

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



DOTTORATO DI RICERCA IN
FISIOPATOLOGIA CLINICA E MEDICINA SPERIMENTALE
XVIII Ciclo – 2002 - 2006

Coordinatore: Prof. Gianni Marone

Tesi di Dottorato

**CARATTERIZZAZIONE DELL'UROCHINASI E DEI
SUOI RECETTORI NEI BASOFILI UMANI**

TUTORE

Chiar.mo
Prof. Gianni Marone

CANDIDATA

Dott.ssa
Isabella Fiorentino

| | |
|--|----|
| INTRODUZIONE | 4 |
| MATERIALI E METODI | 13 |
| <i>Reagenti</i> | 13 |
| <i>Tamponi</i> | 14 |
| <i>Purificazione dei Basofili</i> | 15 |
| <i>Colture cellulari</i> | 16 |
| <i>Inattivazione di uPA</i> | 15 |
| <i>Analisi Citofluorimetrica</i> | 16 |
| <i>Western Blot</i> | 17 |
| <i>RT-PCR</i> | 18 |
| <i>Chemiotassi dei Basofili Umani</i> | 19 |
| <i>Rilascio d'istamina dai Basofili</i> | 20 |
| <i>Dosaggi ELISA per IL-4 ed IL-13</i> | 21 |
| <i>Dosaggio LDH</i> | 21 |
| <i>Analisi Statistica</i> | 22 |
| RISULTATI | 23 |
| <i>Espressione di uPA e uPAR nei basofili umani</i> | 23 |
| <i>Effetti di DFP-uPA sulla chemiotassi dei</i> <i>basofili umani</i> | 24 |
| <i>Espressione dei recettori per l'FMLP nei</i> <i>basofili umani</i> | 26 |
| <i>Migrazione dei basofili umani uPA-dipendente e la</i> <i>famiglia dei recettori per l'FMLP</i> | 27 |
| <i>Effetti di uPAR₈₄₋₉₅ sulla chemiotassi dei basofili umani</i> | 29 |
| <i>Effetti di DFP-uPA sul rilascio di istamina e di citochine dai</i> <i>basofili umani</i> | 31 |
| DISCUSSIONE | 33 |

| | |
|----------------------------------|----|
| <i>BIBLIOGRAFIA</i> | 40 |
| <i>FIGURE</i> | 53 |

INTRODUZIONE

L'attivatore del plasminogeno di tipo urochinasi (uPA) è una serin-proteasi di 50 kDa che catalizza la specifica conversione del plasminogeno in plasmina. uPA è secreto come uno zimogeno inattivo (pro-uPA) che proteoliticamente può essere convertito nella forma attiva (uPA). Entrambe le forme dell'urochinasi (pro-uPA ed uPA) sono in grado di legarsi ad alta affinità ad uno specifico recettore di membrana, noto come uPAR (CD87) espresso sulla superficie di numerosi tipi cellulari (1-3). La regione di legame di uPA al recettore uPAR è localizzata in un dominio ricco di residui cisteinici in prossimità della porzione N-terminale della proteina che non comprende il dominio catalitico presente al C-terminale della proteina. A tal proposito, il frammento dell'uPA privato della attività catalitica (amino terminal fragment ATF) è in grado di legarsi al recettore con la stessa affinità dell'urochinasi intera. Il recettore uPAR è sintetizzato come una singola catena aminoacidica di 55-60 kDa, di 313 aminoacidi, preceduta da un peptide di segnale di 21 aminoacidi.

Durante la sintesi proteica, eventi post-transcrizionali conducono al clivaggio degli ultimi 30 residui aminoacidici e all'aggiunta di una coda glicofosfatidilinositolica (GPI), che ancora il recettore alla membrana (4). La proteina matura è costituita da tre domini: D1, che rappresenta la

porzione amino-terminale ed il sito d'interazione con il ligando (uPA), D2, denominata regione linker che connette D1 a D3, e D3, la porzione carbossi-terminale che ancora il recettore alla membrana cellulare grazie alla coda GPI (4).

uPAR può essere clivato nella regione di legame fra D1/D2 da numerosi enzimi proteolitici, incluso l'uPA (5,6). Il taglio del recettore causa il rilascio della regione D1 dalla molecola. uPAR, pertanto, potrà

presentarsi sulla membrana cellulare in due forme: quella costituita da tre domini (D1D2D3), che è in grado di legare uPA, e quella costituita da due domini (D2D3), che ha perso il sito di legame dell'uPA (5) (Fig. 1). E' possibile inoltre riscontrare forme solubili del recettore intero che possono derivare sia dall'attività proteolitica della fosfolipasi D che opera al livello della coda GPI (suPAR) sia da uno splicing alternativo dell'mRNA. Il ruolo di suPAR sarebbe quello di reclutare al livello ematico l'uPA (7). Resnati et al. hanno dimostrato che esiste anche una forma clivata solubile (8). dopo il taglio proteolitico del dominio D1, operato da diversi enzimi incluso uPA stesso, la forma clivata (D1D2) espone un epitopo (SRSRY) che presenta una forte attività chemioattica per diversi tipi cellulari (7).

Il meccanismo attraverso il quale uPAR trasduce il segnale intracellulare di legame dell'urochinasi è stato ampiamente studiato . Si è

certi infatti, che il recettore ha bisogno di un partner prossimale in membrana che sia in grado di formare un complesso con la GPI dell'uPAR ancorato e abbia la capacità di attivare il segnale intracellulare. Evidenze sperimentali hanno dimostrato che uPAR si può trovare fisicamente e funzionalmente associato a recettori della famiglia delle integrine ($\alpha 3$ ed $\alpha 5$) (9,10), a recettori per peptidi formilati (FPRLr) (11,12), a recettori per fattori di crescita (*Epidermal growth factor*, (EGF), *Fibroblast growth factor* (bGF) e ad altre molecole che permettono la trasduzione del segnale all'interno della cellula (13).

Numerose evidenze suggeriscono che il ruolo dell'uPAR è quello di requisire e concentrare uPA sulla superficie cellulare permettendo la conversione del plasminogeno in plasmina. Tuttavia, il sistema uPA/uPAR non è coinvolto solo nella fibrinolisi, ma media molti altri fenomeni quali l'adesione e la migrazione cellulare, il rimodellamento tissutale, l'apoptosi e l'invasione neoplastica (Fig. 2).

Per molti anni l'osservazione che i livelli di uPA risultavano aumentati in corso di diverse neoplasie aveva suggerito l'ipotesi che il ruolo dell'uPA nei fenomeni di migrazione cellulare fosse limitato all'invasione tumorale (14-16). Tale ruolo è sempre stato tradizionalmente legato alla attività proteolitica dell'uPA: l'enzima, infatti, attivando il plasminogeno, promuove la degradazione della

matrice extracellulare (ECM) favorendo la migrazione della cellula neoplastica. Inoltre, il suo recettore, partecipa attivamente e regola tale funzione concentrando l'enzima sulla superficie cellulare e amplificandone l'effetto. Tuttavia, crescenti evidenze sperimentali dimostrano che il sistema uPA/uPAR riveste un ruolo cruciale anche nella migrazione e nell'adesione di cellule infiammatorie sia *in vitro* che *in vivo* (17,18). Infatti la migrazione delle cellule immunitarie nei siti di lesione è ridotta nei topi uPA^{-/-} e uPAR^{-/-}, il che si traduce in una ridotta difesa dell'ospite nei confronti delle infezioni e in una aumentata mortalità (19-20). L'effetto chemiotattico esplicito da uPA sulle cellule infiammatorie richiede il suo legame ad uPAR e la presenza di un "adattatore transmembrana" per la trasduzione del segnale (21).

Plesner et al. hanno dimostrato che i neutrofili contengono uPAR sia nei granuli citoplasmatici che nelle vescicole secretorie. La stimolazione dei neutrofili con l'FMLP causa l'immediata traslocazione in membrana di uPAR. E' stato inoltre dimostrato che uPAR utilizza come adattatore nei monociti il recettore per peptidi formilati (FMLP) FPRL1 (22). L'FMLP lega e attiva i recettori accoppiati alle proteine G a sette domini transmembrana (STM) (19). Tre STM sono stati purificati e clonati: il recettore FPR indicato come quello ad alta affinità in quanto l'FMLP si lega a concentrazioni nanomolari (10^{-7} M), il suo omologo

FPRL1 al quale l'FMLP si lega a concentrazioni più alte (10^{-4}M) (23,24), FPRL2 che presenta una elevata omologia recettoriale con FPRL1 (20,21). FPRL1 è stato inizialmente identificato come un recettore promiscuo, in grado cioè di legare numerosi prodotti endogeni (lipossina A_4), di origine batterica (FMLP, Hp2-20, proteina prionica PrP₁₀₆₋₁₂₆), di origine virale (gp41) ma anche prodotti di sintesi come il peptide WKYMv (25); FPRL2 è invece stato denominato in passato recettore orfano in quanto non si conoscevano ligandi endogeni specifici per questo recettore ed era possibile attivarlo solo sinteticamente (WKYMv).

Recentemente il nostro gruppo ha dimostrato che il peptide Hp2-20 di *Helicobacter pylori* è in grado di indurre la chemiotassi dei basofili umani interagendo con i recettori FPRL1 e con FPRL2 (26). E' stata quindi fornita una prima dimostrazione della presenza di un ligando specifico per questo recettore. Inoltre è stata anche evidenziata la presenza dei basofili per la prima volta in alcune patologie gastriche (gastrite cronica ed ulcera gastrica).

E' noto che i basofili, cellule che esprimono recettori ad alta affinità per le IgE ($\text{Fc}\epsilon\text{RI}^+$), svolgono principalmente un ruolo patogenetico nelle malattie allergiche dell'apparato respiratorio e cutaneo (asma bronchiale, dermatite atopica, rinite allergica, ecc.) ed in

molteplici condizioni patologiche dell'apparato cardiaco, gastrointestinale e muscolo-scheletrico (27,28).

L'interazione dell'antigene con la porzione Fab delle IgE presenti su basofili e mastociti ed il conseguente legame a ponte dei recettori FcεRI attiva una serie di eventi biochimici che inducono la secrezione di numerosi mediatori chimici.

I mediatori chimici sintetizzati dai basofili e dai mastociti umani sono responsabili delle manifestazioni cliniche delle malattie allergiche. Queste cellule contengono granuli citoplasmatici, il cui contenuto può essere liberato, attraverso un meccanismo di esocitosi, in seguito ad attivazione da parte di stimoli immunologici IgE- e non IgE-mediati. Le cellule FcεRI⁺ sintetizzano l'istamina che è in grado di contrarre la muscolatura liscia bronchiale, aumentare la permeabilità vascolare, modulare il flusso coronarico e la funzione linfocitaria. I basofili ed i mastociti umani, dopo stimolazione IgE-mediata, sintetizzano quantità equivalenti di leucotriene C₄ (LTC₄) e prostaglandina D₂ (PGD₂) (27,28).

Numerosi gruppi di ricercatori hanno dimostrato che le cellule FcεRI⁺ umane sintetizzano molteplici citochine e chemochine. In particolare, i basofili sintetizzano IL-4, IL-13 e MIP-1α, mentre i mastociti sintetizzano uno spettro più ampio di citochine (IL-4, IL-5, IL-8, IL-16, TNF-α, etc.) e MIP-1α (29). Queste ultime osservazioni

indicano che in molteplici malattie immunomediate le cellule FcεRI⁺ umane svolgono anche una significativa funzione immunoregolatrice.

E' noto che i basofili vengono reclutati per effetto di alcune sostanze (Eotassina, RANTES, MCP-1 ecc.) definite chemiochine. Diverse molecole sono altresì in grado di esplicare un potente effetto chemiotattico su tali cellule, contribuendo alla cronicizzazione della flogosi allergica ma anche del reclutamento dei basofili e dei mastociti umani nei siti di crescita neoplastica (26).

Recenti evidenze sperimentali prodotte dal nostro gruppo indicano che i basofili sintetizzano un potente fattore angiogenico (VEGF) responsabile della neovascolarizzazione dei tessuti neoplastici (30). Esistono numerose relazioni tra la presenza del sistema uPA/uPAR ed il ruolo del Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) nelle cellule endoteliali (31-33). Il VEGF è responsabile della migrazione, dell'invasione e della proliferazione delle cellule endoteliali in corso di angiogenesi. A tal proposito le cellule endoteliali si servono di diversi enzimi proteolitici per provocare la degradazione della matrice extracellulare. Tra questi un ruolo di primo piano è svolto dal sistema uPA/uPAR. Infatti, alcune evidenze sperimentali indicano che la stimolazione delle cellule endoteliali con il VEGF₁₆₅ (principale isoforma del VEGF-A) induce un aumento dei livelli sierici di pro-

urochinasi, precursore inattivo dell'uPA, che attiva la cascata fibrinolitica. Tale processo culmina nella attivazione della plasmina responsabile della modulazione dell'espressione delle proteine della matrice extracellulare e di alcune metalloproteinasi che facilitano il rimodellamento tissutale, l'invasione e la proliferazione delle cellule endoteliali. L'insieme di tali considerazioni inducono a ritenere l'attivazione dell'urochinasi come una delle fasi iniziali nello sviluppo del processo di angiogenesi (33).

Il sistema uPA/uPAR nei basofili umani non è stato ancora caratterizzato. Pertanto, scopo di questo studio è stato quello di identificare l'espressione del sistema uPA/uPAR e la sua possibile interazione con i recettori dell'FMLP nei basofili umani ed anche caratterizzare l'eventuale relazione tra il sistema uPA/uPAR ed il VEGF nelle cellule FcepsilonRI+ umane (basofili e mastociti) che infiltrano i tessuti sede di crescita neoplastica.

