DELL'uPAR

Numerose evidenze, riportate negli ultimi anni, hanno dimostrato chiaramente che l'uPAR, oltre ad avere ligandi extracellulari, si associa a molecole della superficie cellulare, che contribuiscono alle sue attività proteolisi-indipendenti. Tra queste sicuramente vi sono le integrine, la cui associazione all'uPAR è stata largamente dimostrata da numerosi studi negli ultimi anni.

➤ INTEGRINE

Le integrine sono recettori presenti sulla superficie cellulare che ancorano le cellule all'ECM e trasducono i segnali da essa inviati all'interno della cellula. Le integrine regolano adesione e motilità cellulare interagendo con molecole coinvolte nella trasmissione del segnale e nell'organizzazione citoscheletrica.

Le integrine sono eterodimeri composti da due subunità, α e β , rispettivamente di 120-170 kDa e 90-100 kDa, associate in modo non covalente. Queste subunità attraversano la membrana cellulare, presentando brevi code C-terminali intracellulari e lunghi domini N-terminali extracellulari. La porzione extracellulare del dimero di integrina si lega a specifiche sequenze aminoacidiche di proteine dell'ECM o a ligandi espressi sulla superficie di altre cellule, mentre la porzione intracellulare si connette con le molecole del citoscheletro ed è in grado di trasdurre segnale. Sono noti attualmente 24 tipi diversi di integrine derivanti dalla combinazione di 8 tipi diversi di subunità β e 18 tipi diversi di subunità α (Fig. 9).

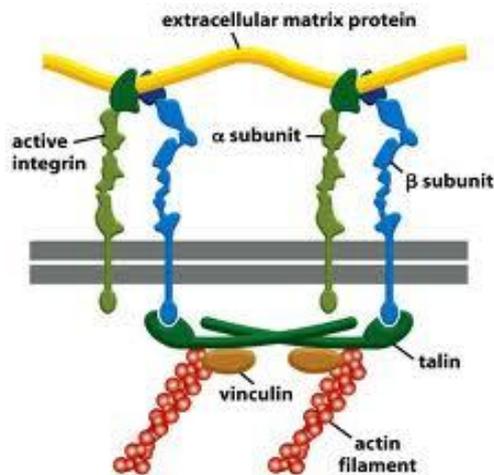


Fig. 9 Le integrine legano l'ECM e attivano segnale intracellulare.

Esperimenti di immunolocalizzazione, co-immunoprecipitazione e FRET hanno dimostrato che l'uPAR è associato sulla superficie cellulare con integrine appartenenti a varie famiglie, come $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ e $\beta 5$ (Kjaergaard, 2008). I siti di legame per le integrine sono stati localizzati nel dominio DII (residui 130-142) (Degryse et al., 2005) e nel dominio DIII (residui 240-248) (Chaurasia et al., 2006) dell'uPAR. Il legame alle integrine, tuttavia, richiede l'intero recettore, come per le interazioni uPAR-uPA e uPAR-VN.

La prima dimostrazione dell'associazione di uPAR a integrine risale al 1994 (Xue et al.) quando fu evidenziata l'associazione di uPAR con l'integrina $\alpha M\beta 2$. $\alpha M\beta 2$ e uPAR co-immunoprecipitano e co-localizzano nei monociti e nei neutrofili, dove tale integrina è fortemente espressa. L'associazione uPAR- $\alpha M\beta 2$ aumenta la capacità di monociti e neutrofili di aderire alle cellule endoteliali e l'affinità di $\alpha M\beta 2$ per il suo ligando, il fibrinogeno. Gli aspetti strutturali e funzionali dell'interazione uPAR- $\alpha M\beta 2$ sono poi stati confermati ed esaminati con diversi approcci in numerosi studi successivi (Simon et al., 1996; Smith e Marshall, 2010).

Un'altra classe di integrine che interagisce con l'uPAR è quella delle integrine appartenenti alla famiglia $\beta 1$. Una delle prime evidenze di tale associazione e delle sue conseguenze funzionali fu riportata da Chapman et al. nel 1996. Successivamente, in un interessante lavoro di Ossowski (1999), è stato dimostrato che, in cellule di epatoma Hep-3, l'uPAR si associa all'integrina $\alpha 5\beta 1$ (recettore per la fibronectina) e che tale associazione incrementa la fosforilazione del mediatore di segnale FAK (focal adhesion Kinase), determinando l'attivazione della via di segnale Ras-ERK. Ancora, nel 2001, Chapman ha fornito ulteriori evidenze sperimentali circa la formazione di complessi stabili fra uPAR e integrine e, in particolare, ha dimostrato che in cellule HEK-293 trasfettate con uPAR, esso si associa all'integrina $\alpha 3\beta 1$ (recettore per la laminina) attivando vie di segnalazione cellulare pro-adesive.

L'uPAR co-immunoprecipita anche con l'integrina $\beta 3$ che forma eterodimeri con le subunità αv e αIIb , capaci di legare molti ligandi dell'ECM come vitronectina, fibronectina, osteopontina e fibrinogeno. L'interazione dell'uPAR con le integrine della famiglia $\beta 3$ svolge un ruolo importante nei processi migratori promossi dal legame dell'uPAR sia con uPA che con VN. In base al tipo di ligando dell'uPAR, infatti, vengono attivati, attraverso le integrine $\beta 3$, differenti mediatori di segnale che vanno dalla protein-chinasi C (PKC) alla fosfatidilinositolo-3-chinasi (PI-3K) (Degryse et al., 2001).

L'importanza funzionale dell'interazione uPAR-integrine è stata dimostrata anche in vivo attraverso l'uso di un peptide sintetico (p25), che interferisce con la formazione del complesso (Wei Y. et al., 1996). La somministrazione del p25 in topi inoculati con cellule di carcinoma mammario MDA-MD-231 riduce fortemente la formazione di metastasi ossee (Van der Pluijm et al., 2001).

➤ RECETTORI PER FATTORI DI CRESCITA E CHEMOCHINE

L'uPAR è stato co-immunoprecipitato anche con recettori di fattori di crescita, in particolare il recettore per il fattore di crescita epidermico (EGFR) e il recettore per il fattore di crescita derivato dalle piastrine beta (PDGFR), i quali sembrano coinvolti nelle vie di segnalazione uPAR-dipendenti.

Nel lavoro di Ossowski del 2002, è stata ampiamente analizzata l'attivazione di EGFR nelle cellule Hep3 che esprimevano alti e bassi livelli di uPAR (rispettivamente H-Hep3 e L-Hep3). Nelle cellule H-Hep3 l'espressione di uPAR promuove l'attivazione di EGFR indipendentemente dai suoi ligandi, attraverso la formazione di un complesso multiproteico costituito da uPAR stesso, integrine, EGFR e FAK, in grado di attivare ERK.

L'interazione uPAR-PDGFR β è stata, invece, descritta in cellule umane della muscolatura liscia vascolare (Kiyani et al., 2005). L'uPA induce l'associazione dell'uPAR con PDGFR β , stimolando la sua fosforilazione e, quindi, la segnalazione PDGFR-dipendente; d'altro canto, l'associazione uPAR-PDGFR è necessaria per attivare i segnali migratori e proliferativi indotti da uPA.

1.5 uPAR E "LIPID RAFTS"

I "*lipid rafts*" sono domini della membrana citoplasmatica ricchi in colesterolo, glicosfingolipidi e gangliosidi. Molecole ad ancora GPI come l'uPAR sono spesso associate a tali strutture in virtù del legame che la coda GPI può stabilire con tali componenti. Possono associarsi ai lipid rafts anche proteine transmembrana come integrine, o recettori di membrana tirosin-chinasici o recettori accoppiati a proteine G (Sahores et al., 2008).

Kiyani et al. (2009) hanno dimostrato l'importanza cruciale della localizzazione dell'uPAR nei *lipid rafts* nella sua capacità di regolare il differenziamento delle cellule della muscolatura liscia vascolare (VSMCs). L'importanza dei *lipid rafts* come "regolatori" dell'attività dell'uPAR nei fenomeni di migrazione, differenziamento e angiogenesi, è stata confermata in uno studio del 2010 da parte di Raghu e colleghi. Essi hanno dimostrato che inibendo la co-localizzazione dell'uPAR e della MMP-9 con i lipid rafts si osservava inibizione della migrazione e dell'invasione di cellule di tumore mammario.

L'interazione dell'uPAR con i *lipid rafts* è cruciale probabilmente perchè in essi si concentrano trasduttori e mediatori di segnale, come dimostra un recentissimo lavoro del 2014 (Grove et al.). In questo lavoro è stata presa in esame l'attività motoria dei fibroblasti. Il legame dell'uPAR all'ATF provoca la migrazione dei fibroblasti su fibronectina in maniera indipendente dall'attività proteasica ma dipendente dai *lipid rafts*. Il legame uPAR-ATF, infatti, porta al reclutamento dell'integrina $\alpha 5\beta 1$ che, a sua volta, attiva, nei lipid rafts, la chinasi acetilata della famiglia Src, Fyn. L'attivazione di Fyn causa, così, un aumento della motilità dei fibroblasti dipendente dai *lipid rafts* e dal pathway di segnale caveolina-Fyn-Shc.

1.6 FUNZIONI DELL'uPAR

L'uPAR è in grado di esercitare svariate attività, dipendenti e indipendenti dall'attività proteolitica dell'uPA, grazie alla sua capacità di interagire con molteplici ligandi, attivando svariate vie di segnalazione cellulare. Nel loro insieme tali attività possono essere distinte in attività proteolisi-dipendenti e proteolisi-indipendenti.

1.6.1 FUNZIONI PROTEOLISI-DIPENDENTI

➤ REGOLAZIONE DELLA PROTEOLISI DELL'ECM

L'uPAR regola la proteolisi extra-cellulare concentrando l'attività proteolitica del suo ligando, l'uPA, sulla superficie cellulare. Il legame dell'uPA e del substrato (il plasminogeno) alla membrana, infatti, amplifica l'attivazione del plasminogeno a plasmina e quindi la cascata proteolitica conseguente. In tale modo, l'uPAR conferisce alla cellula che lo esprime capacità migratorie ed invasive. La plasmina, infatti, promuove la degradazione dell'ECM sia degradando direttamente componenti dell'ECM, sia attivando varie metalloproteasi come MMP3, MMP9, MMP12 e MMP13, che, a loro volta, degradano l'ECM, creando così lo spazio necessario per la migrazione delle cellule stesse (Castellino e Ploplis, 2005) (Fig. 10). Tale attività dell'uPAR è indirettamente regolata dal PAI-1; l'uPAR, infatti, media, come già anticipato in precedenza, l'internalizzazione del complesso inattivo uPA-PAI-1 grazie all'interazione con l'LRP. L'endocitosi del complesso trimolecolare uPAR-uPA-PAI-1 porta alla degradazione dell'uPA e del suo inibitore e al riciclo dell'uPAR sulla superficie cellulare, nuovamente disponibile a legare uPA e, quindi, ad amplificare la generazione della plasmina sulla cellula; in questo modo si ha un potenziamento dell'attività proteolitica extracellulare (Blasi e Sidenius, 2009).

L'uPAR è fortemente espresso in vari tipi di tumore ed è associato a maggiore aggressività (Noh et al., 2013). La sua capacità di regolare e focalizzare la proteolisi extracellulare favorisce il processo di invasione tumorale e formazione delle metastasi.

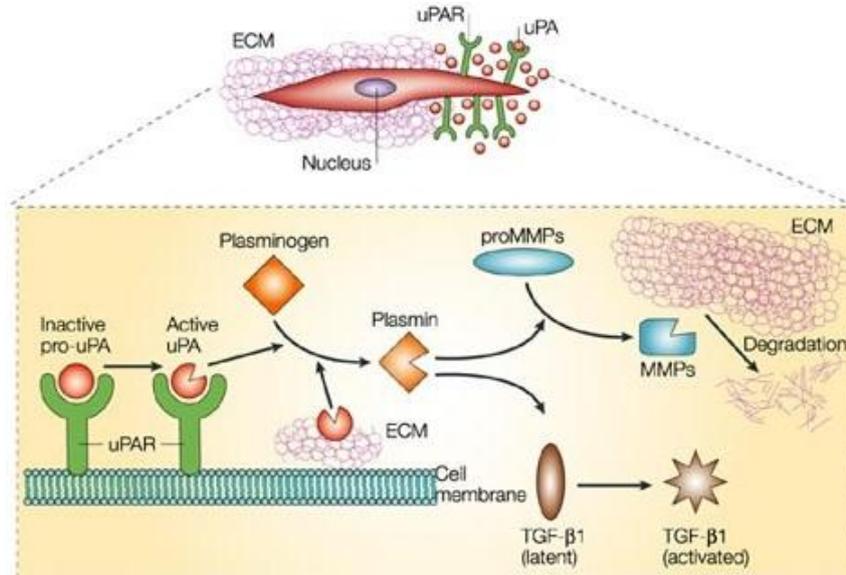


Fig. 10 Regolazione uPAR-dipendente della proteolisi pericellulare

1.6.2 FUNZIONI PROTEOLISI-INDIPENDENTI

L'uPAR presenta anche rilevanti attività indipendenti dalle funzioni proteolitiche dell'uPA. Tali attività sono legate alla sua capacità di interagire con altri ligandi extracellulari o di membrana e di attivare, così, vie di segnalazione all'interno della cellula. E' stato, infatti, ampiamente dimostrato che l'uPAR attiva diverse vie di segnalazione che confluiscono nell'attivazione delle MAP-chinasi di tipo ERK, che regolano la trascrizione di numerosi geni. E' infatti coinvolto nelle vie attivate da FAK, che mediano la segnalazione intracellulare attivata da integrine; promuove l'attivazione della proteina Src, mediatore di segnale importante nel controllo della proliferazione cellulare, e di proteine della famiglia Rho, piccole GTPasi che regolano le componenti del citoscheletro, influenzando forma, motilità, adesione e proliferazione cellulare.

➤ REGOLAZIONE DELL'ADESIONE CELLULARE

L'uPAR può regolare l'adesione cellulare all'ECM grazie al suo legame con la VN e all'interazione con le integrine. La regolazione dell'adesione cellulare alla VN da parte dell'uPAR è stata dimostrata in una varietà di cellule, inclusi monociti, fibroblasti, cellule epiteliali e cellule della muscolatura liscia (Blasi e Carmeliet, 2002). Cellule che iperesprimono uPAR presentano un'elevata capacità

di aderire alla VN, adesione mediata unicamente dall'uPAR e non dalle integrine. Le integrine, tuttavia, sono necessarie affinché l'uPAR possa attivare i segnali intracellulari pro-adesivi. L'uPAR infatti, che è ancorato alla cellula tramite la coda GPI, è privo di regione transmembrana e citosolica. L'uPAR, quindi, da una parte lega la VN all'ECM, dall'altra si associa a integrine sulla superficie cellulare che, in seguito a tale associazione, trasmettono i segnali pro-adesivi necessari alla cellula. L'interazione fra uPAR di superficie e VN presente nell'ECM, infatti, induce con grande efficienza riarrangiamenti citoscheletrici attraverso un meccanismo Rac-dipendente (Degryse et al., 2001). Esperimenti di FRET e immunoprecipitazione hanno dimostrato che l'uPAR è associato alle integrine $\beta 1$ sulla superficie di svariati tipi di cellule, in particolare a livello delle adesioni focali (Xue et al., 1997). L'interazione fra uPAR e integrina $\beta 1$ sembra coinvolgere anche la proteina di membrana caveolina. Diminuendo, infatti, i livelli di espressione della caveolina, viene inibita l'adesione delle cellule HEK-293 iperesprimenti uPAR alla VN. Si pensa che la caveolina giochi un ruolo importante in quanto potrebbe partecipare all'attivazione del segnale per l'adesione mediato da Src-chinasi (Wei et al., 1999). D'altro canto, l'uPAR, oltre ad "usare" le integrine per attivare i segnali pro-adesivi alla VN, ne modula anche l'attivazione; l'uPAR, ad esempio, stimola l'attivazione dell'integrine $\alpha 5\beta 1$ promuovendo l'adesione di cellule epiteliali Hep-3 all'FN e la sua organizzazione in fibrille (Aguirre-Ghiso et al., 2003).

➤ REGOLAZIONE DELLA MIGRAZIONE CELLULARE

Per molti anni si è ritenuto che l'uPA fosse coinvolta nella migrazione cellulare grazie alla sua capacità di promuovere la degradazione localizzata dell'ECM. Tuttavia, nel 1988 (Fibbi et al.) fu riportato, per la prima volta, che l'uPA induceva migrazione direzionale di cellule endoteliali, ovvero attivava direttamente segnali migratori all'interno della cellula. Successivamente è stato ampiamente dimostrato che il legame dell'uPA all'uPAR è condizione necessaria affinché si verifichi la migrazione cellulare e che non è richiesto che l'uPA sia attiva; infatti, anche il frammento privo del dominio catalitico dell'uPA, l'ATF, induce migrazione. Il legame dell'uPA all'uPAR, quindi, permette la trasmissione del segnale attraverso la membrana cellulare, inducendone la migrazione. Il legame dell'uPA o dell'ATF all'uPAR provoca l'attivazione di una varietà di mediatori di segnale che include membri della famiglia src, ERK-1/2, FAK, JAK, STAT1, e, infine, piccole GTPasi come Rac e Rho. Inibendo, infatti, questi mediatori, si inibiscono gli effetti migratori uPA/uPAR-dipendenti (Sidenius e Blasi, 2003). Anche in questo caso le integrine sono partners di segnale per l'uPAR. La migrazione cellulare verso uPA, inoltre, richiede l'espressione di recettori per fMLF (fMLF-Rs) (Resnati et al., 2002). È interessante notare che, viceversa, anche la migrazione verso fMLF richiede l'espressione di uPAR. Infatti, cellule HEK-293 prive di uPAR non sono in grado di migrare verso fMLF, pur esprimendone i recettori, mentre acquistano tale capacità se trasfettate con uPAR (Montuori et al., 2002).

fMLF è un peptide formilato di origine batterica, potente chemioattrattante; esso fa parte della categoria dei PAMPs (pattern molecolari associati ai patogeni), la cui funzione è quella di riconoscere agenti patogeni, come i batteri, dell'immunità innata (Giebeler et al.; 2014). Gli fMLF-Rs sono stati inizialmente identificati nei leucociti e, successivamente, in numerosi altri tipi di cellule, incluse le cellule epiteliali (Le et al., 2002). Attualmente sono stati identificati tre recettori per fMLF: il recettore ad alta affinità FPR (FPR1); il recettore a bassa affinità FPRL1 (FPR2); il recettore FPRL2 (FPR3), omologo agli altri due ma incapace di legare fMLF (Ragno P., 2006). Una prima connessione fra il sistema uPA-uPAR e gli fMLF-Rs fu dimostrata nel 2002, documentando il legame tra la forma solubile e tronca di uPAR (DII-DIII suPAR) con esposta la sequenza SRSRY e FPR2 nei monociti, legame che attivava FPR2 inducendo la migrazione (Fig. 11) (Resnati et al., 2002). Successivamente è stato riportato che tale forma di suPAR è in grado di legare e attivare anche gli altri due recettori per fMLF. Infatti, DII-DIII suPAR induce la migrazione dei basofili attivando sia FPR2 che FPR3 e attivando FPR1 espresso sulla migrazione di cellule staminali ematopoietiche e di cellule epiteliali HEK293. DII-DIII suPAR, quindi, può essere considerato un ligando dei recettori per fMLF, mentre è incapace di legare gli altri ligandi extracellulari dell'uPAR, uPA e VN a differenza della forma intera e solubile, che è in grado di interagire con integrine e VN, ma non lega i recettori per fMLF, probabilmente perchè il sito di legame è mascherato dal D1 (Ragno P., 2006).

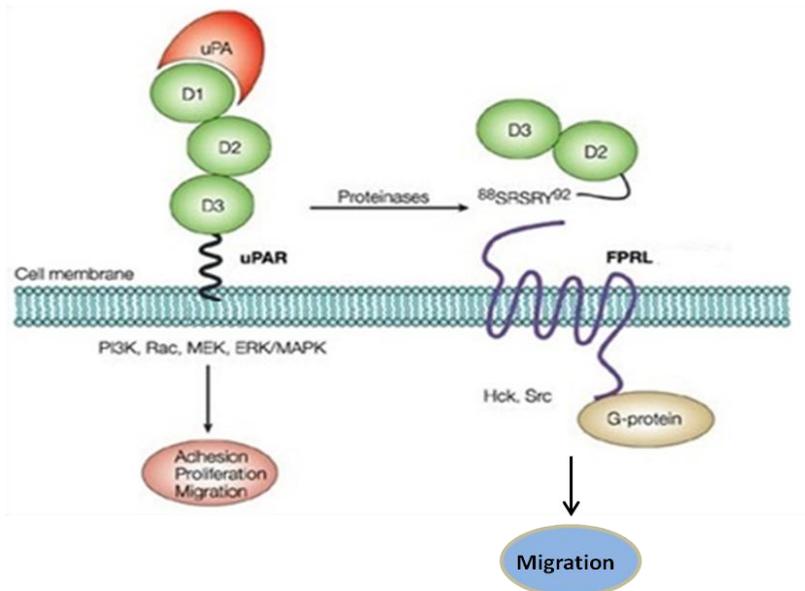


Fig. 11 La forma tronca e solubile dell'uPAR è ligando dei recettori per fMLF (fMLF-Rs)

➤ REGOLAZIONE DELLA PROLIFERAZIONE CELLULARE E DELL'APOPTOSI

L'uPAR, stimolato dall'uPA, può attivare anche segnali di proliferazione cellulare e protezione dall'apoptosi (Alfano et al., 2005).

Il primo lavoro che ha suggerito che la proliferazione cellulare potesse essere stimolata dall'uPAR risale al 1989 (Kirchheimer et al.). Fu dimostrato, infatti, che in cellule di melanoma umano, l'inibizione con specifici anticorpi del legame uPA-uPAR provocava un decremento della proliferazione. Risultati analoghi furono ottenuti in cellule umane del tumore alle ovaie (Fischer et al., 1998) e molti altri lavori si sono susseguiti negli anni a sostegno di questa funzione dell'uPAR. Maggiori informazioni molecolari sugli effetti esercitati dall'uPAR sulla crescita cellulare sono stati forniti da uno studio effettuato sulle cellule di carcinoma umano HEp-3 impiantate nella membrana corio-allantoidea (CAM) modificata di pollo. Cloni di cellule HEp-3 rese uPAR-negative mostravano un'inalterata proliferazione in coltura ma, se inoculate nella CAM, entravano in uno stato di dormienza che garantiva loro solo la sopravvivenza ma non la proliferazione (Yu et al., 1997). Numerose evidenze hanno dimostrato, inoltre, la relazione fra uPAR e apoptosi. Un esempio è fornito da cellule di fibrosarcoma impiantate in topi uPA-/- che mostravano una ridotta proliferazione ed un'aumentata apoptosi, suggerendo che alterazioni nell'espressione di queste componenti sono in grado di alterare l'equilibrio fra crescita e morte cellulare (Gutierrez et al., 2000). L'attività anti-apoptotica dell'uPAR potrebbe essere dovuta alla sua abilità di attivare le vie di segnale dipendenti da Ras-ERK in diversi tipi cellulari. In cellule di glioma, anticorpi in grado di bloccare il legame uPA-uPAR riducono i livelli di fosforilazione di ERK portando ad un aumento dell'apoptosi (Ma et al., 2001).

