

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
"FEDERICO II"**

DOTTORATO DI RICERCA

IN

BIOLOGIA AVANZATA

**Indirizzo: Sistematica molecolare
(XVIII ciclo)**

**Ruolo del sistema urochinasi-recettore
nel controllo del processo apoptotico**

Relatore
Ch.ma Prof.ssa Laura Fucci

Candidata
Daniela Alfano

Correlatore
Dott.ssa M.Patrizia Stoppelli

Coordinatore
Ch.ma Prof.ssa Silvana Filosa

ANNO ACCADEMICO 2004/2005

INDICE

Sommario	p.1
1. INTRODUZIONE	p.3
1.1 Apoptosi: aspetti generali	p.4
1.2 Vie di trasduzione del segnale attivate nel processo apoptotico	p.6
1.3 Induttori dell' apoptosi	p.9
1.4 Vie di trasduzione del segnale anti-apoptotiche e fattori di crescita coinvolti	p.10
1.5 La serin proteasi urochinasi: domini e funzione	p.12
1.6 Il recettore per l'urochinasi e suo coinvolgimento nei meccanismi di sopravvivenza	p.14
1.7 Urochinasi, recettore ed apoptosi	p.16
1.8 Il sistema uPA/uPAR: rilevanza degli effetti proliferativi e anti-apoptotici nei tumori	p.19
2. RISULTATI	p.22
2.1 La serin-proteasi urochinasi protegge la linea di cellule epiteliali della retina (RPE) dall'anoikis	p.23
2.2 L'uPA protegge dall'anoikis attraverso il legame al recettore uPAR	p.24
2.3 L'uPA protegge anche dall'apoptosi indotta da UV	p.25
2.4 Modulazione del sistema uPA/uPAR in cloni stabili di cellule RPE	p.25
2.5 Cloni cellulari con una ridotta espressione di uPA o uPAR mostrano un'aumentata sensibilità all'apoptosi	p.28
2.6 Il legame dell'uPA al recettore determina l'attivazione di PI3K e MAPK	p.30
2.7 Il "survival signal" uPA-dipendente è mediato sia da MAPK che da PI3K	p.31
2.8 L'attivazione dei "pathways" MAPK- e PI3K-dipendenti da parte dell'uPA induce la sintesi della proteina anti-apoptotica Bcl-x	p.32
3. DISCUSSIONE	p.34
4. MATERIALI E METODI	p.48
4.1 Colture cellulari	p.49
4.2 Costruzione dei plasmidi pSUPER-uPAi e pSUPER-uPARi	p.49
4.3 Trasformazione batterica e preparazione del DNA plasmidico	p.53
4.4 Trasfezione stabile di cellule RPE	p.55
4.5 Analisi dell'uPA, dell'uPAR, di Akt e ERK1/2 mediante "Western blotting"	p.56

4.6 Anoikis	p.59
4.7 Induzione di apoptosi con UV e cis-platino	p.60
4.8 Saggio ELISA per l'analisi quantitativa dell'apoptosi	p.61
4.9 Real-Time PCR	p.62
5. BIBLIOGRAFIA	p.65

1. INTRODUZIONE

1.1 Apoptosi: aspetti generali

Fino agli anni '70 si riteneva che la morte cellulare fosse unicamente un fenomeno patologico legato ad eventi traumatici che portavano alla necrosi di vaste regioni del tessuto colpito. Dal punto di vista fenomenologico, nella necrosi, la cellula lisa riversando il suo contenuto all'esterno, innescando nell'area circostante una reazione infiammatoria. Studi successivi, tuttavia, hanno reso sempre più evidente l'esistenza di un tipo di morte cellulare che si attua secondo un programma presente nel codice genetico di tutti gli eucarioti pluricellulari e che viene denominata apoptosi. A differenza della cellula necrotica, la cellula apoptotica non riversa il contenuto citosolico all'esterno, ma perde rapidamente volume, si distacca dalle cellule vicine ed espone sulla membrana particolari determinanti riconosciuti da cellule adiacenti che la fagocitano. In generale, proprio perché non vi è lisi con fuoriuscita di citoplasma nello spazio extracellulare, l'apoptosi non induce un fenomeno infiammatorio. A livello nucleare, si osserva la disgregazione del nucleolo/i, il taglio della laminina, la condensazione ed il taglio della cromatina in frammenti di lunghezza pari a quella dei tratti internucleosomali (180-200bp o multipli interi di questi numeri). I frammenti di materiale nucleare si riversano nel citoplasma mentre per evaginazione della membrana ("blebbing") si staccano i cosiddetti corpi apoptotici che vengono fagocitati. Il programma apoptotico è svolto in maniera attiva, con dispendio energetico e attraverso l'utilizzo di specifici prodotti genici. Infatti, la morte cellulare per apoptosi non è casuale, ma svolge diverse funzioni, come contribuire al mantenimento dell'omeostasi numerica cellulare bilanciando il processo mitotico. Inoltre è fondamentale per l'eliminazione delle strutture vestigiali o stadio-specifiche durante lo sviluppo embrionale e fetale; nel sistema immunitario l'apoptosi è importante per l'eliminazione selettiva delle cellule

timiche autoreattive, per lo spegnimento delle risposte immunitarie e per l'uccisione del bersaglio nelle reazioni di citotossicità. Alcuni dei fenomeni già citati, possono essere parzialmente riproducibili in coltura, cosa che permette lo studio dei "pathways" molecolari coinvolti. Gli studi condotti fino ad oggi hanno fatto luce sulle caratteristiche morfologiche e biochimiche dell'apoptosi, mentre molto resta ancora da scoprire dei meccanismi genetici che la regolano. A livello molecolare, è possibile suddividere il processo apoptotico in tre fasi: 1) induzione; 2) esecuzione; 3) riconoscimento e fagocitosi. Negli eucarioti superiori, la fase d'induzione è regolabile e reversibile ed è il prodotto di un "cross-talk" tra segnali di sopravvivenza e di morte. I diversi segnali apoptogeni possono poi seguire due (o forse più) distinti "pathways": la via recettoriale, attivata da "segnali di morte" che attivano specifici recettori di superficie, e la via mitocondriale, innescata da segnali endogeni e regolata dal mitocondrio. Entrambe le vie convergono nell'attivazione delle caspasi, centrali esecutori del processo. Le caspasi (cysteine aspartate-specific proteinases) sono enzimi proteolitici il cui centro reattivo è caratterizzato da una cisteina e che tagliano il loro bersaglio a valle di un residuo di acido aspartico in una sequenza di quattro aminoacidi (Trp-Glu-His-Asp-X); in particolare tale sito è individuato soprattutto per l'acido aspartico e per gli aa che lo precedono nella direzione N-terminale. Le caspasi sono presenti in forma inattiva nel citoplasma; ognuna è attivata dalla precedente, e, a sua volta, attiva la successiva in una reazione a cascata. Tipicamente, le caspasi iniziatrici (caspasi-2, -8, -9, -10) attivano le caspasi effettrici (caspasi-3, -6, -7), ma possono essere anche attivate da queste ultime producendo così un'amplificazione del segnale. L'attivazione delle caspasi effettrici termina con la degradazione dei substrati finali, tra cui PARP (poli(ADP)ribosio polimerasi), la cui attivazione accelera la frammentazione del DNA e ne inibisce la riparazione. Altri substrati sono la

laminina A, che causa la perdita d'integrità della matrice nucleare, e l' α -foldrina, probabilmente associata a cambiamenti morfologici della cellula apoptotica. Inoltre, uno dei più importanti bersagli è ICAD, l'inibitore della DNasi CAD (Caspasi Activated DNase) che, viene inattivato, consentendo tagli a doppio filamento internucleosomici, con conseguente frammentazione del DNA. Nella successiva fase di riconoscimento e fagocitosi, la superficie cellulare espone segnali e secerne molecole chemotattiche che richiamano i macrofagi; se, come può accadere in coltura, la cellula non può essere fagocitata, va incontro a necrosi secondaria.

1.2 Vie di trasduzione del segnale attivate nel processo apoptotico

I due principali “pathways” molecolari attivati nel processo apoptotico sono quello recettoriale, e quello mitocondriale (Fig.1). La via recettoriale è innescata da specifici recettori di membrana, definiti “recettori di morte”, come Fas/Apo1/CD95 , TNF (Tumor Necrosis Factor), TRAIL (TNF- α -Related Apoptosis Inducing Ligand), i cui ligandi possono essere solubili o presenti sulla superficie di altre cellule che entrano in diretto contatto con la cellula innescandone il processo apoptotico. Il legame della molecola-segnale porta all'oligomerizzazione del recettore sulla membrana che favorisce l'assemblaggio di un complesso costituito da uno o più adattatori, come FADD (Fas Associated Death Domain protein) e da più pro-caspasi iniziatrici, come la pro-caspasi 8. Queste molecole si assemblano mediante interazioni omeotipiche: gli adattatori fanno da ponte tra il recettore e la pro-caspasi attraverso l'interazione del proprio “death domain” e “death effector domain” con quello del recettore, e della pro-

caspasi rispettivamente. L'indotta prossimità delle pro-caspasi 8, dovuta al legame con l'adattatore FADD, porta alla loro auto-attivazione.

La via mitocondriale costituisce un via apoptotica alternativa alla via recettoriale, che si attiva in risposta a segnali endogeni, come ad esempio i danni al DNA, ma può essere innescata anche in un secondo momento, in risposta all'attivazione della stessa via recettoriale. Questi diversi segnali arrivano al mitocondrio, inducendo una permeabilizzazione della membrana esterna. Questo porta alla fuoriuscita di diversi fattori pro-apoptotici che provocano la formazione, nel citoplasma, di un complesso denominato apoptosoma, analogo a quello che si costituisce a livello del dominio intracellulare dei recettori di morte. L'apoptosoma è costituito da un adattatore ad attività ATPasica, detto APAF-1 (Apoptotic Protease Activating Factor I), dal citocromo C e dalla pro-caspasi iniziatrice 9. Il citocromo C, rilasciato nel citoplasma, si lega ad APAF-1, ne provoca un cambio conformazionale che porta all'esposizione di un dominio di interazione con pro-caspasi 9 e ne induce una auto-attivazione, analogamente a quello che succede per le pro-caspasi 8 nella via recettoriale. Sia l'apoptosoma che il complesso formatosi a livello dei recettori di morte innescano una cascata di eventi proteolitici che convergono nell'attivazione delle caspasi effettrici, come la caspasi 3. A valle della caspasi -3, il programma apoptotico si dirama in una moltitudine di sottoprogrammi il cui effetto finale è l'ordinato smantellamento e rimozione della cellula.

L'attivazione delle caspasi segna una decisione importante, in quanto rende irreversibile il programma apoptotico; per questa attivazione, è importante il bilancio fra tutti quei segnali di morte, dalla via recettoriale o mitocondriale, e di sopravvivenza, veicolati da fattori di crescita, citochine, molecole di adesione e relativi recettori.

In questa fase assolvono un ruolo fondamentale una serie di proteine, definite i “modulatori” dell’apoptosi, appartenenti alla famiglia di Bcl-2 (Fig. 2).

Bcl-2 è il capostipite di una famiglia di geni che include sia membri ad attività anti-apoptotica (Bcl-2, Bcl-xL) che pro-apoptotica (bid, bax, bad, bak). La caratteristica delle proteine di questa famiglia, localizzate sulla membrana nucleare, su quella mitocondriale esterna e su quelle del reticolo endoplasmatico, è la capacità di interagire tra loro formando sia omodimeri che eterodimeri: semplificando, l’eterodimerizzazione può essere vista come una “neutralizzazione” tra membri pro e anti-apoptotici, mentre la preponderanza di omodimeri anti-apoptotici manterrà integra la membrana mitocondriale e la preponderanza di omodimeri pro-apoptotici ne determinerà l’apertura di pori che causerà la caduta di potenziale mitocondriale e la fuoriuscita del citocromo C ed altri fattori pro-apoptotiche. Tra questi, l’endonucleasi AIF (Apoptosis-Inducing Factor), che causa la condensazione della cromatina e un estesa frammentazione del DNA in modo indipendente dalle caspasi (*Daugas et al., 2000*), Smac/DIABLO (“second mitochondria-derived activator of caspases”/IAP-binding protein with low pI), che lega i membri della famiglia IAP (Inhibitors of Apoptosis Proteins) neutralizzando la loro attività anti-apoptotica (*Verhagen et al., 2000*), Omi/HtrA2, che si comporta in modo analogo a Smac/Diablo (*Martins et al., 2002*) e diverse pro-caspasi, incluse la 2, 3, e 9. Il mitocondrio può essere coinvolto nel processo apoptotico anche se il segnale parte dai recettori di membrana, in quanto la caspasi 8 ha la capacità di indurre un taglio proteolitico attivatore in Bid, un membro pro-apoptotico della famiglia Bcl-2. Questo, come detto in precedenza, indurrà la fuoriuscita del citocromo C dalla membrana mitocondriale, l’attivazione della caspasi 9 con la conseguente amplificazione della cascata caspasi.

1.3 Induttori dell' apoptosi

Molte sostanze tossiche, farmaci, radicali liberi dell'ossigeno e radiazioni ionizzanti causano danni al DNA o gravi stress al reticolo endoplasmatico o ai mitocondri: tutte queste condizioni, qualora superino una certa soglia, possono indurre la morte per apoptosi. Per i miei esperimenti, ho utilizzato come induttori di apoptosi sia le radiazioni ionizzanti UV-C, che dei farmaci come il cis-platino (alla base di numerose terapie anti-tumorali), ed in particolare ho rivolto la mia attenzione all'apoptosi indotta dalla mancanza di ancoraggio o anoikis. Le radiazioni ionizzanti, come gli UV-C, causano danni al DNA attivando un processo molto complesso che include l'attivazione del gene onco-soppressore p53 e di recettori di morte. Questi ultimi sono direttamente attivati dagli UV o attraverso il rilascio autocrino di ligandi specifici. Il meccanismo d'azione del cis-platino, o cis-diclorodiamminoplatino, non è ancora ben conosciuto; esso reagisce con il DNA dando luogo alla formazione di legami crociati con due atomi di azoto N(7) di guanine adiacenti. Probabilmente, oltre a creare un blocco sterico delle funzioni del DNA (replicazione e trascrizione), l'addotto iniziale sul DNA scatena, attraverso fattori proteici di riconoscimento del danno, una complicata cascata di reazioni che coinvolgono molti elementi (proteine HMG, enzimi di riparazione, fattore p53, ed altri) portando alla morte cellulare per apoptosi. L'Anoikis (dal greco "senza casa") è il nome utilizzato per indicare l'apoptosi indotta dalla mancanza di ancoraggio. Per alcuni tipi cellulari, ed in particolare per le cellule di natura epiteliale, il contatto con la matrice extracellulare (ECM) costituisce un fattore di sopravvivenza; pertanto, quando il segnale viene a mancare, queste cellule si "auto-percepiscono" come "inutili" o potenzialmente metastatiche e si autoeliminerebbero. L'anoikis svolge un ruolo cruciale sia in

condizioni patologiche che fisiologiche; ad esempio durante lo sviluppo, nel mantenimento dell'organizzazione tissutale e l'omeostasi. Le cellule endodermali interne perdono l'adesione alla matrice extracellulare e vanno incontro ad anoikis durante l'embriogenesi dei vertebrati, così da permetterne la cavitazione (Coucouvanis *et al.*, 1995). Un altro esempio è fornito dal fatto che nei mammiferi la proteolisi diffusa dalla matrice extracellulare causa *in vivo* anoikis delle cellule epiteliali e contribuisce in questo modo all'involuzione della ghiandola mammaria (Streuli *et al.*, 1999). Nell'intestino le cellule epiteliali perdono l'ancoraggio appena raggiungono la superficie luminale delle cripte, vanno soggette ad anoikis e quindi vengono rilasciate nel lume intestinale (Grossmann *et al.*, 1998). Evidenze mostrano che i cheratinociti della pelle possono andare incontro ad anoikis, quando perdono l'attacco dalla membrana basale e con conseguente desquamazione (Watt *et al.*, 2002).

1.4 Vie di trasduzione del segnale anti-apoptotiche e fattori di crescita coinvolti

La sopravvivenza delle cellule somatiche richiede la continua presenza di segnali trofici e di sopravvivenza; gli organismi pluricellulari producono infatti, una varietà di fattori di sopravvivenza che cooperano con precursori metabolici per sostenere la vita dei tessuti. Per massimizzare i vantaggi e ridurre i costi energetici associati alla vita, gli organismi pluricellulari hanno evoluto meccanismi comuni che regolano la vita e la morte delle loro singole cellule ed il bilancio tra questi due eventi è fondamentale per assicurare il corretto sviluppo e mantenimento dei tessuti. Un eccesso di proliferazione, insieme ad una scarsità di morte cellulare può determinare malattie come il cancro e l'autoimmunità; d'altra parte,

un'insufficiente sopravvivenza cellulare può portare alla degenerazione tissutale e a disordini nello sviluppo. Tra i fattori di sopravvivenza vi sono gli ormoni ed i fattori di crescita. Inoltre per le cellule di natura epiteliale ed endoteliali, la sopravvivenza è assicurata anche dall'interazione con la matrice extracellulare attraverso le integrine, recettori transmembrana, costituiti da una subunità alfa ed una beta e presenti in forma di eterodimeri. A livello molecolare, i meccanismi con cui agiscono i fattori di sopravvivenza non sono ancora completamente chiari; probabilmente, il loro ruolo principale è quello di mantenere attivi i "pathways" di sopravvivenza e proteggere l'integrità del mitocondrio; il meccanismo non è semplice, un unico fattore di sopravvivenza è in grado di innescare simultaneamente cascate segnaletiche multiple, così come una combinazione di più fattori può agire in modo sinergico (*Ballif et al., 2001*). In Fig. 3 sono rappresentate tre cascate di trasduzione di segnale centrali innescate da fattori di sopravvivenza, che convergono su substrati effettori comuni, regolando l'integrità mitocondriale: quella delle MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase), di PI3-K/Akt (Phosphatidylinositide 3-Kinase/Protein Kinase B) e di PKA (Protein Kinase A). Tutti e tre i "pathways" possono controllare il macchinario apoptotico neutralizzando l'effetto pro-apoptotico della proteina Bad, e attivando il fattore trascrizionale CREB (cyclic adenosina monophosphate response element binding protein), che influenza positivamente la trascrizione di diversi geni, tra cui quelli di alcuni fattori di sopravvivenza e di membri anti-apoptotici della famiglia Bcl-2. Le MAPK sono attivate in risposta a fattori di crescita come EGF (Epidermal Growth Factor) (*Jost et al., 2001*), FGF (Fibroblast Growth Factor) o IGF (Insulin-like Growth Factor), e probabilmente svolgono un ruolo anche nel meccanismo anti-apoptotico integrina-dipendente, mediante la proteina adattatrice Shc (*Barberis et al., 2000*).

PI3K media l'effetto anti-apoptotico di specifici fattori di crescita attivando Akt, una chinasi Ser-Thr nota anche come proteina chinasi B (PKB); questo "pathway" sembra essere alla base della protezione dall'anoikis nelle cellule di natura epiteliale. In questo tipo di cellule assolve un ruolo fondamentale la chinasi delle adesioni focali (FAK) che collega i segnali integrino-dipendenti al "pathway" delle MAPK.

1.5 La serin proteasi urochinasi: domini e funzione

L'attivatore del plasminogeno di tipo urinario o urochinasi (uPA) è una proteasi a serina capace di attivare, con un singolo taglio proteolitico, il plasminogeno, presente nel plasma in forma enzimaticamente inattiva. Questo processo porta alla formazione di plasmina, una proteasi serinica ad ampia specificità, responsabile della lisi della fibrina e capace di degradare, direttamente o indirettamente, diverse componenti della matrice extracellulare e delle membrane basali (*Mignatti et al., 1993*) (Fig.4). Tuttavia, negli ultimi anni, varie evidenze hanno indicato che l'uPA induce una cascata di reazioni intracellulari indipendentemente dalla sua attività catalitica, controllando motilità, proliferazione ed adesione cellulare; tali effetti sono mediati da uno specifico recettore di membrana definito uPAR (*Blasi et al., 1994*). L'uPA è, dunque, una molecola bifunzionale: da una parte ha il dominio catalitico, dall'altra il dominio di legame al suo specifico recettore e la capacità di stimolare crescita, motilità, adesione cellulare e trascrizione di specifici geni; ciò suggerisce, inoltre, alcune implicazioni per la biologia dei tumori: è ipotizzabile che l'incrementata produzione di urochinasi e del suo recettore da parte di cellule tumorali, ne possa accrescere la capacità invasiva, sia fornendo alla cellula un'attività proteolitica di superficie, sia stimolandone la

motilità (Carriero *et al.*, 1994). Alla complessità funzionale dell'uPA corrisponde la sua complessità strutturale; infatti, così come altre proteasi della stessa famiglia, è una glicoproteina costituita da una serie di "domini" strutturalmente e funzionalmente distinti che sono: il dominio "growth factor-like" o "EGF-like", omologo al fattore di crescita epidermico EGF (aa 1-45), responsabile del legame specifico al recettore uPAR; il dominio denominato "kringle" (aa 45-135), possibile responsabile delle interazioni con le proteine della matrice extracellulare; il dominio catalitico (aa 158-411), coinvolto nell'attività proteolitica di superficie, separato dal "kringle" mediante il cosiddetto "peptide di connessione" (aa 135-158) che contiene il sito di attivazione del proenzima (Fig.4). Il prodotto primario di traduzione è una glicoproteina di 431 amminoacidi (pre-pro-urochinasasi), secreta contestualmente alla rimozione di un peptide segnale e all'aggiunta di gruppi fosforici e glicosidici (Fig.5). La forma extracellulare o pro-uPA è una glicoproteina di 411 amminoacidi a catena singola, con un peso molecolare di circa 50 KDa, priva di attività catalitica. Lo zimogeno viene poi attivato da un singolo taglio proteolitico tra la lisina 158 e l'isoleucina 159, operato *in vitro* dalla plasmina e dalla catepsina B. L'enzima attivo è costituito da due catene polipeptidiche tenute insieme da un ponte disolfuro: la catena A (aa 1-158) di circa 18 KDa, che comprende la porzione ammino-terminale con il sito di legame al recettore specifico di membrana, e la catena B (159-411) di circa 33 KDa, che comprende la porzione carbossi-terminale contenente il sito catalitico. L'isolamento dei prodotti di degradazione dell'uPA, dopo l'attivazione con plasmina, ha consentito l'identificazione di un secondo sito di taglio, dopo la lisina 135, che determina il rilascio di un frammento ammino-terminale (ATF, "Amino Terminal Fragment"), e di una molecola di detta "LMW uPA" che mantiene l'attività catalitica. Il frammento ammino terminale in particolare, il

“growth factor-like domain”, conservano la capacità di legare il recettore specifico e di stimolare specifici “pathways” cellulari.