MATERIALI E METODI

Reagenti

I seguenti reagenti sono stati acquistati: di-isopropil fluorofosfato (DFP; Fluka, Buchs, Switzerland); 60% HClO₄ (Baker Chemical Co., Deventer, The Netherlands); albumina sierica umana (HSA), PIPES buffer ed inibitori delle proteasi (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO); HBSS, FCS, TRIzol e SuperScript II trascrittasi del virus della leucemia murina di Moloney (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY); FMLP (Calbiochem, La Jolla, CA); RPMI 1640 con 25 mM HEPES buffer (Invitrogen Life Technologies, Gaithersburg, MD); Eagle's minimum essential medium (Flow Laboratories, Irvine, U.K.); Dextran 70 e Percoll (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden); anticorpo policlonale di coniglio anti-uPAR 399 (American Diagnostica, Greenwich, CT); anticorpi anti-IgE PE (Caltag Laboratories, Burlingame, CA); IgG anti-coniglio HRP-coniugato e saggio colorimetrico per proteine (Bio-Rad, Richmond, CA); anticorpi anti-IgE PE (Caltag Laboratories, Burlingame, CA); anticorpi IgG anti-coniglio FITC (Abcam, Cambridge, UK); kit per ECL (Amersham Biosciences, Little Chalfont, U.K.); filtri di fluoruro di polivinilidene (Millipore, Bedford, MA); kit per PCR (PerkinElmer, Branchburg, NJ); filtri per chemiotassi (NeuroProbe, Cabin John, MD). L'esapeptide WKYMVM è stato sintetizzato da Innovagen (Lund,

Sweden); il peptide uPAR₈₄₋₉₅ (AVTYSRSRYLEC) e il suo peptide “scrambled” (TLVEYYSRASCR) sono stati sintetizzati da PRIMM (Milan, Italy). La Ciclosporina H è stata donata da Dr. D. Romer e Dr. E. Rissi (Novartis, Basel, Switzerland).

Tamponi

Il tampone usato in questi esperimenti è composto da PIPES 25 mM, pH 7,4, NaCl 110 mM, KCl 5 mM (Tampone P). Il tampone PCG contiene, oltre a P, CaCl₂ 5 mM e 1 g/litro di D-glucosio (34). Il tampone PAGMC contiene, oltre a P, albumina sierica umana al 3%, CaCl₂ 1 mM, 1 g/litro di destrosio e 0,25 g/litro di MgCl₂·6H₂O (pH 7,4). Il PGMD contiene, in aggiunta al P, 0,25 g/litro MgCl₂·6H₂O, 10 mg/litro di DNase e 1 g/litro di gelatina, pH 7,4. Il PBS contiene 8 g/litro di NaCl, 1,15 g/litro di Na₂HPO₄, 200 mg/litro KH₂PO₄, pH 7,4.

Purificazione dei basofili umani

I basofili sono stati purificati dal sangue periferico di donatori sani negativi per anticorpi anti-HIV-1 e HIV-2 (di età compresa tra 20 e 39 anni: età media pari a 33,6 ± 4,9 anni), afferenti al Servizio di Immunoematologia dell'Università degli Studi di Napoli Federico II. I leucociti sono stati risospesi in PBS contenente 0,5 g/l di albumina sierica umana (HSA) e 3,42 g/l sodio citrato e, quindi, purificati usando

un elutriatore controcorrente (modello J2-21, Beckman Instruments, Inc., Fullerton, CA). Le frazioni arricchite in basofili ($> 10 \times 10^6$) e con un buon grado di purezza ($>15\%$) sono state ulteriormente purificate su gradiente discontinuo di Percoll. I basofili sono stati infine isolati, con una omogeneità $>98\%$ eliminando linfociti B, monociti, cellule NK, cellule dendritiche, eritrociti, piastrine, neutrofili, eosinofili e cellule T mediante un cocktail di apteni coniugati CD3, CD7, CD14, CD15, CD16, CD36, CD45RA e anticorpi anti-HLA-DR e MACS MicroBeads coniugate con anticorpi anti-apteni. Le cellule magneticamente marcate sono state eliminate attraverso la loro ritenzione in una colonna MACS su un supporto magnetico della MidiMACS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Con tale metodica si ottiene un numero di basofili variabile tra 3 e 10×10^6 , con una purezza in genere $>99\%$, come attestato dalla colorazione dei basofili con Alcian blue e dal conteggio nella camera di conta per eosinofili di Spiers-Levy (35).

Colture cellulari

La linea cellulare THP-1 di derivazione monocitaria è stata coltivata in mezzo RPMI 1640, con l'aggiunta del 10% di FCS inattivato al calore (36).

Inattivazione di uPA

uPA è stata inattivata tramite incubazione con 10 mM DFP, per 2 ore a 4°C (18).

Analisi Citofluorimetrica

L'analisi citofluorimetrica delle molecole presenti sulla superficie cellulare è stata condotta come descritto di seguito. Dopo la saturazione dei siti di legame non specifici con IgG di coniglio, le cellule sono state incubate (20 minuti a 4°C) con anticorpi specifici o IgG isotipiche, come controllo. Per la marcatura indiretta, questo passaggio è stato seguito da una seconda incubazione per 20 minuti a 4°C con un anticorpo anti-isotipo marcato con un fluorocromo. Infine, le cellule sono state lavate ed analizzate con un citofluorimetro FACSCalibur utilizzando il software CellQuest (Becton & Dickinson, San Fernando, CA). Un totale di 10^4 eventi per ogni campione è stato acquisito in tutte le analisi citofluorimetriche eseguite (30).

Western Blot

Basofili e cellule THP-1 sono stati lisate in 1% Triton X-100/PBS, in presenza di inibitori delle proteasi. La quantità di proteine nella preparazione è stata misurata mediante saggio colorimetrico. 50 µg di

proteina sono stati sottoposti ad elettroforesi su un gel al 9% SDS-PAGE in condizioni non riducenti e poi trasferiti su una membrana di fluoruro di polivinilidene. La membrana è stata bloccata con latte e marcata con 1 µg/ml di anticorpo anti-uPAR. Infine i filtri sono stati lavati e incubati con un anticorpo anti-coniglio HRP-coniugato. La rilevazione della proteina è stata eseguita mediante ECL (12).

RT-PCR e PCR quantitativa

RNA cellulare totale dei granulociti basofili umani purificati è stato isolato mediante lisi in TRIzol, secondo il protocollo fornito dal produttore. L'RNA è stato fatto precipitare ed è stato quantificato tramite spettroscopia. 5 µg di RNA totale sono stati retrotrascritti a cDNA ed amplificati utilizzando specifici primers. Una PCR semiquantitativa è stata effettuata in un termocycler per il numero indicato di cicli: a 57°C per FPR e FPRL1, 64°C per FPRL2 e a 62°C per uPAR e uPA. I prodotti della reazione sono stati analizzati mediante elettroforesi in un gel all'1% di agarosio contenente bromuro di etidio. La rilevazione è stata eseguita sotto illuminescenza UV (12).

Chemiotassi dei basofili

La chemiotassi dei basofili è stata effettuata utilizzando la tecnica della camera di Boyden (28). In sintesi, 25 μ l di tampone (PAGCM) o di concentrazioni variabili degli stimoli da testare, sono stati posti in triplicato nel compartimento inferiore di una camera per micro-chemiotassi costituita da 48 pozzetti (Neuroprobe, Cabin John, MD). Il compartimento inferiore è stato ricoperto da una membrana in policarbonato con pori di 5 μ m (Nucleopore Corp., Pleasanton, CA). Successivamente 50 μ l (5×10^4 cellule/pozzetto) della sospensione cellulare in PAGCM sono stati aggiunti in ogni pozzetto del compartimento superiore. La camera per la chemiotassi è stata posta per 1 ora a 37°C, in un incubatore umidificato con CO₂ al 5% (Automatic CO₂ Incubator, Model 160 IR, ICN Flow Laboratories, McLean, VA). Al termine dell'incubazione dei basofili, la membrana di policarbonato è stata rimossa, lavata con PAGCM nella parte superiore, fissata e colorata con May-Grunwald/Giemsa. La chemiotassi dei basofili è stata valutata mediante la conta al microscopio del numero di cellule che erano rimaste adese alla membrana con pori da 5 μ m. Per ogni esperimento sono stati contati 10 campi per ciascuno dei pozzetti in triplicato, ad un ingrandimento di 40x. L'analisi di controllo è stata eseguita per discriminare la migrazione spontanea (chemiochinesi) dalla chemiotassi

indotta dagli stimoli. I basofili sono stati posti nei pozzetti del compartimento superiore della camera mentre concentrazioni ottimali degli stimoli o del tampone PAGCM sono state aggiunte nel compartimento superiore, inferiore o in entrambi. La chemochinesi è stata definita in assenza di stimoli chemiotattici o quando questi erano presenti sia nel compartimento superiore che in quello inferiore della camera di Boyden. Da questi esperimenti è risultato che i basofili migrano in risposta agli stimoli prevalentemente per chemiotassi e non per chemochinesi (30).

Rilascio d'istamina dai basofili

I basofili ($\sim 6 \times 10^4$ cellule/provetta) isolati sono stati risospesi in PCG. 0,1 ml di sospensioni cellulari sono state poste in provette di polietilene di 12 x 75 mm (Sarstadt Inc., Princeton, NJ) ed incubate a 37° C. Successivamente sono stati aggiunti 0,1 ml di ogni stimolo, ed è stata continuata l'incubazione a 37° C per 45 minuti. Al termine dell'incubazione le cellule sono state separate mediante centrifugazione (1000 x g, 22°C); il sopranatante è stato conservato a -20° C per la successiva determinazione delle concentrazioni di istamina mediante una tecnica fluorometrica automatizzata. Il contenuto totale di istamina è stato valutato nei campioni ottenuti mediante lisi delle cellule con HClO₄ prima della centrifugazione.

Per calcolare il rilascio di istamina come percentuale del contenuto totale di istamina, è stata utilizzata la seguente formula:

$$\frac{A - B}{T - B} \times 100$$

dove A è il campione; B è il rilascio spontaneo di istamina dai mastociti (2-14% dell'istamina cellulare totale); T è il contenuto totale di istamina. Tutti i valori esprimono la media di determinazioni effettuate in duplicato o triplicato. I duplicati differiscono tra loro meno del 10% nel contenuto di istamina (29).

Dosaggi ELISA per IL-4 ed IL-13

Il rilascio di IL-4 ed IL-13 nei sovrinatanti dei basofili è stato misurato mediante metodica immunoenzimatica ELISA con un kit commercialmente disponibile (R&D System Minneapolis, MN) (29).

Dosaggio della lattico deidrogenasi (LDH)

Il dosaggio della LDH è stato misurato nei sovrinatanti di basofili come indice di citotossicità mediante un kit commercialmente disponibile (Sigma-Aldrich) (30).

Analisi statistica

I risultati sono espressi come media dei campioni \pm SEM. Valori derivanti da gruppi sono stati sottoposti a test t di Student (37). La significatività è stata definita come $p < 0,01$.

RISULTATI

Espressione di uPA e di uPAR nei basofili umani

In una prima serie di esperimenti abbiamo esaminato l'espressione di uPA e di uPAR nei basofili umani, a livello di mRNA e di proteina. Le cellule di derivazione monocitaria THP-1 sono state utilizzate come controllo, poiché il sistema uPA/uPAR è stato ben caratterizzato in tale linea cellulare (38). L'analisi RT-PCR ottenuta tramite elettroforesi su gel di agarosio ha evidenziato la presenza di mRNA per uPAR nei basofili e nelle cellule THP-1 (Fig. 3A). Abbiamo poi indagato l'espressione del recettore a livello proteico. L'analisi tramite Western Blot utilizzando un anticorpo policlonale, ha dimostrato che i basofili umani esprimono uPAR sia nella forma intera (D1D2D3) che clivata (c-uPAR; D1D2; 35kDa) (Fig. 3B).

L'analisi citofluorimetrica è stata eseguita per confermare che uPAR fosse espresso sulla superficie dei basofili umani. I basofili sono stati incubati con un anticorpo policlonale di coniglio anti-uPAR o con IgG di controllo, poi marcati con un anticorpo IgG anti-coniglio FITC-coniugato e un anticorpo anti-IgE PE-coniugato. La figura 4 mostra l'espressione di uPAR sulla maggior parte dei basofili (80-94%). Questi esperimenti dimostrano che i basofili sintetizzano mRNA per uPAR e lo trasformano in una proteina espressa a livello di membrana. Viceversa,

non abbiamo evidenziato alcuna produzione di mRNA per uPA. L'analisi tramite Western Blot mediante un anticorpo policlonale specifico anti-uPA ha confermato l'assenza di uPA a livello proteico. Viceversa, le cellule THP-1, usate come controllo positivo, esprimono uPA sia a livello di mRNA che a livello proteico (Fig. 5A e 5B).

Effetto di DFP-uPA sulla chemiotassi dei basofili umani

In una serie successiva di esperimenti abbiamo valutato gli effetti *in vitro* di un largo spettro di concentrazioni (10^{-13} - 10^{-9} M) di DFP-uPA inattivato, sulla chemiotassi di basofili umani purificati (>99%). E' stato utilizzato l'uPA inattivato per valutare solo gli effetti dovuti al legame con il recettore, escludendo quelli correlati alla attività enzimatica propria della molecola. Concentrazioni nanomolari di DFP-uPA sono in grado di indurre la chemiotassi dei basofili, con un plateau a 10^{-10} M (Fig. 6). Per confermare che la migrazione dei basofili fosse dovuta alla chemiotassi e non alla chemochinesi abbiamo effettuato un'analisi di controllo che ha evidenziato che, in maniera dose-dipendente, DFP-uPA induceva la chemiotassi dei basofili se aggiunta alle cellule nei compartimenti inferiori della camera per chemiotassi. Una concentrazione ottimale di DFP-uPA (5×10^{-10} M) aggiunta alle cellule nei pozzetti superiori della camera per chemiotassi, o in entrambi

(superiori ed inferiori), non induceva una migrazione direzionale dei basofili. Pertanto, è possibile confermare che la migrazione dei basofili è chemiotassi dipendente e non dovuta alla chemochinesi.