Le proteine appartenenti alla famiglia Bcl-2 hanno un ruolo fondamentale nel controllo dell'apoptosi e della crescita cellulare; molti lavori riportano una correlazione fra proteine della famiglia Bcl-2 e uPAR. L'espressione di Bcl-2 incrementa l'espressione di uPAR attraverso il fattore di trascrizione Sp-1 e un meccanismo regolatorio ERK-dipendente (Triscioglio et al., 2004).

In conclusione, il sistema uPA/uPAR è in grado di regolare adesione, migrazione, proliferazione e sopravvivenza cellulare, eventi cruciali nella crescita e nella progressione del tumore (Fig. 12). Poiché l'uPAR è fortemente espresso in numerosi tumori, incluse le neoplasie del compartimento ematologico, ed è considerato fattore prognostico negativo, questi presupposti ci hanno spinto a cercare di comprendere meccanismi molecolari che regolano l'attività di questo recettore per poter identificare strumenti specifici in grado di inattivare le sue funzioni pro-tumorali.

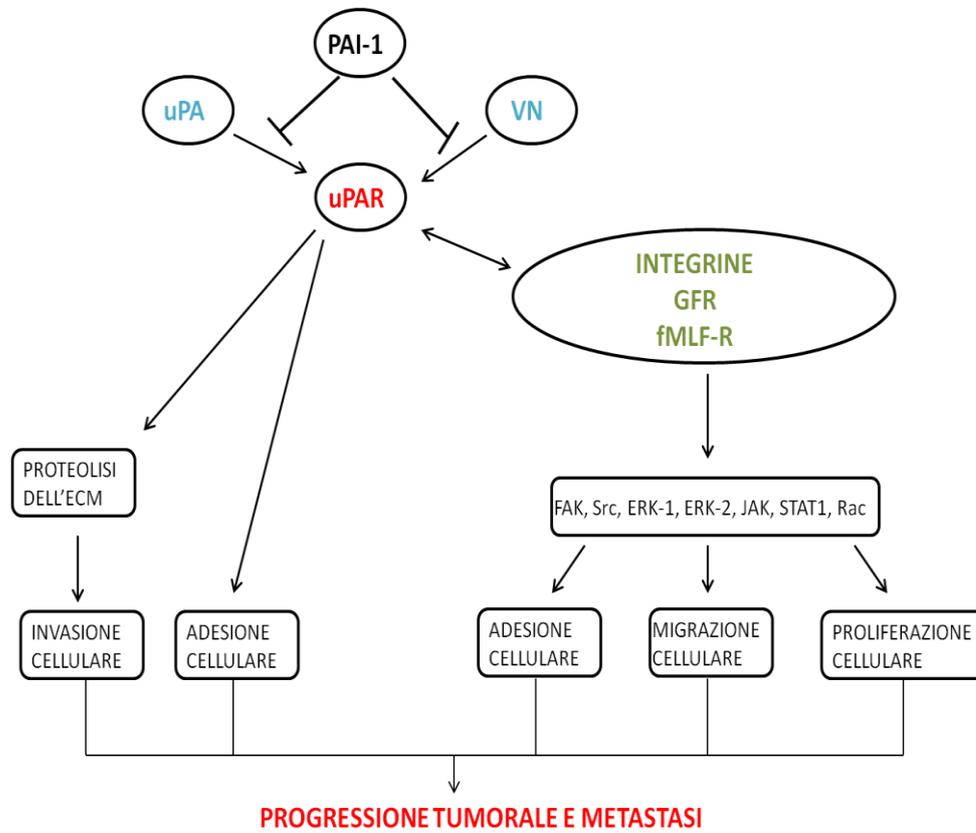


Fig.12 Ruolo dell'uPAR nella progressione tumorale e nella formazione delle metastasi

CAPITOLO 2

L'uPAR NELLA MIGRAZIONE CELLULARE. RUOLO DI fMLF-Rs E INTEGRINE

2.1 INTRODUZIONE

L'uPAR è in grado di attivare numerose vie di segnale all'interno della cellula, pur essendo un recettore ad ancora GPI, quindi privo di regione transmembrana e citosolica. E' per tale ragione che l'uPAR necessita di partners che facciano da tramite tra l'esterno della cellula, dove esso risiede e raccoglie il segnale, e l'interno della cellula, dove il segnale deve essere trasdotto. Ad oggi, si ritiene che il principale, anche se non l'unico, partner di segnale, siano le integrine. Numerose evidenze hanno suggerito, nel tempo, che un altro possibile partner potessero essere gli fMLF-Rs, ma la loro associazione all'uPAR di membrana non è mai stata esplorata in dettaglio. In passato, infatti, è stato dimostrato che la forma tronca e solubile di uPAR contenente la sequenza SRSRY (aa 88-92) all'estremità N-terminale, è un ligando di fMLF-Rs (Resnati et al., 2002). Tale sequenza è mascherata nel suPAR dal dominio DI, quindi viene esposta solo in seguito alla sua rimozione, ma risulta esposta nell'uPAR di membrana intero (Hoyer-Hansen et al., 1997). Recentemente è stato dimostrato che l'uPAR di membrana regola l'attività di CXCR4, il recettore della chemochina SDF-1 (stromal derived factor 1), attraverso un meccanismo che coinvolge sia le integrine che i recettori per fMLF (Montuori et al., 2011). In realtà, l'uPAR, sulla superficie cellulare, è in grado di interagire con un elevato numero di molecole, tuttavia un legame diretto dell'uPAR solubile purificato è stato dimostrato solo con integrine e fMLF-Rs. Ci siamo, quindi, chiesti innanzitutto se l'uPAR di membrana, anche nella sua forma intera, potesse rappresentare un ligando endogeno di fMLF-Rs, come la forma tronca e solubile, e se gli fMLF-Rs potessero partecipare, insieme alle integrine, ad un macchinario di segnalazione diretto dall'uPAR, in grado di regolare la migrazione cellulare in generale, indotta da qualsiasi chemioattrattante.

2.2 RISULTATI

2.2.1 uPAR E FPR1 CO-LOCALIZZANO SULLA SUPERFICIE DELLE CELLULE HEK-293 TRANSFETTATE CON uPAR

In base ai presupposti sopra citati, abbiamo, per prima cosa, esaminato se l'uPAR di membrana e i recettori per fMLF co-localizzano sulla superficie cellulare. A tal fine abbiamo utilizzato cellule uPAR-negative HEK-293, stabilmente trasfettate con cDNA di uPAR intero (cellule uPAR-293). Poichè le cellule HEK-293 esprimono prevalentemente FPR1, abbiamo focalizzato i nostri studi sull'associazione fra FPR1 e uPAR. Le cellule uPAR-293 sono state trasfettate transientemente con cDNA di FPR1, al fine di rafforzarne l'espressione, e l'associazione fra uPAR e FPR1 è stata analizzata attraverso microscopia confocale con anticorpi specifici per uPAR e FPR1. L'analisi ha mostrato la presenza di entrambi i recettori sulla superficie della cellula e la loro co-localizzazione (Fig. 13A, Basal). È stata effettuata l'analisi quantitativa dei segnali normalizzando i pixel corrispondenti alla co-localizzazione uPAR-FPR1 (gialli) sui pixel totali rappresentati l'uPAR (verdi) o sui pixel totali rappresentanti FPR1 (rossi) (Fig. 13C). L'analisi quantitativa ha dimostrato che, in condizioni basali, circa il 44% dell'uPAR presente co-localizza con FPR1 e che circa il 41% di FPR1 co-localizza con l'uPAR sulla superficie delle cellule trasfettate.

Al fine di capire se stimoli esterni fossero in grado di aumentare la co-localizzazione uPAR-FPR1, le cellule uPAR-293 sono state poste in assenza di siero (-FBS) per 24 ore e, successivamente, incubate per un'ora con mezzo contenente il 10% di siero (+FBS) oppure con mezzo contenente un ligando dei recettori per fMLF, il peptide WKYMV (+W Pep) (Fig. 13A). Come si evince dalle immagini, in assenza di siero la co-localizzazione fra uPAR e FPR1 ha valori leggermente inferiori a quelli ottenuti in condizioni basali, tuttavia, in seguito a stimolazione con siero o con Peptide W, la loro co-localizzazione aumenta significativamente, al 69% e 61% per l'uPAR e al 64% e 76% per FPR1 (Fig. 13C).

Abbiamo, poi, esaminato nelle stesse cellule l'associazione di uPAR alle integrine $\beta 1$, per poter comparare i valori ottenuti per uPAR-FPR1 con i valori di co-localizzazione uPAR-integrine $\beta 1$, e, quindi, per poter ipotizzare o meno una loro reale rilevanza. I risultati ottenuti mostrano che, in condizioni basali, circa il 55% dell'uPAR co-localizza con le integrine $\beta 1$ e il 51% delle integrine $\beta 1$ co-localizza con uPAR sulla superficie delle cellule. Anche in questo caso, tale co-localizzazione aumenta significativamente in seguito a stimolazione con siero o con Peptide W raggiungendo il 70% e l'81% per l'uPAR ed il 70% e 71% per le integrine (Fig. 13B e 13C).

La rappresentazione grafica dell'analisi quantitativa (Fig. 13C), mette bene in evidenza che il grado di co-localizzazione fra uPAR e FPR1 è piuttosto simile a quello fra uPAR e integrine $\beta 1$, sia in condizioni basali, sia in seguito a stimolazione, suggerendo la possibilità che tale associazione possa avere una rilevanza funzionale paragonabile a quella uPAR-integrine.

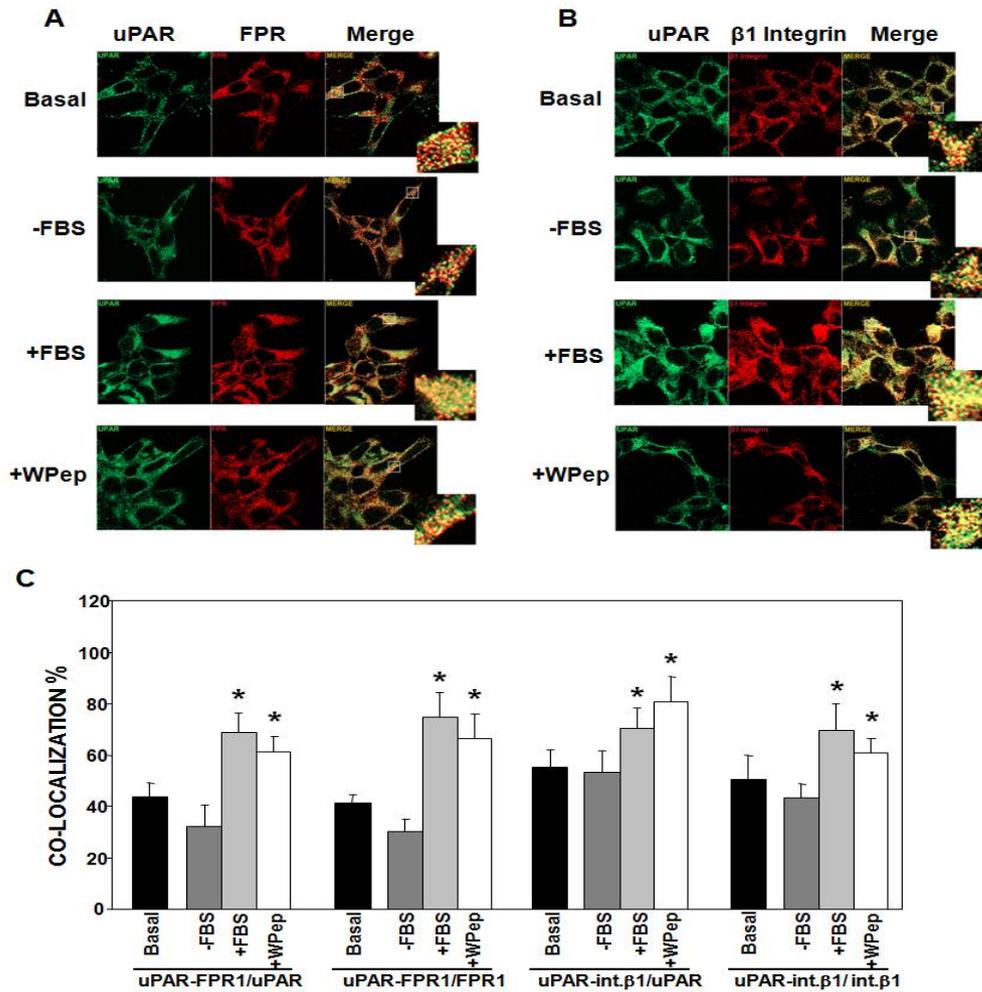


Fig. 13 L'uPAR co-localizza con FPR1 ed Integrine $\beta 1$ sulla superficie di cellule uPAR-293. Cellule HEK-293 transfettate con cDNA di uPAR (uPAR-293) sono state transientemente transfettate con cDNA di FPR1. Dopo 24 h, le cellule sono state incubate per altre 24 h in 10% siero (Basal) o in mezzo di coltura privo di siero (-FBS) e stimulate per 1 h a 37°C con 10% siero (+FBS) o con 5 nM peptide WKYMVm (+W Pep). Le cellule sono state poi fissate e incubate con anticorpo monoclonale anti-uPAR e anticorpo policlonale anti-FPR1 (A) o con anticorpo monoclonale anti-uPAR e anticorpo policlonale anti- $\beta 1$ (B) e successivamente con anticorpi secondari coniugati con Cy3 o Alexa 488 e analizzate attraverso microscopia confocale. (C) Rappresentazione grafica dell'analisi quantitativa delle co-localizzazioni uPAR/FPR1 e uPAR/integrine $\beta 1$. Il numero dei pixel gialli, corrispondenti alla co-localizzazione uPAR/FPR1 (A) o uPAR/Integrine $\beta 1$ (B) è stato normalizzato sui pixel verdi (uPAR) o sui pixel rossi (FPR1 in A e integrine $\beta 1$ in B); l'analisi è stata effettuata su 50 cellule/campione. (*): $p \leq 0.05$ determinata mediante il t-test di Student.

2.2.2 L'uPAR RECLUTA FPR1 E INTEGRINE SULLA SUPERFICIE CELLULARE

Avendo dimostrato che l'uPAR co-localizza con FPR1, così come con le integrine $\beta 1$, abbiamo indagato se l'uPAR si associasse alle due molecole contemporaneamente, ovvero se fosse in grado di promuovere l'aggregazione fra integrine e fMLF-Rs sulla superficie della cellula. A tal fine, abbiamo utilizzato ancora un saggio di immunofluorescenza ma con un differente approccio. Le cellule HEK-293 sono state trasfettate con cDNA di uPAR inserito in un vettore GFP. In questo modo è stato possibile valutare non solo la co-localizzazione uPAR/FPR1 endogeno e uPAR/integrine $\beta 1$ endogene, ma anche e soprattutto la co-localizzazione fra FPR1 e integrine $\beta 1$. Tali esperimenti hanno, innanzitutto, confermato i dati precedenti, ossia che vi è co-localizzazione uPAR/FPR1 ed uPAR/integrine $\beta 1$ e che tale co-localizzazione aumenta in maniera significativa dopo stimolazione con siero o con Pep W (Fig. 14A e 14B).

E' stata, quindi, valutata la co-localizzazione FPR1/integrine $\beta 1$, evidenziando che già in condizioni basali il 77% di FPR1 co-localizza con le integrine $\beta 1$ e circa il 42% delle integrine $\beta 1$ co-localizza con FPR1; anche in questo caso, i valori aumentano significativamente in seguito a stimolazione con siero o con Pep W (fig.14A e 14B).

Abbiamo, infine, esaminato la co-localizzazione FPR1/Integrine $\beta 1$ in assenza di uPAR, ovvero in cellule HEK-293 transfettate col vettore GFP vuoto. In questo caso la co-localizzazione FPR1/Integrine $\beta 1$ si mantiene intorno al 30% e non subisce variazioni in seguito a stimolazione col siero o col Pep W (Fig. 15A e Fig. 15B), indicando che l'elevata percentuale di associazione FPR1/Integrine $\beta 1$ osservata precedentemente è legata esclusivamente all'espressione di uPAR.

I risultati ottenuti suggeriscono quindi che l'uPAR possa reclutare FPR1 e integrine $\beta 1$ sulla superficie cellulare promuovendo il loro avvicinamento, evento che potrebbe avere implicazioni funzionali.

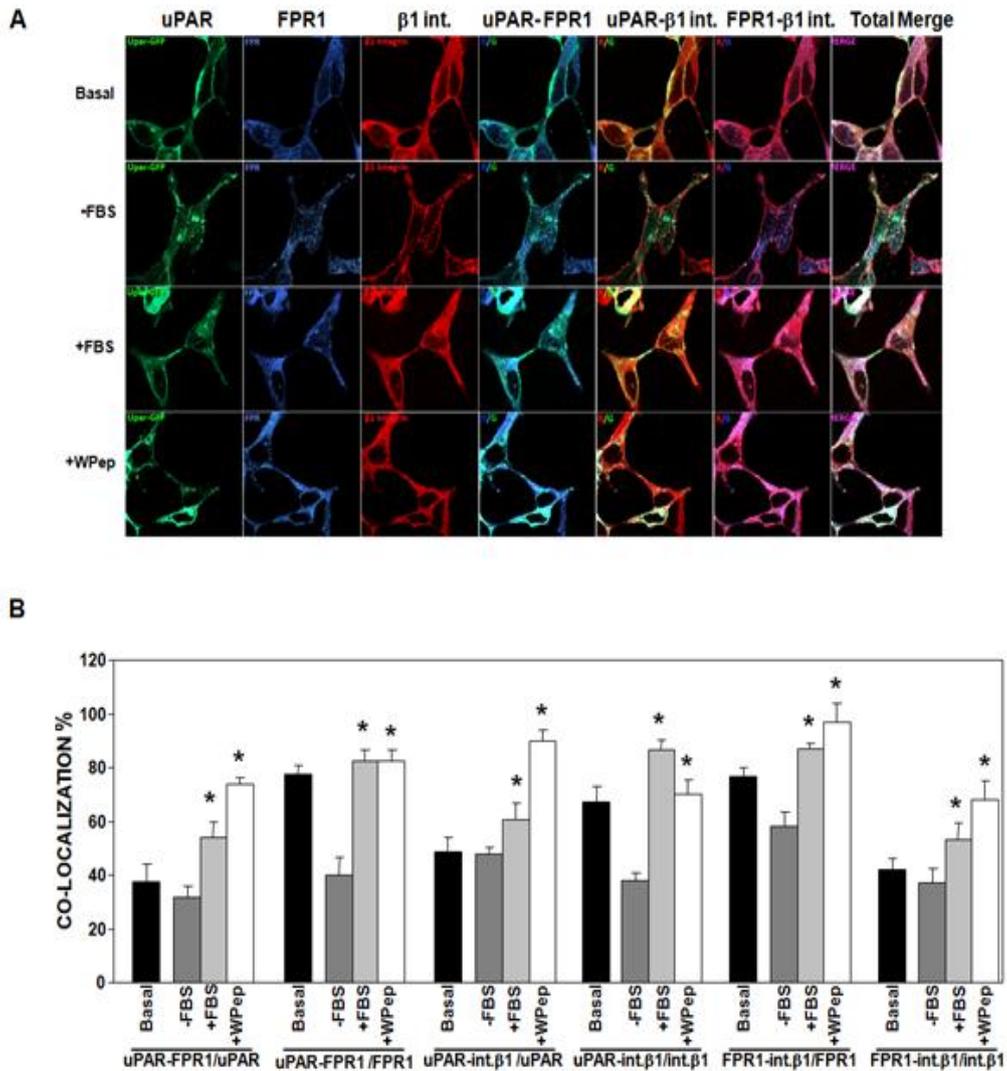


Fig. 14 L'uPAR recluta FPR1 e Integrine $\beta 1$ sulla superficie della cellula. **A)** Cellule HEK-293 sono state transientemente trasfettate con cDNA di EGFP-uPAR. Dopo 24 h, le cellule sono state incubate per altre 24 h in 10% siero (Basal) o in mezzo di coltura privo di siero (-FBS) e stimolate per 1 h a 37°C con 10% siero (+FBS) o con 5 nM peptide WKYMVm (+W Pep). Le cellule sono state poi fissate e incubate con anticorpo policlonale anti-FPR1 e anticorpo monoclonale anti- $\beta 1$, e successivamente con anticorpi secondari coniugati con Cy3 o Alexa 488, e analizzate attraverso microscopia confocale. **B)** Il numero dei pixel corrispondenti ad ogni co-localizzazione è stato normalizzato sui pixel verdi (uPAR) o sui pixel blu (FPR1) sui pixel rossi (integrine $\beta 1$). L'analisi è stata effettuata su 50 cellule/campione. (*): $p \leq 0.05$ determinata mediante il t-test di Student.

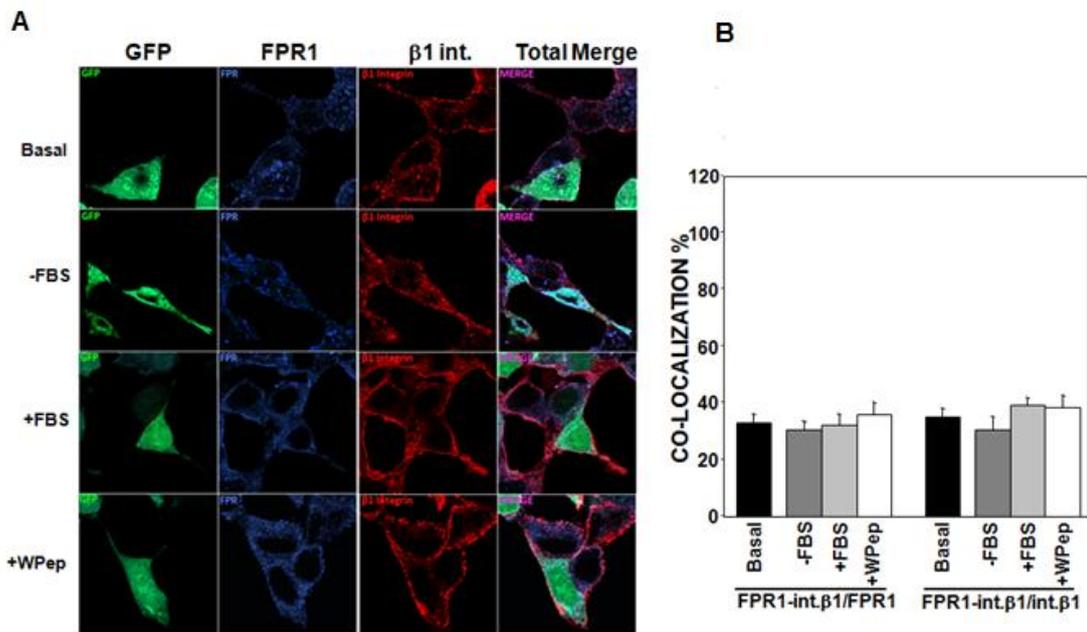


Fig. 15 FPR1 e Integrine $\beta 1$ non co-localizzano in cellule uPAR-negative. **A)** Cellule HEK-293 sono state transientemente trasfettate con cDNA del vettore vuoto pEGFP-N1. Dopo 24 h, le cellule sono state incubate per altre 24 h in 10% siero (Basal) o in mezzo di coltura privo di siero (-FBS) e stimolate per 1 h a 37°C con 10% siero (+FBS) o con 5 nM peptide WKYMVm (+W Pep). Le cellule sono state poi fissate e incubate con anticorpo policlonale anti-FPR1 e anticorpo monoclonale anti- $\beta 1$ e successivamente con anticorpi secondari coniugati con Cy3 o Alexa 488, e analizzati attraverso microscopia confocale. **B)** Rappresentazione grafica dell'analisi quantitativa della co-localizzazione FPR1/integrine $\beta 1$. Il numero dei pixel corrispondenti alla co-localizzazione FPR1/integrine $\beta 1$ è stata normalizzata sui pixel blu (FPR1) o sui pixel rossi (integrine $\beta 1$); l'analisi è stata effettuata su 50 cellule/campione. (*): $p \leq 0.05$ determinata mediante il t-test di Student.