1.6 Il recettore per l'urochinasi e suo coinvolgimento nei meccanismi di sopravvivenza

Una delle molecole coinvolte nella regolazione dell'attività enzimatica dell'urochinasi umana è lo specifico recettore di membrana o uPAR, identificato per la prima volta sulla superficie cellulare della linea di cellule leucemiche umane di tipo linfo-monocitario U937 (*Stoppelli et al., 1985, Stoppelli et al., 1986*). Successivamente è stata dimostrata la sua presenza sulla superficie di fibroblasti, cellule endoteliali, polimorfonucleati e linee cellulari tumorali di diversa origine (*Vassalli et al., 1994*).

L'uPAR è costituito da una singola catena polipeptidica di 313 amminoacidi, con un peso molecolare di circa 55 KDa, altamente glicosilata, ancorata alla componente fosfolipidica della membrana cellulare mediante una regione glicosil-fosfatidil-inositolica o “GPI” (*Ploug et al., 1991*). Questa “àncora” fosfolipidica consente al recettore di scorrere lungo la membrana cellulare, localizzandosi ovunque sia richiesta la sua attività; ad esempio, a livello dei contatti focali, dove è necessaria l'attività proteolitica uPA-dipendente (*Janicke et al., 1990*). Preferenzialmente si trova nei cosiddetti “lipid rafts”, dei compartimenti specializzati dove avviene la sua dimerizzazione e la sua interazione con la vitronectina (*Blasi et al., 2002*). In un lavoro molto recente è stato proposto un nuovo modello di interazione del complesso uPA/uPAR, secondo cui la regione di interazione dell'uPA all'uPAR comprende la cavità centrale dell'uPAR, lasciando la superficie esterna del recettore accessibile ad interazioni con altre proteine,

come vitronectina e integrine (*Llinas et al., 2005*). Nella struttura dell'uPAR, dall'estremità N-terminale, si distinguono tre domini detti D1, D2 e D3 (*Chapman et al., 1997*). Il dominio D1 contiene il sito di legame ad alta affinità per il dominio GFD dell'uPA (*Robbiati et al., 1990*). I domini D2 e D3 aumentano l'affinità per il ligando specifico, probabilmente stabilizzando la struttura spaziale del D1. Sebbene la loro funzione non sia stata ancora chiarita, questi due domini sembrano coinvolti nel legame alla vitronectina, una proteina della matrice extracellulare. Tra il D1 e il D2 esiste una regione chemotattica con sequenza SRSRY (residui 88-92) che ha effetto sulla polimerizzazione dell'actina, sull'attività protrusiva di membrana e sulla migrazione in maniera uPAR-indipendente ma che necessita di un'alta affinità per i recettori dell'fMLP e della vitronectina, grazie al quale interagiscono (*Gargiulo et al., 2005*). Non sono ancora completamente note le modalità attraverso le quali l'uPAR stimoli delle risposte cellulari, non potendo fisicamente raggiungere l'interno della cellula e recenti evidenze, provenienti dal laboratorio della dott.ssa Stoppelli, dimostrano che l'uPA induce una mobilitazione dell'uPAR, favorita dalla natura del suo sistema di ancoraggio alla membrana (*Franco et al., 1997*). Tale spostamento potrebbe essere seguito dall'associazione con una integrina, come il recettore per la vitronectina $\alpha_v\beta_5$ (*Carriero et al., 1999*). Molteplici evidenze suggeriscono che l'uPAR può essere un dinamico regolatore della funzione delle integrine, quasi sicuramente attraverso interazioni "laterali"; ciò è ampiamente sostenuto da evidenze sperimentali in cui anticorpi anti-integrine inibiscono il "signaling" uPA-dipendente, così come anticorpi anti-uPAR inibiscono l'adesione, migrazione e proliferazione mediata dalle integrine (*Wei et al., 1996*). Ulteriori informazioni sulla possibile associazione dell'uPAR con altre molecole vengono dallo studio delle "caveolae", microdomini della membrana ricchi in lipidi, in cui

l'uPAR si associa a diverse molecole come le caveoline, proteine transmembranarie legate ad elementi del citoscheletro, chinasi della famiglia di Src e FAK. Dati recenti mostrano come l'uPAR, oltre a regolare motilità e adesione, sia implicato in meccanismi di "survival". Data l'incapacità di raggiungere l'interno della cellula, è generalmente assunto che il recettore espliciti la sua funzione all'interno di un complesso multiproteico (*Fazioli et al., 1997; Nguyen et al., 2000*) che in cellule che esprimono alti livelli di uPAR include uPAR, l'integrina $\alpha_5\beta_1$ ed il recettore per l' EGF (*Liu et al., 2002*). Prove dirette dell'implicazione dell'uPAR nei fenomeni di proliferazione provengono dal sistema della membrana corioallantoidea dell'embrione di pollo, in cui vengono inoculate cellule di carcinoma epidermoide umano (HEp-3); in tale sistema, una riduzione del 70% dei livelli di uPAR induce uno stato di "tumor-dormancy" in vivo, con un arresto del ciclo cellulare nelle fasi G0/G1 (*Aguirre-Ghiso et al., 1999*). Ciò sembra dovuto ad un equilibrio tra il processo proliferativo regolato dalla chinasi ERK-1 (Extracellular Regulated Kinase) e quello apoptotico regolato da p38. Allo stesso modo, si è visto che una iper-espressione di uPAR è in grado di far passare le cellule HEp3 dallo stato di "tumor dormancy" a quello di crescita, attraverso la sua diretta interazione con l'integrina $\alpha_5\beta_1$ che causa una costitutiva attivazione di FAK e dell'EGFR (*Aguirre-Ghiso et al., 2001*).

1.7 Urochinasi, recettore ed apoptosi

Il bilancio tra proliferazione cellulare ed apoptosi è un aspetto critico per la fisiopatologia cellulare. Nei tumori, ad esempio, durante la progressione neoplastica che si accompagna all'aumento di volume del tumore stesso, è noto che si determina una condizione di ipossia nella regione centrale della massa. A

livello di quest'ultima vi è morte apoptotica che è controbilanciata da un effetto anti-apoptotico esplicito dai fattori di crescita secreti dalle stesse cellule tumorali e dalle cellule fibroblastoidi che le circondano. In questa transizione, il sistema uPA-uPAR assolve un ruolo importante, infatti recenti dati mostrano che una iperespressione di uPA e uPAR contribuiscono ad impedire la morte cellulare favorendo la crescita del tumore.

Recenti evidenze mostrano una stretta relazione tra il sistema uPA/uPAR e la sensibilità all'apoptosi. Dati recenti indicano che cellule di glioblastoma SNB19, esprimenti costrutti uPAR antisense iniettate *in vivo*, sono meno invasive di quelle parentali. Il fenotipo meno invasivo è associato alla perdita del potenziale mitocondriale transmembrana, al rilascio di citocromo c dal mitocondrio, alla successiva attivazione di caspasi-9 e quindi all'apoptosi (Yanamandra *et al.*, 2000). Inoltre cellule di glioma che presentano un ridotto livello di uPAR sono più sensibili all'apoptosi indotta dal fattore TRAIL (tumor necrosis factor-alpha-related apoptosis-inducing ligand-induced) rispetto alle parentali. Il fatto che cloni cellulari mancanti di uPA presentano un livello più alto di mRNA dei recettori TRAIL DR4 e DR5 rispetto alle cellule parentali può, almeno in parte, giustificare la loro accresciuta sensibilità (Krishnamoorthy *et al.*, 2001). E' ragionevole che l'effetto anti-apoptotico dell' uPAR sia dovuto, almeno in parte, alla sua capacità di attivare la cascata di trasduzione del segnale Ras-ERK in più tipi cellulari diversi. In cellule di tumore alla mammella, trattate con anticorpi anti-uPA bloccanti l'interazione dell'uPA con l'uPAR, il livello di ERK fosforilato diminuisce fortemente e il livello di apoptosi aumenta, rivelando un circuito autocrino in cui l'uPA è il maggior determinante dell'attivazione di ERK e della protezione dall'apoptosi (Ma Z *et al.*, 2001). La correlazione positiva tra il livello di espressione di uPA e la resistenza all'apoptosi è suggerita dall'evidenza che

cellule di glioblastoma in cui il livello di uPA è ridotto mediante antisenso presentano una diminuzione della sopravvivenza e un'augmentata sensibilità all'apoptosi indotta da staurosporina (*Chandrasekar et al., 2003*).

La scoperta che proteine anti-apoptotiche come Bcl-2 e Bcl-xL potessero svolgere un ruolo nella progressione tumorale ha permesso di focalizzare l'attenzione sull'analisi della loro espressione in linee cellulari cancerose e campioni tumorali. Come l'uPA e l'uPAR, sia Bcl-2 che Bcl-xL sono frequentemente iperespresse nelle neoplasie umane (*Cheng et al., 2001*). Alcune informazioni presenti in letteratura sulla relazione esistente tra uPA, uPAR e membri della famiglia Bcl-2 sono degne di nota. Innanzitutto, il livello di espressione di Bcl-2 in due linee cellulari di glioma maligno controlla positivamente l'espressione di MMP-2/-3/-9/-12 e l'uPA legata alla superficie cellulare mentre riduce il livello di mRNA degli inibitori della metalloproteasi. Inoltre l'iperespressione di Bcl-2 promuove migrazione e invasione di cellule di glioma (*Wick et al., 1998*). E' noto anche che l'iperespressione di Bcl-2 regola positivamente l'espressione di uPAR attraverso il fattore trascrizionale Sp1 e la chinasi ERK, che è un importante mediatore in questo circuito regolatorio. Dopo trattamento di cellule di carcinoma alla mammella con specifici ologonucleotidi anti-Bcl-2 viene indotta una diminuzione del livello di espressione di uPAR (*Trisciuoglio et al., 2004*).

Dati recenti mostrano che il recettore di morte Fas o CD95, riscontrato in dosi elevate in parecchie cellule tumorali umane apoptosi-resistenti, se stimolato con il ligando CD95L, causa un incremento di motilità cellulare e capacità invasiva. In queste condizioni CD95L induce la trascrizione di NF-kB, Erk1/2 e uPA. Inoltre anticorpi anti-uPA inibiscono la migrazione indotta da CD95, suggerendo l'esistenza di un legame funzionale tra l'uPA e la cascata di trasduzione CD95-mediata (*Barnhart et al., 2004*). Queste informazioni, nel loro complesso,

suggeriscono un legame fra uPA/uPAR e protezione dall'apoptosi che il presente lavoro si propone di approfondire.

1.8 Il sistema uPA/uPAR: rilevanza degli effetti proliferativi e anti-apoptotici nei tumori

E' stato proposto che, durante la progressione tumorale, le cellule acquisiscano almeno sei capacità, come l'autosufficienza nella crescita, l'insensibilità ai segnali inibitori della crescita, la capacità di evadere l'apoptosi, un illimitato potenziale replicativo, capacità angiogenetica e metastatica da parte delle cellule endoteliali o cancerose, rispettivamente; tali cellule infatti sviluppano un'alterazione nell'"affinità" e nell'"avidità" per l'ECM (*Hood et al., 2002*). Sebbene tutte queste acquisite capacità siano importanti perché una cellula diventi trasformata e quindi possa dare origine al tumore, la capacità di evadere l'apoptosi gioca un ruolo cruciale a vari stadi dello sviluppo tumorale (*Hanahan et al. 2000*). La protezione dall'apoptosi è quindi un meccanismo cruciale per la realizzazione del processo della trasformazione. L'attivazione di oncogeni come Ras o Myc e l'ipossia che si verifica al centro della massa tumorale possono dar luogo ad apoptosi ; la capacità delle cellule a migrare e metastatizzare può generare l'anoikis (*Kauffman et al., 1997*). Diventa quindi essenziale per una cellula trasformata acquisire la resistenza all'apoptosi o all'anoikis a livello di molteplici punti, durante la progressione tumorale. Alla luce di ciò, l'uPA ha la capacità di sostenere il fenotipo maligno attraverso numerosi meccanismi. Prima di tutto, grazie alla sua capacità di degradare la matrice, favorisce la disseminazione del tumore; in secondo luogo, stimola la motilità cellulare favorendo il distacco cellulare dal tumore primario; inoltre, come alcune precedenti evidenze e il

presente lavoro sostengono, protegge le cellule dall'apoptosi, favorendone la sopravvivenza. L'uPAR stesso, oltre a concentrare l'attività proteolitica dell'uPA sulla superficie cellulare ed essendo un mediatore di molti effetti ligando-dipendenti della crescita, della motilità e dell'apoptosi, potrebbe essere di per sé un fattore anti-apoptotico (Fig.6) (Alfano *et al.*, 2005) Il ridotto livello di PI3K/Akt and ERK1/s attivi in cellule prive di uPAR suggerisce che l'uPAR possa modulare il rapporto sopravvivenza/morte cellulare attraverso il controllo di importanti cascate di trasduzione del segnale. (Lund *et al.*, 2002) Un dato interessante, infatti, proviene da topi deficienti del gene soppressore di tumore p16INK4a codificante Cdkn2a; è stato identificato un gruppo di geni che correla con la formazione di tumori: tra questi vi è anche il gene dell'uPAR che può essere considerato come un "cooperating oncogene" (Adachi *et al.*, 2002) tutte insieme queste informazioni permettono di concludere che il sistema uPA/uPAR, insieme alla potente capacità di indurre migrazione e crescita, ne ha anche evoluto un'altra mirata a proteggere le cellule dall'apoptosi, contribuendo così al mantenimento del fenotipo trasformato. Ciò suggerisce che il sistema uPA/uPAR è un bersaglio obbligato per interventi terapeutici. Queste strategie dovrebbero avere un impatto critico sia sulla cascata proteolitica iniziata dall'uPA che su diverse vie di trasduzione del segnale mediate dall'uPAR (Romer *et al.*, 2004). Esperimenti in un modello singenico di ratto mostrano come tumori primari esposti a IgG anti-uPA presentano una riduzione della crescita e della disseminazione del tumore, con un concomitante aumento di apoptosi delle cellule tumorali, evidenziando come un'alterazione dell'interazione tra uPA e uPAR è capace anche di influenzare il livello di apoptosi (Rabbani *et al.*, 2002). Inoltre, alcuni peptidi ciclici sintetizzati, derivati dalla regione di legame dell'uPA all'uPAR e inibenti l'interazione uPA/uPAR, bloccano la disseminazione

intraperitoneale di cellule cancerose umane (*Sato et al., 2002*). Un possibile approccio terapeutico, basato su nuove strategie inibenti la crescita tumorale, è suggerito dall'introduzione adenovirus-mediata di una sequenza antisenso per uPAR e di una senso per il soppressore tumorale p16. Questa combinazione causa un arresto del ciclo cellulare di cellule di glioma, in G0/G1e inibisce sensibilmente la crescita in un modello di tumore intracerebrale *ex vivo* e in uno di tumore subcutaneo *in vivo* (*Fabbrini et al., 1997; Adachi et al., 2002*). Recentemente sono stati generati ligandi di uPAR per mutagenesi sito-specifica combinata con pegilazione amino-terminale capaci di diminuire significativamente le dimensioni del glioma U87MG in topi, in seguito ad un incremento del tempo di sopravvivenza e dell'apoptosi delle cellule tumorali (*Bu et al., 2004*). Alcuni risultati che correlano il livello di espressione di uPA con lo stato di metilazione del promotore e la crescita tumorale suggeriscono un interessante approccio terapeutico. Infatti se cellule altamente invasive quali le cellule umane di cancro della mammella MDA-231 sono soggette al trattamento con S-Adenosil-Metionina (AdoMet) che causa ipermetilazione e inibisce la demetilazione, l'espressione di uPA è annullata e la crescita del tumore e l'invasione *in vivo* appaiono sensibilmente ridotti (*Pakneshan et al., 2004*). Sebbene la loro rilevanza *in vivo* sia difficile da prevedere, il numero di inibitori che hanno come bersaglio l'uPA e l'uPAR è decisamente in crescita e ci si aspettano delle svariate verifiche nei prossimi anni.

2. RISULTATI

2.1 La serin-proteasi urochinasi protegge la linea di cellule epiteliali della retina (RPE) dall'anoikis

Oggetto di questa tesi è lo studio degli effetti dell'interazione uPA/uPAR sulla morte cellulare programmata. Particolare attenzione è stata rivolta all'anoikis, che è un tipo di apoptosi indotta dalla distruzione delle interazioni tra cellule epiteliali e matrice extracellulare (*Frisch et al., 1994*). Infatti, nel presente lavoro, è stata utilizzata una linea derivata da cellule dell'epitelio pigmentato della retina umana o RPE (Retinal Pigment Epithelial). *In vivo*, le cellule dell'epitelio pigmentato sono nutrite dai vasi sanguigni della coroide ed hanno una funzione trofica nei confronti dei fotorecettori della retina. In particolare, la linea da utilizzata in questo lavoro è stata ottenuta da cellule umane normali mediante immortalizzazione per trasfezione della subunità catalitica della telomerasi; dunque, non essendo una linea trasformata, mantiene ancora una certa sensibilità a diversi stimoli pro-apoptotici ed, in particolare, all'anoikis. Pertanto, essa rappresenta un sistema adatto per studiare i meccanismi molecolari che regolano la risposta cellulare a stimoli pro- ed anti-apoptotici. Esperimenti di caratterizzazione della linea cellulare, condotti nel laboratorio della dott.ssa Stoppelli, hanno verificato che le cellule RPE, in accordo con dati presenti in letteratura (*Elner et al., 2003; Alexander et al., 1999*), esprimono sia uPA, secreta nel mezzo di coltura, che uPAR ($3,5 \times 10^6$ circa recettori/cellula). Allo scopo di eliminare l'ancoraggio, le cellule vengono poste su piastre su cui è stato stratificato il poli-2-idrossietilmetacrilato (poly-HEMA), un composto che impedisce la deposizione di matrice e, quindi, l'adesione alla piastra (*Frisch et al., 1994*). Inoltre, per minimizzare la formazione di aggregati cellulari, che potrebbero inibire l'attivazione del "pathway" apoptotico (*Zhang et al., 2004*), le cellule sono tenute in terreno di coltura in presenza di metil-cellulosa, un composto inerte con una densità tale da immobilizzare le cellule nella loro posizione. Per eliminare interferenze da parte della regione catalitica della proteasi, è stato

utilizzato il frammento ammino-terminale dell'uPA (ATF, residui 1-135) e l'uPA 1-158 (residui 1-158 della sequenza umana), entrambi cataliticamente inattivi ma capaci di legare il recettore uPAR (Fig.7A). In breve, le cellule RPE vengono incubate per 8 ore, in piastre stratificate con poly-HEMA in presenza o in assenza di ATF o di uPA 1-158. Successivamente, il livello di anoikis viene determinato mediante un kit disponibile in commercio denominato "Cell death detection ELISA assay" che identifica la presenza dei complessi DNA-istoni nel citoplasma, condizione che si verifica in seguito alla lisi nucleare durante il processo apoptotico. Tale saggio immuno-enzimatico colorimetrico è basato sulla determinazione qualitativa e quantitativa di frammenti di DNA associato agli istoni attraverso l'uso di due anticorpi monoclonali diretti rispettivamente contro il DNA e gli istoni (maggiori dettagli sono riportati nella sezione "Materiali e Metodi"). La Fig.7B mostra che il distacco forzato dalla matrice produce un incremento del livello basale di anoikis delle RPE. Inoltre, è da notare anche che la presenza di ATF o uPA 1-158 riduce drasticamente il livello di anoikis. L'effetto protettivo è dose-dipendente con un massimo a 10 nM uPA, concentrazione che cade nell'intervallo fisiologico di attività dell'uPA dopo legame con uPAR (*Ploug et al., 1994*).

2.2 L'uPA protegge dall'anoikis attraverso il legame al recettore uPAR

Come mostrato in Fig.7B, i frammenti di uPA che mancano del dominio proteasico proteggono le cellule epiteliali dall'apoptosi indotta da distacco forzato. L'uPA, quindi, non richiede la sua attività proteolitica per esercitare il suo effetto anti-apoptotico. Per verificare se è il legame dell'uPA con l'uPAR ad essere necessario per l'effetto protettivo dell'uPA, è stato utilizzato un anticorpo policlonale anti-uPAR (399R) che blocca l'interazione uPA/uPAR e di un peptide denominato GFDp (residui 12-32, DCLNGGTAVSNKYFSNIHWCN), corrispondente alla regione minima per il legame

al recettore (*Appella et al., 1987*). Tale peptide conserva l'effetto chemotattico uPAR-dipendente dell'uPA (dati non mostrati). Come mostrato in Fig.8, la preincubazione delle cellule RPE con l'anticorpo 399R abolisce completamente l'effetto di protezione dell'ATF. Inoltre, il GFDp mantiene la capacità dell'ATF di proteggere dall'anoikis, diversamente dal peptide "scrambled" (DCLNGGTAVSAAAAANIHWCN) che non lega l'uPAR. Tali risultati portano alla conclusione che l'effetto anti-apoptotico dell'uPA, viene esercitato attraverso il legame con l'uPAR.