Per escludere che l'inattivazione di uPA potesse influenzare la sua attività chemotattica i risultati di sei esperimenti, effettuati con l'uPA nativa, sono mostrati nella figura 7A. L'inattivazione dovuta al DFP non modifica le proprietà chemotattiche di uPA. In una seconda fase, esperimenti con il frammento amino terminale (ATF) (aa 1-43) che conserva la regione di legame al recettore e perde la sua attività enzimatica, dimostrano che questo peptide mantiene la sua proprietà chemotattica (Fig.7B).

Questi risultati dimostrano che l'attività enzimatica di uPA non è responsabile della funzione chemotattica dei basofili umani.

Per verificare che la chemiotassi dei basofili mediata da DFP-uPA fosse correlata alla attivazione del recettore uPAR abbiamo condotto degli esperimenti di bloccaggio utilizzando un anticorpo policlonale anti-uPAR. La Fig. 8 mostra che la preincubazione dei basofili con un anticorpo policlonale anti-uPAR (5 µg/ml) era in grado di inibire significativamente ($68.2 \pm 5.4\%$) la chemiotassi dei basofili DFP-uPA dipendente. La conferma di tali risultati è stata ottenuta da analoghi esperimenti in cui la preincubazione dei basofili con l'anticorpo anti-

uPAR non determinava modifiche nella chemiotassi indotta da eotassina. Tali risultati indicano che il legame al recettore rappresenta un momento fondamentale nel favorire la chemiotassi indotta da uPA.

Espressione dei recettori per l'FMLP nei basofili umani

L'espressione della famiglia dei recettori per l'FMLP nei basofili umani è stata studiata per valutare l'interazione fra questi tre recettori e il sistema uPA/uPAR in queste cellule. E' noto che FPRL1, un membro della famiglia dei recettori per l'FMLP, media la chemiotassi dei monociti uPA e uPAR-D2-D3 dipendente (11). Inoltre, l'espressione di uPAR è richiesta per la migrazione FMLP dipendente (12,39,40). Le cellule di derivazione monocitaria THP-1 sono state utilizzate come controllo positivo poichè è noto che i monociti esprimono tutti e tre i recettori (14,32). I basofili purificati e le cellule THP-1 sono state lisate in TRIzol per la preparazione dell'RNA totale. L'RNA era trascritto e amplificato con 40 cicli di PCR in presenza di specifici primers di FPR, FPRL1 ed FPRL2 e di specifici primers per GAPDH, utilizzata come controllo. L'analisi PCR mediante elettroforesi su gel di agarosio ha mostrato la presenza di tutti e tre i recettori nei basofili umani e nella cellule THP-1 (Fig. 9). I livelli dei prodotti di PCR, dopo 30, 35 e 40 cicli di amplificazione, mostrano una minore espressione di FPRL1

rispetto a FPR e FPRL2 nei basofili umani. Analoghi risultati si sono ottenuti sulle cellule THP-1.

Migrazione dei basofili umani uPA-dipendente e la famiglia dei recettori per l'FMLP

uPA dopo essersi legata al recettore uPAR, induce la migrazione dei monociti in seguito alla attivazione del recettore FPRL1, il recettore per FMLP a bassa affinità (11). Abbiamo pertanto indagato quale membro della famiglia dei recettori per l'FMLP fosse in grado di mediare la chemiotassi dei basofili umani dipendente da uPA.

La CsH è uno specifico antagonista del recettore ad alta affinità per l'FMLP, FPR (41-43). Infatti, una breve preincubazione (15 minuti a 37°C) dei basofili con CsH era in grado di inibire significativamente la chemiotassi dei basofili dipendente da FMLP. Al contrario la CsH non induceva inibizione della chemiotassi dei basofili DFP-uPA dipendente (Fig. 10A). Questi risultati sono compatibili con l'ipotesi che la chemiotassi dei basofili uPA dipendente è correlata alla attivazione di un recettore diverso da FPR. E' noto che la preincubazione della cellule con alte dosi di FMLP causa desensibilizzazione dei recettori FPR e FPRL1 (14). Nei nostri esperimenti abbiamo valutato gli effetti della desensibilizzazione dei recettori FPR e FPRL1, pretrattando i basofili

con alte concentrazione di FMLP (10^{-4} M). Tale trattamento era in grado di indurre una modesta inibizione ($23.1 \pm 2.1\%$) della risposta chemiotattica di DFP-uPA (Fig. 10B). In una serie parallela di esperimenti abbiamo pretrattato le cellule THP-1 con FMLP (10^{-4} M). Come riportato in letteratura, la preincubazione con alte dosi di FMLP blocca la chemiotassi delle cellule THP-1. Questi dati confermano il coinvolgimento del recettore FPRL1 nella attività chemiotattica della molecola sui monociti. Al fine di chiarire quale recettore fosse responsabile della chemiotassi indotta da uPA. Abbiamo studiato il coinvolgimento del recettore FPRL2, che non lega FMLP, ma il peptide sintetico WKYVMm (14). Questo peptide lega, anche se con diverso grado di affinità, i recettori FPR, FPRL1, FPRL2 (14). La preincubazione dei basofili umani con il peptide era fortemente in grado di inibire completamente la chemiotassi DFP-uPA dipendente ($55.6 \pm 4.8\%$) (Fig. 10C). I risultati di tali esperimenti indicano che la chemiotassi dei basofili uPA dipendente è strettamente correlata alla attivazione del recettore FPRL2. La specificità di tali osservazioni è confermata dal fatto che alte o basse concentrazioni di FMLP non inducono modificazioni della chemiotassi dei basofili mediata da altri potenti stimoli quali PDG2, C5a o Eotassina, che agiscono attivando altri specifici recettori (44-46) (Fig. 11A, 11B, 11C).

Effetti di uPAR₈₄₋₉₅ sulla chemiotassi dei basofili umani

In una serie successiva di esperimenti abbiamo valutato gli effetti del peptide uPAR₈₄₋₉₅ sulla chemiotassi dei basofili umani e il coinvolgimento dei recettori della famiglia dell'FMLP. La Fig. 12 evidenzia i risultati di una serie di esperimenti che, dimostrano che concentrazioni picomolari (10^{-3} - 10^{-9} M) di uPAR₈₄₋₉₅, inducono la chemiotassi dei basofili con un plateau a 10^{-11} M; nessuna chemiotassi era indotta dalle stesse concentrazioni (10^{-3} - 10^{-9} M) del peptide "scrambled" di uPAR₈₄₋₉₅.

La relazione esistente tra uPAR₈₄₋₉₅, FMLP (5×10^{-7} o 10^{-4} M) e il peptide WKYMVm è stata ulteriormente esaminata con la valutazione degli effetti indotti sulla chemiotassi dei basofili dalla desensibilizzazione eterologa con questi stimoli. Le cellule purificate erano trattate per 30 minuti a 37°C con buffer o basse concentrazioni (5×10^{-7} M) di FMLP o alte concentrazioni (10^{-4} M) di FMLP che sono in grado di attivare FPR ed FPRL1, rispettivamente. Al termine dell'incubazione le cellule erano lavate e fatte migrare in presenza di uPAR₈₄₋₉₅ (10^{-10} M). La Fig. 13 mostra i risultati di alcuni esperimenti, nei quali la risposta allo stimolo uPAR₈₄₋₉₅ era debolmente, ma significativamente, inibita ($27 \pm 2.1\%$; $p < 0.01$) dalla preincubazione con

alte concentrazioni di FMLP. La preincubazione dei basofili con basse concentrazioni di FMLP, viceversa, non modificava la risposta mediata da uPAR₈₄₋₉₅. Al contrario, la desensibilizzazione in seguito alla preincubazione con il peptide WKYVM, che attivava FPR, FPRL1 e FPRL2 inibiva marcatamente ($71.6 \pm 4.5\%$) la risposta ad uPAR₈₄₋₉₅. Questi risultati sono compatibili con l'ipotesi che uPAR₈₄₋₉₅ induce la chemiotassi dei basofili principalmente in seguito alla interazione con FPRL1 ed in parte con FPRL2.

Effetti di DFP- uPA sul rilascio di istamina e di citochine dai basofili umani

Abbiamo valutato gli effetti di concentrazioni crescenti di DFP-uPA sul rilascio di istamina dai basofili purificati da donatori sani. Il risultato di cinque esperimenti illustrato in figura 14 dimostra che DFP-uPA non induce il rilascio di istamina dai basofili. Anche gp41 (una glicoproteina dell'HIV-1) che si lega ad i recettori FPRL1 ed FPRL2 che induce la liberazione di istamina dai basofili. La concentrazione di DFP-uPA utilizzata non induce il rilascio di LDH.

Al contrario l'FMLP utilizzato a concentrazioni opportune (10^{-8} - 10^{-6} M) tali da interagire con il recettore FPR ed il peptide WKYMV (10^{-9} - 10^{-7} M) che si lega a tutti e tre i sottotipi recettoriali (FPR, FPRL1 ed FPRL2)

sono in grado di indurre un potente stimolo secretorio di istamina dai basofili umani.

In tre esperimenti, l'incubazione (18 h a 37°C) dei basofili con DFP-uPA non induce il rilascio di IL-4 ed IL-13.

DISCUSSIONE

Il sistema uPA/uPAR è un importante sistema biologico che media fenomeni fondamentali quali la fibrinolisi, l'adesione cellulare, la migrazione ed il rimodellamento tissutale (3,13,47-51). In questo studio abbiamo dimostrato che i basofili umani esprimono il recettore uPAR sulla loro superficie cellulare sia nella forma intera (D1D2D3) che nella forma clivata (D2D3). Al contrario, i basofili non esprimono uPA, il ligando di uPAR. Abbiamo inoltre dimostrato che la forma di uPA inattivata (DFP-uPA) ed il suo frammento ATF, sono potenti fattori chemiotattici per i basofili umani. La dimostrazione che la chemiotassi dei basofili umani è mediata dalla interazione con lo specifico recettore di membrana uPAR, ha avuto un ulteriore supporto dalla dimostrazione che un anticorpo policlonale anti-uPAR inibisce la chemiotassi dei basofili indotta da uPA. Quindi, i risultati ottenuti sono compatibili con l'ipotesi che la chemiotassi dei basofili indotta da uPA richiede l'attivazione del recettore uPAR ed inoltre non necessita dell'attività enzimatica di uPA.

Abbiamo inoltre dimostrato che il peptide derivato da uPAR, ovvero uPAR₈₄₋₉₅, è un potente chemoattrattante per i basofili. E' noto che uPAR può essere tagliato da numerosi enzimi, uPA incluso (5,6), a livello della regione linker, tra i domini D1 e D2, il che comporta la rimozione del

dominio D1 e determina l'esposizione di una porzione chemiotattica da parte della molecola D2-D3-uPAR ancorata alla superficie cellulare (38). Questo epitopo chemiotattico (residui 84-95), nella forma solubile, agirebbe inoltre come potente stimolo chemiotattico per i monociti attraverso l'attivazione di FPRL1 (11). La forma clivata di uPAR solubile, priva del dominio D1 (D2D3-suPAR), è stata dosata in tessuti e nei liquidi biologici (52,53).

I basofili umani sono attivati dall'FMLP che è in grado di mediare la chemiotassi e/o il rilascio di mediatori proinfiammatori (26,42). Sulla superficie dei basofili umani abbiamo dimostrato la presenza di tutti e tre i recettori per questo peptide (FPR, FPRL1 e FPRL2) (15,16). Questi recettori appartengono alla famiglia dei recettori a sette domini transmembrana, accoppiati alle proteine G (54,55). In particolare, il recettore FPR ha alta affinità per l'FMLP ed è attivato da concentrazioni nanomolari di FMLP. FPRL1 è un recettore definito promiscuo, attivato da concentrazioni più elevate di FMLP e da numerosi prodotti di origine batterica ed endogena, inclusi la proteina prionica PrP₁₀₆₋₁₂₆ (56), l'amiloide sierica A (57), la proteina derivata dall'*Helicobacter pylori* Hp(2-20) (25), la lipossina A (58), e vari peptidi sintetici. I monociti ed i basofili umani esprimono FPRL2. In un precedente studio condotto dal nostro gruppo abbiamo dimostrato che il peptide Hp(2-20) esercita la sua

attività chemiotattica attraverso l'interazione con questo sottotipo recettoriale (25, 26). I risultati ottenuti in questo lavoro sono compatibili con l'ipotesi che FPRL2 sia coinvolto anche nei meccanismi di chemiotassi mediati da uPA. Infatti, è ben documentato che la CsH blocca le risposte evocate dal recettore FPR (16,41,42) e quindi l'attività chemiotattica dei basofili indotta dall'FMLP, ma non determina alcuna modificazione della chemiotassi mediata da uPA. Questo risultato indica che FPR non è coinvolto nella chemiotassi dei basofili mediata da uPAR. Pertanto, abbiamo anche condotto degli esperimenti di desensibilizzazione eterologa, per verificare la specificità delle vie di attivazione indotte da uPA e da FMLP. La preincubazione dei basofili con basse concentrazioni di FMLP, che legano FPR (54), non interferisce con la chemiotassi dei basofili mediata da uPA e da uPAR₈₄₋₉₅. Viceversa, la preincubazione con alte dosi di FMLP, che legano FPR e FPRL1, determina una modesta inibizione della chemiotassi indotta da uPA e da uPAR₈₄₋₉₅. Al contrario, quando i basofili sono esposti al peptide WKYMVm, che lega anche FPRL2 (54), la risposta chemiotattica mediata da uPA e uPAR₈₄₋₉₅ viene fortemente inibita. Il risultato di questi due gruppi di esperimenti dimostra che il potente effetto chemoattrattante di uPA sui basofili è legato alla esposizione di un dominio chemiotattico di uPAR, presumibilmente uPAR₈₄₋₉₅, che

rappresenterebbe un ligando endogeno di FPRL2. L'apparente differenza nella capacità da parte di uPA e uPAR₈₄₋₉₅ di indurre la chemiotassi dei basofili potrebbe essere legata alla diversa accessibilità e/o affinità per questo recettore. I nostri risultati confermano i dati ottenuti in altri studi (11), ovvero che la chemiotassi delle THP-1 mediata da uPA e dalla forma clivata di uPAR avviene tramite il recettore FPRL1. Inoltre, in questo lavoro, abbiamo esteso i risultati precedentemente ottenuti, dimostrando che i basofili esprimono l'mRNA per FPRL1 e per FPRL2 e che pertanto uPA e uPAR₈₄₋₉₅ potrebbero indurre la chemiotassi principalmente tramite il recettore FPRL2. Questi risultati suggeriscono l'ipotesi che dopo il legame con uPA, uPAR subisca modifiche conformazionali, permettendo l'interazione con FPRL1 nei monociti (11) e con FPRL2 nei basofili.