2.2.3 L'uPAR CO-IMMUNOPRECIPITA CON fMLF-Rs

Avendo dimostrato la co-localizzazione dell'uPAR con FPR1 mediante i saggi di immunofluorescenza, abbiamo valutato la possibile associazione fisica di uPAR a fMLF-Rs sulla superficie cellulare mediante saggi di co-immunoprecipitazione.

Le cellule uPAR-293 o le cellule controllo V-293 (trasfettate stabilmente con il vettore vuoto) sono state transientemente trasfettate col cDNA di FPR1 per aumentarne l'espressione che risulta simile nei due tipi cellulari (Fig. 16A). Successivamente le cellule sono state lisate e immunoprecipitate con un anticorpo specifico per FPR1 oppure con Immunoglobuline (Ig) non immuni, come controllo. Gli immunoprecipitati sono stati, poi, analizzati per Western blot con anticorpo specifico per uPAR. L'analisi ha mostrato che FPR1 e uPAR co-immunoprecipitano nelle cellule uPAR-293; la banda corrispondente all'uPAR è specifica in quanto non appare nè nel campione immunoprecipitato con Ig non immuni, nè nelle cellule uPAR-negative V-293 (Fig. 16B). Per verificare che la co-

immunoprecipitazione non sia dovuta all'iper-espressione di FPR1 sono stati effettuati esperimenti di co-immunoprecipitazione anche con cellule uPAR-293 non trasfettate con FPR1, dimostrando che l'uPAR co-immunoprecipita anche solo con l'FPR1 endogeno (Fig. 16C).

Al fine di investigare se l'uPAR si associa anche agli altri due tipi di fMLF-Rs, le cellule uPAR-293 sono state transientemente trasfettate con cDNA di FPR2 e FPR3. Le HEK-293, infatti, risultavano negative per FPR2 e debolmente positive per FPR3. I lisati sono stati immunoprecipitati con anticorpi specifici anti-FPR2 ed anti-FPR3 e gli immunoprecipitati analizzati per Western blot con anticorpi anti-uPAR. Tale analisi ha mostrato che, anche in questo caso, l'uPAR co-immunoprecipita ed è quindi associato ad FPR2 e ad FPR3 (Fig. 17A e 17B).

I risultati ottenuti hanno, quindi, dimostrato che l'uPAR si associa con tutti e tre i recettori per fMLF. Poichè studi precedenti hanno già dimostrato l'associazione fra uPAR e integrine $\beta 1$ (Thang e Wei, 2008), tali risultati supportano l'ipotesi suggerita precedentemente, ovvero che l'uPAR potesse essere un "ponte" fra integrine $\beta 1$ e FPR1 sulla superficie cellulare formando, così, un complesso trimolecolare, la cui funzione potrebbe essere quella di trasdurre segnale uPAR-dipendente all'interno della cellula, controllando processi fondamentali per la cellula come la migrazione.

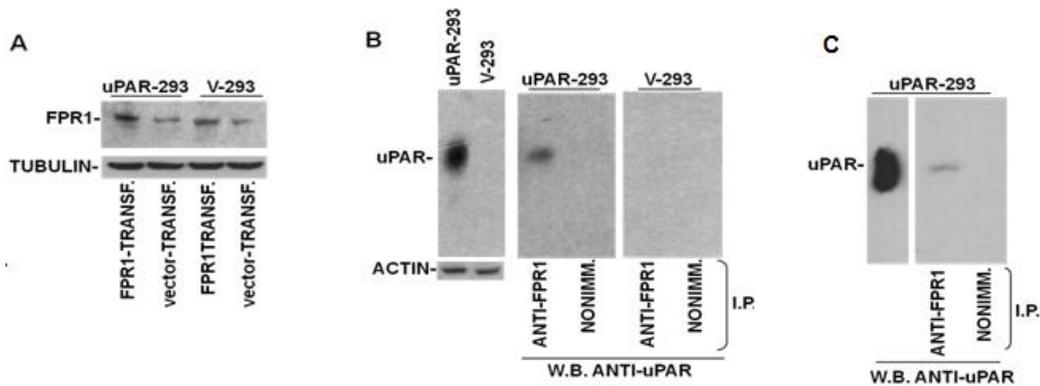


Fig. 16 L'uPAR co-immunoprecipita con FPR1. **A)** I lisati di cellule uPAR-293 o V-293, transientemente trasfettate con cDNA di FPR1 o con vettore vuoto, sono stati analizzati per Western blot con un anticorpo anti-FPR1. **B)** I lisati trasfettati con FPR1 sono stati analizzati per Western blot con anticorpo anti-uPAR o immunoprecipitati con anticorpo policlonale anti-FPR1 o con immunoglobuline non immuni di controllo. Gli immunoprecipitati sono stati analizzati per Western blot con anticorpo monoclonale anti-uPAR. **C)** I lisati di cellule uPAR-293, sono stati analizzati per Western blot con un anticorpo monoclonale specifico per uPAR o immunoprecipitati con anticorpi policlonali anti-FPR1 o con immunoglobuline non immuni di controllo e analizzati per Western blot con anticorpo monoclonale anti-uPAR.

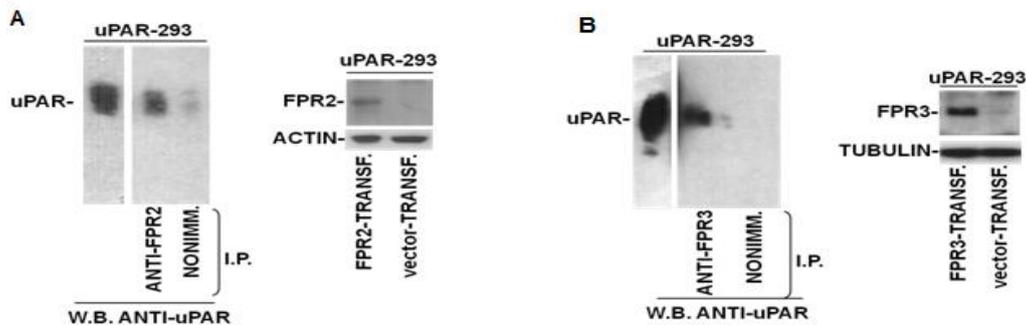


Fig. 17 L'uPAR co-immunoprecipita con FPR2 e FPR3. **A)** I lisati di cellule uPAR-293, transientemente trasfettati con cDNA di FPR2, sono stati analizzati per Western blot con un anticorpo monoclonale specifico per uPAR o immunoprecipitati con anticorpo monoclonale anti-FPR2 o con immunoglobuline non immuni di controllo e analizzati per Western blot con anticorpo policlonale anti-uPAR (pannello di sinistra). I lisati di cellule uPAR-293 trasfettate con FPR2 o col vettore vuoto di controllo sono stati analizzati per Western blot con un anticorpo monoclonale specifico per FPR2 al fine di valutarne l'espressione (pannello di destra). **B)** I lisati di cellule uPAR-293, transientemente trasfettati con cDNA di FPR3, sono stati analizzati per Western blot con un anticorpo monoclonale specifico per uPAR o immunoprecipitati con anticorpo policlonale anti-FPR3 o con immunoglobuline non immuni di controllo e analizzati per Western blot con anticorpo monoclonale anti-uPAR (pannello di sinistra). I lisati di cellule uPAR-293 trasfettate con FPR3 o col vettore vuoto di controllo sono stati analizzati per Western blot con un anticorpo policlonale specifico per FPR3 al fine di valutarne l'espressione (pannello di destra).

2.2.4 L'ESPRESSIONE DELL'uPAR CONTROLLA LA MIGRAZIONE CELLULARE VERSO SIERO

Dimostrata l'associazione di uPAR a FPR1 e integrine β 1, abbiamo provato ad analizzarne il significato funzionale nell'ambito della migrazione cellulare.

E' stato precedentemente dimostrato che l'espressione di uPAR di membrana, in cellule HEK-293, è necessaria per la migrazione cellulare verso fMLF e che, al contempo, la migrazione verso uPA richiede, oltre l'uPAR, l'espressione dei recettori per fMLF (Montuori e Ragno, 2009). L'uPAR, inoltre, è necessario per la migrazione verso PDGF (Kiyani et al., 2005) e verso la chemochina SDF-1 su specifici substrati, e influenza l'attività dell'EGFR (Montuori et al., 2005). Abbiamo quindi ipotizzato che l'uPAR possa influire sulla migrazione cellulare indipendentemente dal tipo di chemioattrattante e grazie alla sua capacità di associarsi a due efficienti trasduttori di segnale come fMLF-Rs e integrine.

Per esplorare questa ipotesi, abbiamo effettuato saggi di migrazione cellulare verso siero, che si può considerare una miscela generica di chemioattrattanti. Abbiamo utilizzato cellule uPAR-293 e V-293, come controllo. I saggi di migrazione sono stati effettuati in camere di Boyden, utilizzando filtri ricoperti di collagene (CG), componente della matrice extracellulare che non ha alcun tipo di legame con l'uPAR e quindi non può interferire con un suo possibile ruolo nella migrazione. Le cellule uPAR-293 o V-293 sono state poste a migrare verso siero in presenza di anticorpi policlonali diretti contro la molecola intera di uPAR o contro la regione corrispondente ai residui aminoacidici 84-95, che comprendono i residui responsabili dell' interazione dell'uPAR tronco solubile con i recettori per fMLF (Resnati et al., 2002), oppure in presenza di immunoglobuline non immuni di controllo. Dagli esperimenti effettuati si evince che sia le cellule uPAR-293 che V-293 migrano efficientemente verso siero e che ambedue gli anticorpi anti-uPAR non hanno alcun effetto sulla migrazione basale (in assenza di siero). Tuttavia, ambedue gli anticorpi anti-uPAR inibiscono totalmente la migrazione verso siero delle cellule uPAR-293 senza alterare quella delle V-293 (Fig. 18A e 18B), suggerendo che le interazioni che l'uPAR può stabilire con molecole della superficie cellulare, e che possono essere neutralizzate dall'uso degli anticorpi anti-uPAR, sono cruciali nella migrazione di cellule esperimenti uPAR.

Questi risultati preliminari indicano chiaramente che le cellule HEK293 migrano indipendentemente dall'espressione di uPAR ma, se l'uPAR è espresso, la migrazione diventa totalmente uPAR-dipendente.

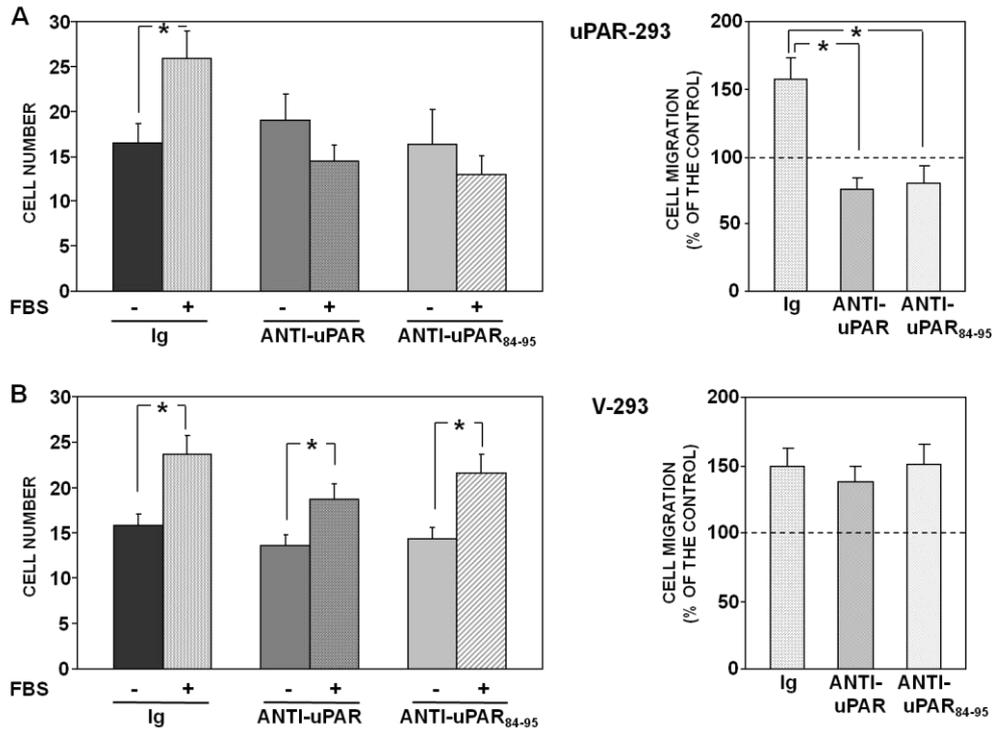


Fig. 18 L'uPAR controlla la migrazione delle cellule verso siero. **A)** Cellule uPAR-293 o **B)** V-293 sono state incubate con immunoglobuline non-immuni di controllo, anticorpo policlonale anti-uPAR o anticorpo policlonale anti-uPAR₈₄₋₉₅, poste in camere di Boyden e fatte migrare verso siero 10%FBS. Le cellule che hanno migrato sono state fissate, colorate in ematossilina e contate (pannelli a sinistra). I risultati sono stati espressi anche come percentuale delle cellule che hanno migrato verso siero rispetto a quelle che hanno migrato in assenza di siero (pannelli a destra). Il 100% rappresenta la migrazione in assenza di chemioattrattante. I valori rappresentano la media di tre esperimenti effettuati in triplicato. (*): $p \leq 0.05$ determinata mediante il t-test di Student.

2.2.5 fMLF-Rs E INTEGRINE $\beta 1$ CONTRIBUISCONO ALL'ATTIVITA' DI CONTROLLO ESERCITATA DALL'uPAR SULLA MIGRAZIONE CELLULARE

Abbiamo, quindi, analizzato il ruolo che le interazioni dell'uPAR con fMLF-Rs e integrine possano avere nell'attività di controllo che l'uPAR esercita sulla migrazione cellulare.

A tale scopo abbiamo effettuato saggi di migrazione verso siero con cellule uPAR-293 e V-293, desensibilizzando o meno i recettori per fMLF attraverso un pre-trattamento con il loro ligando, il peptide W. I risultati hanno mostrato che la desensibilizzazione dei recettori per fMLF non ha alcun effetto sulla migrazione basale, sia per quanto riguarda le cellule uPAR-293 che V-293, tuttavia essa inibisce totalmente la migrazione verso siero

delle cellule uPAR-293, senza influenzare in alcun modo quella delle V-293 (Fig. 19A e 19B).

Abbiamo, poi, effettuato altri saggi di migrazione per valutare il ruolo anche dell'interazione uPAR/Integrine $\beta 1$ nella migrazione controllata da uPAR. Sono stati effettuati saggi di migrazione con cellule uPAR-293 e V-293 in presenza ed in assenza del peptide P-25, un peptide in grado di distruggere le interazioni uPAR-integrine $\beta 1$ (Wei et al., 1996). Il trattamento delle cellule uPAR-293 con il peptide P-25 inibisce la loro migrazione verso siero, mentre non sortisce alcun effetto, nelle medesime condizioni, sulla migrazione delle cellule V-293 (Fig. 19C e 19D). Anche in questo caso, la migrazione basale di entrambi i tipi di cellule non subisce variazioni in presenza o in assenza del peptide.

Tali risultati indicano, quindi, che il controllo della migrazione cellulare da parte dell'uPAR coinvolge sia i recettori per fMLF che le integrine.

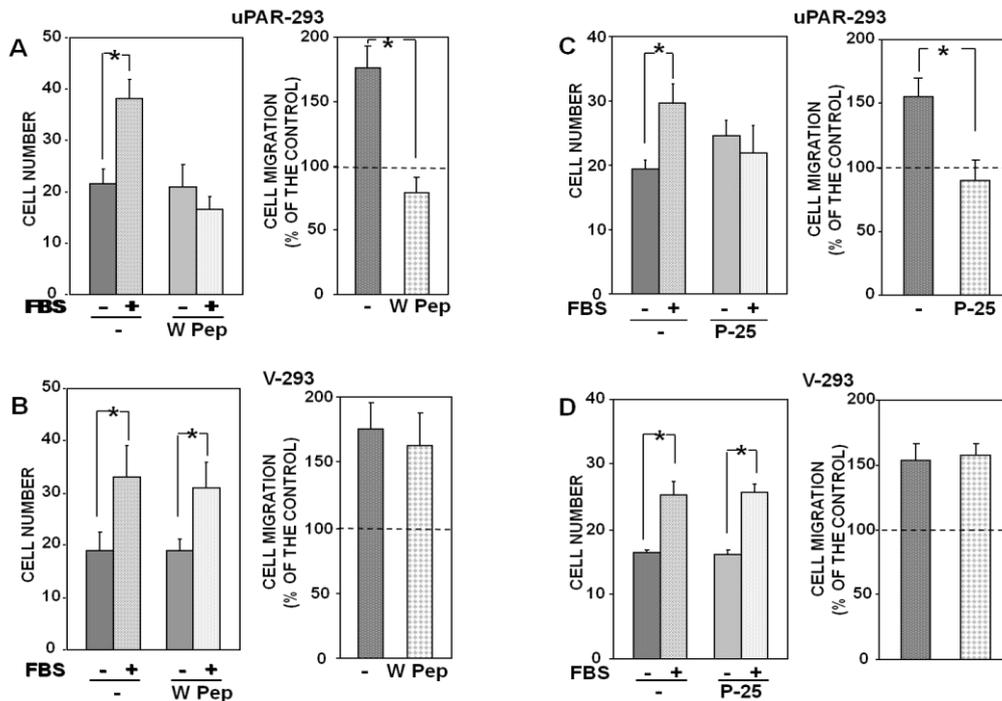


Fig. 19 L'uPAR controlla la migrazione cellulare verso siero attraverso interazioni con fMLF-Rs e Integrine $\beta 1$. Cellule uPAR-293 (A e C) o V-293 (B e D) sono state pre-incubate con diluente (-) o con Peptide W (A e B) oppure con diluente (-) o con P-25 (C e D). Le cellule quindi sono state poste in camere di Boyden e fatte migrare verso 10%FBS. Le cellule che hanno migrato sono state fissate, colorate in ematossilina e contate (pannelli a sinistra). I risultati sono stati espressi anche come percentuale delle cellule che hanno migrato verso siero rispetto a quelle che hanno migrato in assenza di siero (pannelli a destra). Il 100% rappresenta la migrazione in assenza di chemioattrattante. I valori rappresentano la media di tre esperimenti effettuati in triplicato; (*): $p \leq 0.05$ determinata mediante il t-test di Student.

2.2.6 LA MIGRAZIONE uPAR-DIPENDENTE E' MEDIATA DA VIE DI SEGNALE CHE NON SONO COINVOLTE NELLA MIGRAZIONE uPAR-INDIPENDENTE

I risultati ottenuti finora hanno dimostrato chiaramente, che, se espresso, l'uPAR prende il controllo del processo di migrazione cellulare, rendendola totalmente uPAR-dipendente, e che tale ruolo prevede, probabilmente, l'interazione dell'uPAR con fMLF-Rs e integrine $\beta 1$. Abbiamo quindi ipotizzato che l'uPAR recluti tali molecole per formare un "complesso trimolecolare" in grado di attivare vie di segnalazione che gli permetta, così, di assumere il controllo della migrazione. Ci siamo chiesti, quindi, quali potevano essere queste vie di segnalazione "governate" con la collaborazione di fMLF-Rs e integrine.

Sono stati riportati in letteratura vari mediatori di segnale coinvolti in vie di segnalazione attivate da uPAR, come piccole GTPasi quali Rac1, RhoA, Cdc42 e RhoB, MAP-chinasi di tipo ERK e PI3K (Smith e Marshall, 2010; Alfano et al., 2012). Abbiamo, quindi, effettuato esperimenti di migrazione verso siero in presenza o in assenza di inibitori di tali mediatori per chiarire il loro coinvolgimento nella migrazione uPAR-dipendente osservata. Le cellule uPAR-293 o V-293 sono state fatte migrare verso siero in presenza o in assenza di inibitori di fattori di scambio di nucleotidi guanilici (GEF) specifici per Rac, Trio e Tiam1, o di inibitori della chinasi associata a Rho (ROCK) o di inibitori di PI3K ed ERK.

I risultati dei saggi di migrazione hanno evidenziato il coinvolgimento sia di Rho che di Rac1 nella migrazione controllata da uPAR, e non in quella uPAR-indipendente delle cellule V-293, in quanto l'inibizione delle vie di segnalazione dipendenti da Rho e Rac, hanno inibito in maniera significativa la migrazione delle cellule uPAR-293 verso siero (Fig. 20A), senza produrre alcun effetto sulla migrazione delle cellule uPAR-negative (Fig. 20B). Gli inibitori di PI3K e ERK hanno, invece, bloccato la migrazione sia delle cellule uPAR-293 che delle cellule V-293, indicando che questi due mediatori sono utilizzati nella migrazione cellulare sia dipendente da uPAR, sia indipendente da uPAR (Fig. 20C e 20D).

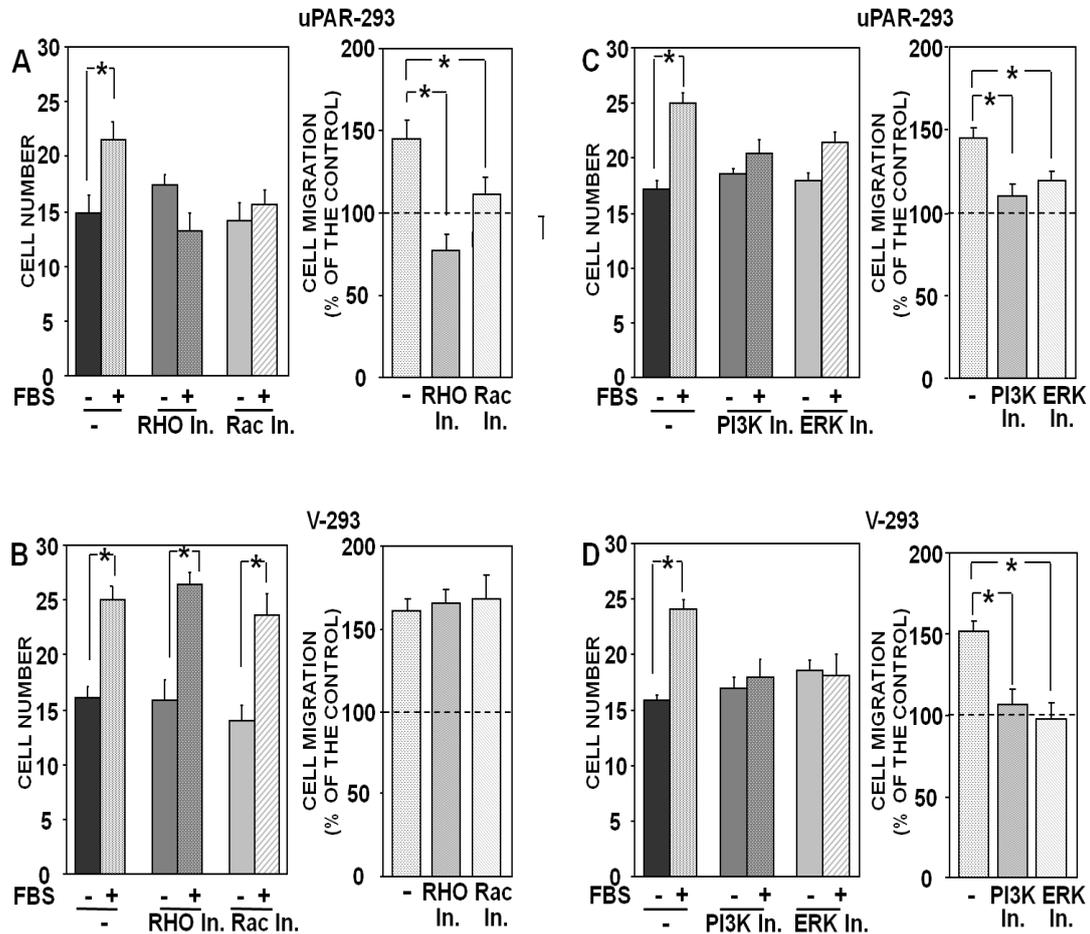


Fig. 20 La migrazione cellulare uPAR-dipendente è mediata da segnali non coinvolti nella migrazione uPAR-indipendente. Cellule uPAR-293 (A e C) o V-293 (B e D) sono state pre-incubate con diluente (-) o con inibitori delle vie di segnalazione dipendenti da Rho e Rac1 (A e B) oppure con diluente (-) o con inibitori di PI3K o ERK-MAPK (C e D). Le cellule quindi sono state poste in camere di Boyden e fatte migrare verso 10%FBS. Le cellule che hanno migrato sono state fissate, colorate in ematosilina e contate (pannelli a sinistra). I risultati sono stati espressi anche come percentuale delle cellule che hanno migrato verso siero rispetto a quelle che hanno migrato in assenza di siero (pannelli di destra). Il 100% rappresenta la migrazione in assenza di chemioattrattante. I valori rappresentano la media di tre esperimenti effettuati in triplicato; (*): $p \leq 0.05$ determinata mediante il t-test di Student.