2.3 L'uPA protegge anche dall'apoptosi indotta da UV

Al fine di verificare se l'uPA proteggesse esclusivamente dall'apoptosi distacco-indotta o svolgesse un ruolo più generale come fattore di sopravvivenza, è stato esaminato l'effetto dell'ATF sulla sopravvivenza cellulare dopo irradiazione delle RPE con raggi UV. Innanzitutto, circa il 50% di cellule irradiate con luce UV ad un'energia di 100mJ, sopravvive a distanza di 24 ore, come un test con il "trypan blue" ha permesso di verificare. Tale dato è confermato anche dall'analisi ELISA che valuta l'entità della morte apoptotica. In maniera molto simile a quanto avveniva per l'anoikis, sia l'uPA 1-158 che l'ATF sono capaci di ridurre la sensibilità delle cellule RPE anche all'apoptosi UV-dipendente, come quantificato dal saggio immunoenzimatico di morte cellulare (Fig.9). Dunque, l'interazione dell'uPA con l'uPAR innesca un segnale di sopravvivenza che protegge le cellule RPE da vari insulti pro-apoptotici.

2.4 Modulazione del sistema uPA/uPAR in cloni stabili di cellule RPE

Per verificare ulteriormente il ruolo del sistema uPA/uPAR si è pianificato di ridurne o incrementarne il livello così da valutare se l'alterazione di questi componenti potesse

influenzare la sensibilità cellulare all'apoptosi. Dunque, sono state generate linee cellulari derivanti da RPE, in cui è stato artificialmente modulato il livello di espressione di uPA o di uPAR. I cloni cellulari iper-esprimenti uPAR sono stati ottenuti trasfettando stabilmente le cellule RPE con il vettore pcDNA3-uPAR al cui interno è stato clonato il cDNA dell'uPAR (Figure 10). Per ridurre il livello di espressione dell'uPA o dell'uPAR, invece, è stata utilizzata la tecnica dell'"RNA interference", che si può attuare attraverso l'introduzione nella cellula di un piccolo (21-22nt) RNA a doppio filamento (definito siRNA) complementare al gene che deve essere silenziato o di un plasmide codificante per un siRNA. In entrambi i casi è possibile ottenere il silenziamento genico post-trascrizionale in animali e piante, attraverso un processo sequenza-specifico iniziato da un RNA a doppio filamento (dsRNA) omologo a parte della sequenza del gene da silenziare. La costruzione degli oligo specifici, clonati nel plasmide pSUPER, è stata possibile grazie ad un apposito programma, basato su un algoritmo che tiene conto di alcune caratteristiche fondamentali (descritte in dettaglio nella sezione Materiali e Metodi). Tale metodologia computerizzata ha indicato per l'uPA le seguenti sequenze:

1) 5'GATCCCCCACGCAAGGGGAGATGAAGTTCAAGAGACTTCATCTCCCCT
TGCGTGTTTTTGGAAA3'

2) 5'GATCCCCTGACTGTTGTGAAGCTGATTTCAAGAGAATCAGCTTCACAA
CAGTCATTTTTGGAAA3'

Per l'uPAR, invece, la scelta è caduta sulla sequenza:

5'GATCCCCGCCGTTACCTCGAATGCATTTCAAGAGAATGCATTCGAGGTAA
CGGCTTTTTGGAAA3'

Tali oligo sono costituiti da due sequenze di 19 nt ripetute ed invertite (sottolineate), omologhe ad una regione dell'mRNA dell'uPA o dell'uPAR e separate tra loro mediante un "loop" di 9 nt, che non presenta nessuna omologia con le due sequenze. Come si

vede dalla figura 10, a valle del promotore della RNA polimerasi III dell'istone H1, tra i siti unici Bgl II (al 5') e Hind III (al 3'), viene inserito l'oligo sintetico, a doppio filamento, di 64-mer.

Per la trasfezione, cellule RPE cresciute alla subconfluenza, sono state incubate con pcDNA3-uPAR, pSUPER-uPAi, pSUPER-uPARi o con i rispettivi vettori privi di inserto per generare i controlli. Dopo la trasfezione e la selezione, sono stati isolati cloni singoli che sono stati cresciuti ed analizzati per il livello di espressione di uPA o uPAR. Per quanto riguarda l'uPA, poichè è una proteina secreta, il suo livello di espressione è stato valutato mediante l'analisi di mezzi di coltura dei diversi cloni stabili, dopo essere stati concentrati per precipitazione con acido tricloracetico. La tecnica adoperata è quella del "Western blotting" utilizzando un anticorpo policlonale diretto contro la regione ammino-terminale. Per analizzare invece il livello di uPAR sono stati preparati degli estratti cellulari totali dai singoli trasfettanti; anche in questo caso è stata adoperata la tecnica del "Western blotting" utilizzando un anticorpo monoclonale anti-uPAR (R2, che riconosce un epitopo tra i domini D2 e D3 dell' uPAR). Uno dei vantaggi di questa metodologia consiste nel fatto che essa consente di determinare la quantità di uPAR, in modo indipendente dalla sua affinità per il ligando specifico marcato, come avverrebbe con la tecnica del "binding". L'affidabilità della quantizzazione si determina analizzando con la medesima metodologia, quantità crescenti di mezzi di coltura contenenti uPA e verificando la linearità del segnale ottenuto. L'analisi densitometrica ha permesso di quantizzare il livello di espressione della proteina nei diversi cloni cellulari stabili rispetto a quello delle cellule parentali trasfettate con il vettore. Sono stati analizzati un totale di 30 cloni "interference" per uPA e 24 cloni "interference" per uPAR. Di quelli esaminati, i più significativi sono stati ri-analizzati. Tra questi, i cloni (SiuPA-4, -8, -17) presentavano un sostanziale decremento di pro-uPA (il pro-enzima inattivo dell'urochinasi, MW 50 kDa) (2-10% del

controllo), mentre per l'uPAR i cloni scelti (SiuPAR-8, -12 e -20) mostravano una riduzione del livello di espressione pari a circa il 50-70% del controllo. E' interessante notare che i cloni SiuPA con una consistente riduzione del prodotto derivano tutti da pSUPER contenente la prima delle due sequenze indicate da EXTRACTOR. Riguardo ai 14 cloni cellulari ottenuti trasfettando il pcDNA3-uPAR, ne sono stati scelti tre (RPE/uPAR2, 6 e 17), che presentano un livello di espressione di uPAR di circa 5 volte superiore al controllo (Fig.11).

2.5 Cloni cellulari con una ridotta espressione di uPA o uPAR mostrano un'augmentata sensibilità all'apoptosi

Il passo successivo è stato quello di analizzare la risposta sia dei cloni SiuPA che SiuPAR all'apoptosi indotta da radiazioni ionizzanti UV-C. A questo scopo, cellule sub-confluenti sono state coltivate in assenza di siero per circa 18 ore e successivamente irradiate con luce ultravioletta, come descritto nella sezione dei Materiali e Metodi; ne è stato, quindi, analizzato il livello di apoptosi dopo ulteriori 24 ore in assenza di siero, mediante il kit ELISA. Nella Fig.12A è riportato il livello di apoptosi UV-dipendente dei cloni SiuPA-4, -17 e SiuPAR-8 e -20 rispetto alle cellule RPE/vec.

Appare evidente che tutti i cloni cellulari in cui il livello di uPA o di uPAR è stato ridotto, presentano un livello di apoptosi UV-dipendente, di circa il doppio rispetto a quello delle cellule parentali contenenti il solo vettore (RPE/vec).

Per meglio caratterizzare la risposta cellulare agli stimoli pro-apoptotici in cloni con un ridotto livello di uPAR, l'analisi è stata estesa agli effetti del cis-platino (o cis-diclorodiamminoplatino). A tale scopo, cloni SiuPA e SiuPARi (10^5 cellule/campione), tenuti per una notte in assenza di siero, sono stati trattati con 100 μ M cis-platino per ulteriori 24 ore. Dopo aver raccolto le cellule adese e quelle in sospensione, ne è stato

analizzato il livello di morte apoptotica mediante l'utilizzo del saggio ELISA precedentemente descritto. Anche in questo caso (Fig.12B), i cloni SiuPA e SiuPAR si mostrano 2-3 volte più sensibili all'apoptosi indotta con cis-platino, rispetto alle cellule RPE/vec.

Successivamente, è stata analizzata la risposta sia dei vari cloni (SiuPA, SiuPAR, RPE/uPAR) all'anoikis o apoptosi indotta da mancanza di ancoraggio. Applicando la medesima procedura descritta in precedenza, in seguito a sospensione forzata dei diversi cloni di cellule RPE, è stato saggiato il loro livello di anoikis mediante il saggio ELISA. Il livello di apoptosi è stato misurato mediante una stima dell'attivazione di una serie di molecole coinvolte nella risposta cellulare scatenata da stimoli apoptotici, come le caspasi (3, 9) e l'enzima polyADP-ribosio-polimerasi (PARP). In particolare l'attivazione della polimerasi PARP o della caspasi-3 (dati non mostrati) subisce un incremento di circa 4 volte nei cloni con ridotta espressione di uPA o uPAR rispetto a quello delle cellule parentali; anche il livello di apoptosi basale risulta incrementato nei suddetti cloni (Fig.13A). Per valutare ulteriormente la relazione causale tra il livello di uPAR e la suscettibilità all'anoikis, i cloni SiuPAR-20, -8 e -12 oltre ai cloni RPE/uPAR 6, 2 e 17 sono stati ordinati in una serie con espressione di uPAR progressivamente crescente. E' stato interessante rilevare che i cloni con un incremento progressivo del numero di uPAR presentano una progressiva riduzione della suscettibilità all'anoikis, come mostrato dal saggio ELISA (Fig.13B).

La stretta correlazione tra l'espressione di uPAR e la sensibilità all'apoptosi ha consentito di spingersi a verificare se in altre linee cellulari di diversa origine si verificasse lo stesso fenomeno. A questo scopo, sono state utilizzate cellule HEK-293 ("human embryonic kidney cells"), che, secondo informazioni presenti in letteratura, anche sostenute da un nostro precedente lavoro, non esprimono uPAR. Effettivamente, vari cloni di cellule HEK-293 iperesprimenti uPAR sono più resistenti all'apoptosi

indotta da assenza di siero, rispetto alle cellule di controllo, dimostrando che l'espressione ectopica dello stesso recettore determina protezione dall'apoptosi. (Fig.14). Complessivamente, i dati dimostrano che l'effetto anti-apoptotico dell'uPAR non è ristretto alle cellule RPE, ma presenta proprietà più generali.

2.6 Il legame dell'uPA al recettore determina l'attivazione di PI3K e MAPK

La morte per apoptosi è considerata essere l'evento finale di una complessa rete di segnali, caratterizzata dall'azione coordinata di molecole che promuovono la morte, costantemente contrastata dall'azione di vie di trasduzione del segnale di sopravvivenza. Tra le principali vie attivate da fattori anti-apoptotici vi è la diretta stimolazione di chinasi quali "Mitogen-Activated Protein Kinase" (MAPK) o "Phosphatidylinositol-3-kinase" (PI3K), attraverso i relativi recettori che agiscono su Raf o Ras, rispettivamente (*Marani M et al., 2004*). Benchè la chinasi-bersaglio di PI3K, detta Akt e l'effettore Ras sono tra i principali mediatori della protezione delle cellule epiteliali dall'anoikis (*Khwaja et al., 1997; Rytomaa et al., 2000; ; Rodriguez-Viciano et al., 1997*), recenti dati evidenziano un contributo essenziale della via Raf/MEK/ERK nel mediare la resistenza all'anoikis (*Le Gall et al., 2000; McFall et al., 2001; Schulze et al., 2001; Rodriguez-Viciano et al. 1994, 1996*). Per chiarire quale è il meccanismo molecolare e quali sono i mediatori coinvolti nell'effetto anti-apoptotico dell'uPA dall'anoikis, è stato prima di tutto verificato se l'uPA, legandosi al suo recettore di membrana, attivasse le due chinasi MAPK e PI3K. L'attivazione di suddette chinasi viene misurata valutando il livello di fosforilazione delle chinasi ERK1 ed ERK2 (extracellular signal-regulated kinases 1/2 o p44/p42 MAP kinases) e Akt (Protein kinase B), rispettivamente

dopo trattamento delle RPE con uPA 1-158. Come mostrato in Fig.15A sia ERK1/2 che Akt vengono fosforilate in seguito a stimolazione con uPA 1-158, in modo tempo-dipendente, sebbene con cinetiche differenti. Inoltre tale attivazione da parte dell'uPA richiede l'interazione con il recettore; infatti una pre-incubazione delle cellule con l'anticorpo anti-uPAR 399R blocca completamente la fosforilazione uPA-dipendente di ERK1/2 e Akt (Fig.15B). E' interessante notare che il livello di espressione di uPA e uPAR influenza lo stato di fosforilazione della chinasi Akt (Fig.15C). In un successivo esperimento, è stata poi analizzata l'attivabilità di Akt, in risposta ad uno stimolo esterno non correlato al sistema uPA/uPAR nei cloni SiuPAR. In questo caso, il trattamento con siero viene seguito dalla preparazione degli estratti e da "Western blotting" utilizzando un anticorpo policlonale anti-fosfoAkt che riconosce il sito fosforilato al livello della Ser473 (Fig. 15C). Nei vari cloni SiuPA (SiuPA-4, -17) e SiuPAR (SiuPARi -8, -20) esaminati il livello di fosforilazione basale e lo stato di attivazione di Akt, dopo stimolazione con siero risultano ridotti rispetto a quelli delle cellule RPE/vec. In particolare, si può notare a 45 minuti, una riduzione del 20, 55 e 43 % nei cloni SiuPARi-20, e -8 rispettivamente.

Gli esperimenti appena descritti permettono di concludere che l'uPAR è coinvolto nella risposta cellulare al siero attraverso un segnale mediato da PI3-K/Akt. Inoltre, il fatto che il livello di attivazione di Akt dipende dalla quantità di uPAR presente suggerisce che l'uPAR possa favorire l'attivazione di PI3K.

2.7 Il "survival signal" uPA-dipendente è mediato sia da MAPK che da PI3K

L' intensità e la durata dell' attivazione delle chinasi MAPK e PI3K possono essere diversi a seconda del tipo cellulare e della natura/intensità dello stimolo (*Fico et al.*,

2004). Al fine di valutare se le chinasi MAPK e/o PI3K siano mediatori dell'azione anti-apoptotica dell'uPA, sono stati utilizzati inibitori farmacologici delle due vie di "survival" e una variante dominante-negativa di Akt (Akt^{K179M}). Come mostra la Fig. 16A, l'effetto protettivo viene annullato se le cellule sono simultaneamente trattate con uPA e con l'inibitore di PI3K, LY294002 o con l'inibitore di Mek, UO126. Risultati simili si osservano in trasfettanti che esprimono transientemente la variante Akt^{K179M} 24 ore dopo la trasfezione (Fig.16B).

2.8 L'attivazione dei "pathways" MAPK- e PI3K-dipendenti da parte dell'uPA induce la sintesi della proteina anti-apoptotica Bcl-xL

I risultati qui presentati dimostrano che il trattamento delle cellule RPE con uPA protegge dall'anoikis e da altri stimoli pro-apoptotici. L'effetto generale che noi osserviamo sulla vitalità cellulare indica che l'uPA potrebbe regolare qualche componente del macchinario anti-apoptotico. Tra le molecole che hanno un ruolo cruciale nella morte cellulare apoptotica, Bcl-xL è noto essere frequentemente regolato trascrizionalmente e/o traduzionalmente in seguito all'attivazione di differenti vie di trasduzione del segnale. E' stato interessante determinare se il livello di espressione di Bcl-xL fosse modificato dal trattamento con ATF o uPA 1-158. Come mostra la Fig.17, in seguito a trattamento di 5 ore con ATF o uPA 1-158 (alle concentrazioni di 1nM e 10nM), si osserva un netto aumento della proteina Bcl-xL. Tale incremento del livello di espressione è dovuto a nuova sintesi di proteina, poiché l'inibitore della sintesi proteica cicloesimide blocca l'aumento di espressione della proteina di Bcl-xL uPA-dipendente (Fig.17B).

Nei cloni SiuPA, il livello basale di Bcl-xL è ridotto rispetto a quello delle cellule parentali, cosa che potrebbe essere determinata da un circuito autocrino anti-apoptotico sostenuto da uPA endogena. Al fine di stabilire se l'uPA possa stimolare a livello trascrizionale l'espressione di Bcl-xL, sono stati allestiti degli esperimenti di RT-PCR semi-quantitativa a partire da RNA totale estratto da cellule RPE trattate con ATF. La Fig.17C mostra che il trattamento con ATF induce un incremento del mRNA di Bcl-xL pari a $2,65 \pm 0,15$ volte. Evidenze presenti in letteratura dimostrano che entrambe le vie di trasduzione MAPK- e PI3K-dipendenti possono modulare il livello trascrizionale di Bcl-xL in altri sistemi cellulari. Il passo successivo, quindi, è stato quello di valutare se l'attivazione da parte di uPA di una di queste vie, potesse mediare l'aumento del livello di proteina Bcl-xL osservato. Il risultato dell'analisi mediante Western blotting del livello di Bcl-xL di cellule pretrattate con gli inibitori chimici LY294002 o UO126 e poi incubate con 10nM ATF è mostrata in Fig.18. Entrambi gli inibitori risultano efficaci, (anche se LY294002 sembra essere più potente) per cui si può concludere che entrambe le protein chinasi possono mediare l' induzione dell'espressione di Bcl-xL (Fig.18).

In conclusione, i dati presentati nell'ultima parte di questa tesi dimostrano che l'uPA stimola l'espressione di Bcl-xL in maniera indipendente dalla sua attività catalitica, attraverso le vie di trasduzione del segnale PI3K/Akt- e MAPK-dipendenti.

3. DISCUSSIONE

Il presente studio fornisce una relazione causale tra l'espressione del recettore per l'urochinasi (uPAR) e la protezione dalla morte cellulare programmata. Innanzitutto si dimostra che l'uPAR, una volta occupato dal suo ligando, ha un effetto anti-apoptotico per una linea cellulare derivata da epitelio retinico umano (RPE) esposta a luce UV, a farmaci come il cis-platino, o a distacco forzato dal substrato (anoikis). Tale effetto non richiede la regione catalitica della proteasi ma esclusivamente la regione di legame con il recettore. Inoltre, viene anche mostrato che il livello di espressione dell'uPAR correla positivamente con la resistenza all'apoptosi, sia di cellule RPE che di cellule di rene embrionale HEK-293. Infine, i dati qui presentati evidenziano alcuni mediatori intracellulari dell'attività anti-apoptotica uPA-dipendente, mostrando il coinvolgimento delle chinasi Akt, ERK1/2 e del fattore anti-apoptotico Bcl-xL.

Per la maggior parte degli esperimenti è stata utilizzata la linea RPE, derivata da cellule dell'epitelio pigmentato della retina. Tale scelta è stata dettata da vari motivi; *in vivo* le cellule dell'epitelio retinico possono andare incontro ad apoptosi contribuendo allo sviluppo di varie patologie degenerative oculari umane (*Suter et al., 2000*). Nel caso della ARMD o "age-related macular degeneration" si ritiene che le cellule dell'epitelio retinico abbiano un ruolo trofico nei confronti delle cellule del fotorecettore che possono degenerare se le prime vanno incontro ad apoptosi. Viceversa, in disordini caratterizzati da abnorme proliferazione come la vitreoretinopatia proliferativa (PVR), l'induzione farmacologica dell'apoptosi potrebbe contrastare lo sviluppo della patologia, rappresentando uno strumento terapeutico innovativo (*Ratiglia et al., 1999*). Un ulteriore motivo della scelta di questa linea è che essa è stata ottenuta mediante immortalizzazione per trasfezione della subunità catalitica della telomerasi. Tali cellule quindi, essendo non trasformate, mantengono ancora una certa sensibilità a diversi stimoli pro-apoptotici, mentre le comuni linee umane derivate da tumori sarebbero alquanto resistenti all'apoptosi; inoltre la natura epiteliale di queste cellule le rende un

sistema ottimale per studiare, in particolare, la morte cellulare dovuta a distacco forzato dalla matrice (che nel caso di colture cellulari *in vitro* è la piastra per colture cellulari) e quindi i meccanismi che ne regolano la risposta. *In vivo*, l'anoikis si può verificare in seguito a distacco di cellule epiteliali o endoteliali che, fisiologicamente, con la loro superficie inferiore si attaccano alla membrana basale. In particolare, l'anoikis è dovuta alla diretta perdita delle interazioni cellula-matrice, per la quale i sensori sono i recettori di tipo integrinico. Una ulteriore motivazione della scelta del sistema RPE è dovuta al fatto che l'uPAR è un regolatore della funzione integrinica e, dunque, potrebbe contribuire all'attivazione dei sensori o proteggere cellule prive di ancoraggio. Numerose sono le evidenze presenti in letteratura che dimostrano un coinvolgimento delle integrine nell'anoikis. Qui di seguito si fa un breve sommario delle informazioni presenti in letteratura allo scopo di comprendere i risultati presentati in questa tesi. Una evidenza è che il blocco dei recettori integrinici di fibronectina e vitronectina, ottenuto con il peptide GRGDSP, causa apoptosi (Ruoslahti *et al.*, 1987). Inoltre, studi *in vivo* dimostrano che la morte cellulare programmata può essere indotta semplicemente mediante iniezione intravascolare di un peptide ciclico o di anticorpi monoclonali antagonisti dell'integrina $\alpha v \beta 3$ (Brooks *et al.*, 1994). Inoltre, l'inibizione delle αv -integrine è sufficiente ad indurre apoptosi indipendentemente dal distacco delle cellule endoteliali dalla matrice di *per se* (Erdreich-Epstein *et al.*, 2005). Viceversa, se le integrine vengono attivate possono produrre effetti anti-apoptotici: ad esempio possono cooperare con il recettore dell'EGF regolando negativamente la proteina pro-apoptotica Bim e contrastando l'anoikis di cellule epiteliali (Reginato *et al.*, 2003). Un altro esempio ci è fornito da cellule HUVEC (human umbelical vein endothelial cells) cresciute su piastre su cui è stata stratificata FN o anticorpi monoclonali anti- $\beta 1$ immobilizzati con funzione stimolatoria che risultano protette dall'apoptosi rispetto a cellule di controllo (Meredith *et al.*, 1993). E' sempre più evidente che le integrine

svolgono un ruolo cruciale nell'“avvertire” il distacco della cellula. Infatti, studi focalizzati sulla relazione esistente tra ECM, integrine, molecole di segnale intracellulari e citoscheletro hanno permesso di scoprire che le integrine agiscono come meccanorecettori. Come tali, le integrine “sentono” lo stimolo meccanico matrice-derivato e lo convertono in un segnale chimico che modula la trasduzione del segnale intracellulare. La struttura specializzata del citoscheletro, o i complessi delle adesioni focali, formano un vero e proprio ponte molecolare che accoppia meccanicamente integrine, e quindi l'ECM all'actina del citoscheletro. In particolare, le adesioni focali possono integrare i segnali meccanici derivati dal cambiamento di forma cellulare con quelli chimici integrino-dipendenti. Quando la cellula è privata dell'ancoraggio e rimane in sospensione la sua forma si altera. Ebbene la forma stessa della cellula può determinarne il destino; infatti, sono stati condotti studi su cellule endoteliali dei capillari piastrate su “isole di adesione”, stratificate con fibronectina, per restringere i punti di contatto cellula-substrato: più ritratta e tonda è la cellula, maggiore è il livello di apoptosi (*Chen et al., 1997*). La distruzione simultanea dei microfilamenti e dei microtubuli ad opera di citocalasina D e nocodazolo, rispettivamente, causa un più pronunciato arrotondamento della cellula e un aumento di apoptosi, come si osserva durante l'anoikis, dove le cellule sono completamente staccate, in sospensione; ciò indica che questi due sistemi citoscheletrici possono cooperare nel promuovere sopravvivenza cellulare e nel controllo della proliferazione (*Flusberg et al., 2001*). Non possiamo escludere un ruolo dell'uPAR nella “mechanotransduction” in quanto esso ha la capacità di legare direttamente la vitronectina e tale legame è stabilizzato da uPA (*Carriero et al., 1997*).