Esperimenti successivi hanno identificato che esistono alcune differenze tra le THP-1, cellule di controllo nel nostro modello, ed i basofili rispetto al sistema uPA/uPAR.

Infatti abbiamo confermato la presenza dell'mRNA di uPA nelle THP-1, ma non nei basofili dove non si riscontra l'mRNA per l'urochinasi.

Questo risultato è in accordo con alcuni lavori pubblicati da Valent e collaboratori nei quali si dimostra che i mastociti non producono ne

sintetizzano l'uPA. Queste osservazioni ci permettono di ipotizzare che la mancanza di un loop autocrino nei basofili e nei mastociti renderebbe queste cellule maggiormente responsive a basse concentrazioni di uPA. L'implicazione del sistema uPA/uPAR nei processi infiammatori mediante l'attivazione della plasmino è stata ampiamente dimostrata sia in vitro che in vivo.

Upa è un potente agente chemiotattico per neutrofili e monociti; è in grado di indurre nei neutrofili il rilascio di radicali dell'ossigeno, inoltre l'espressione di uPAR è richiesta per la chemiotassi FMLP dipendente e per la degranolazione nei monociti e nei granulociti.

Infine topi uPA^{-/-} ed uPAR^{-/-} hanno mostrato una ridotta chemiotassi dei neutrofili e una aumentata suscettibilità alle infezioni batteriche.

Ci sono numerose evidenze che indicano i basofili ed i mastociti (cellule FcεRI⁺) come effettori della risposta immunitaria verso i batteri, verso i virus, e verso i parassiti.

Le interazioni tra basse concentrazioni di uPA ed i recettori dell'FMLP espressi sui basofili potrebbero contribuire al reclutamento delle cellule FcεRI⁺ nei siti d'infiammazione.

In conclusione, il coinvolgimento del recettore FPRL2 nella chemiotassi dei basofili indotta da uPAR₈₄₋₉₅ permette di ipotizzare che

tale peptide rappresenti un ligando endogeno per il recettore. Fino ad oggi FPRL2 è stato considerato un recettore orfano nonostante la sua omologia di sequenza con FPR ed FPRL1 (14). Pertanto l'identificazione di altri ligandi endogeni e esogeni renderebbero il recettore FPRL2 anch'esso un recettore promiscuo come FPRL1.

Quindi, abbiamo, attraverso questo studio, fornito la prima evidenza che i basofili umani posseggono uPAR sia nella forma intatta che clivata. Abbiamo inoltre dimostrato che uPA inattivato e uPAR₈₄₋₉₅ sono potenti fattori chemiotattici per i basofili; uPAR non ha domini transmembrana pertanto deve mediare le proprie azioni attraverso il legame con molecole di superficie in grado di interagire con sistemi intracellulari. I nostri risultati sono compatibili con l'ipotesi che la chemiotassi dei basofili dipendente da uPA è legata alla esposizione di un dominio chemiotattico del recettore per l'urochinasasi che rappresenterebbe, pertanto, un ligando endogeno per il recettore FPRL2 sui basofili umani.

Infine, i risultati descritti in questo studio, potrebbero avere implicazioni pratiche in patologie quali disordini allergici e alcune infezioni batteriche, nelle quali i basofili, infiltrando i siti di flogosi rivestirebbero un ruolo preminente (59-61). Infatti, potrebbe essere ipotizzato l'utilizzo di fattori in grado di inibire la chemiotassi indotta da

uPAR (ad esempio fattori che bloccano l'epitopo chemiotattico) per inibire la risposta sostenuta dai basofili nelle reazioni infiammatorie.

BIBLIOGRAFIA

1. Irigoyen, J. P., P. Muñoz-Cánoves, L. Montero, M. Koziczak, Y. Nagamine. 1999. The plasminogen activator system: biology and regulation. *Cell. Mol. Life Sci.* 56:104.
2. Preissner, K. T., S. M. Kanse, A. E. May. 2000. Urokinase receptor: a molecular organizer in cellular communication. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12:621.
3. Blasi, F., P. Carmeliet. 2002. uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3:932.
4. Danø, K., N. Behrendt, N. Brünner, V. Ellis, M. Ploug, C. Pyke. 1994. The urokinase-receptor: protein structure and role in plasminogen activation and cancer invasion. *Fibrinolysis* 8:189.
5. Høyer-Hansen, G., E. Rønne, H. Solberg, N. Behrendt, M. Ploug, L. R. Lund, V. Ellis, K. Danø. 1992. Urokinase plasminogen activator cleaves its cell surface receptor releasing the ligand-binding domain. *J. Biol. Chem.* 267:18224.
6. Ragno, P., N. Montuori, B. Covelli, G. Høyer-Hansen, G. Rossi. 1998. Differential expression of a truncated form of the urokinase-type plasminogen-activator receptor in normal and tumor thyroid cells. *Cancer Res.* 58:1315.

7. Jo, M., K.S. Thomas, L. Wu, S. Gonias. 2003. Soluble urokinase-type plasminogen activator receptor inhibits cancer cell growth and invasion by direct urokinase-independent effects on cell signalling. *The Journal of Biological Chemistry* 278:46692.
8. Fazioli F., M. Resnati, N. Sidenius, Y. Higashimoto, E. Appella, F. Blasi. 2006. A urokinase-sensitive region of the human urokinase receptor is responsible for its chemotactic activity . *The EMBO Journal* 16:7279.
9. Wei, Y., M. Lukashev, D. I. Simon, S. C. Bodary, S. Rosenberg, M. V. Doyle, H. A. Chapman. 1996. Regulation of integrin function by the urokinase receptor. *Science* 273:1551.
10. Petty, H. R., R. F. Todd, III. 1996. Integrins as promiscuous signal transduction devices. *Immunol. Today* 17:209.
11. Resnati, M., I. Pallavicini, J. M. Wang, J. Oppenheim, C. N. Serhan, M. Romano, F. Blasi. 2002. The fibrinolytic receptor for urokinase activates the G protein-coupled chemotactic receptor FPRL1/IXA4R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:1359.
12. Montuori, N., M. V. Carriero, S. Salzano, G. Rossi, P. Ragno. 2002. The cleavage of the urokinase receptor regulates its multiple functions. *J. Biol. Chem.* 277:46932.

13. Ossowski, L., J. A. Aguirre-Ghiso. 2000. Urokinase receptor and integrin partnership: coordination of signaling for cell adhesion, migration and growth. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12:613.
14. Shetty, S., S. Idell. 1999. Posttranscriptional regulation of urokinase receptor gene expression in human lung carcinoma and mesothelioma cells in vitro. *Molecular Cellular Biochemistry* 199:189.
15. Zhang, L., Z.S. Zhao, G.Q. Ru, J. Ma. 2006. Correlative studies on UpA mRNA and uPAR mRNA expression with vascular endothelial growth factor, microvessel density, progression and survival time of patients with gastric cancer. *World J Gastroenterology* 12:3970.
16. Konno, H., J. Abe, T. Kaneko, M. Baba, A. Shoji, K. Sunayama, K. kamiya, T. Tanaka, S. Suzuki, S. Nakamura, T. Urano. 2001 *Cancer Research* 92:516.
17. Le, Y., P. M. Murphy, J. M. Wang. 2002. Formyl-peptide receptors revisited. *Trends Immunol.* 23:541.
18. Stoppelli, M. P., A. Corti, A. Soffientini, G. Cassani, F. Blasi, R. K. Assoian. 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. USA* 82:3427.
19. Vassalli, J.-D., J.-M. Dayer, A. Wohlwend, D. Belin. 1984. Concomitant secretion of prourokinase and of a plasminogen activator-specific inhibitor by cultured human monocytes-macrophages. *J. Exp. Med.* 159:1653.
 20. Durstin, M., J.-L. Gao, H. L. Tiffany, D. McDermott, P. M. Murphy. 1994. Differential expression of members of the *N*-formylpeptide receptor gene cluster in human phagocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201:174.
 21. Christophe, T., A. Karlsson, C. Dugave, M.-J. Rabiet, F. Boulay, C. Dahlgren. 2001. The synthetic peptide Trp-Lys-Tyr-Met-Val-Met-NH₂ specifically activates neutrophils through FPRL1/lipoxin A₄ receptors and is an agonist for the orphan monocyte-expressed chemoattractant receptor FPRL2. *J. Biol. Chem.* 276:21585.
 22. Plesner, T., N. Behrendt, M. Ploug. 1997. Structure, function and expression on blood and bone marrow cells of the urokinase-type plasminogen activator receptor uPAR. *Stem Cells* 15:398.
 23. Murphy, A. C., E. Rozengurt. 1992. *Pasteurella multocida* toxin selectively facilitates phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate

- hydrolysis by bombesin, vasopressin, and endothelin: requirement for a functional G protein. *J. Biol. Chem.* 267:25296.
24. Gao, J.-L., P. M. Murphy. 1993. Species and subtype variants of the *N*-formyl peptide chemotactic receptor reveal multiple important functional domains. *J. Biol. Chem.* 268:25395.
 25. Betten, Å., J. Bylund, T. Cristophe, F. Boulay, A. Romero, K. Hellstrand, C. Dahlgren. 2001. A proinflammatory peptide from *Helicobacter pylori* activates monocytes to induce lymphocytes dysfunction and apoptosis. *J. Clin. Invest.* 108:1221.
 26. de Paulis, A., N. Prevede, I. Fiorentino, A. F. Walls, M. Curto, A. Petraroli, V. Castaldo, P. Ceppa, R. Fiocca, G. Marone. 2004. Basophils infiltrate human gastric mucosa at sites of *Helicobacter pylori* infection, and exhibit chemotaxis in response to *H. pylori*-derived peptide Hp(2–20). *J. Immunol.* 172:7734.
 27. Marone, G. 1995 Human basophils and mast cells: biological aspects. Basel: Karger
 28. Marone, G. 1995 Human basophils and mast cells: clinical aspects. Basel: Karger..
 29. de Paulis A, De Palma R, Di Gioia L, Carfora M, Prevede N, Tosi G, Accolla RS, Marone G. 2000. Tat protein is an HIV-1-encoded beta-chemokine homolog that promotes migration and up-

- regulates CCR3 expression on human Fc epsilon RI+ cells. *J Immunol.* 165:7171.
30. de Paulis A, Prevete N, Fiorentino I, Rossi FW, Staibano S, Montuori N, Ragno P, Longobardi A, Liccardo B, Genovese A, Ribatti D, Walls AF, Marone G. 2006. Expression and functions of the vascular endothelial growth factors and their receptors in human basophils. *J Immunol.* 177:7322.
 31. Mandriota SJ, Seghezzi G, Vassalli JD, Ferrara N, Wasi S, Mazziere R, Mignatti P, Pepper MS. 1995. Vascular endothelial growth factor increases urokinase receptor expression in vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 270:9709.
 32. Prager GW, Breuss JM, Steurer S, Olcaydu D, Mihaly J, Brunner PM, Stockinger H, Binder BR. 2004. Vascular endothelial growth factor receptor-2-induced initial endothelial cell migration depends on the presence of the urokinase receptor. *Circ Res.* 94:1562.
 33. Prager GW, Breuss JM, Steurer S, Mihaly J, Binder BR. 2004. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces rapid prourokinase (pro-uPA) activation on the surface of endothelial cells. *Blood.* 103:955.
 34. de Paulis, A., R. Cirillo, A. Ciccarelli, M. Condorelli, G. Marone. 1991. FK-506, a potent novel inhibitor of the release of

- proinflammatory mediators from human Fc ϵ RI⁺ cells. *J. Immunol.* 146:2374.
35. Romagnani, P., A. de Paulis, C. Beltrame, F. Annunziato, V. Dente, E. Maggi, S. Romagnani, G. Marone. 1999. Tryptase-chymase double-positive human mast cells express the eotaxin receptor CCR3 and are attracted by CCR3-binding chemokines. *Am. J. Pathol.* 155:1195.
36. Ragno, P., N. Montuori, J. D. Vassalli, G. Rossi. 1993. Processing of complex between urokinase and its type-2 inhibitor on the cell surface: a possible regulatory mechanism of urokinase activity. *FEBS Lett.* 323:279.
37. Snedecor, G. W., W. G. Cochran. 1980. *Statistical Methods* Iowa State University Press, Ames.
38. Fazioli, F., M. Resnati, N. Sidenius, Y. Higashimoto, E. Appella, F. Blasi. 1997. A urokinase-sensitive region of the human urokinase receptor is responsible for its chemotactic activity. *EMBO J.* 16:7279.
39. Gyetko, M. R., R. F. Todd, III, C. C. Wilkinson, R. G. Sitrin. 1994. The urokinase receptor is required for human monocyte chemotaxis *in vitro*. *J. Clin. Invest.* 93:1380.