2.2.7 L'ESPRESSIONE DELL'uPAR CONTROLLA LA MIGRAZIONE VERSO EGF

Tutti gli esperimenti di migrazione condotti fino a questo momento sono stati effettuati ponendo a migrare le cellule verso siero che, come già detto, è una miscela di chemioattrattanti. In quanto tale, il siero potrebbe contenere anche ligandi specifici dell'uPAR come uPA e VN, che potrebbero attivare vie di segnalazione specifiche per uPAR oltre quelle attivate nelle cellule uPAR-negative. Per tale ragione abbiamo condotto ulteriori saggi di chemiotassi usando un chemioattrattante purificato, l'epidermal growth factor (EGF). L'EGF è un fattore di crescita abbondante nel siero e non lega l'uPAR, sebbene il suo recettore, EGFR, può essere coinvolto nella segnalazione mediata da uPAR (Liu et al., 2002).

Da questi esperimenti è emerso che sia le cellule uPAR-293 che V-293 migrano con la medesima efficienza verso EGF (Fig.21); anticorpi diretti contro l'uPAR o contro la regione 84-95 dell'uPAR, il peptide P-25 e il Peptide W, inibiscono la migrazione verso EGF solo delle cellule uPAR-293 (Fig. 21A e 21C) senza avere alcun effetto sulla migrazione basale delle cellule V-293, esattamente come avveniva nella migrazione verso siero (Fig. 21B e 21D). Anche i saggi di migrazione verso EGF in presenza degli inibitori dei vari mediatori di segnale hanno prodotto risultati analoghi a quelli ottenuti nella migrazione verso siero (Fig. 21E e 21F).

Tutti i risultati ottenuti facendo migrare le cellule verso EGF, quindi, sono comparabili a quelli ottenuti utilizzando siero come chemioattrattante, confermando che il controllo da parte dell'uPAR della migrazione è indipendente dal tipo di chemioattrattante utilizzato e, quindi, ha, probabilmente, carattere generale.

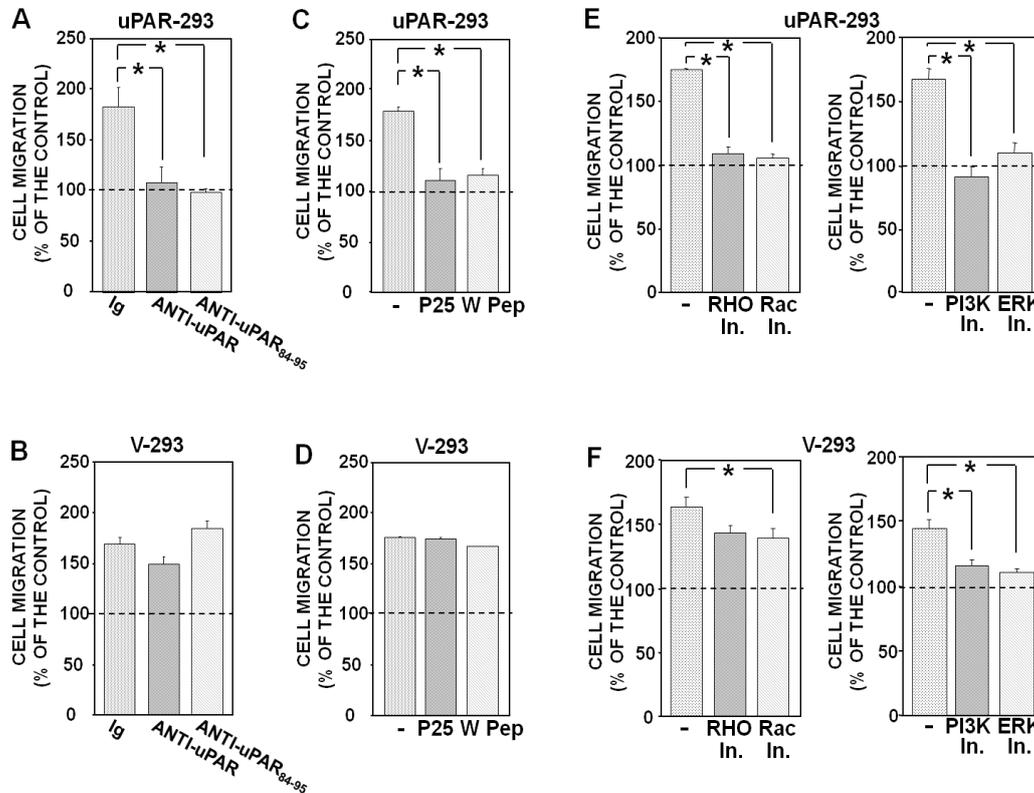


Fig. 21 L'uPAR controlla la migrazione cellulare verso EGF. Cellule uPAR-293 (A, C ed E) o V-293 (B, D e F) sono state pre-incubate con immunoglobuline non immuni di controllo (-) o con anticorpi policlonali anti-uPAR o anti-uPAR₈₄₋₉₅ (A e B), con i diluenti (-) o con P-25 o Peptide W (C e D), con i diluenti (-) o con gli inibitori di Rho o Rac1 (E e F, pannelli di sinistra), con i diluenti (-) oppure con gli inibitori di PI3K ed ERK MAPK (E e F, pannelli di destra). Le cellule sono state poste in camere di Boyden e fatte migrare verso EGF. Le cellule che hanno migrato sono state fissate, colorate in ematossilina e contate. I risultati sono stati espressi come percentuale delle cellule che hanno migrato verso EGF rispetto a quelle che hanno migrato in assenza di EGF. Il 100% rappresenta la migrazione in assenza di chemioattrattante. I valori rappresentano la media di tre esperimenti effettuati in triplicato; (*): $p \leq 0.05$ determinata mediante il t-test di Student.

2.3 DISCUSSIONE

La prima connessione tra il sistema uPAR-uPAR e gli fMLF-Rs fu scoperta nel 2002 (Resnati et al.), anno in cui fu dimostrato che la forma tronca e solubile di uPAR con esposta la sequenza SRSRY era un ligando di FPR2 e che la migrazione verso uPA richiedeva l'espressione di FPR2. Successivamente fu evidenziato che il DII-DIII suPAR era in grado di attivare anche gli altri due fMLF-Rs. In parallelo fu evidenziato che l'uPAR di membrana esponeva la sequenza di legame per fMLF-Rs anche nella forma intera e che dialogava con essi. Infatti, la migrazione cellulare indotta da fMLF richiede l'espressione di uPAR sulla superficie della cellula (Gyetko et al., 1994; Montuori et al., 2002; Bifulco et al., 2012). Tutte queste osservazioni suggerivano fortemente un legame diretto tra uPAR e fMLF-Rs e un possibile ruolo funzionale di tale legame; tuttavia, l'associazione fra uPAR di membrana e fMLF-Rs e il suo ruolo nelle attività di uPAR non erano stati mai esplorati in dettaglio e sono stati, quindi, oggetto dei miei studi nella prima parte del mio progetto di dottorato.

I risultati presentati mostrano che le cellule HEK-293, uPAR-negative, possono migrare attraverso meccanismi uPAR-indipendenti oppure, se indotte ad esprimere uPAR, esclusivamente attraverso meccanismi uPAR-dipendenti. L'uPAR ectopicamente espresso in tali cellule, infatti, si associa ad FPR1 e ad integrine e monopolizza i meccanismi di migrazione al punto che, pur inibendo le sue interazioni con tali molecole di superficie, i meccanismi di migrazione uPAR-indipendenti presenti nelle cellule HEK-293, non possono essere ripristinati. Questi risultati sono stati ottenuti sia in saggi di migrazione verso siero, che rappresenta una miscela di chemioattrattanti, sia in saggi di migrazione verso EGF, che è un chemioattrattante purificato, che non lega uPAR.

In precedenza è stato riportato che le integrine sono in grado di attivare i recettori per EGF, PDGF β , VEGF, HGF (hepatocyte growth factor) e MSP (macrophage-stimulating protein) (Comoglio et al., 2005), e che gli fMLF-Rs, a loro volta, possono modulare l'attività di varie integrine (Miettinen et al., 1998; Sadhu et al., 1998; Campbell et al., 1996). Nel loro insieme i risultati ottenuti e le osservazioni riportate in letteratura supportano l'ipotesi che, quando espresso, l'uPAR di membrana possa reclutare fMLF-Rs e integrine sulla superficie cellulare, connettendoli funzionalmente, controllando l'attività pro-migratoria di recettori per fattori di crescita, monopolizzando le vie di segnalazione da essi dipendenti (Fig. 22).

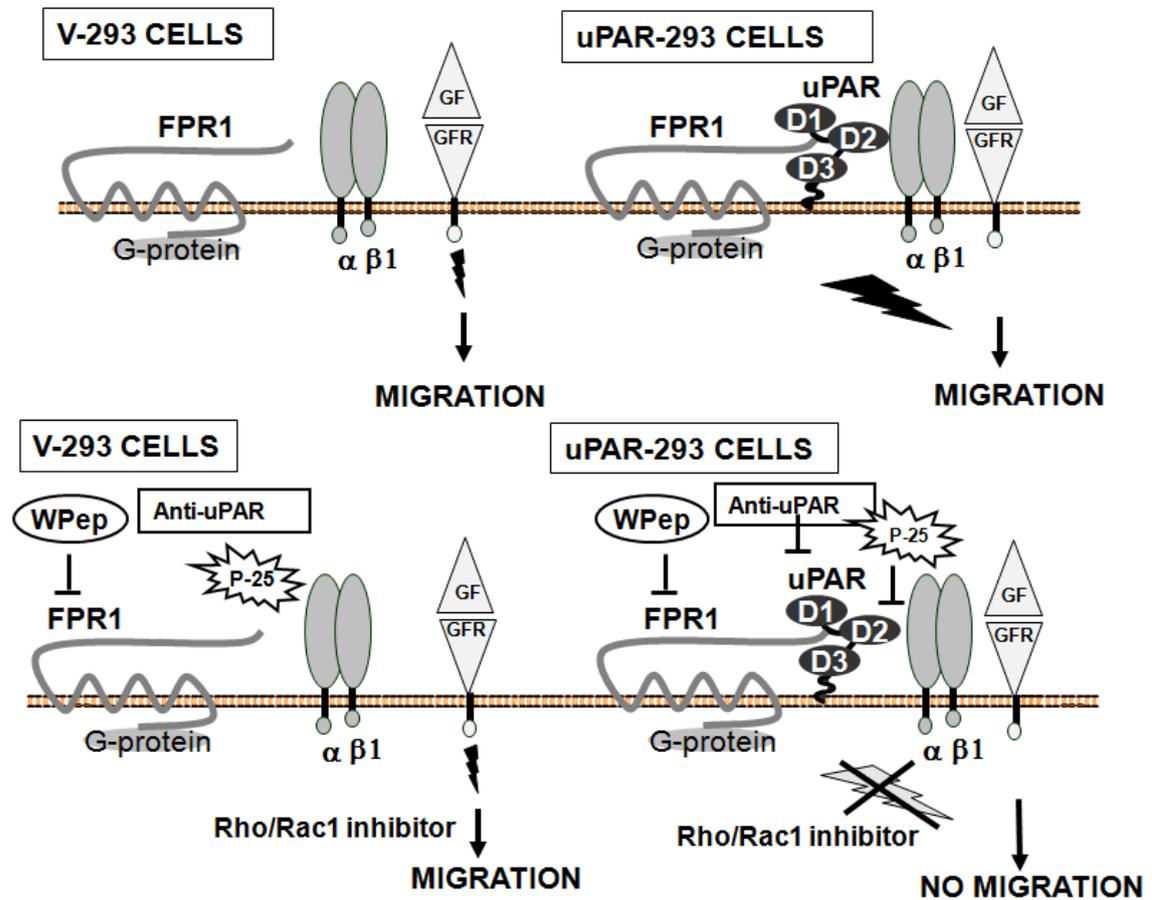


Fig. 22 L'uPAR controlla la migrazione cellulare. Cellule uPAR-293 e V-293 migrano efficientemente verso siero e verso EGF. L'uPAR, quando espresso, recluta fMLF-Rs e integrine $\beta 1$ sulla superficie cellulare e, in tal modo, dirige segnali pro-migratori (pannello superiore). Anticorpi anti-uPAR che bloccano il recettore, il Peptide W che desensibilizza FPR1, il peptide P-25 che inibisce il legame uPAR-integrine o inibitori di mediatori di segnale bloccano la migrazione delle cellule uPAR-293 senza avere alcun effetto sulle cellule uPAR negative V-293 (pannello inferiore).

CAPITOLO 3

L'uPAR REGOLA LA MIGRAZIONE DELLA CELLULA TUMORALE. RUOLO DELL'ANCORA GPI.

3.1 INTRODUZIONE

Nella prima parte del mio progetto di dottorato ho caratterizzato il ruolo dell'uPAR e delle sue interazioni nella migrazione di cellule che normalmente non lo esprimono, mostrando che l'uPAR ectopicamente espresso in tali cellule monopolizza completamente i meccanismi di migrazione. Ho, quindi, proseguito lo studio esaminando il ruolo dell'uPAR e delle sue interazioni in cellule che lo esprimono costitutivamente. A tal fine, abbiamo effettuato saggi di migrazione utilizzando cellule di carcinoma di prostata (PC3) particolarmente invasive che esprimono elevati livelli di uPAR.

Nella seconda parte di questo capitolo mi sono poi soffermata sul ruolo nella migrazione cellulare dell'unica regione della molecola dell'uPAR non ancora presa in considerazione in ambedue le linee cellulari esaminate, ovvero l'ancora GPI. L'ancora GPI, oltre a conferire alla molecola una grande mobilità sulla membrana plasmatica della cellula, può promuovere la sua associazione a compartimenti specializzati della membrana quali i *lipid rafts*. Quindi, in tali analisi, abbiamo valutato l'effetto sulla migrazione cellulare sia della degradazione dell'ancora GPI dell'uPAR sia della disgregazione dei *lipid rafts*, al fine di comprendere se anche tale tipo di ancoraggio alla superficie cellulare abbia un ruolo nella migrazione uPAR-dipendente. Tali esperimenti sono stati effettuati sia su cellule uPAR-293 che su cellule PC3.

3.2 RISULTATI

3.2.1 L'uPAR REGOLA LA MIGRAZIONE DI CELLULE TUMORALI VERSO SIERO.

Poichè abbiamo osservato che le cellule uPAR-negative HEK-293, trasfettate o meno con cDNA di uPAR, possono migrare attraverso meccanismi uPAR-indipendenti o uPAR-dipendenti, abbiamo investigato se silenziando o bloccando l'uPAR in cellule che lo esprimono costitutivamente come le cellule PC3 si ottenessero comportamenti analoghi.

L'espressione di uPAR in tali cellule è stata silenziata trasfettandole transientemente con un siRNA specifico per uPAR o con un siRNA di controllo. Le cellule

sono state poi lisate ed analizzate per Western blot con un anticorpo anti-uPAR per verificare il silenziamento dell'uPAR, oppure sottoposte a saggio di chemiotassi verso siero (Fig. 23A). Nelle cellule in cui l'uPAR era stato silenziato, la migrazione verso siero è risultata inibita (Fig. 23A). In accordo con tali risultati, anche gli anticorpi anti-uPAR o anti-uPAR₈₄₋₉₅ hanno inibito totalmente la migrazione (Fig. 23B).

Nel loro insieme, questi risultati indicano che anche nel caso di uPAR endogeno, quindi non iper-espresso mediante trasfezione, la migrazione cellulare è totalmente sotto il controllo dell'uPAR e, in questo caso, non sembrano essere presenti meccanismi di migrazione uPAR-indipendenti che, invece, sono presenti in cellule costitutivamente uPAR-negative come le HEK-293.

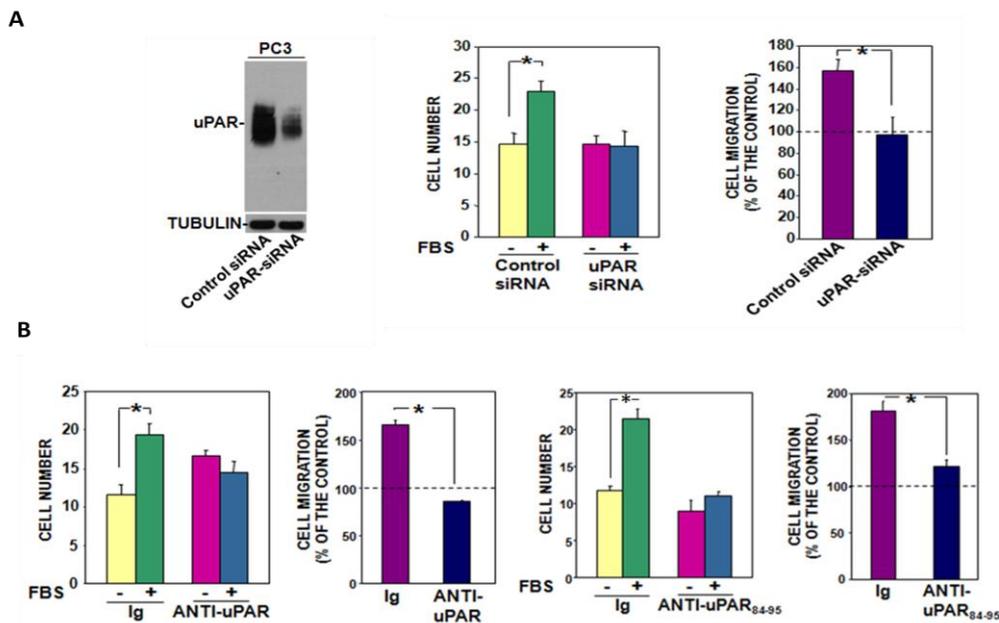


Fig. 23 L'uPAR è essenziale per la migrazione di cellule tumorali che lo esprimono costitutivamente. A) Cellule di carcinoma della prostata (PC3) sono state trasfettate con siRNA-uPAR o con siRNA-controllo. Una parte di esse è stata lisata ed analizzata per Western Blot con anticorpi anti-uPAR (pannello a sinistra), le altre sono state poste a migrare verso 10%FBS in camere di Boyden. Le cellule migrate sono state fissate, colorate in ematossilina e contate. I risultati sono stati espressi anche come percentuale delle cellule che hanno migrato verso siero rispetto a quelle che hanno migrato in assenza di siero (pannello a destra). Il 100% rappresenta la migrazione in assenza di chemoattrattante. I valori relativi alle migrazioni rappresentano la media di almeno tre esperimenti effettuati in triplicato; (*): $p \leq 0.05$ determinata mediante il t-test di Student. **B)** Cellule PC3 sono state pre-incubate con immunoglobuline non immuni (Ig) o con anticorpi policlonali anti-uPAR o anti-uPAR₈₄₋₉₅, poste in camere di Boyden e fatte migrare verso 10%FBS. Le cellule migrate sono state fissate, colorate in ematossilina e contate. I risultati sono stati espressi anche come percentuale delle cellule che hanno migrato verso siero rispetto a quelle che hanno migrato in assenza di siero. Il 100% rappresenta la migrazione in assenza di chemoattrattante. I valori relativi alle migrazioni rappresentano la media di almeno tre esperimenti effettuati in triplicato; (*): $p \leq 0.05$ determinata mediante il t-test di Student.

3.2.2 I RECETTORI PER fMLF E LE INTEGRINE SONO COINVOLTI NELLA MIGRAZIONE uPAR-DIPENDENTE DI CELLULE TUMORALI

Abbiamo, quindi, esaminato il coinvolgimento dei recettori per fMLF e delle integrine nella regolazione uPAR-dipendente della migrazione verso siero delle cellule PC3. Sono stati effettuati saggi di chemiotassi con cellule PC3 pre-incubate o meno con il peptide W (W Pep), che induce l'internalizzazione degli fMLF-Rs, o con il peptide P-25 che inibisce l'interazione uPAR-integrine e, poi, poste a migrare verso siero. L'inibizione dell'associazione dell'uPAR ai suoi due partner causa inibizione della migrazione verso siero (Fig. 24A e 24B). Dunque, come ovviamente in cellule uPAR-293, la migrazione di cellule PC3, che sembra esclusivamente uPAR-dipendente, coinvolge gli fMLF-Rs e le integrine.

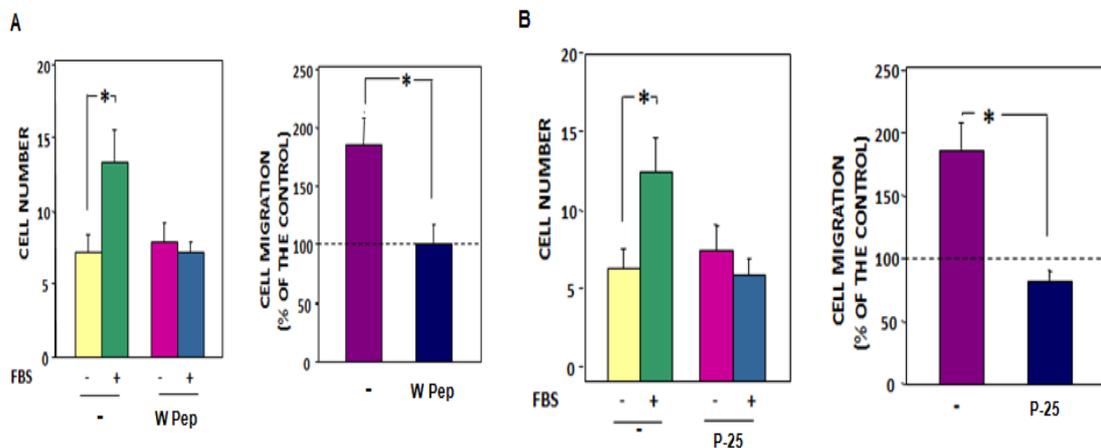


Fig. 24 La migrazione uPAR-dipendente di cellule PC3 coinvolge fMLF-Rs e Integrine β 1. Cellule PC3 sono state pre-incubate con diluente (-) o Peptide W (A) oppure con diluente (-) o P-25 (B) e poste a migrare verso 10%FBS in camere di Boyden. Le cellule migrate sono state fissate, colorate in ematosilina e contate. I risultati sono stati espressi anche come percentuale delle cellule che hanno migrato verso siero rispetto a quelle che hanno migrato in assenza di siero. Il 100% rappresenta la migrazione in assenza di chemioattrattante. I valori rappresentano la media di almeno tre esperimenti effettuati in triplicato; (*) $p \leq 0.05$ calcolata mediante il t-test di Student.