Nel corso dello svolgimento di questa tesi è stato riscontrato un coinvolgimento dell'uPAR nella protezione cellulare dall'anoikis. Essendo l'uPAR un interattore diretto delle integrine, tra cui $\alpha v \beta 5$, è stato verificato il ruolo delle integrine nella trasduzione

del segnale uPA-dipendente ed è stato dimostrato che anticorpi anti- $\alpha\text{v}\beta\text{5}$ bloccano l'effetto protettivo dell'uPA, dimostrando che $\alpha\text{v}\beta\text{5}$ è un mediatore di tale "pathway" (risultati non mostrati). E' ragionevole ipotizzare che l'associazione dei domini citoplasmatici integrinici con lipidi e protein chinasi trasduca il segnale di sopravvivenza. Diversi componenti promuovono la sopravvivenza cellulare in cellule private dell'ancoraggio, come le chinasi integrina-associate, PI3K, la chinasi Akt/PKB e la chinasi N-terminale c-Jun che inattiva la via di trasduzione mediata dalla proteina "tumor suppressor" p53. Evidenze sperimentali mostrano come l'interazione dell'integrina β1 con la matrice extracellulare recluti pp125FAK ai complessi di adesione focale, attivandola mediante autofosforilazione della tirosina 397. Questo crea un sito di legame per il dominio SH2 della subunità regolativa di PI3K, p85 che, una volta fosforilata, attiva la subunità catalitica p110 (*Schlaepfer et al., 1998*). PI3K, a sua volta, fosforila i gruppi fosfatidilinositolo in posizione 3' del gruppo inositolo. I fosfolipidi risultanti attivano la chinasi fosfoinositide-dipendente, PDK1 e richiamano verso la membrana plasmatica la chinasi Akt attraverso il suo dominio plecstrina-omologo (*Stein et al., 2000*). E' stato osservato che in cellule quiescenti, Akt è citosolica ed inattiva; in seguito a stimolazione con fattori di crescita o citochine, Akt si associa alla superficie interna della membrana plasmatica portandosi in prossimità dei gruppi 3'-fosfoinositide generati da PI3K. Così, Akt viene fosforilata a livello della treonina 308 e della serina 473 da PDK1 e dalla chinasi integrina-associata, rispettivamente (*Persad et al., 2001*). Una volta localizzatosi alla membrana e fosforilato, Akt diventa "full active" e capace di fosforilare i suoi substrati.

Tra gli effetti dell'uPAR attivato dal ligando vi è la stimolazione sia di MEK/ERK che di PI3K/Akt. Oltre ad una stimolazione diretta di entrambe le protein-chinasi, dimostrata con anticorpi diretti contro le forme fosforilate, negli esperimenti presentati in questo lavoro sono stati utilizzati inibitori farmacologici o l'espressione di un

dominante-negativo di Akt (come Akt^{K179M}). Il coinvolgimento di queste chinasi nella protezione dall'anoikis promossa dall'uPA è dimostrato dal fatto che la presenza degli inibitori LY294002, di UO126 o di Akt^{K179M} riduce drasticamente gli effetti dell'uPA. Ne consegue che sia PI3K/Akt che MEK/ERK sono entrambi effettori dell'uPAR, nella sua azione anti-apoptotica. Inoltre, entrambe le vie sembrano convergere sulla regolazione della trascrizione e della sintesi del fattore anti-apoptotico Bcl-xL. In realtà, numerosi sono gli esempi di molecole che aumentano la sopravvivenza cellulare in seguito a regolazione positiva dei membri anti-apoptotici della famiglia Bcl-2 ed in particolare di Bcl-xL. In particolare, proprio in cellule RPE il fattore di crescita dei fibroblasti, detto FGF, secondo un circuito autocrino/paracrino, è capace di indurre sopravvivenza cellulare proprio attraverso la sintesi *de novo* e la produzione di Bcl-xL; l'inibizione dell'attivazione di ERK2, la riduzione della sintesi di Bcl-xL o l'uso di oligonucleotidi antisense per Bcl-xL inibiscono l'attività anti-apoptotica di FGF (Bryckaert *et al.*, 1999). E' stato anche riportato che l'FGF previene l'apoptosi etoposide-indotta in cellule di "small cell lung carcinoma" in modo MAPK-dipendente, in seguito a sintesi *de novo* di proteine quali Bcl-xL e bcl-2 secondo un meccanismo di regolazione traduzionale piuttosto che trascrizionale, come invece accade nel caso dell'uPA (Pardo *et al.*, 2002).

Dati forniti dalla letteratura indicano che anche il "transforming growth factor-alpha" (TGF-alpha), un ligando dell'EGFR secreto da cellule cancerose di tumore colonrettale, inibisce fortemente l'anoikis di cellule non maligne. Il TGF-alpha esercita la sua azione anti-apoptotica contrastando l'inibizione della chinasi Src e la "down-regulation" di Bcl-xL, entrambi associati al processo apoptotico (Rosen *et al.*, 2001). Se da un lato i fattori che inducono sopravvivenza possono svolgere la loro attività anti-apoptotica regolando positivamente, secondo meccanismi trascrizionali o traduzionali, i membri

anti-apoptotici della famiglia di Bcl-2, dall'altro anche i membri pro-apoptotici possono subire una regolazione negativa. E' plausibile che la cascata uPA-dipendente svolga una doppia azione, quella di stimolare i membri anti-apoptotici e di inibire quelli pro-apoptotici. Come descritto nel capitolo introduttivo, durante l'apoptosi vi è la traslocazione di proteine pro-apoptotiche al mitocondrio, dove esse contrastano i membri anti-apoptotici; tra le componenti pro-apoptotiche vi è la proteina Bax che subisce un cambiamento spazio-temporale della rilocalizzazione subcellulare in seguito a distacco delle cellule dalla matrice extracellulare (*Valentijn et al., 2003*). Tuttavia, in recenti esperimenti da noi effettuati l'uPA non ha effetto sulla regolazione dell'espressione della proteina Bax in cellule RPE (dati non mostrati). Sebbene non abbiamo dati a riguardo, sarebbe interessante analizzare un'altra proteina, denominata Bim, ad effetto pro-apoptotico, che è sensibilmente indotta dopo distacco cellulare: infatti, una riduzione del suo livello di espressione, mediante "RNA interference", inibisce l'anoikis di cellule epiteliali. Bim funziona come sensore capace di collegare le integrine e i segnali trasdotti dai fattori di crescita alla via ERK-mediata e la perdita di tale regolazione controllata può contribuire alla progressione tumorale (*Reginato et al., 2003*). In cellule non apoptotiche Bim è fosforilato e associato al citoscheletro ed alle catene leggere LC8 di dineina (*Puthalakath et al., 1999*). Segnali apoptotici che si ripercuotono sulla rete di microtubuli possono causare il rilascio di Bim dai microtubuli, la sua associazione con altri membri della famiglia bcl-2 e l'induzione dell'apoptosi (*Bouillet et al., 1999*). Dunque, Bim rappresenta un ottimo candidato per la mediazione della morte cellulare indotta da perdita di ancoraggio, un segnale apoptotico che si ripercuote sul citoscheletro (*Marani et al., 2004*). Tuttavia, è ancora da verificare se l'uPA, associandosi con uPAR, inibisca la sintesi o la funzione di Bim, neutralizzando così il suo effetto pro-apoptotico, oltre a stimolare la trascrizione di Bcl-xL.

I motogeni hanno spesso anche un effetto di stimolazione della sopravvivenza cellulare: il meccanismo di attacco-distacco della cellula dalla membrana basale, che avviene ciclicamente durante la migrazione, causerebbe anoikis se il chemoattrattante non svolgesse anche un'azione anti-apoptotica. Tra i vari esempi esistenti in letteratura, vi è quello dell' hepatocyte growth factor/scatter factor o HGF/SF, conosciuto come motogeno, il quale conferisce resistenza all'apoptosi (*Frisch et al., 1994*). Un altro esempio è fornito dalla fibronectina (FN), che stimola il movimento cellulare e svolge anche un ruolo cruciale nella trasduzione di segnali di sopravvivenza in diversi tipi di cellule; infatti, bloccando il segnale FN-integrina con vari metodi, si osserva, in tutti i casi, anoikis. Aggregati multicellulari di cellule di carcinoma umano HSC-3 che si formano in seguito a crescita in sospensione, presentano una significativa riduzione del livello di apoptosi rispetto alle singole cellule; oltre al fatto che i contatti cellula-cellula costituiscono, nella crescita ancoraggio-indipendente, un fattore di sopravvivenza promosso dai recettori della famiglia delle caderine, è da considerarsi anche che gli aggregati, ma non le singole cellule esprimono alti livelli di FN; le singole cellule hanno un livello di espressione dell'integrina alpha (v) più basso degli aggregati; lo stesso effetto si ottiene inibendo l'aggregazione cellulare con oligonucleotidi antisenso o anticorpi bloccanti la funzionalità di alpha (v) (*Zhang et al., 2004*). D'altro canto peptidi sintetici contenenti il motivo arginina-glicina-aspartato (RGD), motivo di riconoscimento delle integrine, bloccando gli effetti stimolatori delle molecole della ECM, sono capaci di indurre direttamente apoptosi. Secondo alcune evidenze, essi possono entrare nella cellula ed indurre, mediante un meccanismo di auto-processamento, l'attività enzimatica della pro-caspasi-3 (*Buckley et al., 1999*). L'effetto protettivo della FN si esplica anche attraverso la proteina mitocondriale Bit-1 che verrebbe rilasciata nel citoplasma durante l'apoptosi; l'associazione della FN alla membrana cellulare neutralizzerebbe l'effetto apoptotico di Bit-1 (*Jan et al., 2004*).

Inoltre anche il fattore chemotattico MSP (macrophage stimulating protein) è capace di proteggere cellule epiteliali dall'anoikis, attivando il suo recettore transmembrana RON (Recepteur d'Origine Nantaise), appartenente alla famiglia dei recettori MET tirosino chinasi, che coopera con le integrine nel promuovere la sopravvivenza cellulare (*Danilkovitch et al., 2001*).

Nonostante i molteplici esempi, il meccanismo molecolare coinvolto nell'effetto anti-apoptotico dei chemoattrattanti non è ben conosciuto. Qualora si tratti di ligandi di integrine quali fibronectina, vitronectina o collagene è verosimile che essi attivino le relative integrine. Poi, l'associazione con altri mediatori nei complessi di adesioni focali, ne permettono un diretto legame con il citoscheletro e con le vie PI3K- e MAPK-dipendenti che controllano la sopravvivenza. In questo effetto la tirosin-chinasi FAK svolge un ruolo cruciale: infatti, l'inibizione di FAK, presente nelle adesioni focali, aumenta il distacco e l'apoptosi di linee cellulari quali HT-29 e WIDR (*Golubovskaya et al., 2003*). Inoltre, l'attivazione costitutiva della tirosin-chinasi pp125FAK nel complesso delle adesioni focali può causare crescita e sopravvivenza forma- e adesione-indipendente (*Owens et al., 1995; Shaller et al., 1992*). Anche l'uPA è un attivatore di pp125FAK, secondo un meccanismo uPAR-dipendente (*Tang et al., 1998*). Inoltre, l'uPA è nota stimolare l'attività tirosino-chinasica di chinasi della famiglia di Src, tra cui Hck (*Chiaradonna et al., 1999*). E' possibile che anche in RPE tali chinasi contribuiscano a generare la risposta protettiva. Tuttavia saranno necessari ulteriori esperimenti per verificarlo.

In questo quadro, va inserito il risultato principale di questo lavoro di tesi che si dimostra come il trattamento delle cellule con uPA, che è un importante motogeno, le protegge dalla morte apoptotica. Varie evidenze riportate in letteratura e già descritte nel capitolo introduttivo, mostrano una relazione circostanziale tra il sistema uPA/uPAR e la sensibilità alla morte cellulare programmata. Una evidenza della relazione tra uPA e

protezione dall'apoptosi *in vivo* è fornita da topi uPA^{-/-}, in cui erano precedentemente state impiantate cellule di fibrosarcoma T241. In tali animali, si è osservata una riduzione del livello di proliferazione ed un aumento di apoptosi, rispetto a topi "wild-type". E' ragionevole pensare che la componente uPA dell'ospite possa influenzare l'equilibrio tra apoptosi e proliferazione tumorale (Gutierrez *et al.*, 2000). Il presente lavoro di tesi è allineato con questi risultati e riporta per la prima volta una relazione causale tra il sistema uPA/uPAR e la sopravvivenza cellulare, fornendo alcune indicazioni sui mediatori molecolari coinvolti nell'effetto.

In questo studio, vengono utilizzati due frammenti amino-terminali dell'uPA, entrambi privi del dominio proteasico, l'uPA1-158 e l'ATF (aa 1-135), allo scopo di escludere ogni interferenza dovuta all'attività enzimatica. Il loro effetto anti-apoptotico ha una sua valenza *in vivo*, in quanto alcuni frammenti privi di attività proteolitica come l'ATF sono presenti nelle urine umane. Inoltre, la forma di uPA più frequente nell'organismo umano è la singola catena inattiva o pro-uPA che ci aspettiamo essere anti-apoptotica. L'utilizzo di varianti uPA prive dell'attività proteolitica è giustificata anche dalla presenza in letteratura che indicano che la plasmina generata dal plasminogeno sulla superficie cellulare induce ritrazione e frammentazione della fibronectina, causa distacco e cambi morfologico-biochimici tipici dell'apoptosi (Meilhac *et al.*, 2003); inoltre, studi sul ruolo dell'attivazione del plasminogeno nell'adesione e sulla sopravvivenza cellulare dimostrano che la generazione di plasmina ad opera dell'uPA, al livello della superficie cellulare può causare distacco e quindi apoptosi (Rossignol *et al.*, 2004). In realtà, questi risultati sono solo apparentemente in contraddizione con quelli presentati in questa Tesi: infatti, mentre i primi sottolineano gli effetti dell'attività proteasica "trypsin-like" dell'uPA, che favorisce il distacco e l'apoptosi, altri mettono in rilievo quella di "signaling" che coinvolge l'uPAR e non richiede il dominio catalitico. Si può ragionevolmente supporre che entrambi gli effetti possano avere luogo *in vivo*.

Per esaminare il ruolo delle due componenti del sistema uPA/uPAR separatamente, è stato utilizzato come approccio il silenziamento genico dell'”RNA interference”; i cloni cellulari ottenuti presentano un diverso grado di silenziamento. A questo proposito è interessante notare che, mentre è stata silenziata quasi completamente l'espressione dell'uPA, è stato, invece, possibile ottenere al massimo una riduzione di circa il 60% del livello di espressione di uPAR. Tale risultato favorisce l'ipotesi che l'uPAR sia importante per la sopravvivenza delle cellule in coltura. Comunque, in tutti i casi in cui è stato ridotto il livello di espressione di uPA o uPAR, si osserva un aumento della sensibilità alla morte cellulare. Un dato particolarmente interessante deriva dall'analisi di sopravvivenza dei cloni in cui è stata aumentata o ridotta la quantità di uPAR: è possibile rilevare una stretta correlazione tra il livello di espressione di uPAR e la sensibilità all'anoikis (Fig. 13). Questi dati indicano che l'uPAR stesso debba essere considerato un fattore anti-apoptotico. Per quel che riguarda il suo meccanismo di azione, va considerato che l'uPAR è dotato di una regione glicosil-fosfatidil-inositolica (GPI) e non prende contatto con il citoplasma cellulare. Tuttavia, l'uPAR è capace di attivare svariati segnali intracellulari per il controllo di migrazione, proliferazione e adesione interagendo con altri recettori trans-membrana. Tra questi, sono state ben descritte le interazioni con le integrine, il recettore per l'fMLP denominato FPRL1 e con EGFR (*Liu et al 2002; Blasi et al., 2002*). Il fatto che l'uPAR si associ in maniera reversibile e dinamica con diversi recettori è ben supportato dalla sua mobilità laterale nel “bilayer” fosfolipidico della membrana plasmatica e dalla sua redistribuzione in seguito ad interazione con il ligando uPA nelle adesioni focali (*Simons et al., 2000*). Il legame diretto dell'uPAR alle integrine è stato analizzato *in vitro* mediante l'utilizzo di un peptide che abolisce l'associazione uPAR-integrina: tale peptide è capace di bloccare anche il segnale intracellulare uPAR-mediato. E' plausibile a tal proposito pensare che, vista l'importanza cruciale delle integrine nell'anoikis e la funzione regolatrice del

complesso uPAR/integrine, l'uPAR possa promuovere l'effetto protettivo proprio in seguito all'associazione con specifiche integrine. In particolare, l'associazione $\alpha v\beta 5$ /uPAR è stata descritta da questo laboratorio (*Carriero et al., 1999*). Nel corso di questo studio, infatti, sono stati verificati gli effetti delle integrine $\alpha v\beta 3$ e $\alpha v\beta 5$; dati preliminari suggeriscono che mentre la prima delle due integrine non è coinvolta nel meccanismo di protezione dall'anoikis uPAR-mediato, il blocco dell'integrina $\alpha v\beta 5$, mediante anticorpi specifici, reverte, in esperimenti di anoikis, la protezione uPA-indotta (dati non mostrati). Rimane da verificare se il peptide che blocca le interazioni uPAR/integrina possa revertire l'effetto protettivo dell'uPAR.

Se l'uPAR ha la capacità di interagire con diversi recettori di membrana, si potrebbero fare altri modelli speculativi che prendono in considerazione i dati qui presentati che vedono l'uPAR come fattore anti-apoptotico. Si prenda ad esempio in esame, nella regolazione della risposta cellulare uPAR-mediata, un recettore di membrana non ancora considerato sino ad ora, ossia il recettore di morte Fas/CD95. E' stato dimostrato che il recettore Fas può trovarsi nei "rafts microdomains" (dove è presente anche l'uPAR in virtù della ancora GPI) o perché costitutivamente espresso o in seguito a redistribuzione dopo uno stimolo apoptotico; un esempio è fornito da risultati ottenuti in cellule umane di cancro del colon trattate con cis-platino, in cui si osserva colocalizzazione tra CD95 e la proteina caveolina-2, di cui i "lipid rafts" di membrana sono ricchi; questa transitoria mobilità di CD95 dovuta ad una transiente alterazione della fluidità di membrana (*Lacour et al., 2004*). E' noto che in condizioni apoptotiche CD95 trimerizza attivando la cascata apoptotica. Un ipotesi degna di nota potrebbe essere che nei "lipid rafts" l'uPAR possa ostacolare la trimerizzazione di CD95 ed il conseguente innesco della cascata apoptotica. Dunque, tale effetto anti-apoptotico sarebbe dovuto ad una interazione diretta dell'uPAR con CD95: tale ipotesi meriterebbe una verifica.

La trasduzione del segnale dipendente da recettori con un'ancora GPI presenta ancora punti oscuri in quanto queste molecole non prendono contatto fisico con il citoplasma cellulare. Lo studio di altri casi può aiutare la comprensione del meccanismo del meccanismo anti-apoptotico uPAR-dipendente. Tra le proteine "GPI-anchored" coinvolte nella regolazione dell'apoptosi vi è cripto-1 (CR-1), un membro dell'"epidermal growth factor Cripto FRL1 Cryptic family", che presenta analogie strutturali e funzionali con l'uPAR: è noto che la sua iperespressione conferisce resistenza all'anoikis e aumento della capacità invasiva (Normanno *et al.*, 2004). Secondo un modello innovativo, cripto-1 attiverebbe le vie di MAPK e PI3K indipendentemente dai suoi canonici corecettori Nodal e Alk4, presumibilmente legandosi specificatamente al glicoproteo-1, un "heparan sulfate proteoglycan" di membrana attraverso il quale attiverebbe la tirosino-chinasi Src attiverebbe (Bianco *et al.*, 2003). Se l'uPAR possa utilizzare un simile meccanismo è da verificare.