40. Gyetko, M. R., R. G. Sitrin, J. A. Fuller, R. F. Todd, III, H. Petty, T. J. Standiford. 1995. Function of the urokinase receptor (CD87) in neutrophil chemotaxis. *J. Leukocyte Biol.* 58:533.
41. de Paulis, A., A. Ciccarelli, G. de Crescenzo, R. Cirillo, V. Patella, G. Marone. 1996. Cyclosporin H is a potent and selective competitive antagonist of human basophil activation by *N*-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. *J. Allergy Clin. Immunol.* 98:152.
42. Wenzel-Seifert, K., C. M. Hurt, R. Seifert. 1998. High constitutive activity of the human formyl peptide receptor. *J. Biol. Chem.* 273:24181.
43. Ploug, M., V. Ellis, K. Dano. 1994. Ligand interaction between urokinase-type plasminogen activator and its receptor probed with 8-anilino-1-naphthalenesulfonate: evidence for a hydrophobic binding site exposed only on the intact receptor. *Biochemistry* 33:8991.
44. Hirai, H., K. Tanaka, O. Yoshie, K. Ogawa, K. Kenmotsu, Y. Takamori, M. Ichimasa, K. Sugamura, M. Nakamura, S. Takano, et al 2001. Prostaglandin D₂ selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2. *J. Exp. Med.* 193:255.

45. Ugucioni, M., C. R. Mackay, B. Ochensberger, P. Loetscher, S. Rhee, G. J. LaRosa, P. Rao, P. D. Ponath, M. Baggiolini, C. A. Dahinden. 1997. High expression of the chemokine receptor CCR3 in human blood basophils: role in activation by eotaxin, MCP-4, and other chemokines. *J. Clin. Invest.* 100:1137.
46. Füreder, W., H. Agis, M. Willheim, H. C. Bankl, U. Maier, K. Kishi, M. R. Müller, K. Czerwenka, T. Radaszkiewicz, J. H. Butterfield, et al 1995. Differential expression of complement receptors on human basophils and mast cells: evidence for mast cell heterogeneity and CD88/C5aR expression on skin mast cells. *J. Immunol.* 155:3152.
47. Miles, L. A., E. F. Plow. 1987. Receptor mediated binding of the fibrinolytic components, plasminogen and urokinase, to peripheral blood cells. *Thromb. Hemost.* 58:936.
48. Nursat, A. R., H. A. Chapman. 1991. An autocrine role for urokinase in phorbol ester-mediated differentiation of myeloid cell lines. *J. Clin. Invest.* 87:1091.
49. Chapman, H. A.. 1997. Plasminogen activators, integrins, and the coordinated regulation of cell adhesion and migration. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9:714.

50. Fibbi, G., M. Ziche, L. Morbidelli, L. Magnelli, M. Del Rosso. 1988. Interaction of urokinase with specific receptors stimulates mobilization of bovine adrenal capillary endothelial cells. *Exp. Cell Res.* 179:385.
51. Busso, N., S. K. Masur, D. Lazega, S. Waxman, L. Ossowski. 1994. Induction of cell migration by pro-urokinase binding to its receptor: possible mechanism for signal transduction in human epithelial cells. *J. Cell Biol.* 126:259.
52. Sidenius, N., C. F. M. Sier, F. Blasi. 2000. Shedding and cleavage of the urokinase receptor (uPAR): identification and characterisation of uPAR fragments *in vitro* and *in vivo*. *FEBS Lett.* 475:52.
53. Wahlberg, K., G. Høyer-Hansen, B. Casslen. 1998. Soluble receptor for urokinase plasminogen activator in both full-length and a cleaved form is present in high concentration in cystic fluid from ovarian cancer. *Cancer Res.* 58:3294.
54. Le, Y., W. Gong, B. Li, N. M. Dunlop, W. Shen, S. B. Su, R. D. Ye, J. M. Wang. 1999. Utilization of two seven-transmembrane, G protein-coupled receptors, formyl peptide receptor-like 1 and formyl peptide receptor, by the synthetic hexapeptide WKYMVm for human phagocyte activation. *J. Immunol.* 163:6777.

55. Li, B.-Q., M. A. Wetzel, J. A. Mikovits, E. E. Henderson, T. J. Rogers, W. Gong, Y. Le, F. W. Ruscetti, J. M. Wang. 2001. The synthetic peptide WKYMVm attenuates the function of the chemokine receptors CCR5 and CXCR4 through activation of formyl peptide receptor-like 1. *Blood* 97:2941.
56. Le, Y., H. Yazawa, W. Gong, Z. Yu, V. J. Ferrans, P. M. Murphy, J. M. Wang. 2001. The neurotoxic prion peptide fragment PrP₁₀₆₋₁₂₆ is a chemotactic agonist for the G protein-coupled receptor formyl peptide receptor-like 1. *J. Immunol.* 166:1448.
57. Su, S. B., W. Gong, J.-L. Gao, W. Shen, P. M. Murphy, J. J. Oppenheim, J. M. Wang. 1999. A seven-transmembrane, G protein-coupled receptor, FPRL1, mediates the chemotactic activity of serum amyloid A for human phagocytic cells. *J. Exp. Med.* 189:395.
58. Fiore, S., J. F. Maddox, H. D. Perez, C. N. Serhan. 1994. Identification of a human cDNA encoding a functional high affinity lipoxin A₄ receptor. *J. Exp. Med.* 180:253.
59. Charlesworth, E. N., A. F. Hood, N. A. Soter, A. Kagey-Sobotka, P. S. Norman, L. M. Lichtenstein. 1989. Cutaneous late-phase response to allergen: mediator release and inflammatory cell infiltration. *J. Clin. Invest.* 83:1519.

60. Irani, A.-M. A., C. Huang, H.-Z. Xia, C. Kepley, A. Nafie, E. D. Fouda, S. Craig, B. Zweiman, L. B. Schwartz. 1998. Immunohistochemical detection of human basophils in late-phase skin reactions. *J. Allergy Clin. Immunol.* 101:354.
61. Menzies-Gow, A., S. Ying, I. Sabroe, V. L. Stubbs, D. Soler, T. J. Williams, A. B. Kay. 2002. Eotaxin (CCL11) and eotaxin-2 (CCL24) induce recruitment of eosinophils, basophils, neutrophils, and macrophages as well as features of early- and late-phase allergic reactions following cutaneous injection in human atopic and nonatopic volunteers. *J. Immunol.* 169:2712.

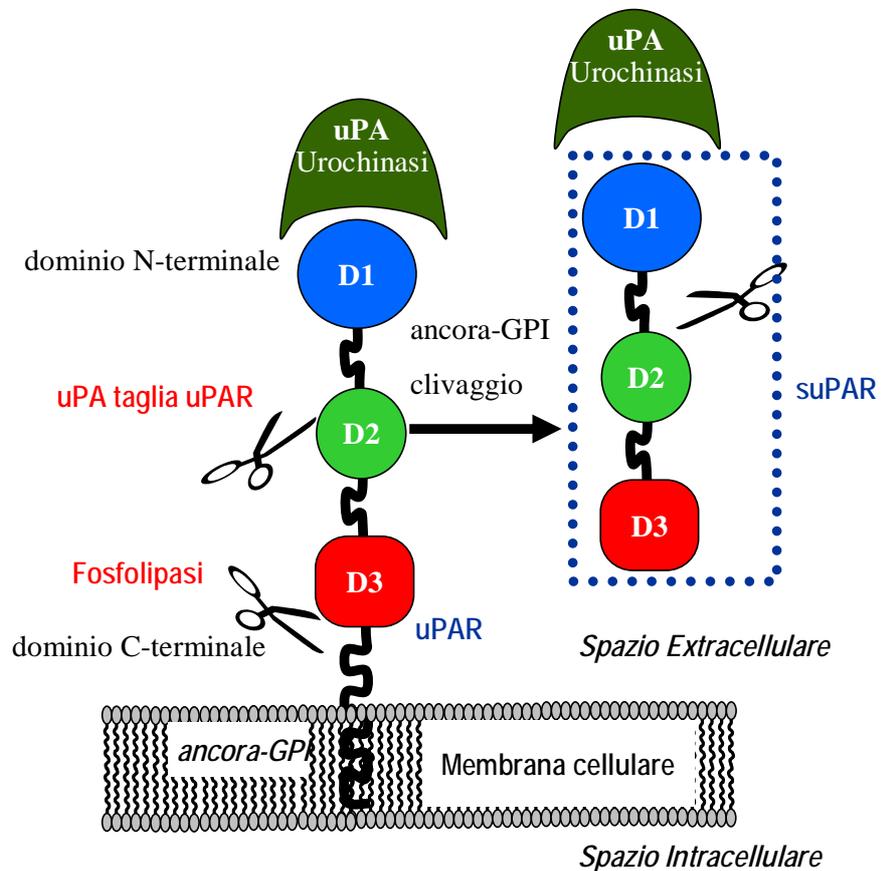


Fig. 1 Rappresentazione schematica di uPAR. La proteina matura è costituita da tre domini: D1, che rappresenta la porzione amino-terminale ed il sito d'interazione con il ligando (uPA), D2, denominata regione linker che connette D1 a D3, e D3, la porzione carbossi-terminale che ancora il recettore alla membrana cellulare grazie alla coda GPI. uPAR può essere clivato nella regione di legame fra D1/D2 da numerosi enzimi proteolitici, incluso l'uPA. Il taglio del recettore causa il rilascio della regione D1 dalla molecola. uPAR, pertanto, potrà presentarsi sulla membrana cellulare in due forme: quella costituita da tre domini (D1D2D3), che è in grado di legare uPA, e quella costituita da due domini (D2D3), che ha perso il sito di legame dell'uPA. E' possibile inoltre riscontrare forme solubili del recettore intero che possono derivare sia dal attività proteolitica della fosfolipasi D che opera la livello della coda GPI (suPAR) sia da uno splicing alternativo dell'mRNA.

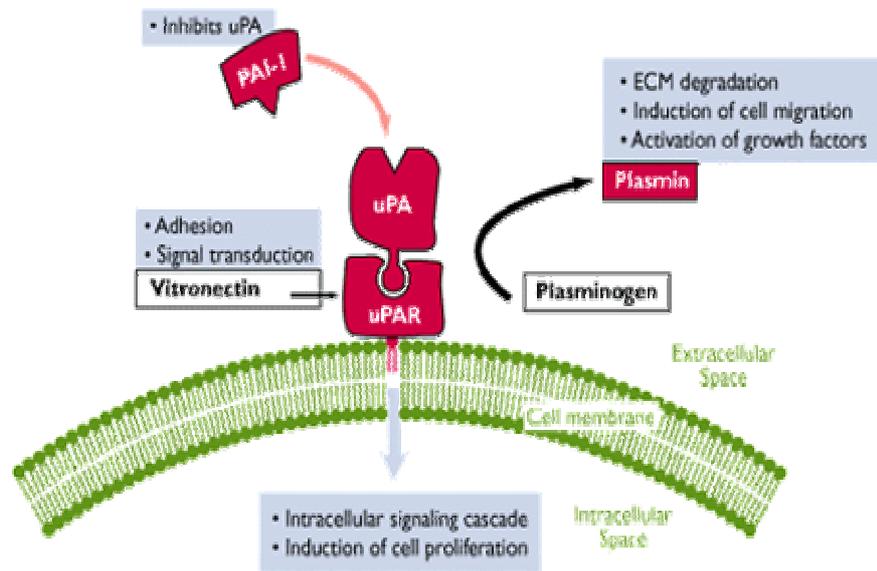


Fig. 2 Rappresentazione schematica dei principali ruoli di uPA/uPAR. Attività proteolitica dell'uPA: l'enzima, infatti, attivando il plasminogeno, promuove la degradazione della matrice extracellulare (ECM) favorendo la migrazione della cellula neoplastica. uPAR, inoltre induce un aumento delle molecole di adesione e partecipa attivamente al reclutamento dell'uPA concentrando l'enzima sulla superficie cellulare e amplificandone l'effetto.

RT-PCR

Western Blot

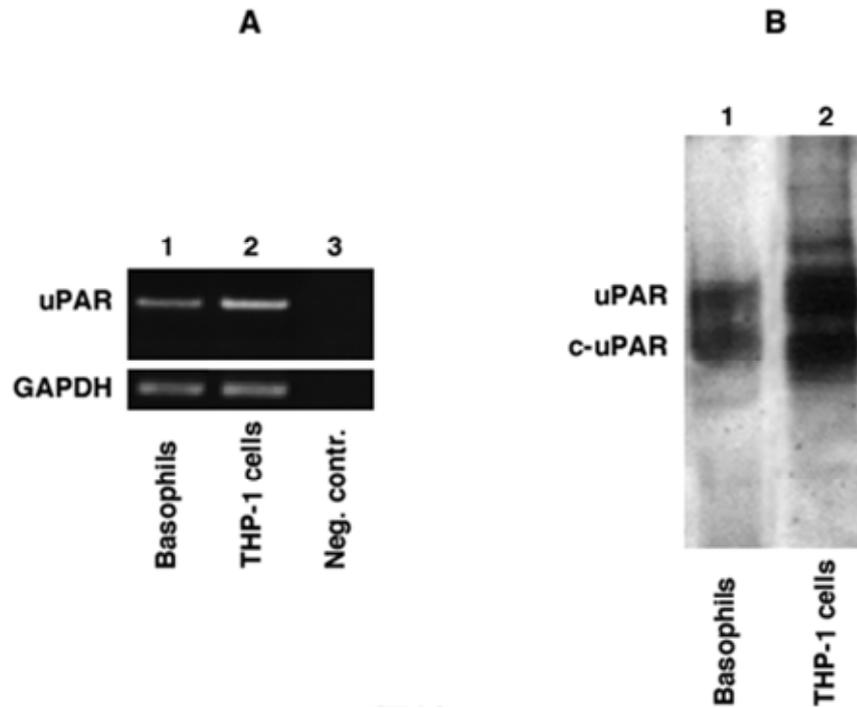


Fig. 3 Espressione di uPAR nei basofili umani e nelle cellule THP-1. **A**, I basofili umani purificati e le cellule di derivazione monocitaria THP-1, usate come controllo positivo, erano lisate in TRIzol per la preparazione dell'RNA. L'RNA era poi trascritto e amplificato da 40 cicli di PCR in presenza di specifici primers di uPAR e primers di GAPDH, come controllo. **B**, Analisi mediante Western Blot dei basofili e delle cellule THP-1, usate come controllo positivo, utilizzando un anticorpo policlonale anti-uPAR.