3.2.3 VIE DI SEGNALE COINVOLTE NELLA MIGRAZIONE uPAR-DIPENDENTE DI CELLULE TUMORALI

Avendo riportato in precedenza il coinvolgimento, nella migrazione uPAR-dipendente delle cellule uPAR-293, delle piccole GTPasi Rho e Rac, sono stati condotti saggi di migrazione con cellule PC3 in presenza o in assenza di inibitori delle vie di

segnale dipendenti da tali mediatori. Il pretrattamento delle cellule PC3 con tali inibitori ha inibito la migrazione verso siero senza alterare la migrazione basale (Fig. 25).

Tali risultati confermano che i meccanismi uPAR-dipendenti del processo migratorio coinvolgono l'attivazione delle piccole GTPasi Rho e Rac, come osservato in cellule uPAR-293.

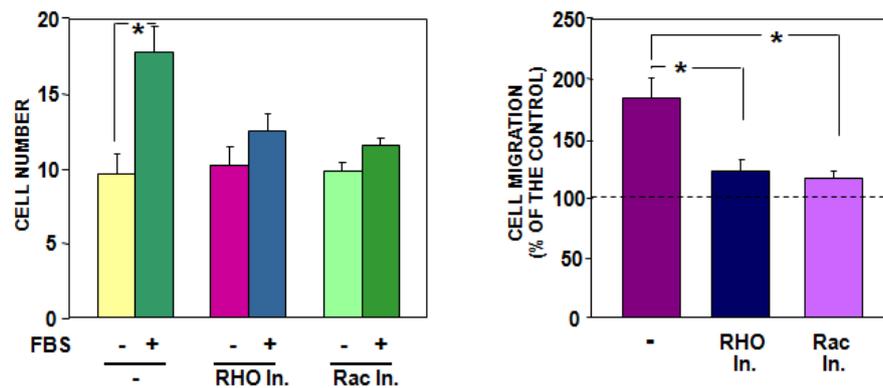


Fig. 25 La migrazione delle PC3 coinvolge le piccole GTPasi. Cellule PC3 sono state pre-incubate con diluente (-) o inibitori delle vie di segnalazione dipendenti da Rho e Rac1. Le cellule quindi sono state poste in camere di Boyden e fatte migrare verso 10%FBS. Le cellule migrate sono state fissate, colorate in ematossilina e contate. I risultati sono stati espressi anche come percentuale delle cellule che hanno migrato verso siero rispetto a quelle che hanno migrato in assenza di siero. Il 100% rappresenta la migrazione in assenza di chemioattrattante. I valori rappresentano la media di tre esperimenti effettuati in triplicato; (*): $p \leq 0.05$ calcolata mediante il t-test di Student.

3.2.4 LA DEGRADAZIONE DELL'ANCORA GPI DELL'uPAR INIBISCE LA MIGRAZIONE uPAR-DIPENDENTE

I risultati ottenuti finora hanno mostrato che quando l'uPAR è costitutivamente espresso, esso è indispensabile per la migrazione cellulare e apparentemente, in questo caso, non esistono meccanismi di migrazione alternativi uPAR-indipendenti. Le cellule HEK-293, uPAR-negative, migrano, invece, efficacemente verso siero sia in assenza di uPAR, sia quando vengono trasfettate con esso; tuttavia, l'inibizione di qualsiasi interazione di uPAR con partners di segnale inibisce la migrazione, non ripristinando i meccanismi di migrazione uPAR-indipendente. Ci siamo, quindi, chiesti per quale motivo la neutralizzazione di tutte le attività di legame dell'uPAR non sia sufficiente per il recupero di tale capacità. Poiché l'unica parte della molecola non ancora presa in considerazione negli esperimenti effettuati era l'ancora GPI, ci siamo focalizzati sul suo possibile ruolo nella migrazione uPAR-dipendente.

A tal fine cellule HEK-293 trasfettate con cDNA di uPAR (uPAR-293) e cellule PC3, sono state trattate con fosfolipasi C specifica per fosfatidilinositolo (PI-PLC), un enzima che può provocare l'idrolisi del fosfatidilinositolo e del glicosilfosfatidilinositolo causando, così, il rilascio di proteine ad ancora GPI dalla superficie cellulare, incluso l'uPAR.

Innanzitutto abbiamo effettuato il trattamento con PI-PLC a diversi tempi d'incubazione e a differenti concentrazioni, così da individuare le condizioni ottimali affinché ci fosse effettivamente la degradazione della coda e, conseguentemente, il rilascio dell'uPAR dalla superficie cellulare. Dopo i trattamenti, i lisati di uPAR-293 sono stati analizzati per Western Blot con anticorpi specifici per uPAR. Tali esperimenti hanno indicato che il migliore risultato era ottenibile ad una densità cellulare pari a 2.000.000, adoperando 1 unità di enzima per ml, per 1 ora a 37°C (non mostrato). Avendo stabilito le condizioni ottimali di trattamento, le cellule uPAR-293 e PC3 sono state trattate con l'enzima e, dopo 1 ora, un'aliquota di cellule è stata lisata ed analizzata tramite Western blot, per verificare che fosse effettivamente avvenuta la degradazione della coda GPI e il conseguente rilascio dell'uPAR dalla superficie cellulare, ed un'altra aliquota è stata invece utilizzata per allestire un saggio di chemiotassi verso siero. L'analisi per Western Blot ha dimostrato una forte riduzione della banda proteica corrispondente al peso molecolare dell'uPAR nei lisati trattati con l'enzima (+PI-PLC) rispetto ai lisati non trattati e, viceversa, il conseguenziale incremento di uPAR solubile nei sovranatanti delle cellule trattate rispetto ai sovranatanti delle non trattate (Fig. 26A), dimostrando chiaramente l'efficacia del trattamento con PI-PLC.

I risultati del saggio di chemiotassi mostrano che il trattamento con PI-PLC, quindi la rimozione dell'ancora GPI dell'uPAR, non altera l'efficienza di migrazione delle cellule uPAR-293 mentre inibisce completamente la migrazione delle cellule PC3 (Fig. 26B).

Poiché, come detto, l'inibizione delle molteplici interazioni dell'uPAR non era stata in grado di ripristinare i meccanismi della migrazione uPAR-indipendente di cui le cellule HEK-293 sono dotate, mentre ciò è avvenuto con la degradazione dell'ancora GPI, probabilmente tale ancora ha un ruolo determinante nei meccanismi di migrazione uPAR-dipendente; tale risultato sembra confermato dall'inibizione di migrazione in cellule PC3 che, invece, non hanno meccanismi di migrazione alternativi.

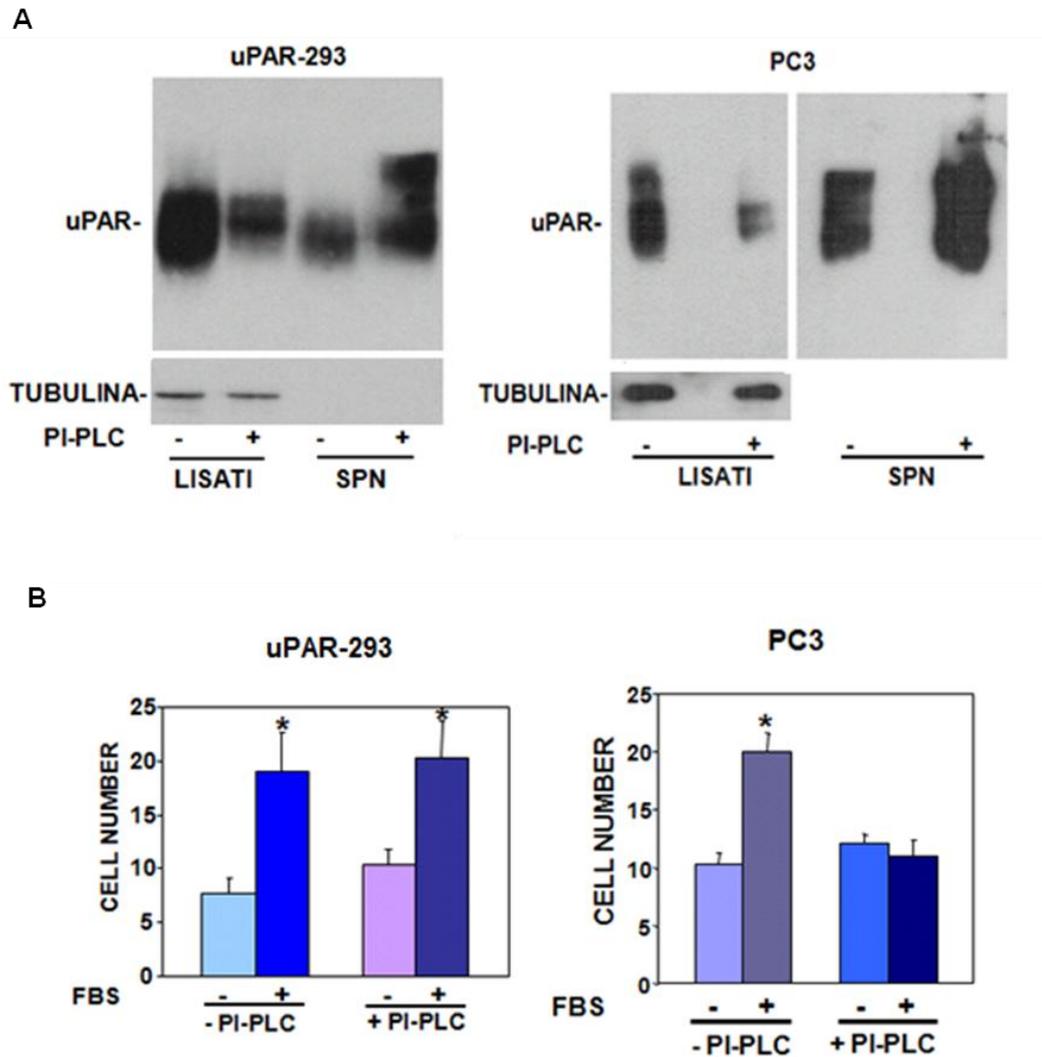


Fig. 26 La degradazione dell'ancora GPI inibisce la migrazione uPAR-dipendente. A) Cellule uPAR-293 e cellule PC3 sono state trattate o meno con l'enzima PI-PLC 1U/ml. 10 μ g di lisati cellulari e 45 μ l di soprannatanti sono stati analizzati per Western blot con anticorpo anti-uPAR. B) Le cellule, trattate o meno con PI-PLC, sono state poste a migrare verso 10%FBS in camera di Boyden. Le cellule migrate sono state fissate, colorate in ematossilina e contate. I valori rappresentano la media di tre esperimenti effettuati in triplicato; (*): $p \leq 0.05$ calcolata mediante il t-test di Student.

3.2.5 LA DISGREGAZIONE DEI *LIPID RAFTS* INIBISCE LA MIGRAZIONE uPAR-DIPENDENTE

Le molecole legate alla membrana tramite un'ancora GPI si localizzano preferenzialmente in particolari microdomini della membrana conosciuti come *lipid rafts*, ricchi in colesterolo e dotati di una composizione glicosfingolipidica differente rispetto alla composizione media della membrana plasmatica. Il *lipid rafts*, nel versante citoplasmatico, aggregano molti mediatori di segnale intracellulari, incluse le piccole GTPasi Rho e Rac, mediatori coinvolti nella segnalazione uPAR-dipendente. Abbiamo quindi ipotizzato che l'ancora GPI possa esercitare un ruolo nella migrazione uPAR-dipendente, guidando l'uPAR nei *lipid rafts*.

La metil- β -ciclodestrina (M β CD), è un composto in grado di estrarre il colesterolo dai *lipid rafts*, provocandone la disgregazione. Abbiamo, quindi, pensato di utilizzarla per esplorare l'importanza dell'eventuale ripartizione dell'uPAR nei *lipid rafts*. Poichè la M β CD è molto tossica per le cellule, è stato necessario mettere a punto le condizioni ottimali di trattamento per le cellule uPAR-293 e PC3. Le cellule sono state trattate con due diverse concentrazioni di M β CD (5 o 10 mM) a quattro tempi diversi di incubazione. Le cellule vive sono state contate in presenza di Trypan Blu e il trattamento migliore è risultato essere 10 mM per 15 minuti per le cellule uPAR-293 e 30 minuti per le PC3, a 37°C e 5% CO₂; tali condizioni determinano una perdita di cellule inferiore al 10% rispetto al controllo senza M β CD (non mostrato). Stabilite le condizioni d'uso della M β CD, abbiamo verificato la ripartizione dell'uPAR nei *lipid rafts* in ambedue i tipi cellulari e l'eventuale sua alterazione in seguito a trattamento con M β CD. Le cellule uPAR-293 e PC3 sono state trattate con o senza M β CD e lisate in 1% TritonX-100, per preservare l'integrità dei *lipid rafts*. Il lisato è stato posto in un gradiente di saccarosio (40%, 30%, 5%) e sottoposto ad ultracentrifugazione, in modo che la frazione dei *lipid rafts* potesse fluttuare nella zona a minore percentuale di saccarosio mentre la frazione non raft potesse rimanere nella zona del gradiente a maggiore concentrazione di saccarosio (Fig. 27A). Le frazioni a diversa densità, mostrate in ordine crescente dalla minore alla maggiore densità, sono state poi prelevate, e analizzate tramite Western Blot con anticorpo anti-uPAR. L'analisi ha chiaramente evidenziato la presenza dell'uPAR nelle frazioni contenenti i *lipid rafts* nelle cellule uPAR-293 non trattate con M β CD, in accordo con la letteratura, e la mancanza dell'uPAR nelle frazioni a minore densità nelle cellule trattate confermando l'effetto della M β CD. Nel caso delle PC3 si osserva presenza di uPAR in frazioni a densità intermedia nelle cellule non trattate con una ripartizione piuttosto differente rispetto alle cellule trattate con M β CD, benchè la sua ripartizione nei *lipid rafts* non sia evidente come nelle cellule uPAR-293 (Fig. 27A).

Avendo, quindi, verificato l'effetto delle M β CD, le cellule uPAR-293 e PC3, trattate o meno con M β CD, sono state poste a migrare verso FBS, al fine di valutare l'effetto della disgregazione dei *lipid rafts* sulla migrazione di tali cellule.

I risultati di questo saggio hanno evidenziato che, anche in questo caso, come nel trattamento con PI-PLC, le cellule uPAR-293 trattate migrano, mentre la migrazione delle cellule PC3 trattate risulta inibita (Fig. 27B). L'osservazione che la disgregazione dei *lipid*

rafts inibisce la migrazione delle cellule PC3, che è esclusivamente uPAR-dipendente, suggerisce che la capacità delle cellule uPAR-293 trattate con M β CD di migrare efficientemente sia legata ai meccanismi di migrazione uPAR-indipendenti esistenti in tali cellule. Per verificare questa possibilità, le cellule uPAR-293 sono state trattate o meno con M β CD e sono state poste a migrare in presenza o in assenza di anticorpo policlonale anti-uPAR. L'anticorpo anti-uPAR non blocca la migrazione delle cellule uPAR-293 trattate con M β CD, mentre, come atteso, inibisce totalmente la migrazione delle stesse cellule non trattate (Fig. 28), dimostrando che la disgregazione dei *lipid rafts* in cellule uPAR-293 ha permesso il ripristino dei meccanismi di migrazione uPAR-indipendente e che, invece, l'integrità dei *lipid rafts*, ai quali l'uPAR si associa, è cruciale nella migrazione uPAR-dipendente delle PC3.

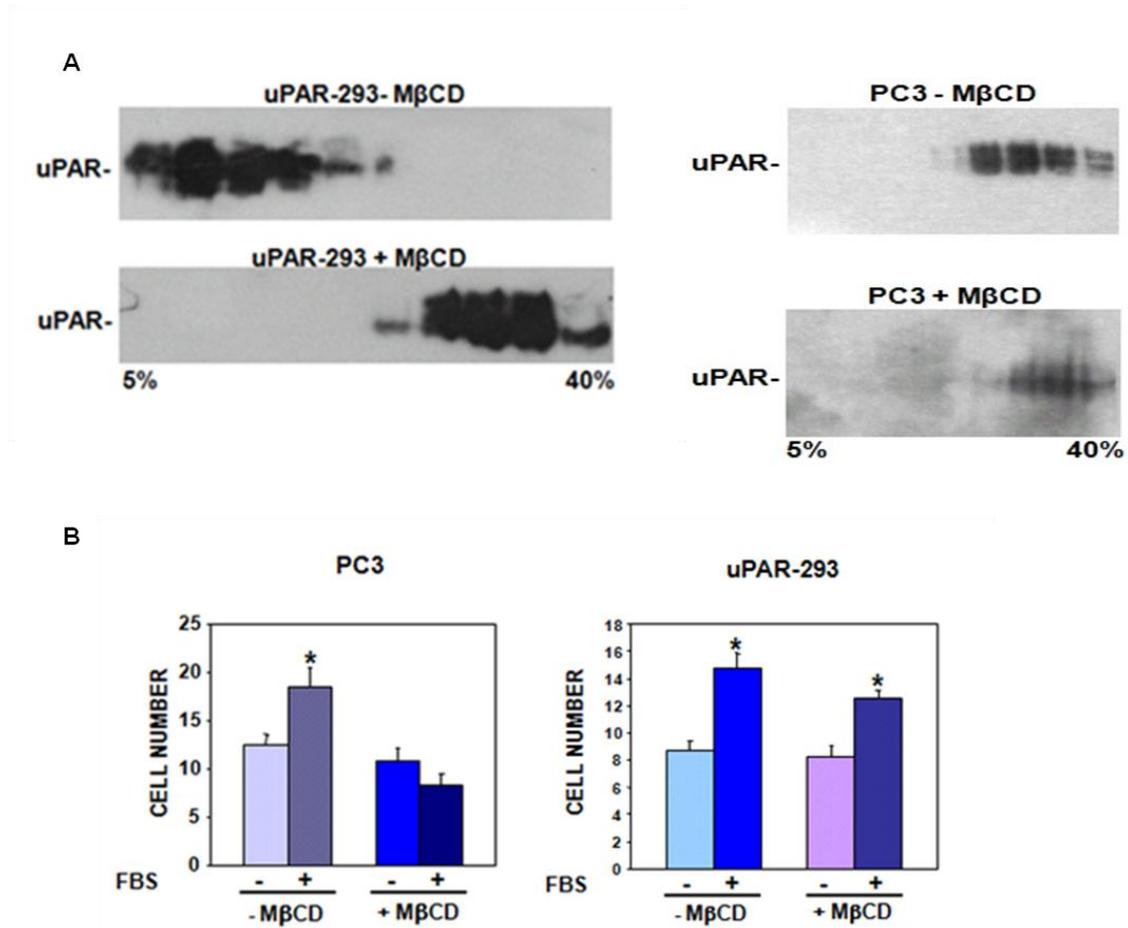


Fig. 27 La disgregazione dei lipid rafts inibisce la migrazione uPAR-dipendente. A) I lisati di cellule uPAR-293 e PC3 trattate o non trattate con M β CD sono stati posti in gradiente di saccarosio e centrifugati a 300.000 rpm per 21 ore. Sono state, poi, prelevate 10 frazioni dall'alto verso il basso (5%-40% saccarosio) ed analizzate per Western Blot con anticorpo anti-uPAR. **B)** Cellule uPAR-293 e PC3, dopo trattamento o meno con M β CD, sono state poste a migrare verso 10%FBS. Le cellule migrate sono state fissate, colorate in ematossilina e contate. I valori rappresentano la media di tre esperimenti effettuati in triplicato; (*): $p \leq 0.05$ calcolata mediante il t-test di Student.

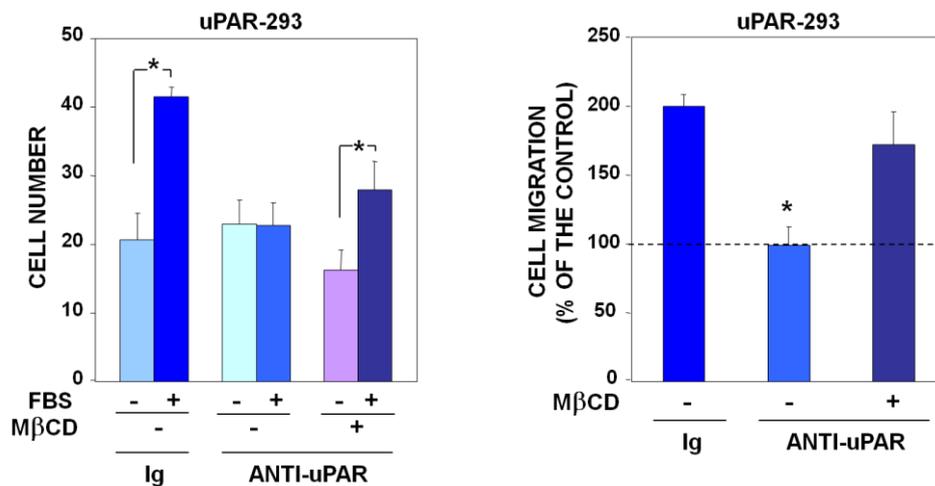


Fig. 27 La disgregazione dei *lipid rafts* ripristina i meccanismi di migrazione uPAR-indipendente. Cellule uPAR-293 dopo trattamento o meno con anticorpo anti-uPAR e MβCD, sono state poste a migrare verso 10%FBS. Le cellule migrate sono state fissate, colorate in ematossilina e contate. I valori rappresentano la media di tre esperimenti effettuati in triplicato; (*) $p \leq 0.05$ calcolata mediante il t-test di Student.

3.3 DISCUSSIONE

Nel capitolo precedente avevamo indotto l'espressione di uPAR in cellule uPAR-negative, evidenziando in tali cellule l'esistenza di un meccanismo di migrazione uPAR-indipendente in assenza di uPAR, ed esclusivamente uPAR-dipendente in seguito alla sua espressione. Il meccanismo uPAR-dipendente necessita dell'interazione dell'uPAR con fMLF-Rs e integrine. Abbiamo, quindi, proseguito lo studio seguendo la strategia inversa, ovvero abbiamo esaminato la capacità dell'uPAR di regolare la migrazione cellulare in un sistema che lo esprimesse costitutivamente e, in particolare, in cellule di carcinoma prostatico PC3, silenziando la sua espressione.