Nel tentativo di analizzare i meccanismi responsabili per l'aumentata resistenza all'apoptosi di cellule trattate con uPA, è stato mostrato in questo lavoro di tesi un aumentato livello della proteina anti-apoptotica Bcl-xL. Quale sia il meccanismo attraverso cui la trascrizione di Bcl-xL viene attivata in seguito all'interazione uPA/uPAR è, per ora, oggetto di ipotesi: una possibilità è che sia coinvolto NF- κ B, un fattore essenziale per la sopravvivenza e la resistenza all'apoptosi in molti tumori. Questo modello si basa sul fatto che l'uPA, contattando l'uPAR, attiva Akt che fosforila tra i vari substrati, anche la subunità citosolica inibitoria del fattore trascrizionale NF- κ B. Quest'ultima, denominata I κ B viene ubiquitinata e degradata; così NF- κ B è libero di traslocare al nucleo, dove attiva la trascrizione di geni anti-apoptotici, come Bcl-xL (Marty *et al.*, 2002). Questo meccanismo è sostanzialmente supportato dalla funzione di altri fattori anti-apoptotici che agiscono in modo Akt- ed NF- κ B-dipendente. Inoltre, è noto che il processo di anoikis può essere regolato attraverso il fattore trascrizionale NF- κ B; in

letteratura sono state riportate delle evidenze secondo cui in cellule MDCK, Smad7 induce sensibilizzazione a differenti insulti apoptotici, inclusa l'anoikis attraverso l'inibizione di NF-kB (*Lallemand et al., 2001*). Inoltre, è stato recentemente dimostrato che il distacco di una cellula dell'epitelio intestinale dalla membrana basale attiva direttamente NFkB che trasloca al nucleo dove induce la trascrizione di diversi geni anti-apoptotici (*Yan et al., 2005*). La relazione funzionale tra uPA ed NF-kB sembra alquanto complessa: secondo un'evidenza presente in letteratura, NF-kB stimola la migrazione di cellule invasive di tumore mammario associandosi al promotore dell'uPA ed attivando la sintesi del suo mRNA. Tale circuito regolativo può essere interrotto dall'iperpressione di un dominante negativo di PI3K o in seguito a trattamento delle MDA-MB231 con inibitori farmacologici specifici per PI3K (*Sliva et al., 2002*). Dunque, il modello proposto in questo lavoro, secondo cui l'uPA attiverrebbe NF-kB in maniera Akt-dipendente, potrebbe includere la stimolazione della sintesi e secrezione di uPA attraverso NF-kB. L'effetto finale sarebbe, dunque, la formazione di un "loop" autocrino ad effetto anti-apoptotico.

4. MATERIALI E METODI

4.1 Colture cellulari

La linea derivante dall'epitelio pigmentato della retina o RPE (retinal pigment epithelial cells), immortalizzata mediante l'espressione stabile della subunità catalitica della telomerasi, è stata fornita dalla Clontech. I cloni SiuPA-4, -8, -17 e SiuPAR-8, -12, e -20 derivano dalla linea cellulare RPE stabilmente trasfettata con pSUPER-uPAi o pSUPER-uPARi (schematizzato in Fig. 10). I cloni derivanti da RPE stabilmente trasfettate con pcDNA3/uPAR (schematizzati in Fig. 10), sono denominati RPE/uPAR (RPE/uPAR 2, 6 e 17). La linea parentale ed i cloni stabili da essa derivati crescono in adesione in DMEM 10% FBS, alla temperatura di 37°C, in atmosfera al 5% di CO₂. Le cellule umane di rene embrionale HEK-293, vengono mantenute in DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) contenente 100 U/ml di Na-penicillina, 100 U/ml di streptomicina solfato e 10% di siero fetale bovino (FBS).

4.2 Costruzione dei plasmidi pSUPER-uPAi e pSUPER-uPARi

Per ridurre il livello di espressione dell'uPA o dell'uPAR è stata utilizzata la tecnica dell'"RNA interference", che si può attuare attraverso l'introduzione nella cellula di un piccolo (21-22nt) RNA a doppio filamento (definito siRNA) complementare al gene che deve essere silenziato o di un plasmide codificante per un siRNA. In entrambi i casi è possibile ottenere il silenziamento genico post-trascrizionale in animali e piante, attraverso un processo sequenza-specifico iniziato da un RNA a doppio filamento (dsRNA) omologo a parte della sequenza del gene da silenziare. Il dsRNA è "aggredito" da DICER, una ribonucleasi ATP-dipendente, appartenente alla famiglia delle RNAsi III e che presenta domini ad attività elicasi oltre che di riconoscimento dell'RNA a doppio filamento. DICER processa il dsRNA in siRNA di 21-25nt, in modo specie-specifico. Quest'ultima molecola rappresenta la specie attiva che induce "interference",

infatti, è riconosciuta dal complesso RISC (“RNA inducing silencing complex”) capace di denaturare il doppio filamento di RNA e facilitare il suo appaiamento all’ mRNA “target” favorendone il taglio al centro della molecola. Nel presente lavoro, allo scopo di ottenere un effetto persistente è stato ottenuto un plasmide capace di generare un dsRNA diretto contro l’ mRNA da silenziare. Questo tipo di approccio scelto risulta più efficiente rispetto alla strategia del DNA antisense, in quanto il costrutto risulta più stabile nella cellula e l’ mRNA “target” viene degradato. A tale scopo, è stato utilizzato il vettore pSUPER (“SUPpression of Endogenous RNA”). Le caratteristiche fondamentali di questo vettore sono: origine di replicazione fl(+) (441-135), gene per la resistenza all’ ampicillina (3048-2191), promotore della RNA polimerasi III dell’ istone H1 (708-934) (*Brummlkamp et al., 2002*). All’ interno di tale plasmide è stato opportunamente inserito l’ oligo corrispondente ad una regione genica dell’ uPA o dell’ uPAR, e che porta alla sintesi del siRNA diretto contro l’ mRNA bersaglio (Fig.10). La costruzione degli oligo specifici è stata possibile grazie ad un apposito programma, denominato EXTRACTOR, basato su un algoritmo che tiene conto di alcune caratteristiche fondamentali: l’ inserto è progettato in modo che le prime due basi al 5’ del “loop” siano espresse come uridine, e contenga una sequenza specifica di terminazione costituita da 5 timidine in successione, tale da incorporare 2 uridine all’ estremità 3’ del trascritto. Per impedire la formazione di trascritti prematuri è consigliabile evitare la presenza di 4 o più timidine in successione all’ interno delle sequenze di 19 nucleotidi. Inoltre, per le stesse sequenze, deve essere rispettato il contenuto di G/C, compreso tra il 30 ed il 70%. Quando il vettore è espresso, l’ RNA trascritto si ripiega su se stesso in una struttura “stem-loop” disegnata in modo tale da costituire un substrato ottimale per DICER, che processa la molecola generando uno siRNA recante, su entrambi i filamenti, due uridine protrudenti all’ estremità 3’. Tale metodologia computerizzata ha indicato per l’ uPA le seguenti sequenze:

1) 5'GATCCCCCCACGCAAGGGGAGATGAAGTTCAAGAGACTTCATCTCCCCT
TGCGTGTTTTTGGAAA3'

2) 5'GATCCCCTGACTGTTGTGAAGCTGATTTCAAGAGAATCAGCTTCACAA
CAGTCATTTTTGGAAA3'

Per l'uPAR, invece, la scelta è caduta sulla sequenza:

5'GATCCCCGCCGTTACCTCGAATGCATTTCAAGAGAATGCATTCGAGGTAA
CGGCTTTTTGGAAA3'

Le sequenze oligonucleotidiche trovate con Extractor sono poi state paragonate con l'intero database dell'NCBI di sequenze di DNA non ridondanti, utilizzando il programma BLAST, per verificare l'unicità delle sequenze. Tali oligo sono costituiti da due sequenze di 19 nt ripetute ed invertite (sottolineate), omologhe ad una regione dell'mRNA dell'uPA o dell'uPAR e separate tra loro mediante un "loop" di 9 nt, che non presenta nessuna omologia con le due sequenze. Come si vede dalla figura 10, a valle del promotore della RNA polimerasi III dell'istone H1, tra i siti unici Bgl II (al 5') e Hind III (al 3'), viene inserito l'oligo sintetico, a doppio filamento, di 64-mer. A tale scopo, 30µg del vettore pSUPER sono stati digeriti con i due enzimi di restrizione (60 U ciascuno), generando un frammento maggiore (4695 bp), costituito dal vettore linearizzato, ed un frammento di 4 bp recante all'estremità i due siti di restrizione. Il frammento di 4695 bp è stato, quindi, estratto da gel di agarosio all'1% e purificato mediante il "QIAquick gel extraction kit" (Quiagen) secondo il protocollo dell'azienda produttrice. Il vettore è stato poi defosforilato con fosfatasi alcalina (2,5 µg di DNA, 3 U di enzima, 1 h a 37 °C). I filamenti senso e antisenso degli oligo sintetici sono stati prima fosforilati mediante l'enzima T4 polinucleotide chinasi (20pmol di oligo, 10 U di enzima, 1 mM ATP) e poi sottoposti alla reazione di "annealing". A tale scopo, 500 pmoli di ciascun filamento sono stati incubati in 50 µl di "annealing buffer" (100 mM NaCl and 50 mM HEPES pH 7.4.) a 90°C per 4 minuti, a 70°C per ulteriori 10 minuti e

poi lasciati raffreddare gradualmente fino a 10°C. A questo punto, l'oligo a doppio filamento ed il vettore linearizzato, in rapporto molare 80:1, sono stati ligati per una notte a 15°C con 3 U dell'enzima ligasi del batteriofago T₄. Con il prodotto di tale reazione sono state trasformate le cellule elettrocompetenti del ceppo Hb 101 di *E. coli*, come descritto nel paragrafo 4.3; le colonie sono state selezionate su piastre con ampicillina. Per l'identificazione dei cloni contenenti l'inserito nel corretto orientamento, è stata effettuata una digestione di controllo con gli opportuni enzimi di restrizione EcoRI e Hind III. I frammenti sono stati quindi separati su gel di agarosio all'2%, utilizzando come marcatore di peso molecolare il genoma del fago λ digerito con Hind III (23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564, 125 bp). Nel caso dell'orientamento desiderato, la digestione con EcoR I e Hind III avrebbe generato due bande di 4408 e 287 bp rispettivamente. Nel caso dell'orientamento scorretto, avrebbe generato due bande di 4468 e 227 bp rispettivamente. Su un totale di 30 colonie analizzate per ognuna delle tre trasformazioni, sono state selezionate 5 colonie con l'orientamento giusto; per una di queste è stata effettuata una crescita su larga scala, come descritto nel paragrafo 4.3. Il clonaggio degli oligonucleotidi per la produzione di shRNA, in realtà, può presentare problemi tecnici legati a sequenze perfettamente complementari, che favoriscono la formazione di strutture secondarie del DNA; dunque, esiste la possibilità di un' espressione selettiva di sequenze con mutazioni che destabilizzano le forchine. Per questo motivo si è pensato di procedere all'analisi delle colonie batteriche sequenziando il DNA plasmidico. Anche per il sequenziamento effettuato su commissione dalla Primm si sono avute, per la maggior parte dei cloni analizzati, difficoltà a causa della formazione di strutture secondarie che ne ostacolano il completo sequenziamento. Tuttavia, i cloni adoperati per le trasfezioni sono stati sottoposti a sequenziamento e sono risultati corretti.

4.3 Trasformazione batterica e preparazione del DNA plasmidico

L'introduzione di DNA plasmidico in cellule batteriche o trasformazione, seguita da opportuna selezione, permette di ottenere colonie batteriche contenenti il plasmide d'interesse. A questo scopo vengono utilizzati batteri resi competenti con il metodo del CaCl_2 . Dopo aver cresciuto per 20 ore un inoculo batterico in LB (o "Luria-Bertani" medium, composto da 10g/L Triptone, 5 g/L di estratto di lievito, 5g/L NaCl), 0,5 ml di coltura vengono introdotti in 100 ml di LB e cresciuti fino al raggiungimento di 0.4 O.D. 600nm. I batteri vengono quindi suddivisi in quattro aliquote, raccolti per centrifugazione a 6000 g per 10 minuti a 4°C, risospesi in 10 ml (per ciascuna aliquota) di CaCl_2 (50mM in H_2O) e centrifugati nuovamente con la modalità precedente. Infine, essi vengono risospesi in 2 ml di CaCl_2 , (50mM) con l'aggiunta di 400 μl di glicerolo, e conservati a -80°C. Al momento della trasformazione, 100 μl di cellule "competenti" vengono incubati con 30 ng di DNA plasmidico per circa 30 minuti a 4°C. Successivamente essi vengono trasferiti per 3 minuti a 37°C provocando uno shock termico che favorisce l'ingresso del DNA esogeno. I batteri vengono trasferiti a temperatura ambiente per 10 minuti, a 37°C per 50 minuti nel mezzo di coltura LB e, successivamente, piastrati su agar solido contenente 100 $\mu\text{g/ml}$ di ampicillina. Dopo un'incubazione di 16-18 ore a 37°C, appaiono le singole colonie resistenti. Esse vengono prelevate con un'ansa sterile, inoculate in 1 ml di LB in presenza di 100 $\mu\text{g/ml}$ di ampicillina ed incubate per circa 12-16 ore a 37°C in agitazione, affinché la coltura batterica raggiunga la fase di crescita stazionaria. La coltura viene quindi centrifugata a 10000 rpm per 1 minuto, a temperatura ambiente, ed il "pellet" batterico ottenuto è poi risospeso in 100 μl di soluzione isotonica S1 (10 mM TrisHCl pH 8, 10mM EDTA pH 8, 100 $\mu\text{g/ml}$ RNAsi). A questa si aggiungono 200 μl della soluzione di lisi S2 (200

mM NaOH, 1% SDS) e dopo 5 minuti si aggiungono, in ghiaccio, 150 µl della soluzione neutralizzante S3 (3 M KCl, 5 M Acido acetico), necessaria per far precipitare le membrane e le pareti delle cellule lisate, insieme al DNA cromosomico ed all'RNA ad alto peso molecolare ad esse associati. Dopo una centrifugazione di 10 minuti a 12000 rpm a 4°C, in centrifuga eppendorf, per eliminare le membrane, si recupera il sovrantante contenente il DNA plasmidico, l'RNA a basso peso molecolare e le proteine batteriche. Si aggiunge poi 1 volume (450 µl) di fenolo/cloroformio/isoamminitiico (P/C/I), si mescola su "vortex" e si centrifuga per 10 minuti a 12000 rpm in centrifuga eppendorf a temperatura ambiente. Successivamente, si aggiungono 2 volumi (900 µl) di Etanolo puro al 99%, si lascia precipitare il DNA plasmidico e l'RNA a basso peso molecolare per 15 minuti a temperatura ambiente e si centrifuga nelle condizioni precedenti. Il pellet ottenuto è risospeso in 20 µl di TE pH 7.6 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) contenente RNAsi A ad una concentrazione di 100 µg/ml, allo scopo di eliminare l'RNA a basso peso molecolare. I plasmidi preparati sono quindi analizzati mediante restrizione, per verificare la presenza dell'inserito con il corretto orientamento. Per la preparazione del plasmide di interesse da adoperare in esperimenti di trasfezione, 1 ml di coltura della colonia prescelta è quindi inoculata in 200 ml di LB ed incubata per circa 12-16 ore a 37°C in agitazione. La crescita viene seguita verificando l'assorbanza della coltura batterica allo spettrofotometro, alla lunghezza d'onda di 600nm fino a raggiungere un valore compreso tra 1 e 1.5 O.D.. I batteri vengono raccolti mediante centrifugazione, a 6000 g per 10' a 4°C, risospesi in 12 ml di una soluzione ipotonica (10 mM Tris-HCl pH 8, 10mM EDTA pH 8) e, successivamente, sottoposti a lisi alcalina in presenza di una soluzione composta da 1% SDS e 0,2M NaOH. Si aggiungono 12 ml di una soluzione di KAc 3M pH 5.5, si chiarifica la soluzione mediante centrifugazione e si isola il DNA con l'ausilio di specifiche resine a scambio ionico, o "Nucleobond AX-100", secondo il protocollo dell'

azienda produttrice. Il DNA eluito con 1M KCl, 100mM Tris/H₃PO₄ pH 8.5 e 15% di etanolo, viene precipitato con 0.7 volumi di isopropanolo, lavato con 1 ml di etanolo 70% freddo e quantizzato allo spettrofotometro considerando che 1 O.D.=50 µg/ml. La resa del plasmide è di circa 3.2 µg/ml di coltura batterica.

4.4 Trasfezione stabile di cellule RPE

Il trasferimento dei vari plasmidi ottenuti e dei rispettivi vettori in cellule RPE è stato effettuato mediante il (kit) “FuGENE 6 Transfection Reagent”. Questa tecnica, usata per una rapida ed efficiente introduzione di DNA in cellule animali, si basa sulla complessazione del DNA con una miscela di composti di natura lipidica, che facilmente interagiscono con la membrana citoplasmatica, favorendo l’ingresso del DNA nella cellula. In tutti i casi il DNA è stato fatto reagire con il FuGENE in rapporto 1:3 (10 µl di FuGENE, 3.3 µg di DNA, in 100 µl finali di DMEM senza FBS) ed la miscela è stata incubata per 30 minuti a temperatura ambiente prima di lasciarla gocciolare sulle cellule RPE nel caso del pcDNA3-uPAR, dei due costrutti pSUPER-uPAi o del pSUPER-uPARi. Dopo 24 ore viene sostituito il terreno per allontanare il FuGENE che potrebbe risultare tossico. Dopo circa 36 ore dalla trasfezione sono state effettuate diluizioni seriali dei trasfettanti allo scopo di isolare singoli cloni. Le cellule trasfettate con pSUPER-uPAi, pSUPER-uPARi o pcDNA3/uPAR sono state quindi poste in presenza di geneticina (G-418) alla concentrazione di 800 µg/ml. Dopo circa 13 giorni dalla trasfezione è stato possibile prelevare con una punta sterile le colonie che, trasferite in piastre “multiwell” da 24 pozzetti, hanno raggiunto la confluenza dopo circa 10 giorni. Per l’analisi dell’espressione di uPAR sono state utilizzate 10⁵ cellule/campione da cui sono stati preparati lisati totali, mentre la valutazione dell’espressione dell’uPA sono

stati analizzati i mezzi condizionati raccolti in 24 ore in assenza di FBS. In entrambi i casi la metodologia prescelta è quella del Western blotting, descritta nel paragrafo successivo. I cloni prescelti sono gli SiuPA-4, -8 e -17, derivanti dall'introduzione della prima sequenza indicata da EXTRACTOR e gli SiuPAR-8, -12 e -20. I cloni iperproducenti uPAR sono: RPE/uPAR 2, 6 e 17 (Fig. 11).

4.5 Analisi dell'uPA, dell'uPAR, di Akt e ERK1/2 mediante "Western blotting"

Il "Western blotting" è un metodo analitico che consente di verificare la presenza e la quantità delle proteine di nostro interesse, anche se queste non sono del tutto purificate. Essa è basata sulla separazione della soluzione in cui si trova la proteina d'interesse, mediante gel elettroforesi su poliacrilammide (SDS-PAGE), seguita da trasferimento su filtri ed identificazione del prodotto d'interesse con anticorpi specifici e sistema di rilevazione per chemiluminescenza. Oltre ad una valutazione qualitativa, questa tecnica consente una quantizzazione approssimativa del prodotto rispetto ad una preparazione della medesima proteina (o uno standard proteico) a concentrazione nota. In tutti i casi è stata impiegata una SDS-PAGE al 10% in condizioni riducenti. Il β -mercaptoetanolo eventualmente presente nel "loading buffer", riduce i ponti disolfuro che possono essere presenti nelle proteine, e quindi destabilizza la struttura terziaria, mentre l'SDS, legandosi fortemente alle proteine, le denatura e conferisce loro una carica netta negativa. La separazione dei complessi SDS-proteine avviene quindi in base agli effetti di "setaccio molecolare" dovuti alle dimensioni dei pori del gel che, a loro volta, dipendono dalla percentuale di acrilammide nel gel. Si applicano a 40 mA per circa un'ora e poi si effettua il trasferimento delle proteine su una membrana di

polivinildifluoruro o PVDF detta "Immobilon" (Millipore), mediante "elettroblotting". Attraverso l'applicazione di una differenza di potenziale, è possibile trasferire le proteine, cariche negativamente per la presenza di SDS, dal gel alla membrana. Il gel viene posto a diretto contatto con il filtro di PVDF ed entrambi posti tra quadrati di carta 3MM e spugna; il tutto viene montato in una griglia opportunamente orientata nel campo elettrico, ed immersa in un tampone di trasferimento (48mM TRIS Base, 38mM Glicina, 20% metanolo). Il trasferimento viene effettuato per un tempo di 2 ore a 0.8 mA/cm² del gel o a 30 mA per 20 ore. Una volta trasferite, le proteine possono essere sottoposte ad ulteriore analisi con anticorpi specifici. Dapprima il filtro viene incubato per 1 ora, a 25°C, nella soluzione A (100mM Tris-HCl pH 8, 1.5 M NaCl, 0.1% Tween-20, 40% latte "Weight Watchers"), in modo da bloccare tutti i siti di interazione idrofobica disponibili sulla membrana. Il filtro viene quindi incubato nella soluzione A (circa 0.2 ml/cm² di filtro) contenente l'anticorpo diretto contro la proteina d'interesse, alla concentrazione di 1 µg/ml. Per poter visualizzare questa interazione, dopo un serie di 3 lavaggi di 10 minuti a temperatura ambiente in "wash buffer" (100 mM Tris-HCl pH 8, 1.5 M NaCl, 0.1% Tween-20), il filtro viene incubato con gli anti-anticorpi o, anticorpi secondari in soluzione A (1 µg/ml per 1 ora a T ambiente), in grado di riconoscere la regione Fc dell'anticorpo primario. Gli anticorpi secondari saranno, dunque, anti-Fc di coniglio nel caso di Akt ed anti-Fc di topo nel caso dell'uPAR. Dopo 3 lavaggi in "wash buffer", il filtro viene sottoposto al sistema di rivelazione "ECL plus" (Amersham Pharmacia Biotech). Esso consiste nell'espore il filtro per 5 minuti ad una miscela (circa 125 µl/cm² di filtro) costituita dalle soluzioni A (Lumigen PS-3 in tampone Tris) e B (Acridan in diossano ed etanolo) nel rapporto 40:1. La perossidasi di rafano coniugata all'anticorpo secondario, produrrà luminescenza in corrispondenza del complesso antigene-anticorpo. Il filtro è quindi deposto in una cassetta fotografica, a

contatto con una lastra fotografica (Kodak XLS) che sarà impressionata dalla luminescenza sviluppatasi in corrispondenza delle proteine specifiche.