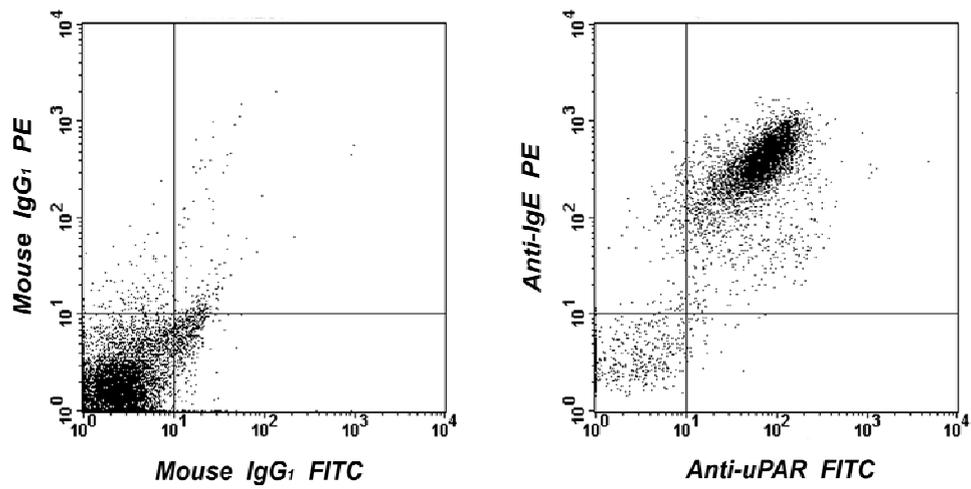


Fig. 4 Analisi citofluorimetrica dell'espressione di uPAR sulla superficie dei basofili umani. I basofili erano preincubati con un anticorpo monoclonale anti-IgE PE-coniugato, un anticorpo policlonale anti-uPAR, un anticorpo monoclonale anti-isotipo, un anticorpo di controllo isotipico FITC-coniugato.

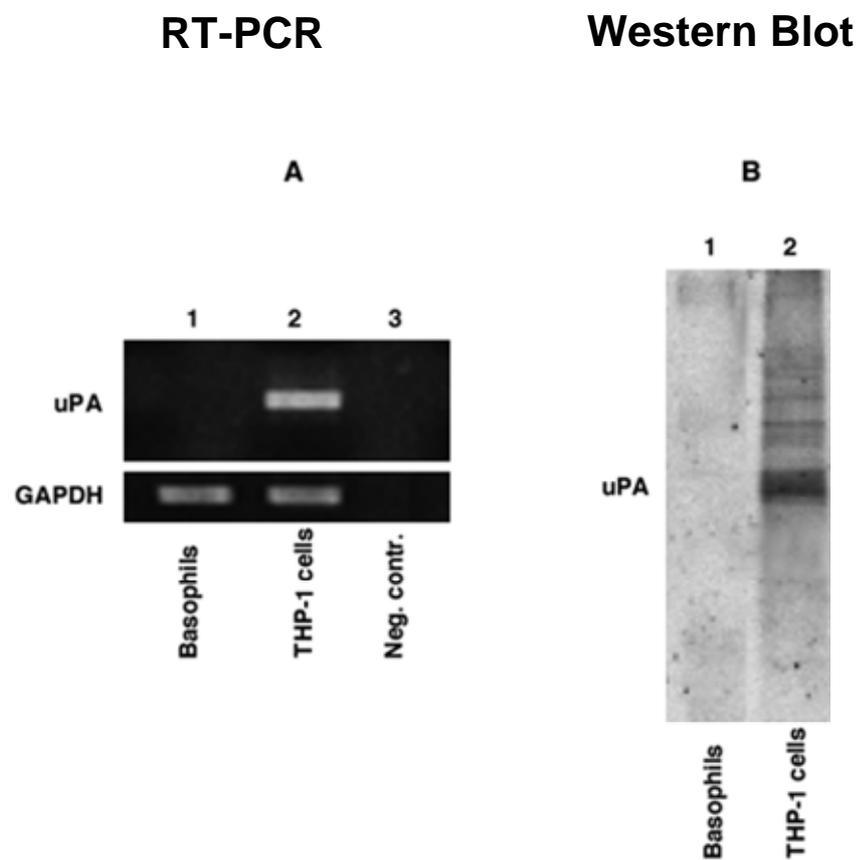


Fig. 5 Espressione di uPA nei basofili umani e nelle cellule THP-1. **A**, I basofili umani purificati e le cellule di derivazione monocitaria THP-1, usate come controllo positivo, erano lisate in TRIZol per la preparazione dell'RNA. L'RNA era poi trascritto e amplificato da 40 cicli di PCR in presenza di specifici primers di uPA e primers di GAPDH, come controllo. **B**, Analisi mediante Western Blot dei basofili e delle cellule THP-1, usate come controllo positivo, utilizzando un anticorpo policlonale anti-uPA.

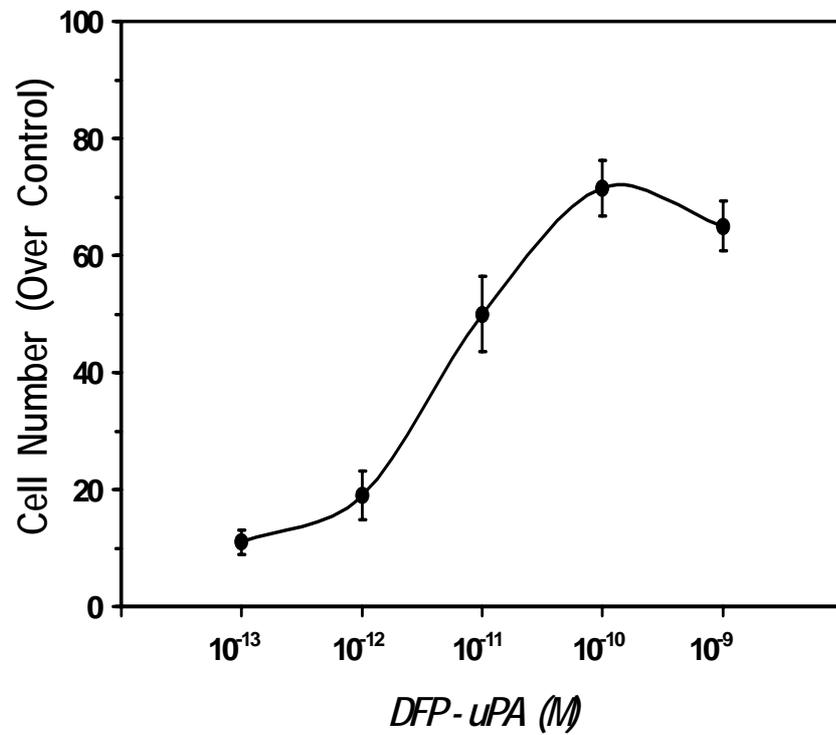


Fig. 6 Effetti di DFP-uPA sulla chemiotassi dei basofili umani. I basofili erano fatti migrare a concentrazioni variabili di DFP-uPA per 1 h a 37°C in un incubatore umidificato con CO₂ al 5%. I valori rappresentati sono le medie ± SEM di sei esperimenti su diverse preparazioni di basofili umani purificati.

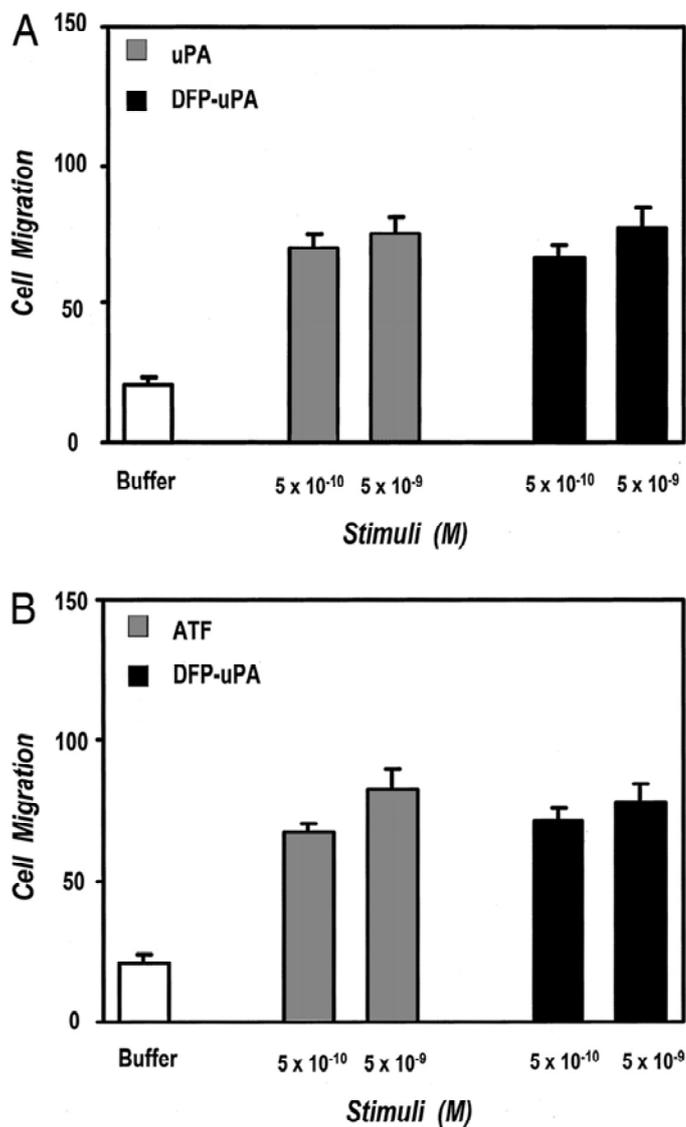


Fig. 7 Effetti di uPA e DFP-uPA (**A**) e ATF e DFP-uPA (**B**) sui basofili umani. I basofili erano fatti migrare verso concentrazioni indicate di proteine per 1 h a 37°C in un incubatore umidificato con CO₂ al 5%. I valori rappresentati sono le medie ± SEM di tre esperimenti su diverse preparazioni di basofili umani purificati.

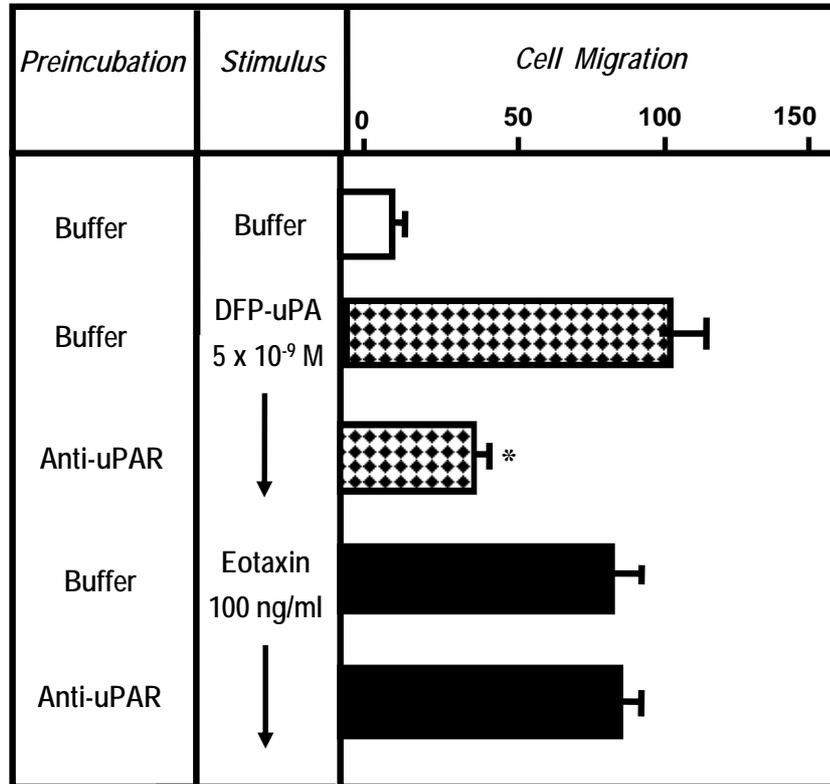


Fig. 8 Effetti della preincubazione dei basofili con un anticorpo policlonale anti-uPAR. I basofili erano preincubati 1 h a 37°C con un anticorpo policlonale anti-uPAR. I basofili erano fatti migrare a concentrazioni ottimali di DFP-uPA e di Eotassina per 1 h a 37°C in un incubatore umidificato con CO₂ al 5%. I valori rappresentati sono le medie ± SEM di sei esperimenti su diverse preparazioni di basofili umani purificati. * $p < 0.01$ quando paragonato con DFP-uPA.