Innanzitutto, abbiamo esaminato l'importanza dell'uPAR nella migrazione di tali cellule, dimostrando che silenziando la sua espressione, le cellule PC3 non sono più in grado di migrare, quindi che, in tale sistema, operano solo i meccanismi di migrazione uPAR-dipendente. Tali meccanismi, come nel sistema precedente, richiedono l'interazione di uPAR con fMLF-Rs e integrine, e l'attivazione delle piccole GTPasi Rho e Rac come mediatori di segnale. Abbiamo, poi, focalizzato lo studio sull'importanza che l'ancora GPI può avere nei meccanismi di migrazione uPAR-dipendente, spinti soprattutto dall'osservazione che, in cellule uPAR-293, capaci di migrare anche in assenza di uPAR, l'inibizione delle sue interazioni bloccava la migrazione senza ripristinare il meccanismo uPAR-indipendente. Abbiamo quindi dimostrato che rimuovendo l'ancora GPI dell'uPAR o disgregando i *lipid rafts*, nei quali probabilmente tale ancora guida l'uPAR, la migrazione

esclusivamente uPAR-dipendente delle cellule PC3 veniva inibita, mentre nelle cellule uPAR-293 veniva ripristinata la migrazione uPAR-indipendente.

Tale risultato ha indicato, chiaramente, un ruolo importante dell'ancora GPI dell'uPAR nei meccanismi di migrazione uPAR-dipendente.

Poiché i *lipid rafts*, microdomini della membrana ricchi in colesterolo, sono capaci di aggregare, nel versante citoplasmatico, molti mediatori di segnale intracellulare, abbiamo ipotizzato che l'ancora GPI possa espletare il suo ruolo guidando l'uPAR, e quindi i suoi partners di membrana, in regioni della cellula particolarmente funzionali alla segnalazione cellulare.

Quindi, sulla base dei risultati ottenuti, possiamo concludere che, nelle cellule PC3, l'uPAR è indispensabile per la migrazione cellulare e non solo per le interazioni con i suoi partners di membrana, ma anche per la sua capacità di associarsi ai *lipid rafts* che, probabilmente, rappresentano la localizzazione ideale per guidare la segnalazione cellulare.

CAPITOLO 4

IDENTIFICAZIONE DI INIBITORI DELL'uPAR

4.1 INTRODUZIONE

L'identificazione di molecole con caratteristiche farmacocinetiche favorevoli e capaci di interferire con la segnalazione uPAR-dipendente, rappresenta, attualmente, un'area di grande interesse scientifico dato che, come già discusso precedentemente, l'espressione e le funzioni dell'uPAR sono implicate nella formazione e nella progressione tumorali (Laufs et al., 2006).

Per tale ragione, parallelamente agli studi sulla caratterizzazione dell'interazione fisica e funzionale fra uPAR e fMLF-Rs ho partecipato, in collaborazione con il gruppo della Prof.ssa Montuori dell'Università di Napoli "Federico II", ad uno studio volto ad identificare inibitori delle molteplici attività dell'uPAR. In particolare, la mia attenzione si è focalizzata sulla caratterizzazione funzionale di potenziali inibitori dell'interazione dell'uPAR con la VN, selezionati mediante l'utilizzo di un metodo computazionale, il "virtual screening" (SB-VS), basato sulla struttura cristallografica a raggi X del complesso ternario uPAR-ATF-SBM (il dominio somatomedina B della vitronectina), determinata con una risoluzione di 2,8 Å (codice PDB: 3BT1). Tali studi di docking molecolare sono stati effettuati attraverso il software GLIDE (Grid-based Lligand Docking from Energetic) su una serie di strutture 3D (circa 2000) estratte da una libreria virtuale, NCI Diversity Set II (http://dtp.nci.nih.gov/branches/dscb/diversity_explanation.html). Attraverso una prima analisi, effettuata assegnando un punteggio ad ogni struttura in base all'affinità di ciascuna con la porzione dell'uPAR responsabile del suo legame con la VN (che include residui del dominio DI e della regione linker DI-DII), il software GLIDE ha selezionato 272 composti, che sono stati successivamente sottoposti ad un'ulteriore analisi di precisione per stimare le più alte affinità. Quest'analisi ha individuato 54 composti; per ogni composto, sono stati poi presi in considerazione i possibili stereoisomeri e tautomeri e con questi è stata effettuata un'ulteriore analisi volta a valutare la loro capacità di interazione con la regione del recettore di interesse. Sono risultati così 41 composti destinati all'analisi biologica in vitro.

La vitronectina è uno dei due ligandi extra-cellulari dell'uPAR. Inibitori dell'interazione uPAR-uPA sono stati già riportati in letteratura (Wang et al., 2012) mentre minore attenzione è stata rivolta a quella uPAR-VN. La VN è presente nel sangue ed è una componente particolarmente abbondante nella matrice extracellulare (ECM) associata a tessuti tumorali. L'espressione di uPAR, condizione tipica di molti tipi di cancro, promuove l'adesione alla VN, attivando segnali intracellulari. E' stato, inoltre, riportato che l'uPAR

promuove la crescita tumorale utilizzando la VN (Pirazzoli et al., 2013). E' interessante sottolineare che il sito di legame dell'uPAR alla VN, come già discusso nel capitolo introduttivo, è un sito composito, che include residui aminoacidici localizzati nel dominio DI e nella regione linker che connette DI a DII, e comprende due aminoacidi, l'arginina (R) in posizione 91 e la tirosina (Y) in posizione 92, coinvolti anche nell'interazione fra uPAR e fMLF-R (residui 88-92); quindi i due siti potrebbero in parte sovrapporsi o interferire l'uno sull'altro.

4.2 RISULTATI

4.2.1. QUATTRO COMPOSTI SELEZIONATI INIBISCONO L'ADESIONE DI CELLULE ESPRIMENTI uPAR ALLA VITRONECTINA

L'uPAR è un recettore non integrinico della VN e promuove l'adesione cellulare ad essa (Wei et al., 1994) (Montuori et al., 2002). E' stata, quindi, valutata la capacità dei composti selezionati per SB-VS di inibire l'adesione di cellule uPAR-293 alla VN.

Le cellule uPAR-293 sono state incubate su VN immobilizzata su plastica in presenza o in assenza dei 41 composti individuati per SB-VS. Le cellule adese sono state colorate con crystal-violetto e l'assorbanza dell'eluato letta a 540 nm (Fig. 29). Sono stati selezionati in questo modo 4 composti particolarmente efficaci nell'inibire significativamente l'adesione di cellule uPAR-293 alla VN, indicati come 6, 13, 24 e 37.

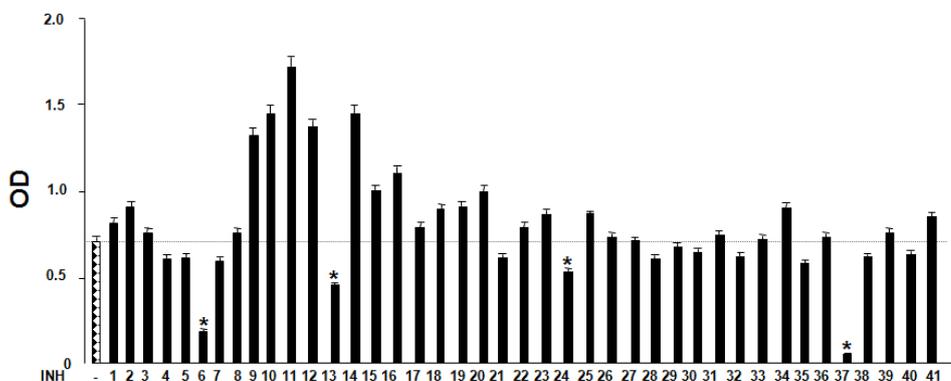


Fig. 29 Valutazione della capacità di inibire l'adesione di cellule uPAR-293 alla VN dei composti selezionati per SB-VS. Cellule uPAR-293 sono state incubate su VN per 1 ora in presenza dei 41 composti individuati per SB-VS (50 $\mu\text{mol/L}$) o DMSO (-), come controllo. Le cellule adese sono state fissate, colorate con crystal-violetto, il colorante eluito e l'assorbanza (OD) dell'eluato letta a 540 nm con uno spettrofotometro. I valori rappresentano la media di tre esperimenti effettuati in triplicato; (*) $p \leq 0.05$ determinata mediante il t-test di Student.

Al fine di controllare che la diminuita adesione in presenza di tali composti fosse realmente dovuta all'inibizione dell'adesione cellulare e non alla loro tossicità, è stato effettuato un saggio MTS-PES per misurare la vitalità cellulare in presenza dei quattro composti. Le cellule uPAR-293 sono state poste in assenza di siero e quindi incubate per 1 o 24 ore con i composti 6, 13, 24 e 37 alla stessa concentrazione usata nel saggio di adesione, o con DMSO come controllo. Due dei quattro composti, il 13 e il 24, sono risultati tossici e, per tale ragione, esclusi dallo studio (non mostrato).

Al fine di confermare la specificità per l'uPAR dei due composti rimasti, sono stati ripetuti saggi di adesione su VN utilizzando, questa volta, sia cellule uPAR-293, sia cellule V-293, trasfettate con il vettore vuoto e quindi uPAR-negative. I risultati dell'esperimento indicano che i composti 6 e 37 sono specifici per l'uPAR espresso sulla superficie cellulare in quanto inibiscono in maniera significativa solo l'adesione delle cellule che iper-esprimono il recettore, non esercitando alcun effetto sull'adesione delle cellule uPAR-negative (la cui adesione alla VN è mediata dalle integrine) (Fig. 30A). Dimostrata la specificità dei composti per l'uPAR, è stata valutata la loro specificità anche per il substrato, la VN. Sono stati quindi effettuati saggi di adesione cellulare anche sulla fibronectina; i risultati hanno confermato che entrambi i composti selezionati inibiscono l'adesione delle cellule uPAR-293 alla VN senza sortire alcun effetto sull'adesione delle cellule uPAR-293 alla fibronectina (Fig. 30B).

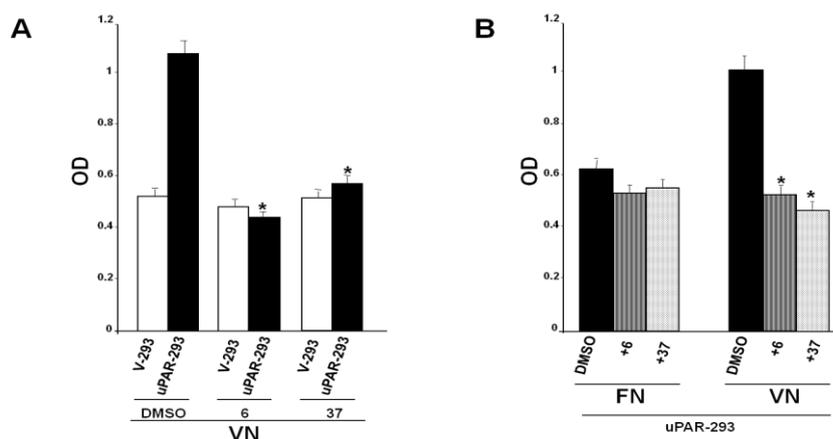


Fig. 30 I composti 6 e 37 inibiscono specificamente l'adesione di cellule uPAR-293 alla VN. **A)** Cellule V-293 e uPAR-293 sono state incubate su VN in presenza dei composti 6 e 37 (50 $\mu\text{mol/L}$) o di DMSO, come controllo. Le cellule adese sono state fissate, colorate con crystal-violetto, il colorante eluito e l'assorbanza (OD) dell'eluato letta a 540 nm con uno spettrofotometro. **B)** Cellule uPAR-293 sono state incubate su VN o FN in presenza dei composti 6 e 37 (50 $\mu\text{mol/L}$) o di DMSO, come controllo. Le cellule adese sono state fissate, colorate con crystal-violetto, il colorante eluito e l'assorbanza (OD) dell'eluato letta a 540 nm con uno spettrofotometro.

I valori rappresentano la media di tre esperimenti effettuati in triplicato; (*) $p \leq 0.05$ determinata mediante il t-test di Student.

4.2.2 I COMPOSTI 6 E 37 INIBISCONO LA MIGRAZIONE CELLULARE uPAR-DIPENDENTE

I composti 6 e 37, interagendo con i residui aminoacidici responsabili dell'interazione fra uPAR e VN, sono capaci di inibire il processo di adesione cellulare dipendente da tale legame. Ci siamo, quindi, chiesti se essi fossero capaci di inibire anche il processo di migrazione cellulare.

Cellule uPAR-293 sono state poste a migrare su VN verso siero, in camere di Boyden, in presenza o in assenza del composto 6 o del composto 37. I risultati, espressi come percentuale delle cellule migrate in presenza del chemioattrattante rispetto al numero di cellule migrate in assenza del chemioattrattante, hanno mostrato che entrambi i composti inibiscono la migrazione cellulare verso tutti i chemioattrattanti utilizzati (Fig. 31A), probabilmente a causa dell'inibizione dell'adesione alla VN.

Al fine di valutare la specificità per l'uPAR dei composti selezionati anche nel processo di migrazione sono stati effettuati ulteriori saggi di migrazione verso FBS, che contiene VN, sia con cellule uPAR-293 che V-293, questa volta utilizzando come substrato il collagene (CG). Sia il composto 6 che il 37 sono stati in grado di inibire specificamente la migrazione delle cellule uPAR-293 anche su CG, non influenzando la migrazione delle cellule V-293 (Fig. 31B). In base ai risultati ottenuti precedentemente, ci siamo chiesti se i due composti inibivano la migrazione verso la VN contenuta nel siero (e in questo caso le cellule avrebbero potuto migrare verso altri chemioattrattanti presenti nel siero) o se invece stavano inibendo i meccanismi di migrazione uPAR-dipendente, a prescindere dalla VN. Per valutare questa ipotesi, abbiamo effettuato saggi di migrazione in un sistema che escludesse completamente la VN, ponendo a migrare le cellule uPAR-293, in presenza o in assenza dei composti, su CG, verso ATF o fMLF. I composti hanno inibito la migrazione delle cellule uPAR-293 verso ATF e fMLF in maniera, dunque, del tutto indipendente dalla VN (Fig. 31C).

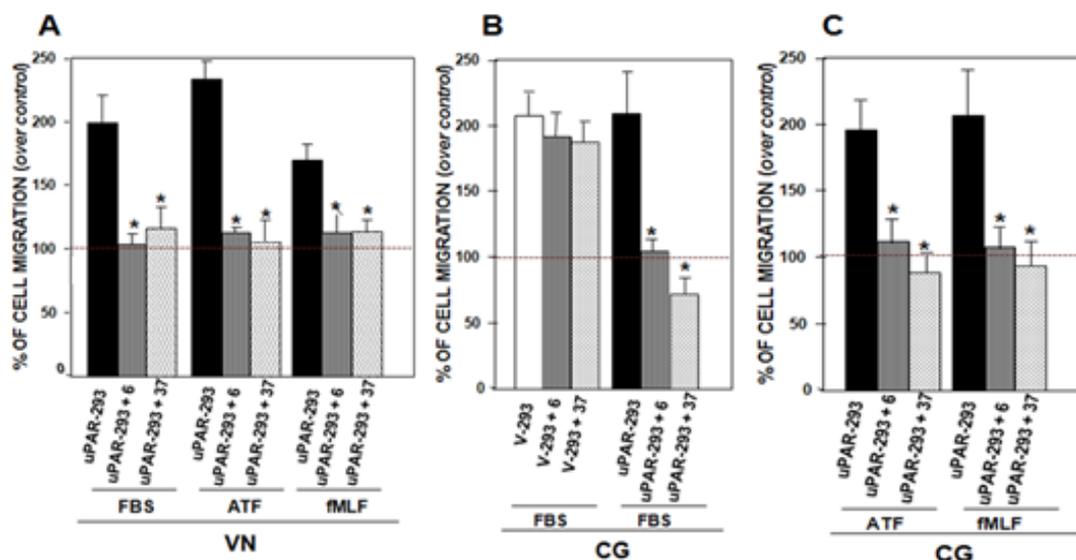


Fig. 31 I COMPOSTI 6 E 37 INIBISCONO LA MIGRAZIONE CELLULARE uPAR-DIPENDENTE **A)** Cellule uPAR-293 sono state pre-incubate con 50 $\mu\text{mol/L}$ del composto 6 o 37 oppure con DMSO, come controllo. Le cellule quindi sono state poste a migrare su filtri ricoperti con VN, verso 10%FBS, ATF oppure fMLF, in camere di Boyden. Le cellule migrate sono state fissate, colorate in ematossilina e contate. **B)** Cellule uPAR-293 e V-293 sono state pre-incubate con 50 $\mu\text{mol/L}$ del composto 6 o 37 oppure con DMSO, come controllo. Le cellule quindi sono state poste a migrare verso 10%FBS su filtri ricoperti con CG in camere di Boyden. Le cellule migrate sono state fissate, colorate in ematossilina e contate. **C)** Cellule uPAR-293 sono state pre-incubate con 50 $\mu\text{mol/L}$ del composto 6 o 37 oppure con DMSO, come controllo. Le cellule quindi sono state poste a migrare verso ATF o fMLF su filtri ricoperti con CG, in camere di Boyden. Le cellule migrate sono state fissate, colorate in ematossilina e contate.

I risultati sono stati espressi come percentuale delle cellule che hanno migrato in presenza del chemioattrattante rispetto a quelle che hanno migrato in assenza del chemioattrattante. Il 100% rappresenta la migrazione in assenza dei composti. I valori rappresentano la media di tre esperimenti effettuati in triplicato; (*): $p \leq 0.05$ determinata mediante il t-test di Student.

L'inibizione della migrazione controllata da uPAR, in un sistema privo di VN, ci ha suggerito che i composti selezionati potessero agire interferendo con le interazioni dell'uPAR con i suoi partners.

In realtà, il composto 6 si estende nella cavità dell'uPAR in cui si trova il sito di legame per la VN, formando legami a idrogeno e interazioni idrofobiche con i residui chiave del sito. In particolare, è stato predetto tramite il software GLIDE, che il gruppo OH in posizione due del composto 6 formi due legami a idrogeno, uno dei quali uno col residuo S88 e che il gruppo OH in posizione cinque dello stesso composto stabilisca un legame a idrogeno con il residuo R91. Il composto 6, quindi, bloccherebbe due residui coinvolti anche nell'interazione uPAR-fMLF-Rs, ovvero S88 e R91.

Il composto 37, invece, è costituito da due centri chirali e può dare vita quindi a 4 diastereoisomeri, (R,S)-37, (R,R)-37, (S,S)-37, (S,R)-37. Poichè il campione fornito da NCI è un mix racemico con un rapporto diastereomerico non determinato, non è chiaro se solo uno di essi o tutti e quattro possano contribuire all'inibizione. Il punteggio, assegnato dal software GLIDE ad ogni isomero, suggerisce che l'isomero (R,S)-37 sia quello in grado di stabilire dei legami più saldi con l'uPAR; esso interagirebbe con vari residui aminoacidici dell'uPAR, incluso R91.

Tali considerazioni, associate ai risultati di migrazione, ci hanno spinto ad esplorare la possibilità che tali composti possano inibire l'interazione uPAR-fMLF-Rs.

4.2.3 I COMPOSTI 6 E 37 INIBISCONO L'INTERAZIONE DI uPAR CON FPR1

Per valutare se i composti 6 e 37 siano capaci di inibire l'interazione fra uPAR e fMLF-Rs, sono stati effettuati esperimenti di co-immunoprecipitazione con cellule uPAR-293 in presenza dei composti.

Cellule uPAR-293 sono state incubate per 16 ore in DMEM 0,1%BSA in presenza del composto 6 o del composto 37 o con DMSO come controllo negativo. I lisati cellulari sono stati, poi, incubati con anticorpo monoclonale anti-uPAR o con immunoglobuline (Igs) non immuni, come controllo, e, successivamente, con proteina A-Sepharosio; l'eluato è stato poi analizzato per Western blot, con anticorpo policlonale anti-FPR1, o con Igs non immuni come controllo. I risultati mostrano che l'uPAR co-immunoprecipita con FPR1 nelle cellule uPAR-293 non trattate con i composti selezionati; la co-immunoprecipitazione risulta completamente inibita dal composto 6 e parzialmente dal composto 37. Nessuna banda è presente nelle cellule uPAR-293 immunoprecipitate con Igs non immuni o nei campioni ibridati con Igs non immuni (Fig. 32).

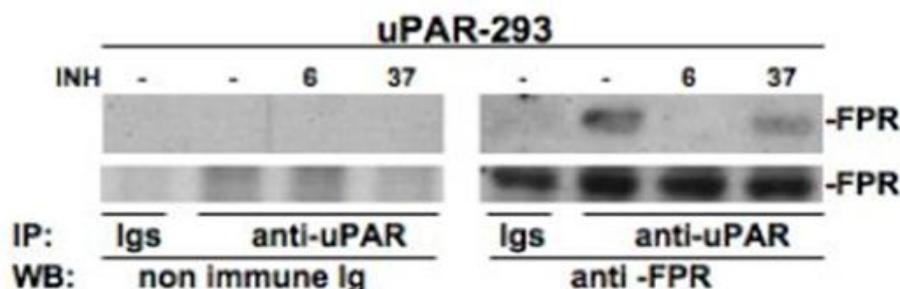


Fig. 32 I COMPOSTI 6 E 37 INIBISCONO L'INTERAZIONE uPAR/FPR1. Cellule uPAR-293 sono state incubate per 16 ore in assenza di siero con i composti 6 o 37 o con DMSO, come controllo. I lisati cellulari sono stati immunoprecipitati con anticorpo monoclonale anti-uPAR o con immunoglobuline non immuni di controllo (Igs) e analizzati per Western blot con anticorpo anti-FPR1 (pannello a destra) o con immunoglobuline (Ig) non immuni (pannello a sinistra).

4.3 DISCUSSIONE

Espressione e funzioni di uPAR sono potenzialmente coinvolti in ogni fase della formazione e della progressione tumorale, quindi, la regolazione delle funzioni dell'uPAR può essere di grande importanza nelle strategie anti-tumorali. L'uPAR, infatti, ha un ruolo fondamentale nell'attivazione della cascata proteolitica sulla superficie della cellula attraverso il legame con uPA e media adesione e migrazione cellulare sulla VN, particolarmente abbondante nei tumori. L'obiettivo di questa parte dello studio è stato proprio identificare piccole molecole che, inibendo il legame dell'uPAR con i suoi ligandi extra-cellulari, potessero bloccare la migrazione cellulare e l'invasione dell'ECM. Poiché composti diretti contro il legame uPAR/uPA sono stati recentemente descritti (Ngo et al., 2011), ci siamo focalizzati sull'identificazione di composti diretti contro il legame dell'uPAR con l'altro suo ligando extra-cellulare, la VN. Composti organici sono stati disegnati in base alla struttura del sito dell'uPAR per la VN e selezionati da una libreria virtuale, per ottenere molecole in grado di bloccare, potenzialmente, il sito di interazione dell'uPAR con la VN. Quest'analisi ha portato all'identificazione di due composti specifici per il sito di legame fra uPAR e VN, il 6 e il 37; entrambi si sono rivelati capaci di inibire specificamente l'adesione di cellule uPAR-293 alla VN, e la loro migrazione, senza esercitare alcun effetto sulle cellule controllo uPAR-negative. Valutando con attenzione i due composti selezionati è emerso che il composto 6 bloccherebbe gli aminoacidi R91 e S88, e il composto 37 solo l'aminoacido R91 i residui coinvolti nel legame di uPAR a fMLF-Rs. Infatti, i due composti inibiscono, totalmente o parzialmente, l'associazione fisica di uPAR a FPR1, come dimostrato dai saggi di co-immunoprecipitazione e inibiscono la migrazione uPAR-dipendente, indipendentemente dalla VN.