L'analisi quantitativa viene effettuata mediante lo strumento di acquisizione Biorad Gel Doc ed il software "Quantity One". Per la quantizzazione dell'uPAR, molecola associata alla membrana mediante un'ancora glicosil-fosfatidil-inositolica, i cloni da analizzare sono stati trattati secondo il seguente schema: i cloni, piastrati in "multiwell" da 24 pozzetti alla densità di 5×10^4 cellule/pozzetto, sono cresciuti in DMEM in presenza di 10% FBS per 24 ore; dopo un lavaggio in PBS 1x, le cellule vengono lisate direttamente in piastra con 50 μ l di "loading buffer" 1x (2% SDS, 200nM Tris Hcl pH 6.8, 40% Glicerolo, 0.1% Blu di Bromofenolo, β -Mercaptoetanololo) non riducente bollente. In entrambi i casi, i campioni così raccolti vengono dapprima bolliti per 5 minuti. Per la quantizzazione dell'uPA, i cloni vengono piastrati in "multiwell" da 24 pozzetti alla densità di 5×10^4 cellule/pozzetto, cresciuti in DMEM in presenza di 10% FBS per 24 ore e tenuti in assenza di FBS per 16 ore; i mezzi condizionati dei diversi cloni sono stati concentrati mediante precipitazione con acido tricloroacetico. A 200 μ l di mezzo condizionato si aggiungono 20 μ g di BSA, 500 μ l di TCA 50%, 300 μ l di H₂O e si effettua una incubazione a 4°C per 2 ore. Poi, i campioni vengono centrifugati a 15000 g per 10 minuti a 4°C in centrifuga eppendorf; una volta eliminato il soprannatante, il sedimento viene lavato con 1 ml di etere dietilico, poi con 1 ml di acetone, e infine, risospeso in 20 μ l 10 mM Tris a pH 7.4. La presenza dell'uPAR viene testata mediante un anticorpo monoclonale, anti-uPAR R2, che riconosce un epitopo sul dominio 3 del recettore dell'urochinasasi in forma non ridotta. Il livello della proteina uPA, invece, viene testato mediante l'utilizzo di un anticorpo policlonale anti-uPA. Nei casi in cui si è resa necessaria la quantizzazione del livello di Akt fosforilata, 2×10^5 cellule dei cloni da analizzare vengono cresciute, per circa 24 ore, in piastre tipo

“multiwell” da 6 pozzetti e quindi tenute per ulteriori 16 ore in DMEM senza siero. Per verificare la fosforilazione di Akt, le cellule vengono incubate con FBS al 10% per diversi tempi (0, 3 e 45 minuti) dopodiché, esse vengono lavate in PBS 1x, sono lisate e raccolte con 100 µl di “loading buffer” 1x (2% SDS, 200nM Tris Hcl pH 6.8, 40% Glicerolo, 0.1% Blu di Bromofenolo, β-Mercaptoetanol) bollente. Per l’analisi di Akt è stato utilizzato come primario, un anticorpo policlonale di coniglio anti-fosfoAkt che riconosce il sito fosforilato al livello della Ser473; per l’analisi di ERK1/2, invece, un anticorpo policlonale che riconosce p44/p42; mentre gli anticorpi utilizzati per verificare la quantità di estratto proteico separato su gel, sono stati utilizzati l’anti-Akt tot che riconosce sia la forma fosforilata che non di Akt o l’anti-actina. Per l’analisi della quota di PARP tagliato sulla quantità di PARP intero, è stato utilizzato un anticorpo che riconosce entrambe le forme: PARP intero (116 kDa) e PARP tagliato (89 kDa). Tutti gli anticorpi primari sono stati utilizzati alla concentrazione di 1µg/ml e sono stati dorniti dalla Cell Signaling Technology.

4.6 Anoikis

Anoikis è il nome utilizzato per indicare la morte cellulare programmata indotta dalla perdita di contatto cellula-cellula e cellula-matrice extracellulare. Tali condizioni possono essere efficacemente riprodotte in coltura mediante l’impiego di poly-HEMA (poli-2-idrossietilmetacrilato) per impedire l’adesione cellulare alle piastre di coltura. In piastre “multiwell” da 24 pozzetti si depongono 800 µl di poly-HEMA (10 mg/ml in etanolo)/pozzetto e lo si lascia asciugare finché tutto l’etanolo non sia evaporato, e lavate più volte con PBS 1x. Per tutti gli esperimenti, si piastrano 5×10^4 cellule RPE in piastre tipo “multiwell” a 24 pozzetti in DMEM con 10% FBS. Dopo 18 ore di

incubazione a 37°C, viene effettuato prima un lavaggio con PBS 1x e successivamente una pre-incubazione di 1 ora con 10nM uPA1-158, preceduta, quando indicato nelle leggende alle figure, dal pre-trattamento per 30 minuti con 20µM LY294002 o 50µM UO126. Alla fine di questa incubazione, le cellule vengono raccolte mediante blanda tripsinizzazione (1×10^5) e risospese in 0.6% metil-cellulosa in DMEM. Le cellule si depongono in piastre trattate con poly-HEMA. Dopo 8 ore di incubazione a 37°C, le cellule vengono raccolte diluendo la metil-cellulosa con PBS 1X e lavate con PBS1X 3 volte. Le cellule vengono poi analizzate per il loro contenuto di complessi DNA-istoni riversati nel citoplasma, mediante saggio ELISA o per il loro livello di PARP nella forma tagliata, mediante Western blotting.

4.7 Induzione di apoptosi con UV e cis-platino

In entrambi i casi vengono piastrate 5×10^4 cellule/campione in piastre per colture cellulari da 24 pozzetti (tipo “multiwell”) in DMEM 10% FBS ed incubate a 37°C per 24 ore. Dopo aver allontanato le tracce di siero lavando le cellule con PBS 1x, le cellule vengono incubate in DMEM privo di siero per ulteriori 18 ore, ed esposte agli stimoli pro-apoptotici. Per l’apoptosi indotta da UV, le RPE vengono esposte a 100 mJ UV-C in presenza di PBS 1X, mediante lo strumento “UV Stratalinker”. Per l’apoptosi indotta da cis-platino (cis-Pt), le cellule vengono trattate con 100 µM cis-Pt per 24 ore in DMEM privo di siero. In entrambi i casi ne viene saggiato il livello di morte apoptotica dopo 24 ore di incubazione in DMEM a 37°C. A tale scopo, le cellule vengono raccolte, lisate e analizzate mediante Cell death ELISA (tale saggio è descritto nel paragrafo successivo).

4.8 Saggio ELISA per l'analisi quantitativa dell'apoptosi

Il livello di apoptosi indotta da vari stimoli è stato testato mediante il kit commerciale “Cell Death Detection ELISA plus”, secondo le istruzioni della casa fornitrice (Roche). In breve, le cellule vengono tripsinizzate, raccolte e centrifugate a 1000 rpm, in centrifuga eppendorf, per 5 minuti a temperatura ambiente, e dopo un ulteriore lavaggio in PBS 1X, vengono trattate per 30 minuti a 25°C, con 30 µl di un tampone di lisi incluso nel kit. La tecnica consiste in un saggio colorimetrico che permette la determinazione quantitativa e qualitativa dei frammenti di DNA associati agli istoni, riversati nel citoplasma della cellula in seguito allo stimolo pro-apoptotico. Il riconoscimento dei frammenti avviene mediante l'uso di due anticorpi monoclonali: uno diretto contro gli istoni e biotinilato, in modo tale da interagire con le apposite piastre di microtitolazione funzionalizzate con streptavidina; l'altro diretto contro il DNA e coniugato alla perossidasi di rafano, che permette di sviluppare colore per ossidazione del substrato 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) ABTS. Per eliminare i nuclei, i lisati cellulari vengono centrifugati a 2000 g per 10 minuti a 25°C. 8 µl del sovrantante (frazione solubile contenente il citoplasma) sono quindi, incubati nei micro-pozzetti con 32 µl di una miscela contenente i due anticorpi (1/20 µl del totale), e posti per 2 ore in agitazione a 200 rpm. Dopo tre lavaggi con lo stesso tampone d'incubazione, per allontanare l'eccesso di anticorpo non legato, è stato aggiunto l'ABTS (40 µl). Lo sviluppo del colore è proporzionale al livello di apoptosi, ed è misurato spettrofotometricamente come O.D. 405 nm.

4.9 Real-Time PCR

Gli esperimenti di quantizzazione del mRNA di Bcl-xL dopo trattamento con uPA sono stati condotti mediante l'utilizzo della macchina *DNA Engine Opticon 2 System*, fornita dalla *Celbio*.

Lo strumento consta di un termociclatore, a livello del quale sono condotte le reazioni di amplificazione, dotato di una sorgente di luce bianca che eccita i campioni e di un dispositivo di lettura della fluorescenza emessa dai singoli campioni ad ogni passaggio dell'amplificazione. Il dispositivo di lettura della fluorescenza emessa è collegato ad un computer, a livello del quale è installato un software, *Opticon monitor 2*, in grado di analizzare i dati e convertirli in grafici di amplificazione per ciascuna reazione.

Il sistema adoperato prevede l'utilizzo di una particolare miscela di reazione 2X (*DyNAmo HS SYBR Green qPCR Kit, Finnzyme*) contenente *DyNAmo hot start DNA polimerasi*, un fluoroforo definito *SYBR Green I*, una miscela di dNTP, 5 mM MgCl₂ ed un tampone ottimizzato per la reazione. Il fluoroforo *SYBR Green I*, intercalandosi nella doppia elica del DNA che di volta in volta viene amplificato, emette una fluorescenza 1000 volte superiore a quella emessa in assenza di DNA. Questa caratteristica lo rende ideale per gli studi di quantizzazione degli acidi nucleici, in quanto, la fluorescenza emessa dal campione che si amplifica è direttamente correlata alla quantità di acido nucleico disponibile inizialmente. Con questo sistema, è possibile rivelare anche piccole variazioni dell'espressione di un dato trascritto tra due o più tessuti, oppure a livello dello stesso tessuto, prelevato dall'animale in fasi temporali differenti. Il vantaggio di questo sistema sperimentale consiste nella possibilità di seguire ogni tappa dell'amplificazione ed analizzare i dati prima che la reazione raggiunga il *plateau* a causa dell'esaurimento dei reagenti disponibili.

L'espressione di un dato trascritto in due tessuti, in fasi temporali differenti o dopo due differenti trattamenti, come in questo caso, viene confrontata con l'espressione di un gene costitutivo, come la gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH), che non

presenterà differenze rilevanti nella sua espressione. Questa operazione normalizza le differenze di espressione che possono derivare da una variabilità sperimentale.

Gli esperimenti di *Real Time quantitative PCR* sono stati effettuati preparando una “master mix” per il gene Bcl-xL, contenente la miscela di reazione 1X, 0,25 µM per ciascun oligonucleotide (BCLF: 5'-GTAAACTGGGGTCGCATTGT-3'; BCLR: 5'-TGCTGCATTGTTCCCATAGA-3') ed H₂O. 16 µl di tale miscela sono stati posti in ciascun tubo di reazione (tre reazioni identiche per il cDNA trattate per 5 ore con 10nM uPA1-158, tre reazioni per il cDNA preparato da RNA di cellule RPE tenute in assenza di uPA 1-158, una reazione di controllo negativo). A ciascun campione sono stati aggiunti 4 µl di una diluizione 1/32 del cDNA corrispondente, mentre nel controllo negativo sono stati aggiunti 4 µl di H₂O. Il prodotto di tale amplificazione presenta una lunghezza di 345 bp.

La “master mix” per il gene GAPDH è stata preparata allo stesso modo. Gli oligonucleotidi da innesco per tale gene sono GAPDHF: 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'; GAPDHR: 3'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-5'. Essi forniscono un amplificato lungo 226 bp. Le amplificazioni del cDNA di Bcl-xL e GAPDH sono state condotte contemporaneamente, utilizzando il medesimo programma, sfruttando, però, il gradiente di temperatura della piastra riscaldante dello strumento. L'appaiamento degli inneschi del gene Bcl-xL è stato effettuato a 58 °C, mentre quello degli inneschi del gene GAPDH è stato effettuato a 60 °C. Le condizioni di amplificazione sono le seguenti:

15 minuti a 95 °C per 1 ciclo

15 secondi a 95 °C, 20 sec alla temperatura di appaiamento degli oligo (58 °C e 60 °C),

20 secondi a 72 °C, lettura della fluorescenza, reiterato per 35 cicli

1 minuto a 72 °C per 1 ciclo

lettura della *melting curve* da 65 °C a 95 °C.

Al termine dell'amplificazione, lo strumento determina la temperatura di fusione (compresa in un intervallo di temperature stabilito *a priori*) di ciascun prodotto amplificato e la rende visibile in un grafico, in cui è riportata l'intensità di fluorescenza in funzione della temperatura. E' possibile, in questo modo, mettere in evidenza la presenza di amplificazioni spurie, che presenteranno una *melting curve* differente da quella del prodotto specifico.

Ad esperimento concluso, per ogni campione viene registrato il ciclo a livello del quale inizia l'incremento di fluorescenza, definito $c(t)$. Viene calcolato, quindi, il valore medio dei $c(t)$ relativi ad i tre esperimenti identici in triplicato del gene Bcl-xL e della GAPDH, quindi si calcola il $\Delta c(t)$, che è dato dalla differenza tra il $c(t)$ medio relativo al gene Bcl-xL ed quello relativo alla GAPDH. Si calcola quindi il valore del $\Delta[\Delta c(t)]$, dato dalla differenza tra il $\Delta c(t)$ del campione trattato con uPA1-158 e il $\Delta c(t)$ del campione non trattato, preso come riferimento. Per conoscere quante volte un dato trascritto è più rappresentato dopo trattamento con uPA1-158 rispetto al non trattato, per ciascun trattamento si calcola $2^{-\Delta[\Delta c(t)]}$.

5. BIBLIOGRAFIA

Adachi Y., Chandrasekar N., Kin Y., Lakka S.S., Mohanam S., Yanamandra N., Mohan P.M., Fuller G.N., Fang B., Fueyo J., Dinh D.H., Olivero W.C., Tamiya T., Ohmoto T., Kyritsis A.P., Rao J.S. (2002). Suppression of glioma invasion and growth by adenovirus-mediated delivery of a bicistronic construct containing antisense uPAR and sense p16 gene sequences. *Oncogene*, 21(1):87-95.

Aguirre Ghiso J.A., Liu D., Mignatti A., Kovalski K. and Ossowski L. (2001). Urokinase receptor and fibronectin regulate the ERK(MAPK) to p38(MAPK) activity ratios that determine carcinoma cell proliferation or dormancy in vivo. *Mol. Biol. Cell.*, 12:863-79.

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

Alexander J.P., Bradley J.M., Gabourel J.D., Acott T.S. (1990). Expression of matrix metalloproteinases and inhibitor by human retinal pigment epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 31(12):2520-8.

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

Appella E., Robinson E.A., Ullrich S.J., Stoppelli M.P., Corti A., Cassani G., Blasi F. (1987). The receptor-binding sequence of urokinase. A biological function for the growth-factor module of proteases. *J Biol Chem.*, 262(10):4437-40.

Ballif B. A. and Blenis J. (2001). Molecular mechanisms mediating mammalian mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK)-MAPK cell survival signals. *Cell. Growth Differ.*, 12: 397-408.

Barberis L., Wary K.K., Fiucci G., Liu F., Hirsch E., Brancaccio M., Altruda F., Tarone G., Giancotti F.G. (2000). Distinct roles of the adaptor protein Shc and focal adhesion kinase in integrin signaling to ERK. *J Biol Chem.*, 275(47):36532-40.

Barnhart B.C., Legembre P., Pietras E., Bubici C., Franzoso G., Peter M.E. (2004). CD95 ligand induces motility and invasiveness of apoptosis-resistant tumor cells. *EMBO J.*, 23(15):3175-85.

Bianco C., Strizzi L., Rehman A., Normanno N., Wechselberger C., Sun Y., Khan N., Hirota M., Adkins H., Williams K., Margolis R.U., Sanicola M., Salomon D.S. (2003). A Nodal- and ALK4-independent signaling pathway activated by Cripto-1 through Glypican-1 and c-Src. *Cancer Res.*, 63(6):1192-7.

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

Blasi F., Conese M., Moller L.B., Pedersen N., Cavallaro U., Cubellis M.V., Soria M.R., Stoppelli M.P., Talarico D., Teesalu T. and Valcamonica S. (1994). The

urokinase receptor: structure, regulation and inhibitor-mediated internalization. *Fibrinolysis*, 8: 182-188.

Bouillet P., Metcalf D., Huang D.C., Tarlinton D.M., Kay T.W., Kontgen F., Adams J.M., Strasser A. (1999). Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science*, 286(5445):1735-8.

Brooks P.C., Montgomery A.M., Rosenfeld M., Reisfeld R.A., Hu T., Klier G., Cheresh D.A. (1994). Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell*, 79(7):1157-64.

Brummlkamp T.R., Bernards R. and Agami R. (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*, 296(5567):550-3.

Bryckaert M., Guillonneau X., Hecquet C., Courtois Y., Mascarelli F. (1999). Both FGF1 and bcl-x synthesis are necessary for the reduction of apoptosis in retinal pigmented epithelial cells by FGF2: role of the extracellular signal-regulated kinase 2. *Oncogene*, 18(52):7584-93.

Bu X., Khankaldyyan V., Gonzales-Gomez I., Groshen S., Ye W., Zhuo S., Pons J., Stratton J.R., Rosenberg S., Laug W.E. (2004). Species-specific urokinase receptor ligands reduce glioma growth and increase survival primarily by an antiangiogenesis mechanism. *Lab Invest*, 84(6): 667-78.

Buckley C.D., Pilling D., Henriquez N.V., Parsonage G., Threlfall K., Scheel-Toellner D., Simmons D.L., Akbar A.N., Lord J.M., Salmon M. (1999). RGD peptides induce apoptosis by direct caspase-3 activation. *Nature*, 397(6719):534-9.

Carriero M.V., Del Vecchio S., Franco P., Massa O., Botti G., Cerra M., D'Aiuto G., Esposito G., Stoppelli M.P. and Salvatore M. (1994). Identification of receptor-bound urokinase in human malignant breast tumors. *Cancer Res.*, 54: 5445-5454.

Carriero M.V., Del Vecchio S., Franco P., Potena M.I., Chiaradonna F., Botti G., Stoppelli M.P., Salvatore M. (1997). Vitronectin binding to urokinase receptor in human breast cancer. *Clin. Cancer Res.*, 3(8):1299-308.

Carriero M.V., Del Vecchio S., Capozzoli M., Franco P., Fontana L., Zannetti A., Botti G., D'Aiuto G., Salvatore and Stoppelli M.P. (1999). Urokinase receptor interacts with $\alpha_5\beta_1$ vitronectin receptor promoting urokinase-dependent cell migration in breast cancer. *Cancer Res.*, 59: 5307-5314.

Chandrasekar N., Mohanam S., Gujrati M., Olivero W.C., Dinh D.H., Rao J.S. (2003). Downregulation of uPA inhibits migration and PI3k/Akt signaling in glioblastoma cells. *Oncogene*, 22(3):392-400.

Chapman H.A. (1997). Plasminogen activators, integrins and the coordinated regulation of cell adhesion and migration. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 9, 714-724.

Chen C.S., Mrksich M., Huang S., Whitesides G.M., Ingber D.E. (1997). Geometric control of cell life and death. *Science*, 276(5317):1425-8.

Cheng E.H., Wei M.C., Weiler S., Flavell R.A., Mak T.W., Lindsten T., Korsmeyer S.J. (2001). BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol. Cell.*, 8(3):705-11.

Chiaradonna F., Fontana L., Iavarone C., Carriero M.V., Scholz G., Barone M.V., Stoppelli M.P. (1999). Urokinase receptor-dependent and -independent p56/59(hck) activation state is a molecular switch between myelomonocytic cell motility and adherence. *EMBO J.*, 18(11):3013-23.

Coucouvanis E., Martin G.R. (1995). Signals for death and survival: a two-step mechanism for cavitation in the vertebrate embryo. *Cell.*, 83(2):279-87.

Danilkovitch-Miagkova A. and Leonard E. J. (2001). Anti-apoptotic action of macrophage stimulating protein (MSP). *Apoptosis*, 6: 183-190.

Daugas E., Nochy D., Ravagnon L., Loeffler M., Susin S.A., Zamzami N. and Kroemer G. (2000). Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. *FEBS Lett.*, 476: 118-23.

Elnor S.G., Elnor V.M., Kindzelskii A.L., Horino K., Davis H.R., Todd R.F., Glagov S., Petty H.R. (2003). Human RPE cell lysis of extracellular matrix: functional urokinase plasminogen activator receptor (uPAR), collagenase and elastase. *Exp. Eye Res.*, 76(5):585-95.

Erdreich-Epstein A., Tran L.B., Cox O.T., Huang E.Y., Laug W.E., Shimada H., Millard M. (2005). Endothelial apoptosis induced by inhibition of integrins α v β 3 and α v β 5 involves ceramide metabolic pathways. *Blood.*, 105(11):4353-61.

Fabbrini M.S., Carpani D., Bello-Rivero I., Soria M.R. (1997). The amino-terminal fragment of human urokinase directs a recombinant chimeric toxin to target cells: internalization is toxin mediated. *FASEB J.*, 11(13): 1169-76.