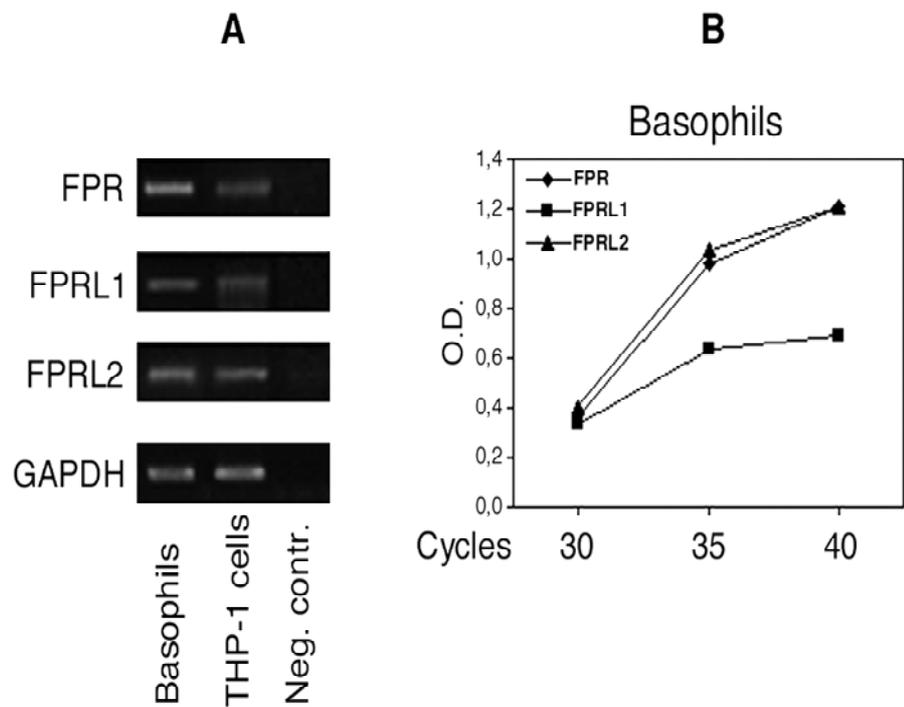


Fig. 9 Espressione dei recettori dell’FMLP nei basofili umani. **A**, Basofili purificati e cellule di controllo THP-1 erano lisate in TRIzol per la preparazione dell’RNA. L’RNA era poi trascritto e amplificato da 40 cicli di PCR in presenza di specifici primers di FPR, FPRL1, e FPRL2 e primers di GAPDH, come controllo. **B**, I livelli dei prodotti ottenuti dalla PCR dopo 30, 35, e 40 cicli erano analizzati con scanning densitometrico.

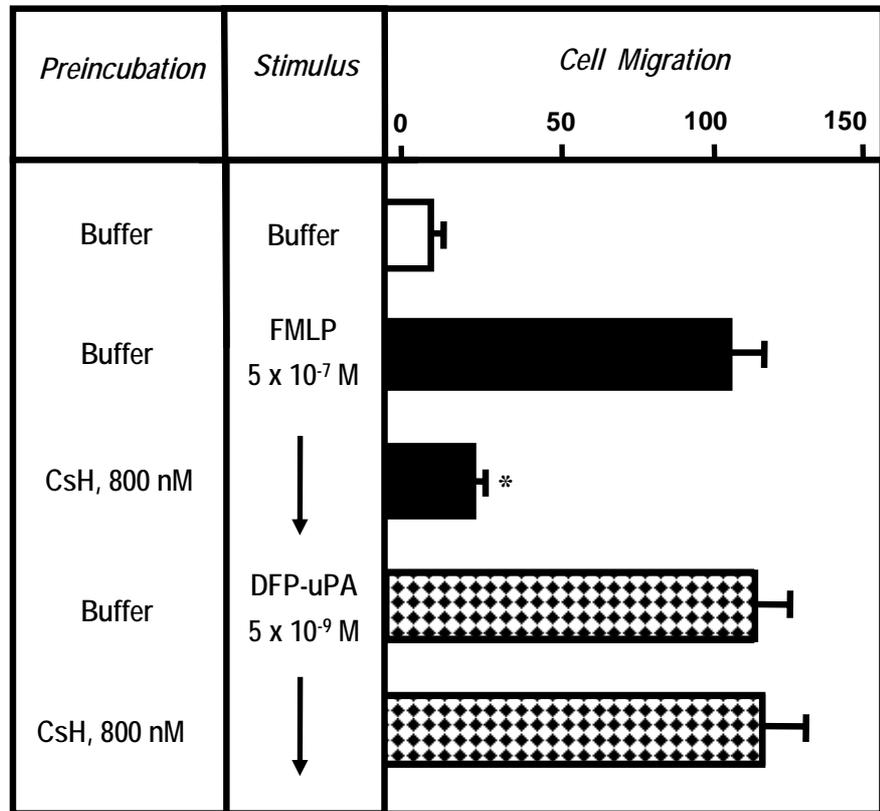


Fig. 10 A Effetti della CsH sulla chemiotassi dei basofili indotta da FMLP o DFP-uPA. I basofili erano preincubati per 5 min a 37°C con CsH (800nM) o buffer. I basofili erano fatti migrare con basse concentrazioni di FMLP (5×10^{-7} M) o DFP-uPA (5×10^{-9} M) per 1 h a 37°C in un incubatore umidificato con CO₂ al 5%. I valori rappresentati sono le medie \pm SEM di tre esperimenti su diverse preparazioni di basofili umani purificati. * $p < 0.01$ quando paragonato con FMLP.

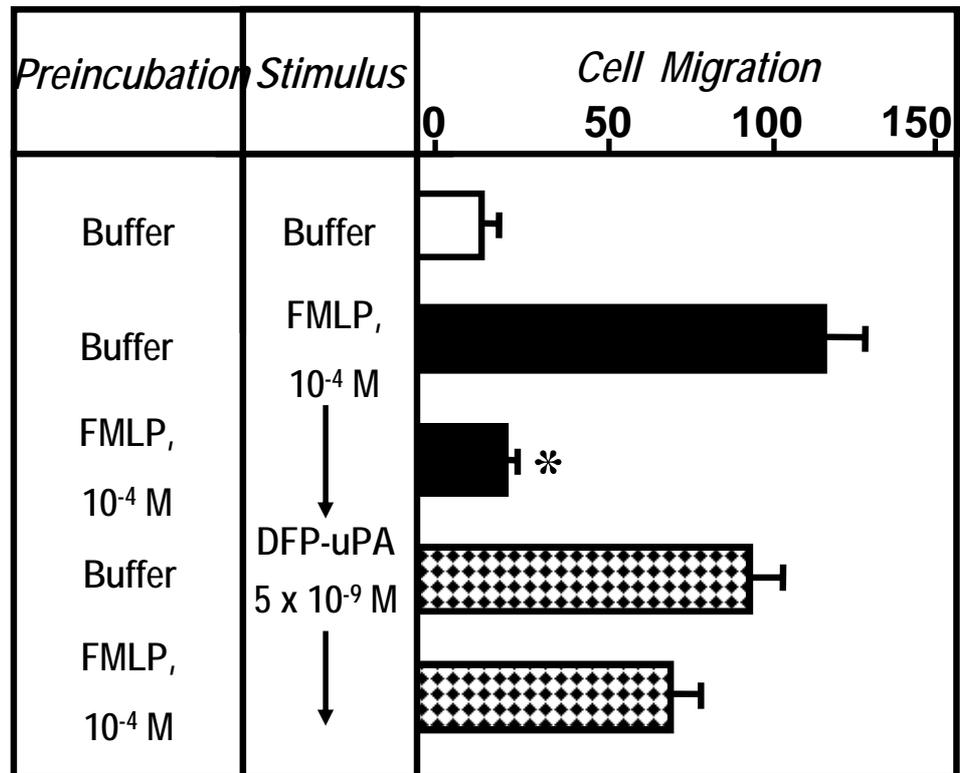


Fig. 10 B Effetti della desensibilizzazione eterologa con alte concentrazioni di FMLP (10⁻⁴ M) sulla chemiotassi dei basofili. I basofili erano incubati in PIPES EDTA (4mM) o con FMLP (10⁻⁴ M) per 30 min a 37°C. alla fine dell'incubazione le cellule erano lavate due volte e risospese in PACGM e stimulate (FMLP, uPA). I basofili erano indotti a migrare per per 1 h a 37°C in un incubatore umidificato con CO₂ al 5%. I valori rappresentati sono le medie ± SEM di cinque esperimenti su diverse preparazioni di basofili umani purificati. * *p* < 0.01 quando paragonato con FMLP.

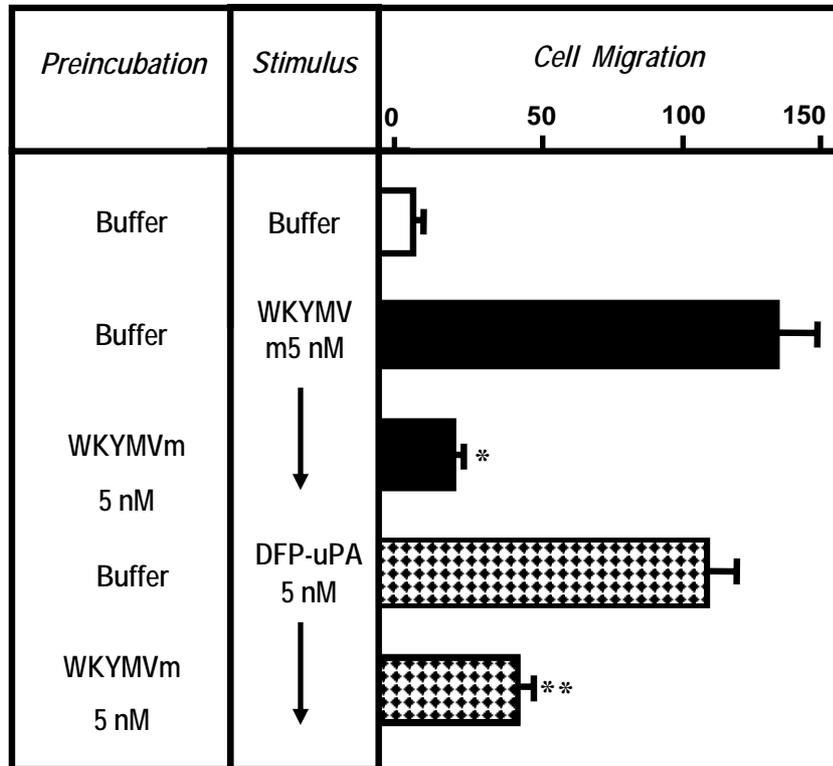


Fig. 10 C Effetti della desensibilizzazione eterologa tra il peptide WKYMVm (5×10^{-9} M) e DFP-uPA (5×10^{-9} M) sulla chemiotassi dei basofili. I basofili erano incubati in PIPES buffer contenente EDTA (4 mM) o WKYMVm (5×10^{-9} M), per 30 min a 37°C. Al termine della incubazione le cellule erano lavate per due volte e risospese in PACGM, e stimolate con WKYMVm (5×10^{-9} M) o DFP-uPA (5×10^{-9} M). I basofili erano fatti migrare per 1 h a 37°C in un incubatore umidificato con CO₂ al 5%. I valori rappresentati sono le medie \pm SEM di tre esperimenti su diverse preparazioni di basofili umani purificati. * $p < 0.01$ quando paragonato con WKYMVm. ** $p < 0.01$ quando paragonato con DFP-uPA.

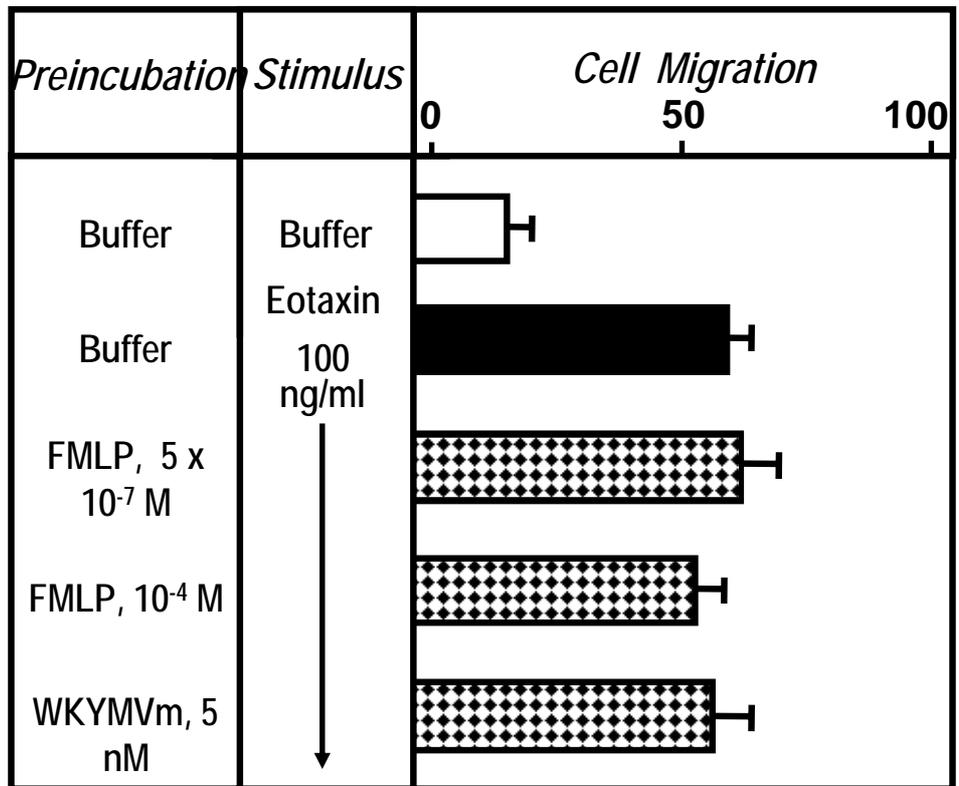


Fig. 11 A Effetti della desensibilizzazione eterologa tra basse (5×10^{-7} M) ed alte (10^{-4} M) concentrazioni di FMLP, WKYMVm (5×10^{-9} M) e eotassina (100ng/ml) sulla chemiotassi dei basofili. I basofili erano incubati in PIPES buffer contenente EDTA (4 mM) FMLP (10^{-4} M) o WKYMVm (5×10^{-9} M), per 30 min a 37°C . Al termine della incubazione le cellule erano lavate per due volte e risospese in PACGM, e stimolate con eotassina (100ng/ml). I basofili erano fatti migrare per 1 h a 37°C in un incubatore umidificato con CO_2 al 5%. I valori rappresentati sono le medie \pm SEM di tre esperimenti su diverse preparazioni di basofili umani purificati.