CAPITOLO 5

CONCLUSIONI

5.1 CONCLUSIONI

Protagonista di questo progetto di dottorato è l'uPAR, una componente chiave del sistema di attivazione del plasminogeno. Inizialmente si riteneva che l'uPAR fosse coinvolto solo nella regolazione delle attività proteolitiche dipendenti dal suo ligando, l'urochinasasi (uPA), successivamente è apparso chiaro che il suo coinvolgimento in vari altri processi biologici, quali adesione e migrazione, differenziazione, sopravvivenza e proliferazione cellulare, avvenisse anche indipendentemente dall'attività proteolitica dell'uPA (Ragno, 2006). Il coinvolgimento in tali processi implica la capacità, da parte dell'uPAR, privo di un dominio transmembrana e citosolico, di attivare vie di segnalazione intracellulare. L'uPAR, quindi, per espletare tale attività, deve necessariamente interagire con altre molecole di superficie adiacenti in grado di segnalare. E' generalmente accettato che i principali partners di segnale dell'uPAR siano le integrine, con le quali è stata dimostrata la sua interazione fisica (Tang et al., 2008). Numerose evidenze sperimentali, tuttavia, indicano che l'uPAR si associa anche ad altre molecole potenzialmente capaci di contribuire alla trasduzione del segnale uPAR-dipendente e la cui attività è spesso regolata dall'uPAR stesso. Tuttavia, un'interazione fisica tra tali molecole e l'uPAR non è mai stata dimostrata.

Un primo obiettivo della mia ricerca è stato quello di chiarire il possibile ruolo co-recettoriale dei recettori per il peptide formilato fMLF, recettori specializzati nella chemiotassi. La nostra ricerca si è incentrata su tali recettori in quanto nel 2002 è stato dimostrato che la forma solubile e tronca dell'uPAR, costituita dai domini DII-DIII e con esposta, all'estremità N-terminale, la specifica sequenza SRSRY (aa 88-92), è un ligando del recettore a bassa affinità per fMLF, FPR2 (Resnati et al.). Uno studio successivo del 2004, ha, inoltre, dimostrato che la stessa forma solubile dell'uPAR regola la migrazione dei monociti verso le chemochine MCP-1 e RANTES attraverso la sua interazione con FPR2 (Furlan et al.). Per l'uPAR di membrana, invece, erano state dimostrate solo interazioni funzionali con gli fMLF-Rs. Ad esempio, era stato riportato che la migrazione cellulare verso uPA, mediata da uPAR, è possibile solo se sono espressi gli fMLF-Rs e, viceversa, la migrazione verso fMLF richiede, oltre all'espressione degli specifici recettori, anche quella di uPAR di membrana (Montuori et al., 2002); inoltre, era stato riportato che l'uPAR di membrana è in grado di regolare l'attività del recettore della chemiochina SDF-1, CXCR4, attraverso un meccanismo che coinvolge sia fMLF-Rs che integrine (Montuori et al., 2011). Nel loro insieme tali dati ci hanno spinto ad esplorare la possibilità che anche l'uPAR di membrana possa essere un ligando endogeno degli fMLF-Rs, come la forma solubile, ed, eventualmente, che possa utilizzarli come partner di segnale.

L'uPAR è stato espresso in una linea cellulare uPAR-negativa, le HEK-293, in modo da poter caratterizzare lo stesso tipo cellulare esprimente o meno uPAR. Sono stati condotti, innanzitutto, esperimenti di immunofluorescenza, per chiarire l'eventuale vicinanza sulla membrana dell'uPAR e di FPR1, l'fMLF-R più espresso in cellule HEK-293. Tali esperimenti hanno dimostrato che l'uPAR co-localizza con FPR1 a livelli paragonabili alla co-localizzazione, già ampiamente mostrata in letteratura, fra uPAR e integrine e che tale co-localizzazione subisce un significativo incremento in seguito a stimolo generico, come il siero, o specifico, come un ligando degli fMLF-Rs. È interessante sottolineare che, in presenza di uPAR, anche fMLF-Rs e integrine co-localizzano e che, anche in questo caso, i livelli di co-localizzazione incrementano fortemente dopo stimolazione, suggerendo l'esistenza di un complesso trimolecolare sulla superficie cellulare, la cui formazione è promossa da stimoli e che, quindi, ha probabilmente un significato funzionale. Abbiamo poi dimostrato che l'uPAR co-immunoprecipita e quindi interagisce direttamente con tutti e tre i recettori per fMLF.

L'obiettivo successivo è stato indagare circa il possibile ruolo funzionale dell'interazione dell'uPAR con fMLF-Rs e integrine nell'ambito della migrazione cellulare. Sia le cellule iperesprimenti uPAR (uPAR-293) che le cellule controllo uPAR-negative (V-293), migrano efficacemente verso siero. Tuttavia, anticorpi anti-uPAR, che bloccano tutte le interazioni possibili del recettore con le varie molecole di superficie, il peptide P-25, che inibisce in modo specifico l'interazione uPAR-integrine, la desensibilizzazione degli fMLF-Rs, bloccano la migrazione delle cellule uPAR-293 verso siero, non sortendo alcun effetto sulla migrazione delle cellule V-293. Tali risultati indicano che le cellule usate possono utilizzare meccanismi di migrazione sia uPAR-indipendenti, sia uPAR dipendenti e che l'uPAR, una volta espresso, governa la migrazione interagendo con i recettori dell'fMLF e con le integrine. La migrazione uPAR-dipendente, inoltre, coinvolge piccole GTPasi Rho e Rac, non utilizzate nella via di segnalazione uPAR-indipendente. Al fine di escludere che i risultati ottenuti dipendessero dall'uso, come chemioattrattante, del siero che può contenere ligandi di uPAR, come uPA e soprattutto VN, abbiamo condotto esperimenti di migrazione analoghi, usando però un chemioattrattante purificato, l'EGF, che non è ligando dell'uPAR. I risultati ottenuti erano sovrapponibili ai precedenti, suggerendo che essi sono dovuti alla capacità dell'uPAR di regolare i meccanismi di migrazione in generale e non semplicemente verso un proprio ligando.

Gli esperimenti condotti, tuttavia, mostravano che la neutralizzazione di tutte le attività di legame dell'uPAR, ritenute cruciali per la sua capacità di controllare la migrazione cellulare, non permetteva alle cellule uPAR-293 di ripristinare i meccanismi uPAR-indipendenti. Poiché l'unica parte della molecola non ancora presa in considerazione negli esperimenti effettuati era l'ancora GPI, ci siamo focalizzati sul suo possibile ruolo nella migrazione uPAR-dipendente. Abbiamo innanzitutto dimostrato che la fosfolipasi C fosfatidilinositolo specifica (PI-PLC) che degrada l'ancora lipidica dell'uPAR, non riduce la migrazione delle cellule uPAR-293. Poiché le molecole legate alla membrana tramite ancora GPI si localizzano preferenzialmente in particolari microdomini della membrana conosciuti come *lipid rafts*, capaci di aggregare, nel versante citoplasmatico, mediatori di segnale intracellulare, abbiamo ipotizzato che l'ancora GPI potesse espletare il suo ruolo nei meccanismi di migrazione uPAR-dipendenti attraverso la sua associazione

ai *lipid rafts*. Abbiamo quindi pre-trattato le cellule uPAR-293 con metil- β -ciclodestrina, in grado di disgregare i *lipid rafts*, dimostrando che le cellule sono ancora in grado di migrare recuperando l'utilizzo dei meccanismi di migrazione uPAR-indipendenti; infatti la loro migrazione non è inibita da anticorpo anti-uPAR. Tali risultati hanno indicato un ruolo cruciale dell'ancora GPI nella migrazione uPAR-dipendente, legato alla sua capacità di associarsi ai *lipid rafts*: l'ancora GPI probabilmente guida l'uPAR e i suoi corecettori in domini della membrana ricchi di mediatori di segnale.

Tutti i risultati discussi fin qui sono stati ottenuti in un sistema uPAR-negativo indotto ad esprimere elevati livelli di uPAR, quindi abbiamo deciso di effettuare esperimenti analoghi in un altro sistema cellulare che, invece, esprime costitutivamente uPAR, le cellule di carcinoma di prostata PC3. Abbiamo innanzitutto esaminato l'importanza dell'uPAR nella migrazione di tali cellule silenziandone l'espressione. L'inibizione dell'espressione di uPAR inibisce la migrazione verso siero suggerendo che, probabilmente, le cellule PC3 non hanno meccanismi di migrazione uPAR-indipendenti. A conferma di ciò, abbiamo verificato che l'inibizione delle interazioni di uPAR con integrine $\beta 1$ e con fMLF-Rs, gli inibitori delle vie di segnalazione Rho e Rac-dipendenti, ed anche i trattamenti con PI-PLC e M β CD inibiscono totalmente la loro migrazione. Quindi nelle cellule PC3, che esprimono costitutivamente elevati livelli di uPAR, il recettore è indispensabile per migrazione cellulare.

Poichè l'uPAR è iper-espresso nel cancro ed è un fattore di prognosi negativo, abbiamo parallelamente collaborato col gruppo della prof.ssa Montuori dell'Università di Napoli "Federico II", in un progetto focalizzato su possibili strategie in grado di inattivare l'uPAR. In particolare, la nostra attenzione si è focalizzata sulla caratterizzazione funzionale di potenziali inibitori dell'interazione dell'uPAR con la VN, legame che si verifica in misura maggiore durante i processi tumorali di invasione e metastasi e durante processi infiammatori. 41 composti organici sono stati selezionati da una libreria virtuale per ottenere molecole in grado di bloccare, potenzialmente, il sito di interazione dell'uPAR con la VN. Sono stati identificati due composti specifici per uPAR, in grado di inibire adesione alla VN e migrazione cellulare uPAR-dipendente. In base all'osservazione che tali composti bersagliano due aminoacidi, R91 e S88 contenuti sia nel sito di legame dell'uPAR per la VN sia nella regione di legame per fMLF-Rs, abbiamo condotto esperimenti che dimostrano che i due composti inibiscono l'interazione uPAR-fMLF-Rs.

In conclusione abbiamo dimostrato che esiste un'associazione tra uPAR, fMLF-Rs e integrine, in grado di regolare in generale il processo di migrazione cellulare, cruciale durante i processi di invasione e metastasi della cellula cancerosa che iper-esprime il recettore. La nostra ipotesi, fortemente supportata da un recente lavoro incentrato sul ruolo dei *lipid rafts* e dell'interazione uPAR-integrine nella migrazione cellulare (Grove et al, 2014), prevede che l'uPAR legghi contemporaneamente fMLF-Rs e integrine, avvicinandole sulla superficie cellulare, in modo che gli uni possano attivare le altre, guidandoli poi nei *lipid rafts*, regioni altamente efficienti nella segnalazione cellulare. Tale attività può essere bloccata da due composti in grado di bloccare anche l'interazione dell'uPAR con la VN.

CAPITOLO 6

MATERIALI E METODI

6.1 REAGENTI

Il frammento aminoterminale dell'uPA (ATF), il peptide formilato fMLF e l'anticorpo policlonale di coniglio anti-uPAR (399) sono stati acquistati presso l'American Diagnostica (Greenwich, CT). L'anticorpo policlonale di coniglio diretto contro la sequenza SRSRY dell'uPAR è stato fornito dalla PRIMM (Milano, Italia). Gli anticorpi monoclonali di topo anti-uPAR, R2 e R4, sono stati gentilmente donati dalla Dott.ssa G. Hoyer-Hansen (Copenaghen, Danimarca). Gli anticorpi monoclonali di topo anti-Integrina β 1 e anti-FPR2, e gli anticorpi policlonali di coniglio anti-Integrina β 1, anti-FPR1 e anti-FPR3 sono stati acquistati presso Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA). L'anticorpo policlonale di coniglio anti- β -actina, gli anticorpi monoclonali di topo anti-tubulina, gli inibitori di PI3K e ERK, il cocktail di inibitori di proteasi, la metil- β -ciclodestrina e la soluzione di Trypan blue sono prodotti dalla SIGMA (St. Louis, MO). Anche i SiRNA-uPAR e SiRNA-controllo utilizzati per la trasfezione sono stati acquistati dalla SIGMA.

Gli inibitori di GEF specifici per Rac, Trio e Tiam1, e delle chinasi associate a Rho (ROCK) sono stati forniti da Calbiochem (Damstadt, Germania). La sequenza di DNA di EGFP-uPAR, inserita nel vettore pEGFP-N1, è stata gentilmente donata dal Dr. N. Sidenius (IFOM, Milano), e il cDNA degli fMLF-Rs dal Dr. M. Perretti (William Harvey Research Institute, Londra, UK). I peptidi WKYMV e P-25 (AESTYHHLSLGYMYTLN) sono stati sintetizzati dalla PRIMM (Milano, Italia). I filtri per chemiotassi sono della Whatman Int. (Kent, UK). Gli anticorpi secondari anti-topo e anti-coniglio coniugati alla perossidasi di rafano e le immunoglobuline (IgG) non immuni di topo e di coniglio sono stati forniti dalla BioRad (Richmond, CO). Gli anticorpi secondari coniugati a Cy3 o Alexa 488 sono stati acquistati da Jackson Immunoresearch (West Grove, PA); il kit Prolong Anti-Fade, la Lipofectamina 2000 e l'oligofectamina sono prodotti da Invitrogen (Grand Island, NY). La PI-PLC è stata acquistata dalla Boehringer Mannheim Biochemica. Il collagene è stato fornito da Collaborative Research (Bedford, MA), la vitronectina da Becton Dickinson Bioscience (New Jersey, USA), la fibronectina da Roche (UK). Il kit di chemiluminescenza (ECL) è della Amersham International (Amersham, England) e la membrana di polivinildifluoruro (PVDF) della Millipore (Windsor, MA).

6.2 COLTURE CELLULARI

Sono state utilizzate cellule umane embrionali di rene (Human Embryonic Kidney, HEK-293) e cellule umane di carcinoma di prostata (PC3 cells). Entrambe queste linee

cellulari sono state coltivate in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), arricchito con siero fetale bovino al 10% (FBS) e Glutamina 2mM. Le cellule sono state mantenute in coltura come monostrato in incubatore a 37°C, 5% di CO₂; sono state tripsinizzate con 0,5% tripsina con frequenza settimanale.

6.3 TRASFEZIONI

Cellule HEK-293, uPAR-negative, sono state stabilmente trasfettate con il cDNA di uPAR clonato nel sito EcoRI del vettore pcDNA3 (cellule uPAR-293) o col vettore vuoto pcDNA3 (cellule V-293), come controllo. Le cellule uPAR-293 sono state, poi, transientemente trasfettate con il cDNA di FPR1, FPR2 e FPR3 o con cDNA di uPAR, clonato nel vettore pEGFP-N1, o con i rispettivi vettori vuoti. 2,5x10⁶ cellule, incubate in piastre da 60 mm, sono state trasfettate con 9 µg di DNA e 22,5 µl di Lipofectamina 2000 (Invitrogen) in DMEM senza siero per 5 ore a 37°C (5% CO₂). Le cellule sono poi state lisate dopo 48 ore per i saggi di co-immunoprecipitazione o trattate per gli esperimenti di immunofluorescenza.

Nel caso di cellule PC3 1x10⁵ cellule sono state incubate in piastre da 35 mm e trasfettate con 100 nM SiRNA-uPAR o SiRNA controllo in mezzo di coltura senza antibiotico usando 4 µl di Oligofectamina, per 20 minuti. Le cellule sono state incubate per 48 ore a 37°C 5%CO₂ e, poi, una parte di esse è stata lisata in 1% TX-100 per l'analisi per Western Blot, un'altra parte è stata utilizzata per allestire i saggi di migrazione cellulare in camere di Boyden.

6.4 WESTERN BLOT

Le cellule sono state lisate in 1%TX-100 e/o in tampone Ripa Buffer in presenza di un cocktail di inibitori di proteasi e di fosfatasi. La concentrazione proteica è stata determinata mediante un saggio colorimetrico (Bio-Rad) ed un'uguale quantità di proteina per ogni campione è stata sottoposta ad elettroforesi su gel di poliaccrilammide al 10% in SDS (SDS-PAGE). Le proteine sono state poi trasferite dal gel ad una membrana di PVDF (Millipore) mediante elettroblot (60 Volts per tre ore per il saggio di co-immunoprecipitazione, 100 Volts per un'ora per i Western blot). Al termine del trasferimento, il filtro è stato incubato per un'ora a temperatura ambiente con la soluzione di "blocking" (100 mM Tris-HCl pH 8, 1.5 M NaCl, 0.1% Tween-20, 5% latte magro liofilizzato), e per 16 ore a 4° C con anticorpo primario. Dopo tre lavaggi di 10 minuti a temperatura ambiente in 100 mM Tris-HCl pH 8, 1.5 M NaCl, 0.1% Tween-20 (pH 8), il filtro è stato incubato a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario per 45', nuovamente lavato per 3 volte e sottoposto al sistema di rivelazione "ECL plus" (Amersham Pharmacia Biotech).

6.5 SAGGI DI IMMUNOFLUORESCENZA

Cellule uPAR-293 o V-293 cresciute su vetrini e transientemente trasfettate con cDNA di FPR1, o cellule HEK-293, cresciute su vetrini e transientemente trasfettate con EGFP-uPAR o col vettore vuoto pEGFP-N1 sono state lavate e fissate 10 minuti in 4% paraformaldeide. Le cellule uPAR-293 trasfettate con cDNA di FPR1, sono state, poi, incubate per 1 ora a temperatura ambiente con 4 µg/ml di anticorpo monoclonale anti-uPAR R4 e 2 µg/ml di anticorpo policlonale di coniglio anti-FPR1, o con 4 µg/ml di anticorpo monoclonale anti-uPAR R4 e 4 µg/ml di anticorpo policlonale di coniglio anti-integrine β1 e successivamente con anticorpi secondari coniugati con Cy3 o Alexa 488. Le cellule HEK-293 trasfettate con EGFP-uPAR o col vettore pEGFP-N1, sono state incubate per 1 ora a temperatura ambiente con 2 µg/ml di anticorpo policlonale di coniglio anti-FPR1 e 4 µg/ml di anticorpo monoclonale di topo anti-integrine β1 e successivamente con anticorpi secondari coniugati con Alexa 594 o Cy5. I vetrini della fluorescenza sono stati, quindi, montati usando il kit Prolong AntiFade sui vetrini porta oggetti. Le immagini sono state acquisite con il microscopio confocale LSM 510 (Carl Zeiss MicroImage) provvisto di un rifrattore Apo 63 e di un obiettivo ad immersione in olio NA 1.4. La percentuale di co-localizzazione dei segnali di fluorescenza è stata misurata attraverso il software LSM 510 4.0 SP2. La percentuale di co-localizzazione è stata quantificata su almeno 50 cellule.

6.6 SAGGI DI CO-IMMUNOPRECIPITAZIONE

Le cellule uPAR-293 o V-293 sono state lavate per due volte con un buffer per stabilizzare i microtubuli (Pipes 0.1 M pH 6.9, glicerolo 2 M, EGTA 1 mM, acetato di magnesio 1 mM) e poi lisate con 0,2% Triton X-100 con inibitori di proteasi e lasciate in ghiaccio per 5 minuti. Il lisato è stato centrifugato e il precipitato è stato sottoposto a una seconda lisi con tampone RIPA (NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7.5, deossicolato 1%, SDS 0.1%, Triton X-100 1%, inibitori delle proteasi) per 20 minuti in ghiaccio. Dopo centrifugazione, il lisato in RIPA è stato pre-incubato con IgG non immuni di coniglio e proteina A-Sepharosio al 50% per 2 ore a 4°C, per eliminare le molecole del lisato in grado di legare aspecificamente Ig e resina. Dopo 2 ore le cellule sono state centrifugate e il contenuto proteico del sovrantante è stato misurato con un saggio colorimetrico (BioRad); 0,5 mg di proteine sono stati incubati con 3 µg/ml di anticorpo policlonale di coniglio anti-FPR1 o anti-FPR3, o con anticorpo monoclonale di topo anti-FPR2, o con 3 µg/ml di IgG di coniglio o di topo non immune, come controllo, per 2 ore a 4°C in agitazione. E' stata poi aggiunta ad ogni campione la proteina A-Sepharosio al 20%, incubando a temperatura ambiente per altri 30 minuti. La resina infine è stata lavata per 10 volte con tampone RIPA, e l'immunoprecipitato eluito. I campioni sono stati sottoposti a elettroforesi su gel al 10% di poliacrilammide in SDS e analizzati per Western Blot con anticorpo monoclonale anti-uPAR R2 (1µg/ml) per i campioni immunoprecipitati con gli anticorpi anti-FPR1 e anti-FPR3, o con anticorpo policlonale anti-uPAR 399 (2 µg/ml) per il campione immunoprecipitato con anticorpo anti-FPR2. I filtri sono stati poi incubati con anticorpi secondari e le bande rilevate col sistema "ECL plus" (Amersham Pharmacia Biotech).

Per i saggi di co-immunoprecipitazione che hanno previsto l'utilizzo dei composti "6" e "37", le cellule uPAR-293 sono state incubate in piastre da 100 mm per 24 ore in mezzo privo di siero e successivamente incubate per 16 ore con DMEM 0,1%BSA contenente i composti o DMSO, come controllo. Le cellule sono state quindi lisate direttamente in RIPA e, successivamente, pre-incubate con IgG non immuni di topo e proteina A-Sefarosio al 50% per 2 ore a 4°C. Dopo centrifugazione, i sovranatanti sono stati incubati con 2 µg/ml di anticorpo monoclonale anti-uPAR R2 o con 2 µg/ml di IgG di topo non immune, come controllo, per 2 ore a 4°C. Sono stati, quindi, aggiunti ad ogni campione la proteina A-Sefarosio al 20% lasciando ad incubare a temperatura ambiente per altri 30 minuti. La resina infine è stata lavata per 10 volte con tampone RIPA, e l'immunoprecipitato eluito. I campioni sono stati sottoposti a elettroforesi su gel al 10% di poliacrilammide in SDS e analizzati per Western Blot con anticorpo policlonale anti-FPR1 o con IgG di coniglio come controllo negativo.

6.7 SAGGI DI MIGRAZIONE CELLULARE

I saggi di migrazione sono stati effettuati in camera di Boyden (Boyden S.V.,1962). I filtri, di policarbonato con pori dal diametro di 8µm, sono stati incubati con 50µg/ml di collagene (CG) di tipo IV o con 5 µg/ml di vitronectina (VN) per 16 ore a 4°C. Sono state quindi allestite le camere di Boyden per l'esperimento. Le camere inferiori sono state riempite con 210 µl di DMEM contenente o meno il chemioattrattante FBS al 10%, oppure EGF (100 ng/ml), o fMLF (100 nM), o ATF (10 nM). Sulle camere inferiori sono stati poi montati e fissati i filtri sui quali sono stati stratificati 800 µl della sospensione cellulare (2×10^5 cellule HEK-293 trasfettate o 1×10^5 cellule PC3). Le camere complete sono state incubate per 4 ore (HEK-293 trasfettate) o per 2 ore (PC3) a 37°C, in atmosfera contenente CO₂ al 5%. Le cellule sono state, poi, fissate in etanolo e colorate con ematossilina, successivamente contate in 10 campi per ciascun filtro ad un ingrandimento di 200 X. In alcuni esperimenti le cellule trasfettate sono state pre-incubate per 1 ora a temperatura ambiente con 5 µg/ml di anticorpo policlonale di coniglio diretto contro l'uPAR (399) o contro la sequenza SRSRY (aa 88-92) dell'uPAR, o con 50 µM peptide P-25, oppure sono state incubate per 1 ora a 37°C con 5 nM Peptide WKYMV, o con PI-PLC per 1 ora a temperatura ambiente, oppure con 10 µM inibitore di Rho o 50 µM di inibitore di Rac o 10 µM di inibitore di ERK o con 20 µM inibitore di PI3K per 30 minuti a 37°C, oppure, infine, con metil-β-ciclodestrina 15 minuti (uPAR/293) o 30 minuti (PC3). Nei saggi di migrazione effettuati per saggiare l'efficacia degli inibitori dell'interazione uPAR-VN, le cellule trasfettate sono state incubate per 30 minuti a 37°C con i suddetti inibitori alla concentrazione di 50 µM.