Fazioli F., Resnati M., Sidenius N., Higashimoto Y., Appella E. and Blasi F. (1997). A urokinase-sensitive region of the human urokinase receptor is responsible for its chemotactic activity. *Embo J.*, 16: 7279-86.

Fico A., Paglialunga F., Cigliano L., Abrescia P., Verde P., Martini G., Iaccarino I., Filosa S. (2004). Glucose-6-phosphate dehydrogenase plays a crucial role in protection from redox-stress-induced apoptosis. *Cell Death Differ.*, 11(8):823-31.

Flusberg D.A., Numaguchi Y., Ingber D.E. (2001). Cooperative control of Akt phosphorylation, bcl-2 expression, and apoptosis by cytoskeletal microfilaments and microtubules in capillary endothelial cells. *Mol. Biol. Cell.*, 12(10):3087-94.

Franco P., Iaccarino C., Chiaradonna F., Brandazza A., Iavarone C., Mastronicola M.R., Nolli M.L. and Stoppelli M.P. (1997). Phosphorylation of human pro-urokinase on Ser^{138/303} impairs its receptor-dependent ability to promote myelomonocytic adherence and motility. *J. Cell. Biol.*, 137: 779-791.

Frisch S.M. and Francis H. (1994). Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J. Cell. Biol.*, 124: 619-26.

Gargiulo L., Longanesi-Cattani I., Bifulco K., Franco P., Raiola R., Campiglia P., Grieco P., Peluso G., Stoppelli M.P., Carriero M.V. (2005). Cross-talk between fMLP and vitronectin receptors triggered by urokinase receptor-derived SRSRY peptide. *J. Biol. Chem.*, 280(26):25225-32.

Golubovskaya V.M., Gross S., Kaur A.S., Wilson R.I., Xu L.H., Yang X.H., Cance W.G. (2003) Simultaneous inhibition of focal adhesion kinase and SRC enhances detachment and apoptosis in colon cancer cell lines. *Mol. Cancer Res.*, 1(10):755-64.

Grossmann J., Mohr S., Lapentina E.G., Fiocchi C., Levine A.D. (1998). Sequential and rapid activation of select caspases during apoptosis of normal intestinal epithelial cells. *Am. J. Physiol.*, 274(6 Pt 1):G1117-24.

Gutierrez L.S., Schulman A., Brito-Robinson T., Noria F., Ploplis V.A., Castellino F.J. (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.

Hanahan D., Weinberg R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1): 57-70.

Hood J.D., Cheresch D.A. (2002). Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat. Rev. Cancer*, 2(2):91-100. Review.

Jan Y., Matter M., Pai J.T., Chen Y.L., Pilch J., Komatsu M., Ong E., Fukuda M., Ruoslahti E. (2004). A mitochondrial protein, Bit1, mediates apoptosis regulated by integrins and Groucho/TLE corepressors. *Cell*, 116(5):751-62.

Janicke F., Schmitt M., Haster R., Hollrieder A., Babic R., Ulm K., Gossner W. and Graess H. (1990). Urokinase-type plasminogen activator (uPA) antigen is a predictor of early relapse in breast cancer. *Fibrinolysis*, 4: 69-78.

Jost M., Huggett T.M., Kari C. and Rodeck U. (2001). Matrix-independent survival of human keratinocytes through an EGF receptor/MAPK-kinase-dependent pathway. *Mol. Biol. Cell*, 12: 1519-27.

Kauffmann-Zeh A., Rodriguez-Viciana P., Ulrich E., Gilbert C., Coffey P., Downward J., Evan G. (1997). Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signalling through PI(3)K and PKB. *Nature*, 385 (6616): 544-8.

Khwaja A., Rodriguez-Viciana P., Wennstrom S., Warne P.H., Downward J. (1997). Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/Akt cellular survival pathway. *EMBO J.*,16(10):2783-93.

Krishnamoorthy B., Darnay B., Aggarwal B., Dinh D.H., Kouraklis G., Olivero W.C., Gujrati M. and Rao J.S. (2001). Glioma cells deficient in urokinase plasminogen activator receptor expression are susceptible to tumor necrosis factor-alpha-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis. *Clin. Cancer Res.*, 7: 4195-201.

Lacour S., Hammann A., Grazide S., Lagadic-Gossmann D., Athias A., Sergent O., Laurent G., Gambert P., Solary E., Dimanche-Boitrel M.T. (2004). Cisplatin-induced CD95 redistribution into membrane lipid rafts of HT29 human colon cancer cells. *Cancer Res.*, 64(10):3593-8.

Lallemand F., Mazars A., Prunier C., Bertrand F., Kornprost M., Gallea S., Roman-Roman S., Cherqui G., Atfi A. (2001). Smad7 inhibits the survival nuclear factor kappaB and potentiates apoptosis in epithelial cells. *Oncogene*, 20(7):879-84.

Le Gall M., Chambard J.C., Breittmayer J.P., Grall D., Pouyssegur J., Van Obberghen-Schilling E. (2000). The p42/p44 MAP kinase pathway prevents apoptosis induced by anchorage and serum removal. *Mol. Biol. Cell.*, 11(3):1103-12.

Liu D., Aguirre Ghiso J., Estrada Y. and 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: 445-57.

Llinas P., Le Du M.H., Gardsvoll H., Dano K., Ploug M., Gilquin B., Stura E.A., Menez A. (2005). Crystal structure of the human urokinase plasminogen activator receptor bound to an antagonist peptide. *EMBO J.*, 24(9):1655-63.

Lund A.H., Turner G., Trubetskoy A., Verhoeven E., Wientjens E., Hulsman D., Russell R., DePinho R.A., Lenz J., Van Lohuizen M. (2002). Genome-wide retroviral insertional tagging of genes involved in cancer in Cdkn2a-deficient mice. *Nat. Genet.*, 32(1): 160-5.

Ma Z., Webb D.J., Jo M. and Gonias S.L. (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: 3387-96.

Marani M., Hancock D., Lopes R., Tenev T., Downward J., Lemoine N.R. (2004). Role of Bim in the survival pathway induced by Raf in epithelial cells. *Oncogene*, 23(14):2431-41.

Martins L.M., Iaccarino I., Tenev T., Gschmeissner S., Totty N.F., Lemoine N.R., Savopoulos J., Gray C.W., Creasy C.L., Dingwall C. and Downward J. (2002). The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a reaper-like motif. *J. Biol. Chem.*, 277:439-44.

Marty W. Mayo, Lee V. Madrid, Sandy D. Westerheide, David R. Jones, Xiu-Juan Yuan, Albert S. Baldwin Jr., and Young E. Whang. (2002). PTEN Blocks Tumor Necrosis Factor-induced NF-B-dependent Transcription by Inhibiting the Transactivation Potential of the p65 Subunit. *J. Biol. Chem.*, 277 (13), 11116-11125.

McFall A., Ulku A., Lambert Q.T., Kusa A, Rogers-Graham K, Der CJ. (2001). Oncogenic Ras blocks anoikis by activation of a novel effector pathway independent of phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol. Cell Biol.*, 21(16):5488-99.

Meilhac O., Ho-Tin-Noe B., Houard X., Philippe M., Michel J.B., Angles-Cano E. (2003). Pericellular plasmin induces smooth muscle cell anoikis. *FASEB J.*, 17(10):1301-3.

Meredith J.E. Jr, Fazeli B., Schwartz M.A. (1993). The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol. Biol. Cell.*, 4(9):953-61.

Mignatti P. and Rifkin D.B. (1993). Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol. Review.*, 73: 161-194.

Nguyen D.H., Webb D.J., Catling A.D., Song Q., Dhakephalkar A., Weber M.J., Ravichandran K.S. and Gonias S.L. (2000). Urokinase-type plasminogen activator stimulates the Ras/Extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway and MCF-7 cell migration by a mechanism that requires focal adhesion kinase, Src, and Shc. Rapid dissociation of GRB2/Sps-Shc complex is associated with the transient phosphorylation of ERK in urokinase-treated cells. *J. Biol. Chem.*, 275: 19382-8.

Normanno N., De Luca A., Bianco C., Maiello M.R., Carriero M.V., Rehman A., Wechselberger C., Arra C., Strizzi L., Sanicola M., Salomon D.S. (2004). Cripto-1 overexpression leads to enhanced invasiveness and resistance to anoikis in human MCF-7 breast cancer cells. *J. Cell Physiol.*, 198(1):31-9.

Owens L.V., Xu L., Craven R.J., Dent G.A., Weiner T.M., Kornberg L., Liu E.T., Cance W.G. (1995). Overexpression of the focal adhesion kinase (p125FAK) in invasive human tumors. *Cancer Res.*, 55(13):2752-5.

Pakneshan P., Szyf M., Farias-Eisner R., Rabbani S.A. (2004). Reversal of the hypomethylation status of urokinase (uPA) promoter blocks breast cancer growth and metastasis. *J. Biol. Chem.*, 279(30): 31735-44.

Pardo O.E., Arcaro A., Salerno G., Raguz S., Downward J., Seckl M.J. (2002). Fibroblast growth factor-2 induces translational regulation of Bcl-xL and Bcl-2 via a MEK-dependent pathway: correlation with resistance to etoposide-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 277(14):12040-6.

Persad S., Attwell S., Gray V., Mawji N., Deng J.T., Leung D., Yan J., Sanghera J., Walsh M.P., Dedhar S. (2001). Regulation of protein kinase B/Akt-serine 473 phosphorylation by integrin-linked kinase: critical roles for kinase activity and amino acids arginine 211 and serine 343. *J. Biol. Chem.*, 276(29):27462-9.

Ploug M., Ronne E., Behrendt N., Jense A.L., Blasi F. and Dano. K. (1991). Cellular receptor for urokinase plasminogen activator. Carboxyl-terminal processing and membrane anchoring by glycosyl-phosphatidylinositol. *J. Biol. Chem.*, 266: 1926-1933.

Ploug M., Ellis. (1994). Structure-function relationships in the receptor for urokinase-type plasminogen activator. Comparison to other members of the Ly-6 family and snake venom alpha-neurotoxins. *FEBS Lett.*, 349(2):163-8. *Review.*

Puthalakath H., Huang D.C., O'Reilly L.A., King S.M., Strasser A. (1999). The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol. Cell.*, 3(3):287-96.

Rabbani S.A., Gladu J. (2002). Urokinase receptor antibody can reduce tumor volume and detect the presence of occult tumor metastases in vivo. *Cancer Res.*, 62(8): 2390-7.

Ratiglia R., Berti E., Galimberti D., Soncini V., Bruno A., Marchi L., Rossi A. (1999). Apoptosis in vitreoretinal disorders. *InterNet J. Ophthalmol.*, 4: 12-20.

Reginato M.J., Mills K.R., Paulus J.K., Lynch D.K., Sgroi D.C., Debnath J., Muthuswamy S.K. and Brugge J.S. (2003). Integrins and EGFR coordinately regulate the pro-apoptotic protein Bim to prevent anoikis. *Nat Cell Biol* 5: 733-40.

Robbiati F., Nolli M.L., Soffientini A., Sarubbi E., Stoppelli M.P., Cassani G., Parenti F. and Blasi F. (1990). A recombinant pro-urokinase derived mutant missing the growth factor-like domain does not bind to its receptor. *Fibrinolysis*, 4: 53-60.

Rodriguez-Viciano P., Warne P.H., Dhand R., Vanhaesebroeck B., Gout I., Fry M.J., Waterfield M.D. and Downward J. (1994). Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature*, 370: 527-32.

Rodriguez-Viciano P., Warne P.H., Khwaja A., Marte B.M., Pappin D., Das P., Waterfield M.D., Ridley A., Downward J. (1997). Role of phosphoinositide 3-OH kinase in cell transformation and control of the actin cytoskeleton by Ras. *Cell*, 89(3):457-67.

Rodriguez-Viciano P., Warne P.H., Vanhaesebroeck B., Waterfield M.D. and Downward J. (1996). Activation of phosphoinositide 3-kinase by interaction with Ras and by point mutation. *Embo J.*, 15: 2442-51.

Romer J, Nielsen BS, Ploug M. (2004). The urokinase receptor as a potential target in cancer therapy. *Curr. Pharm. Des.*, 10(19): 2359-76.

Rosen K., Coll M.L., Li A., Filmus J. (2001). Transforming growth factor- α prevents detachment-induced inhibition of c-Src kinase activity, Bcl-xL down-regulation, and apoptosis of intestinal epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, 276(40):37273-9.

Rosignol P., Ho-Tin-Noe B., Vranckx R., Bouton M.C., Meilhac O., Lijnen H.R., Guillin M.C., Michel J.B., Angles-Cano E. (2004). Protease nexin-1 inhibits plasminogen activation-induced apoptosis of adherent cells. *J Biol Chem.*, 279(11):10346-56.

Ruoslahti E., Pierschbacher M.D. (1987). New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science*, 238(4826):491-7. *Review.*

Rytomaa M., Lehmann K., Downward J. (2000). Matrix detachment induces caspase-dependent cytochrome c release from mitochondria: inhibition by PKB/Akt but not Raf signalling. *Oncogene*, 19(39):4461-8.

Sato S., Kopitz C., Schmalix W.A., Muehlenweg B., Kessler H., Schmitt M., Kruger A., Magdolen V. (2002). High-affinity urokinase-derived cyclic peptides inhibiting urokinase/urokinase receptor-interaction: effects on tumor growth and spread. *FEBS Lett.*, 528(1-3): 212-6.

Schaller M.D., Borgman C.A., Cobb B.S., Vines R.R., Reynolds A.B., Parsons J.T. (1992). pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89(11):5192-6.

Schlaepfer D.D., Hunter T. (1998). Integrin signalling and tyrosine phosphorylation: just the FAKs? *Trends Cell Biol.*, 8(4):151-7. Review.

Schulze A., Lehmann K., Jefferies H.B., McMahon M., Downward J. (2001). Analysis of the transcriptional program induced by Raf in epithelial cells. *Genes Dev.*, 15(8):981-94.

Sliva D., Rizzo M.T., English D. (2002). Phosphatidylinositol 3-kinase and NF-kappaB regulate motility of invasive MDA-MB-231 human breast cancer cells by the secretion of urokinase-type plasminogen activator. *J. Biol. Chem.*, 277(5):3150-7.

Simons K., Toomre D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 1(1):31-9. Review.

Stein R.C., Waterfield M.D. (2000). PI3-kinase inhibition: a target for drug development? *Mol. Med. Today*, 6(9):347-57. Review.

Stoppelli M.P., Corti A., Soffientini A., Cassani G., Blasi F. and Assoian R.K. (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.* 82: 4939-4943.

Stoppelli M.P., Tacchetti C., Cubellis M.V., Corti A., Hearing V.J., Appella E. and Blasi F. (1986). Autocrine saturation of pro-urokinase receptor. *Cell*, 45: 675-684.

Streuli C.H., Gilmore A.P. (1999). Adhesion-mediated signaling in the regulation of mammary epithelial cell survival. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 4(2):183-91. *Review.*

Suter M., Reme C., Grimm C., Wenzel A., Jaattela M., Esser P., Kociok N., Leist M., Richter C. (2000). Age-related macular degeneration. The lipofusion component N-retinyl-N-retinylidene ethanolamine detaches proapoptotic proteins from mitochondria and induces apoptosis in mammalian retinal pigment epithelial cells. *J Biol Chem.*, 275(50):39625-30.

Tang H., Kerins D.M., Hao Q., Inagami T., Vaughan D.E. (1998). The urokinase-type plasminogen activator receptor mediates tyrosine phosphorylation of focal adhesion proteins and activation of mitogen-activated protein kinase in cultured endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, 273(29):18268-72.

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.

Valentijn A.J., Metcalfe A.D., Kott J., Streuli C.H., Gilmore A.P. (2003). Spatial and temporal changes in Bax subcellular localization during anoikis. *J. Cell Biol.*, 162(4):599-612.

Vassalli J.D. (1994). The urokinase receptor. *Fybrinolysis*, 8, Suppl. 1: 172-181.

Verhagen A.M., Ekert P.G., Pakusch M., Silke J., Connolly L.M., Reid G.E., Moritz R.L., Simpson R.J. and Vaux D.L. (2000). Identification of DIABLO, a mammalian

protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*, 102: 43-53.

Watt F.M. (2002). Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation. *EMBO J.*, 21(15):3919-26. Review.

Wei Y., Lukashev M., Simon D.I., Bodary S.C., Rosenberg S., Doyle M.V., Chapman H.A. (1996). Regulation of integrin function by the urokinase receptor. *Science*, 273(5281):1551-5.

Wick W., Wagner S., Kerkau S., Dichgans J., Tonn J.C., Weller M. (1998). BCL-2 promotes migration and invasiveness of human glioma cells. *FEBS Lett.*, 440(3):419-24.

Yan S.R., Joseph R.R., Rosen K., Reginato M.J., Jackson A., Allaire N., Brugge J.S., Jobin C., Stadnyk A.W. (2005). Activation of NF-kappaB following detachment delays apoptosis in intestinal epithelial cells. *Oncogene*, 24(43):6482-91.

Yanamandra N., Konduri S.D., Mohanam S., Dinh D.H., Olivero W.C., Gujrati M., Nicolson G.L., Obeyesekere M., Rao J.S. (2000). Downregulation of urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) induces caspase-mediated cell death in human glioblastoma cells. *Clin. Exp. Metastasis*, 18(7):611-5.

Zhang Y., Lu H., Dazin P., Kapila Y.(2004). Squamous cell carcinoma cell aggregates escape suspension-induced, p53-mediated anoikis: fibronectin and integrin alphav

mediate survival signals through focal adhesion kinase. *J. Biol. Chem.*, 279(46):48342-9.

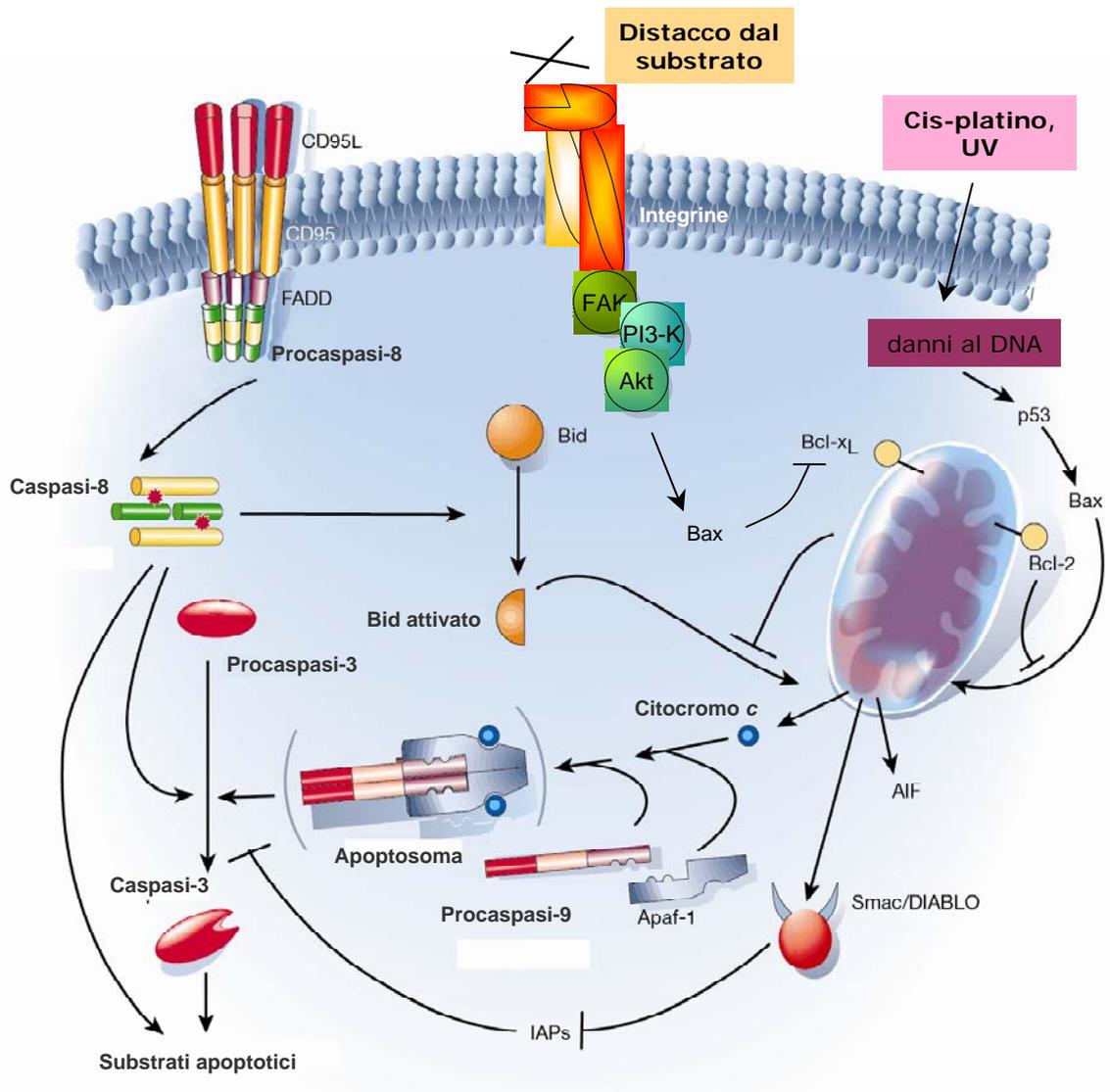
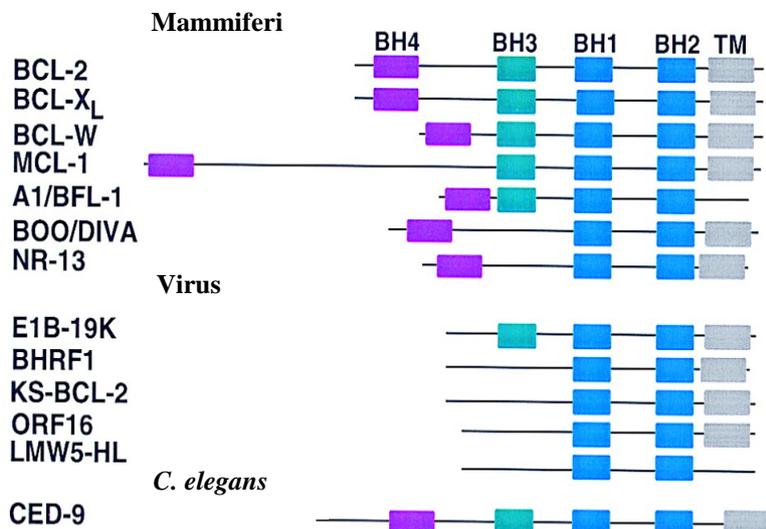


Fig. 1 Le vie apoptotiche recettoriale e mitocondriale in cellule di mammifero.