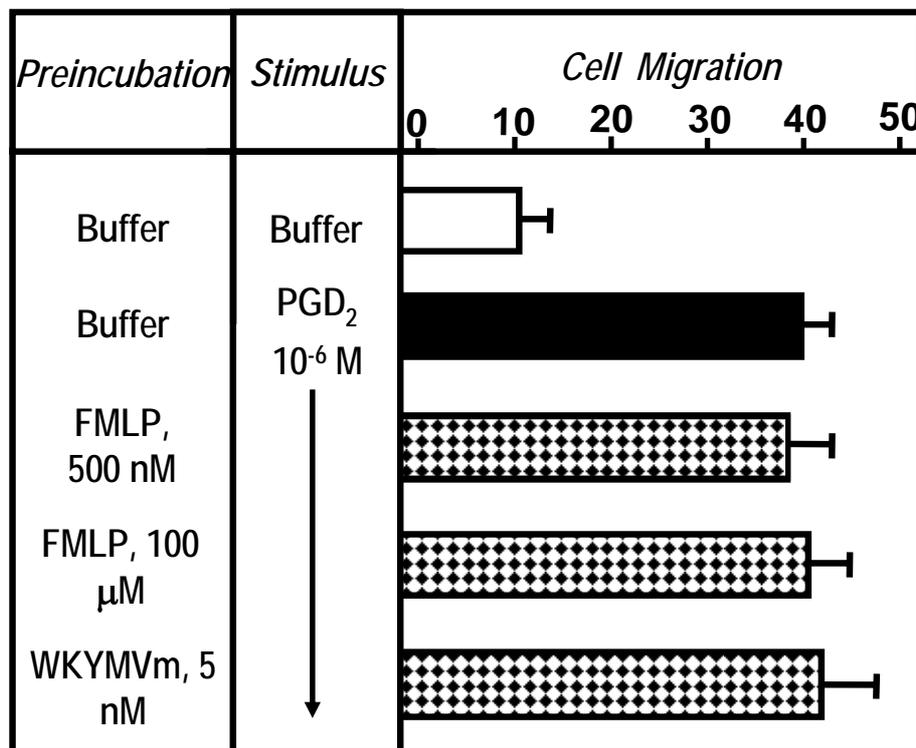


Fig. 11 B Effetti della desensibilizzazione eterologa tra basse (5×10^{-7} M) ed alte (10^{-4} M) concentrazioni di FMLP, WKYMVm (5×10^{-9} M) e PGD₂ (10^{-6} M) sulla chemiotassi dei basofili. I basofili erano incubati in PIPES buffer contenente EDTA (4 mM) FMLP (10^{-4} M) o WKYMVm (5×10^{-9} M), per 30 min a 37°C. Al termine della incubazione le cellule erano lavate per due volte e risospese in PACGM, e stimolate con PGD₂ (10^{-6} M). I basofili erano fatti migrare per 1 h a 37°C in un incubatore umidificato con CO₂ al 5%. I valori rappresentati sono le medie \pm SEM di tre esperimenti su diverse preparazioni di basofili umani purificati.

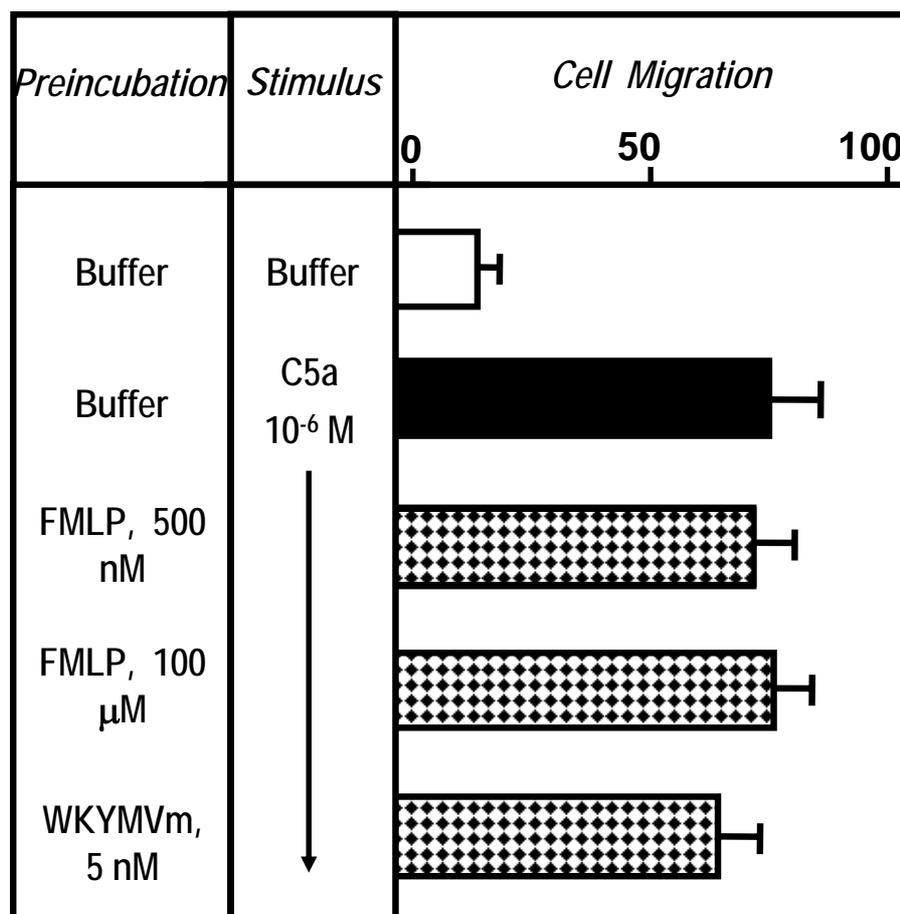


Fig. 11 C Effetti della desensibilizzazione eterologa tra basse (5×10^{-7} M) ed alte (10^{-4} M) concentrazioni di FMLP, WKYMVm (5×10^{-9} M) e C5a (10^{-6} M) sulla chemiotassi dei basofili. I basofili erano incubati in PIPES buffer contenente EDTA (4 mM) FMLP (10^{-4} M) o WKYMVm (5×10^{-9} M), per 30 min a 37°C . Al termine della incubazione le cellule erano lavate per due volte e risospese in PACGM, e stimolate con C5a (10^{-6} M). I basofili erano fatti migrare per 1 h a 37°C in un incubatore umidificato con CO_2 al 5%. I valori rappresentati sono le medie \pm SEM di tre esperimenti su diverse preparazioni di basofili umani purificati.

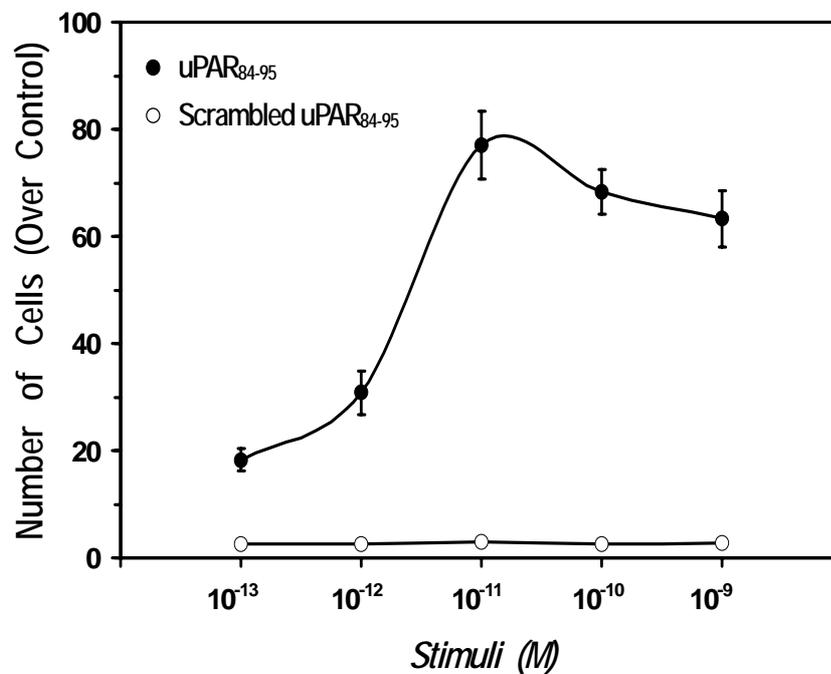


Fig. 12 Effetti di uPAR₈₄₋₉₅ e del suo peptide “scrambled” sulla chemiotassi dei basofili umani. I basofili erano fatti migrare a concentrazioni ottimali di uPAR₈₄₋₉₅ per 1 h a 37°C in un incubatore umidificato con CO₂ al 5%. I valori rappresentati sono le medie ± SEM di sei esperimenti su diverse preparazioni di basofili umani purificati.

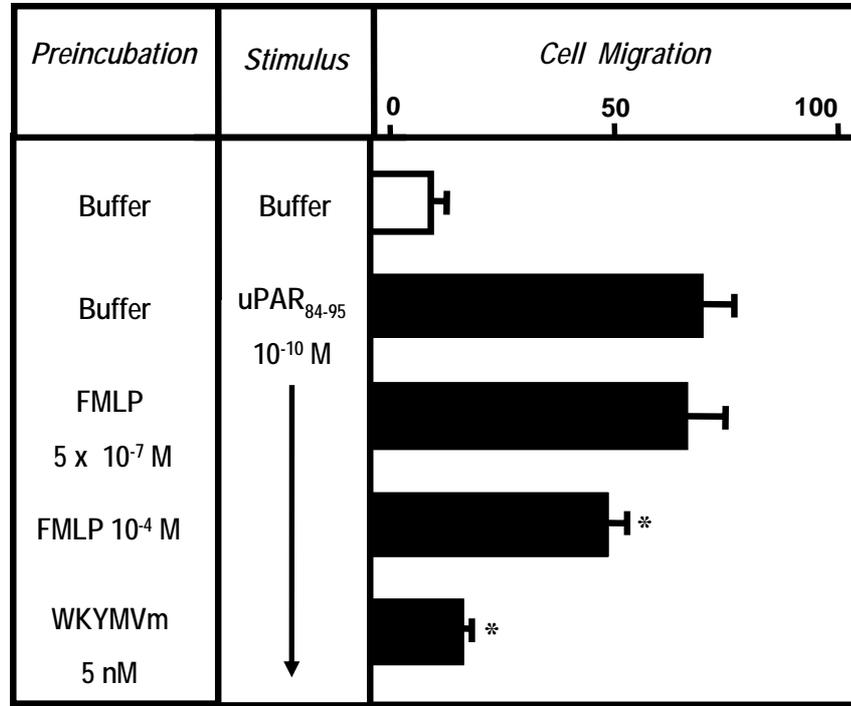


Fig. 13 Effetti della desensibilizzazione eterologa tra basse (5×10^{-7} M) e alte (10^{-4} M) concentrazioni di FMLP, WKYMVm (5×10^{-9} M), e uPAR₈₄₋₉₅ (10^{-10} M) sulla chemiotassi dei basofili. I basofili erano incubati in PIPES buffer contenente EDTA (4 mM), FMLP (5×10^{-7} M), FMLP (10^{-4} M), o WKYMVm (5×10^{-9} M) per 30 min a 37°C. Al termine della incubazione le cellule erano lavate per due volte e risospese in PACGM, e stimolate con uPAR₈₄₋₉₅ (10^{-10} M). I basofili erano fatti migrare per 1 h a 37°C in un incubatore umidificato con CO₂ al 5%. I valori rappresentati sono le medie \pm SEM di nove esperimenti su diverse preparazioni di basofili umani purificati. * $p < 0.01$ quando paragonato con uPAR₈₄₋₉₅.

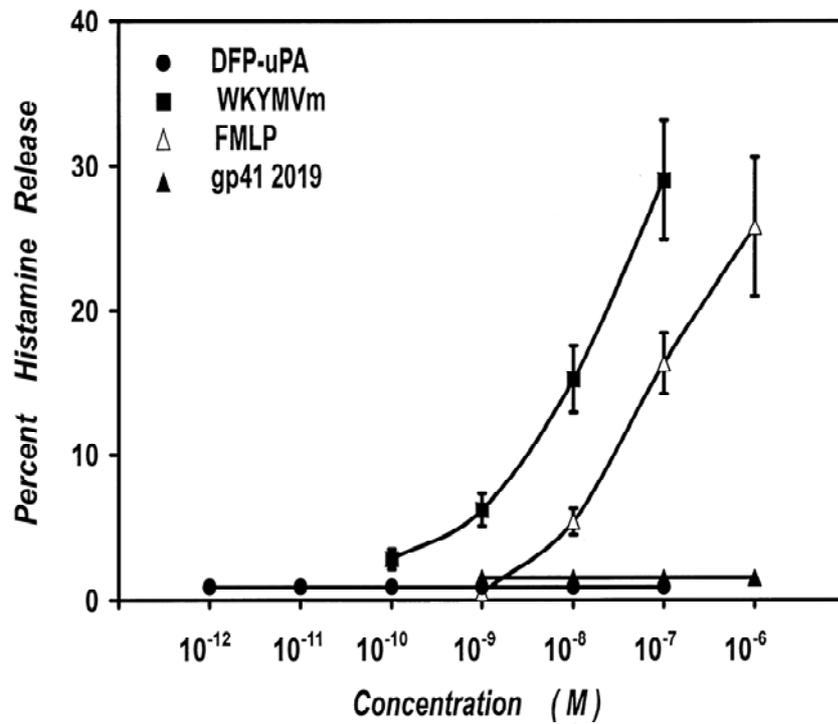


Fig. 14 Effetti di DFP-uPA, WKYMVm, FMLP, e gp41 2019 sul rilascio di istamina dai basofili umani. I basofili sono stati incubati con concentrazioni indicate degli stimoli per 45 minuti a 37°C. I valori rappresentano la medie \pm SEM ottenute da sei esperimenti con differenti preparazioni di basofili.