L'analisi statistica dei risultati ottenuti con i saggi di migrazione cellulare è stata effettuata mediante il software PRISM (GraphPad, San Diego, CA) attraverso il t-test di Student.

6.8 SAGGI DI ADESIONE CELLULARE

1 µg di vitronectina o fibronectina o BSA1% in PBS, come controllo negativo, sono stati incubati in piastra da 96 pozzetti (100µl/pozzetto) per 16 ore a 4°C. I pozzetti sono stati poi riempiti con una soluzione 1mg/ml di BSA cotta per 1 ora a temperatura ambiente.

Le cellule sono state risospese in PBS con $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ e circa 10^5 cellule/pozzetto sono state incubate a 37°C per 1 ora. Le cellule adese sono state fissate con 3% paraformaldeide in PBS per 10 minuti e successivamente incubate con metanolo al 2% per 10 minuti. Le cellule sono state quindi colorate con 0,5% crystal-violetto in metanolo 20% e il colorante fissatosi alle cellule è stato eluito con citrato di sodio 0,1 M in etanolo al 50% a pH 4,2. L'assorbanza dell'eluato è stata misurata con uno spettrofotometro a 540 nm.

6.9 ISOLAMENTO ED ANALISI DEI LIPID RAFTS

Dopo aver staccato le cellule dalla piastra con tripsina 0,5%, le cellule sono state poste in incubatore 1h a 37°C, 5% di CO_2 . Successivamente, le cellule sono state sottoposte a 3 lavaggi con DMEM e trattate con 10 mM MβCD per 15 minuti (uPAR-293) o per 30 minuti (PC3). Dopo aver allontanato la MβCD, le cellule sono state due volte con 20mM MOPS, 0,15M NaCl, pH 6.5, e lisate e poste in ghiaccio per 30 minuti in 900µl di 1% TritonX-100 con inibitori di proteasi e di fosfatasi.

Il lisato è stato mescolato con uguale volume di saccarosio 80% (V/V), in modo tale da ottenere una concentrazione finale pari al 40%, e successivamente trasferito sul fondo di una provetta da centrifuga (Beckman); sopra, sono stati stratificati 1,8ml di saccarosio 30% e 900µl di saccarosio 5%, ottenendo così un gradiente di saccarosio discontinuo.

Il gradiente è stato ultracentrifugato per 21h a 32.900 r.p.m., a 4°C, utilizzando un rotore BECKMAN SW50.1. Dal gradiente sono state raccolte, dall'alto verso il basso (dal 5% al 40%), 10 frazioni di 450µl ciascuna, al fine di permetterne l'analisi tramite Western blott.

BIBLIOGRAFIA

Aguirre Ghiso JA, Kovalski K, Ossowski L, 1999. Tumor dormancy induced by downregulation of urokinase receptor in human carcinoma involves integrin and MAPK signaling. *J Cell Biol.*, **147**(1):89-104.

Aguirre-Ghiso JA, Estrada Y, Liu D, Ossowski L, 2003. ERK(MAPK) activity as a determinant of tumor growth and dormancy; regulation by p38(SAPK). *Cancer Res.*, **63**(7):1684-95.

Alfano D, Franco P, Vocca I, Gambi N, Pisa V, Mancini A, Caputi M, Carriero MV, Iaccarino I, Stoppelli MP, 2005. The urokinase plasminogen activator and its receptor: role in cell growth and apoptosis. *Thromb Haemost.*, **93**(2):205-11.

Behrendt N, Rønne E, Ploug M, Petri T, Løber D, Nielsen LS, Schleming WD, Blasi F, Appella E, Danø K, 1990. The human receptor for urokinase plasminogen activator. NH2-terminal amino acid sequence and glycosylation variants. *J Biol Chem.*, **265**(11):6453-60.

Beschorner R, Schluesener HJ, Nguyen TD, Magdolen V, Luther T, Pedal I, Mattern R, Meyermann R, Schwab JM, 2000. Lesion-associated accumulation of uPAR/CD87- expressing infiltrating granulocytes, activated microglial cells/macrophages and upregulation by endothelial cells following TBI and FCI in humans. *Neuropathol Appl Neurobiol.*, **26**(6):522-7.

Bifulco K, Longanesi-Cattani I, Franco P, Pavone V, Mugione P, Di Carluccio G, Masucci MT, Arra C, Pirozzi G, Stoppelli MP, Carriero MV, 2012. Single amino acid substitutions in the chemotactic sequence of urokinase receptor modulate cell migration and invasion. *PLoS One.*, **7**(9):e44806.

Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA, 1993. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med.*, **4**(2):197-250.

Blasi F, Carmeliet P, 2002. uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, **3**(12):932-43.

Blasi F, Sidenius N, 2009. The urokinase receptor: focused cell surface proteolysis, cell adhesion and signaling. *FEBS Lett.*, **584**(9):1923-30.

Blasi F, Verde P, 1990. Urokinase-dependent cell surface proteolysis and cancer. *Semin Cancer Biol.*, **1**(2):117-26.

Børglum AD, Byskov A, Ragno P, Roldan AL, Tripputi P, Cassani G, Danø K, Blasi F, Bolund L, Kruse TA, 1992. Assignment of the urokinase-type plasminogen activator receptor gene (PLAUR) to chromosome 19q13.1-q13-2. *Am J Hum Genet.*, **50**(3):492-7.

Caiolfa VR, Zamai M, Malengo G, Andolfo A, Madsen CD, Sutin J, Digman MA, Gratton E, Blasi F, Sidenius N, 2007. Monomer dimer dynamics and distribution of GPI-anchored uPAR are determined by cell surface protein assemblies. *J Cell Biol.*, **179**(5):1067-82.

Campbell JJ, Qin S, Bacon KB, Mackay CR, Butcher EC, 1996. Biology of chemokine and classical chemoattractant receptors: differential requirements for adhesion-triggering versus chemotactic responses in lymphoid cells. *J Cell Biol.*, **134**(1):255-66.

Carriero MV, Stoppelli MP, 2011. The urokinase-type plasminogen activator and the generation of inhibitors of urokinase activity and signaling. *Curr Pharm Des.*, **17**(19):1944-61.

Castellino FJ, Ploplis VA, 2005. Structure and function of the plasminogen/plasmin system. *Thromb Haemost.*, **93**(4):647-54.

Chaurasia P, Aguirre-Ghiso JA, Liang OD, Gardsvoll H, Ploug M, Ossowski L, 2006. A region in urokinase plasminogen receptor domain III controlling a functional association with alpha5beta1 integrin and tumor growth. *J Biol Chem.*, **281**(21):14852-63.

Collen D, Lijnen HR, 2005. Thrombolytic agents. *Thromb Haemost.*; **93**(4):627-30.

Degryse B, Orlando S, Resnati M, Rabbani SA, Blasi F, 2001. Urokinase/urokinase receptor and vitronectin/alpha(v)beta(3) integrin induce chemotaxis and cytoskeleton reorganization through different signaling pathways. *Oncogene.*, **20**(16):2032-43.

Degryse B, Resnati M, Czekay RP, Loskutoff DJ, Blasi F, 2005. Domain 2 of the urokinase receptor contains an integrin-interacting epitope with intrinsic signaling activity: generation of a new integrin inhibitor. *J Biol Chem.*, **280**(26):24792-803.

Dublin E, Hanby A, Patel NK, Liebman R, Barnes D, 2000. Immunohistochemical expression of uPA, uPAR, and PAI-1 in breast carcinoma. Fibroblastic expression has strong associations with tumor pathology. *Am J Pathol.*, **157**(4):1219-27.

Fibbi G, Ziche M, Morbidelli L, Magnelli L, Del Rosso M, 1988. Interaction of urokinase with specific receptors stimulates mobilization of bovine adrenal capillary endothelial cells. *Exp Cell Res.*, **179**(2):385-95.

Furlan F, Orlando S, Laudanna C, Resnati M, Basso V, Blasi F, Mondino A, 2004. The soluble D2D3(88-274) fragment of the urokinase receptor inhibits monocyte chemotaxis and integrin-dependent cell adhesion. *J Cell Sci.*, **117**(Pt 14):2909-16.

Gyetko MR, Todd RF 3rd, Wilkinson CC, Sitrin RG, 1994. The urokinase receptor is required for human monocyte chemotaxis in vitro. *J Clin Invest.*, **93**(4):1380-7.

Giebeler A, Streetz KL, Soehnlein O, Neumann U, Wang JM, Brandenburg LO, 2014. Deficiency of formyl peptide receptor 1 and 2 is associated with increased inflammation and enhanced liver injury after LPS-stimulation. *PLoS One.*, **9**(6):e100522.

Grove LM, Southern BD, Jin TH, White KE, Paruchuri S, Harel E, Wei Y, Rahaman SO, Gladson CL, Ding Q, Craik CS, Chapman HA, Olman MA, 2014. Urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) ligation induces a raft-localized integrin signaling switch that mediates the hypermotile phenotype of fibrotic fibroblasts. *J Biol Chem.*, **289**(18):12791-804.

Gutierrez LS, Schulman A, Brito-Robinson T, Noria F, Ploplis VA, Castellino FJ, 2000. Tumor development is retarded in mice lacking the gene for urokinase-type plasminogen activator or its inhibitor, plasminogen activator inhibitor-1. *Cancer Res.*, **60**(20):5839-47.

Holst-Hansen C, Hamers MJ, Johannessen BE, Brünner N, Stephens RW, 1999. Soluble urokinase receptor released from human carcinoma cells: a plasma parameter for xenograft tumour studies. *Br J Cancer.*, **81**(2):203-11.

Høyer-Hansen G, Behrendt N, Ploug M, Danø K, Preissner KT, 1997. The intact urokinase receptor is required for efficient vitronectin binding: receptor cleavage prevents ligand interaction. *FEBS Lett.*, **420**(1):79-85.

Kanse SM, Kost C, Wilhelm OG, Andreasen PA, Preissner KT, 1996. The urokinase receptor is a major vitronectin-binding protein on endothelial cells. *Exp Cell Res.*, **224**(2):344-53.

Kirchheimer JC, Wojta J, Christ G, Binder BR, 1989. Functional inhibition of endogenously produced urokinase decreases cell proliferation in a human melanoma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **86**(14):5424-8.

Kiyan J, Kiyan R, Haller H, Dumler I, 2005. Urokinase-induced signaling in human vascular smooth muscle cells is mediated by PDGFR-beta. *EMBO J.*, **24**(10):1787-97. Epub 2005 May 5.

Kiyan J, Smith G, Haller H, Dumler I, 2009. Urokinase-receptor-mediated phenotypic changes in vascular smooth muscle cells require the involvement of membrane rafts. *Biochem J.*, **423**(3):343-51.

Kjaergaard M, Hansen LV, Jacobsen B, Gardsvoll H, Ploug M, 2008. Structure and ligand interactions of the urokinase receptor (uPAR). *Front Biosci.*, **13**:5441-61.

Le Y, Yang Y, Cui Y, Yazawa H, Gong W, Qiu C, Wang JM, 2002. Receptors for chemotactic formyl peptides as pharmacological targets., *Int Immunopharmacol.*, **2**(1):1-13.

Lengyel E, Wang H, Stepp E, Juarez J, Wang Y, Doe W, Pfarr CM, Boyd D. 1996. Requirement of an upstream AP-1 motif for the constitutive and phorbol ester-inducible expression of the urokinase-type plasminogen activator receptor gene. *J Biol Chem.*, **271**(38):23176-84.

Liu D, Aguirre Ghiso J, Estrada Y, Ossowski L, 2002. EGFR is a transducer of the urokinase receptor initiated signal that is required for in vivo growth of a human carcinoma. *Cancer Cell.*, **1**(5):445-57.

Ma Z, Webb DJ, Jo M, Gonias SL, 2001. Endogenously produced urokinase-type plasminogen activator is a major determinant of the basal level of activated ERK/MAP kinase and prevents apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells. *J Cell Sci.*, **114**(Pt 18):3387-96.

Madsen CD, Sidenius N, 2008. The interaction between urokinase receptor and vitronectin in cell adhesion and signalling. *Eur J Cell Biol.*, **87**(8-9):617-29.

Mayor S, Riezman H, 2004. Sorting GPI-anchored proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, **5**(2):110-20.

Miettinen HM, Gripenrog JM, Jesaitis AJ, 1998. Chemotaxis of chinese hamster ovary cells expressing the human neutrophil formyl peptide receptor: role of signal transduction molecules and alpha5beta1 integrin. *J Cell Sci.*, **111**(Pt 14):1921-8.

Montuori N, Bifulco K, Carriero MV, La Penna C, Visconte V, Alfano D, Pesapane A, Rossi FW, Salzano S, Rossi G, Ragno P, 2011. The cross-talk between the urokinase receptor and fMLP receptors regulates the activity of the CXCR4 chemokine receptor. *Cell Mol Life Sci.*, **68**(14):2453-67.

- Montuori N, Carriero MV, Salzano S, Rossi G, Ragno P, 2002. The cleavage of the urokinase receptor regulates its multiple functions. *J Biol Chem.*, **277**(49):46932-9.
- Montuori N, Ragno P, 2009. Multiple activities of a multifaceted receptor: roles of cleaved and soluble uPAR. *Front Biosci (Landmark Ed)*, **14**:2494-503.
- Montuori N, Visconte V, Rossi G, Ragno P, 2005. Soluble and cleaved forms of the urokinase-receptor: degradation products or active molecules?. *Thromb Haemost.*, **93**(2):192-8.
- Montuori N, Selleri C, Ragno P, 2012. The urokinase-receptor in infectious diseases. *Infez Med.*, **2**:13-8. Review.
- Myöhänen HT, Stephens RW, Hedman K, Tapiovaara H, Rønne E, Høyer-Hansen G, Danø K, Vaheri A, 1993. Distribution and lateral mobility of the urokinase-receptor complex at the cell surface. *J Histochem Cytochem.*, **41**(9):1291-301.
- Ngo JC, Jiang L, Lin Z, Yuan C, Chen Z, Zhang X, Yu H, Wang J, Lin L, Huang M, 2011. Structural basis for therapeutic intervention of uPA/uPAR system. *Curr Drug Targets.*, **12**(12):1729-43.
- Noh H, Hong S, Huang S, 2013. Role of urokinase receptor in tumor progression and development. *Theranostics.*, **3**(7):487-95.
- Pirazzoli V, Ferraris GM, Sidenius N, 2013. Direct evidence of the importance of vitronectin and its interaction with the urokinase receptor in tumor growth. *Blood.*, **121**(12):2316-23.
- Ploug M, Rønne E, Behrendt N, Jensen AL, Blasi F, Danø K, 1991. Cellular receptor for urokinase plasminogen activator. Carboxyl-terminal processing and membrane anchoring by glycosyl-phosphatidylinositol. *J Biol Chem.*, **266**(3):1926-33.
- Pyke C, Ralfkiaer E, Rønne E, Høyer-Hansen G, Kirkeby L, Danø K, 1994. Immunohistochemical detection of the receptor for urokinase plasminogen activator in human colon cancer. *Histopathology.*, **24**(2):131-8.
- Raghu H, Sodadasu PK, Malla RR, Gondi CS, Estes N, Rao JS, 2010. Localization of uPAR and MMP-9 in lipid rafts is critical for migration, invasion and angiogenesis in human breast cancer cells. *BMC Cancer.*, **10**:647.
- Ragno P, 2006. The urokinase receptor: a ligand or a receptor? Story of a sociable molecule. *Cell Mol Life Sci.*, **63**(9):1028-37.

Resnati M, Pallavicini I, Wang JM, Oppenheim J, Serhan CN, Romano M, Blasi F, 2002. The fibrinolytic receptor for urokinase activates the G protein-coupled chemotactic receptor FPRL1/LXA4R. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **99**(3):1359-64.

Resnati M, Guttinger M, Valcamonica S, Sidenius N, Blasi F, Fazioli F, 1996. Proteolytic cleavage of the urokinase receptor substitutes for the agonist-induced chemotactic effect. *EMBO J.*, **15**(7):1572-82.

Reuning U, Sperl S, Kopitz C, Kessler H, Krüger A, Schmitt M, Magdolen V, 2003. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its receptor (uPAR): development of antagonists of uPA/uPAR interaction and their effects in vitro and in vivo. *Curr Pharm Des.*, **9**(19):1529-43.

Riisbro R, Stephens RW, Brünner N, Christensen IJ, Nielsen HJ, Heilmann L, von Tempelhoff GF, 2001. Soluble urokinase plasminogen activator receptor in preoperatively obtained plasma from patients with gynecological cancer or benign gynecological diseases. *Gynecol Oncol.*, **82**(3):523-31.

Roldan AL, Cubellis MV, Masucci MT, Behrendt N, Lund LR, Danø K, Appella E, Blasi F, 1990. Cloning and expression of the receptor for human urokinase plasminogen activator, a central molecule in cell surface, plasmin dependent proteolysis. *EMBO J.*, **9**(2):467-74.

Sadhu C, Masinovsky B, Staunton DE, 1998. Differential regulation of chemoattractant-stimulated beta 2, beta 3, and beta 7 integrin activity. *J Immunol.*, **160**(11):5622-8.

Sahores M, Prinetti A, Chiabrando G, Blasi F, Sonnino S, 2008. uPA binding increases UPAR localization to lipid rafts and modifies the receptor microdomain composition. *Biochim Biophys Acta.*, **1778**(1):250-9.

Schmidt M, Hoppe F, 1999. Increased levels of urokinase receptor in plasma of head and neck squamous cell carcinoma patients. *Acta Otolaryngol.*, **119**(8):949-53.

Shetty S, Velusamy T, Idell S, Shetty P, Mazar AP, Bhandary YP, Shetty RS, 2007. Regulation of urokinase receptor expression by p53: novel role in stabilization of uPAR mRNA. *Mol Cell Biol.*, **27**(16):5607-18.

Sidenius N, Andolfo A, Fesce R, Blasi F, 2002. Urokinase regulates vitronectin binding by controlling urokinase receptor oligomerization. *J Biol Chem.*, **277**(31):27982-90.

Sidenius N, Blasi F, 2003. The urokinase plasminogen activator system in cancer: recent advances and implication for prognosis and therapy. *Cancer Metastasis Rev.*, **22**(2-3):205-22.

- Sidenius N, Sier CF, Blasi F, 2000. Shedding and cleavage of the urokinase receptor (uPAR): identification and characterisation of uPAR fragments in vitro and in vivo. *FEBS Lett.*, **475**(1):52-6.
- Simon DI, Rao NK, Xu H, Wei Y, Majdic O, Ronne E, Kobzik L, Chapman HA, 1996. Mac-1 (CD11b/CD18) and the urokinase receptor (CD87) form a functional unit on monocytic cells. *Blood.*, **88**(8):3185-94.
- Smith HW, Marshall CJ, 2010. Regulation of cell signalling by uPAR. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, **11**(1):23-36.
- Stephens RW, Pedersen AN, Nielsen HJ, Hamers MJ, Høyer-Hansen G, Rønne E, Dybkjaer E, Danø K, Brünner N, 1997. ELISA determination of soluble urokinase receptor in blood from healthy donors and cancer patients. *Clin Chem.*, **43**(10):1868-76.
- Stoppelli MP, Corti A, Soffientini A, Cassani G, Blasi F, Assoian RK, 1985. Differentiation-enhanced binding of the amino-terminal fragment of human urokinase plasminogen activator to a specific receptor on U937 monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **82**(15):4939-43.
- Tang CH, Wei Y, 2008. The urokinase receptor and integrins in cancer progression. *Cell Mol Life Sci.*, **65**(12):1916-32.
- Tran H, Maurer F, Nagamine Y, 2003. Stabilization of urokinase and urokinase receptor mRNAs by HuR is linked to its cytoplasmic accumulation induced by activated mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2. *Mol Cell Biol.*, **23**(20):7177-88.
- Trisciuglio D, Iervolino A, Candiloro A, Fibbi G, Fanciulli M, Zangemeister-Wittke U, Zupi G, Del Bufalo D, 2004. bcl-2 induction of urokinase plasminogen activator receptor expression in human cancer cells through Sp1 activation: involvement of ERK1/ERK2 activity. *J Biol Chem.*, **279**(8):6737-45.
- Van der Pluijm G, Sijmons B, Vloedgraven H, van der Bent C, Drijfhout JW, Verheijen J, Quax P, Karperien M, Papapoulos S, Löwik C, 2001. Urokinase-receptor/integrin complexes are functionally involved in adhesion and progression of human breast cancer in vivo. *Am J Pathol.*, **159**(3):971-82.
- Vassalli JD, Baccino D, Belin D, 1985. A cellular binding site for the Mr 55,000 form of the human plasminogen activator, urokinase. *J Cell Biol.*, **100**(1):86-92.
- Wang Y, Dang J, Wang H, Allgayer H, Murrell GA, Boyd D, 2000. Identification of a novel nuclear factor-kappaB sequence involved in expression of urokinase-type plasminogen activator receptor. *Eur J Biochem.*, **267**(11):3248-54.

Wei C, Möller CC, Altintas MM, Li J, Schwarz K, Zacchigna S, Xie L, Henger A, Schmid H, Rastaldi MP, Cowan P, Kretzler M, Parrilla R, Bendayan M, Gupta V, Nikolic B, Kalluri R, Carmeliet P, Mundel P, Reiser J, 2008. Modification of kidney barrier function by the urokinase receptor. *Nat Med.*, **14**(1):55-63.

Wei Y, Eble JA, Wang Z, Kreidberg JA, Chapman HA, 2001. Urokinase receptors promote beta1 integrin function through interactions with integrin alpha3beta1. *Mol Biol Cell.*, **12**(10):2975-86.

Wei Y, Lukashev M, Simon DI, Bodary SC, Rosenberg S, Doyle MV, Chapman HA, 1996. Regulation of integrin function by the urokinase receptor. *Science.*, **273**(5281):1551-5.

Wei Y, Waltz DA, Rao N, Drummond RJ, Rosenberg S, Chapman HA, 1994. Identification of the urokinase receptor as an adhesion receptor for vitronectin. *J Biol Chem.*, **269**(51):32380-8.

Wei Y, Yang X, Liu Q, Wilkins JA, Chapman HA, 1999. A role for caveolin and the urokinase receptor in integrin-mediated adhesion and signaling. *J Cell Biol.*, **144**(6):1285-94.

Wilhelm OG, Wilhelm S, Escott GM, Lutz V, Magdolen V, Schmitt M, Rifkin DB, Wilson EL, Graeff H, Brunner G, 1999. Cellular glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D regulates urokinase receptor shedding and cell surface expression. *J Cell Physiol.*, **180**(2):225-35.

Xue W, Mizukami I, Todd RF 3rd, Petty HR, 1997. Urokinase-type plasminogen activator receptors associate with beta1 and beta3 integrins of fibrosarcoma cells: dependence on extracellular matrix components. *Cancer Res.*, **57**(9):1682-9.

Xue W, Kindzelskii AL, Todd RF 3rd, Petty HR, 1994. Physical association of complement receptor type 3 and urokinase-type plasminogen activator receptor in neutrophil membranes. *J Immunol.*, **152**(9):4630-40.

Yu W, Kim J, Ossowski L, 1997. Reduction in surface urokinase receptor forces malignant cells into a protracted state of dormancy. *J Cell Biol.*, **137**(3):767-77.