La via recettoriale si attiva mediante il legame della molecola-segnale, o CD95L, che porta all'oligomerizzazione del recettore CD95/Fas sulla membrana, favorendo l'assemblaggio di un complesso costituito da uno o più adattatori, come FADD (Fas Associated Death Domain protein) e da più pro-caspasi iniziatrici, come la pro-caspasi 8 che si attivano per indotta prossimità. Viceversa, la via mitocondriale si attiva in risposta a segnali endogeni, come ad esempio i danni al DNA causati da cisplatino o UV, che inducono una permeabilizzazione della membrana esterna mitocondriale e la fuoriuscita di diversi fattori pro-apoptotici e del citocromo C. Quindi nel citoplasma si assembla l'apoptosoma, costituito da un adattatore ad attività ATPasica, detto APAF-1 (Apoptotic Protease Activating Factor I), dal citocromo C e dalla pro-caspasi iniziatrice 9. Analogamente, la perdita di ancoraggio cellulare, segnalata dalle integrine, è in grado di attivare il fattore pro-apoptotico Bax e quindi, la permeabilizzazione della membrana esterna mitocondriale, presumibilmente attraverso una inibizione di FAK (chinasi delle adesioni focali) e di PI3-K/Akt (Phosphatidylinositide 3-Kinase/Protein Kinase B). In tutti i casi, il processo degradativo della cellula inizia con le pro-caspasi iniziatrici, che con un processo a cascata attivano le caspasi effettrici, come la caspasi 3. A valle della caspasi 3, il programma apoptotico si compone di vari "sottoprogrammi" il cui effetto finale è l'ordinato smantellamento della cellula.

Anti-apoptotici



Pro-apoptotici

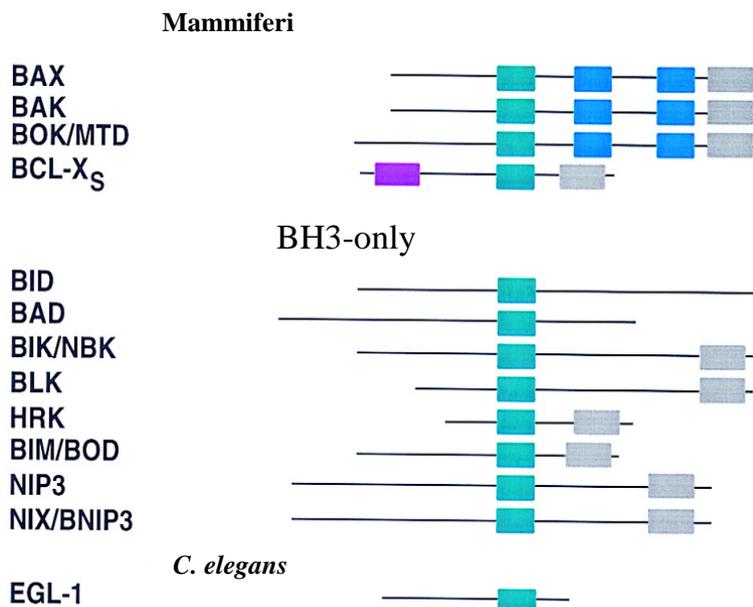


Fig. 2 Famiglia delle proteine Bcl-2. Rappresentazione grafica dei membri della famiglia Bcl-2, la cui denominazione è elencata nella colonna di sinistra. I componenti della famiglia sono divisi in base al numero dei domini di omologia e alla loro attività anti- o pro-apoptotica. Tutti i membri possiedono almeno uno dei quattro motivi conservati, conosciuti come "Bcl-2 homology domains" (BH1 a BH4): quelli molto simili a Bcl-2 hanno tutti e quattro i domini BH. Tutti i membri che inibiscono l'apoptosi contengono almeno i domini BH1 e BH2. Nella sottofamiglia dei membri pro-apoptotici esistono due classi che differiscono per la somiglianza o meno a Bcl-2; i primi contengono i tre domini BH1, BH2 e BH3. Invece, quelli denominati "BH3-only" sono costituiti per la maggior parte unicamente dal dominio BH3, da cui il nome.

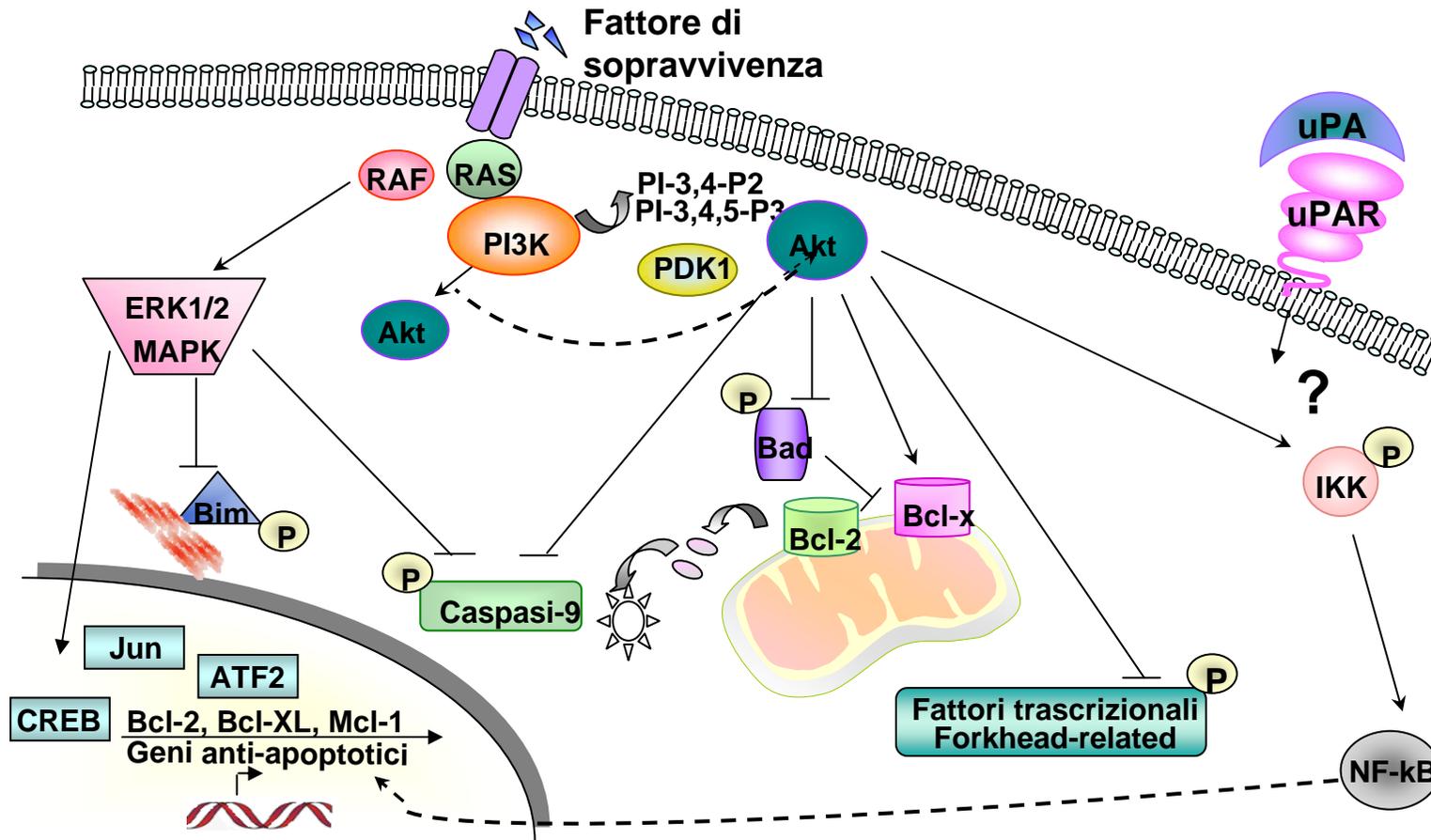


Fig. 3 Vie di trasduzione del segnale attivate da fattori di sopravvivenza.

La via delle MAPK (mitogen-activated protein kinases) prevede l'attivazione della proteina G monomerica Ras da parte del fattore di sopravvivenza, attraverso una proteina "adattatrice" tessuto-specifica. Ras attiva la Ser/Thr chinasi Raf, che a sua volta attiva la chinasi MEK (MAP/ERK kinase). Bersaglio di MEK è la MAP chinasi ERK (extracellular regulated kinase) che, a sua volta, può attivare una serie di bersagli, tra cui fattori trascrizionali. Anche PI3-K (Fosfatidil-inositolo-3-chinasi) è in grado di attivare una varietà di chinasi implicate nei processi di "survival", tra cui la Ser/Thr chinasi Akt; in breve, PI3-K fosforila il fosfatidilinositolo, o i suoi derivati fosforilati, ed i prodotti ottenuti attivano la chinasi fosfoinositide-dipendente PDK1 il cui bersaglio è Akt. Per svolgere la sua funzione anti-apoptotica Akt fosforila una serie di proteine citoplasmatiche, promuovendo la trascrizione di geni anti-apoptotici o bloccando proteine pro-apoptotiche.

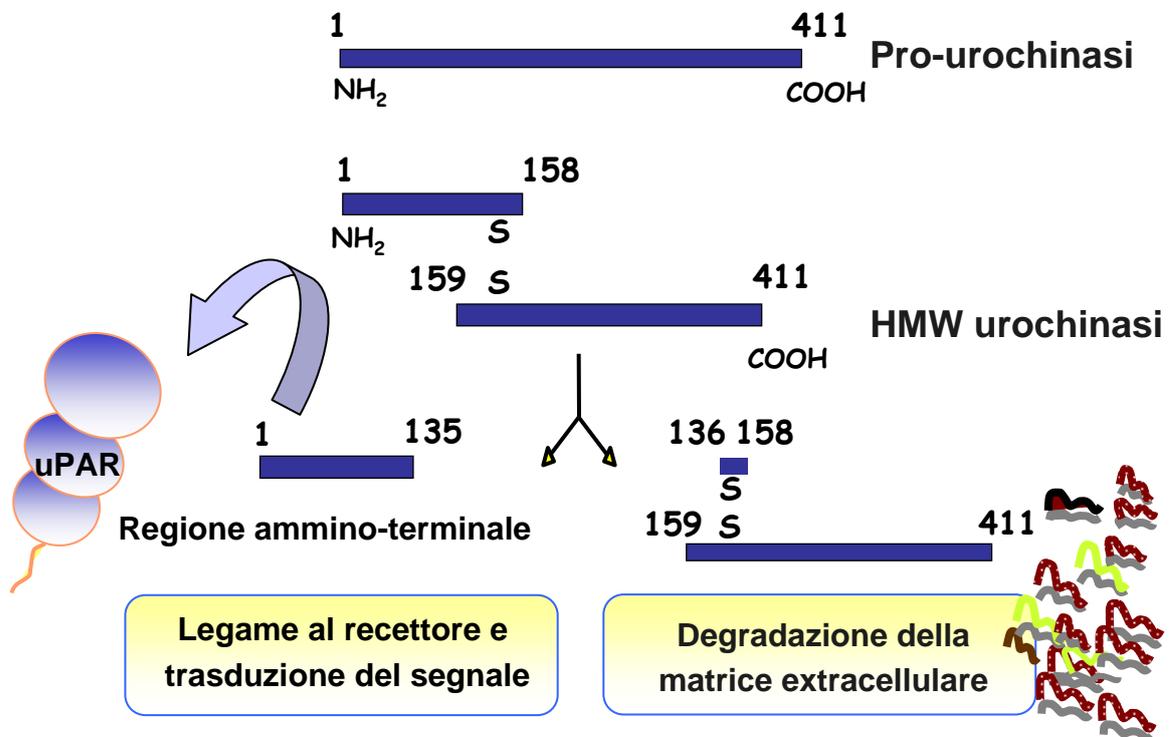
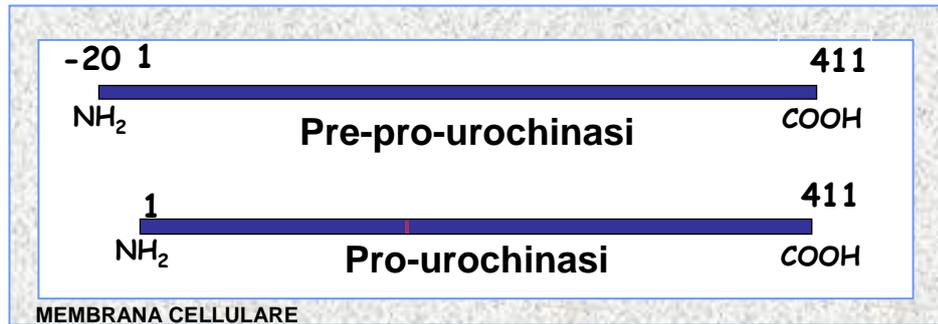


Fig. 5 Biosintesi e “processing” della pro-urochinasi.

Il prodotto primario di traduzione è una singola catena di 431 amminoacidi (pre-pro-urochinasi) a cui viene rimosso il peptide segnale e viene secreta come pro-uPA, proenzima inattivo da 411 amminoacidi. Questo viene poi attivato da un singolo taglio proteolitico a livello della Lys¹⁵⁸ che genera una regione amminoterminale, capace di interagire con il recettore o uPAR ed una regione carbossi-terminale, che può attivare il plasminogeno.

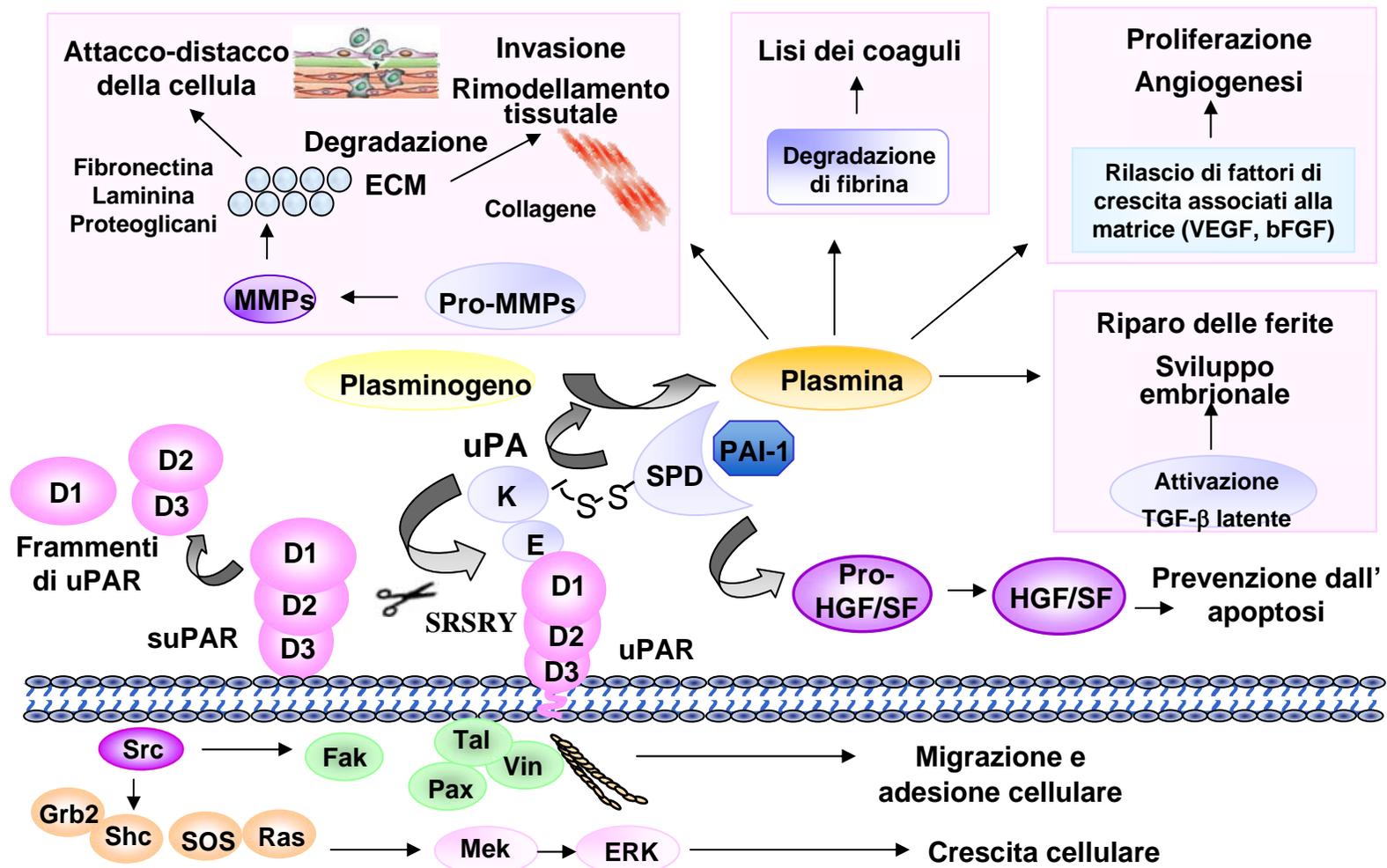
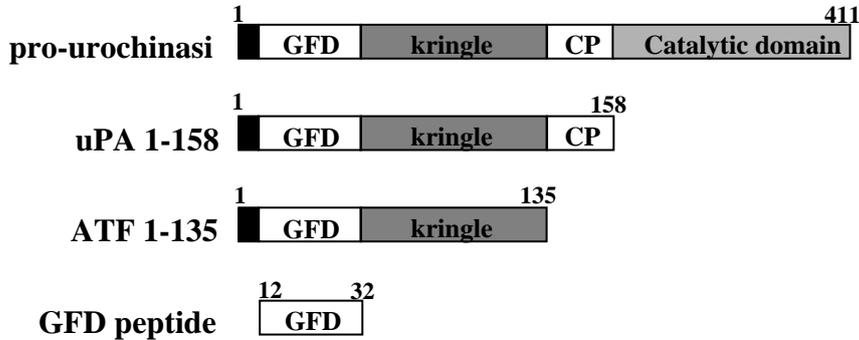


Fig. 6 Effetto dell'attività proteolitica dell'uPA sull'attivazione di fattori di crescita, degradazione della matrice e "signaling" intracellulare. L'uPA attraverso il dominio proteasico converte il plasminogeno inattivo in plasmina ed è responsabile, quindi, della degradazione della fibrina intravascolare e della matrice extracellulare (ECM) o all'attivazione di fattori di crescita latenti come il "trasforming growth factor β 1" (TGF- β 1). La plasmina può anche regolare le pro-metalloproteasi (pro-MMPs) o rilasciare fattori di crescita attivi, come il "vascular endothelial growth factor (VEGF) e il "basic fibroblast growth factor" (bFGF) dalla matrice. L'uPA può, inoltre, attivare direttamente il precursore dell'"hepatocyte growth/scatter factor" (pro-HGF). Tali attività possono essere svolte dall'enzima mentre è associato alla superficie cellulare mediante la sua regione ammino-terminale legata al recettore uPAR. Tuttavia, l'uPA può agire anche in forma solubile nei fluidi extracellulari.

A



B

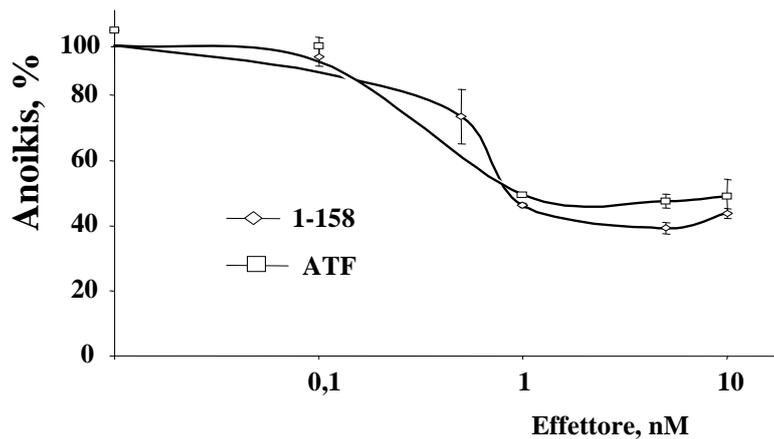


Figura 7. Protezione da anoikis da parte della regione amino-terminale dell'uPA. (A) Rappresentazione schematica della struttura della pro-urochinasi umana che mostra il dominio amino-terminale "growth factor-like" (GFD, residui 1-49), il dominio "kringle" (residui 50-131), la regione detta "connecting peptide" (CP, residui 135-158) e il dominio catalitico (residui 159-411). L'uPA umana "wild type" (His-uPA), le varianti uPA 1-158 (residui 1-158) e ATF (residui 1-135) sono state ottenute come prodotto secreto nel sistema di espressione del lievito *P. pastoris*. Il peptide GFDp corrisponde ai residui 12-32, compresi nel dominio "growth factor-like". (B) Cellule RPE sub-confluenti vengono tenute in assenza di siero per 24 ore e poi esposte ad uPA e relative varianti alle concentrazioni indicate per 8 ore; successivamente le cellule (1×10^5 /campione) vengono staccate mediante una blanda tripsinizzazione e poste in piastre da 24 pozzetti stratificate con polyHEMA (polyhydroxyethylmetacrylate) (non-adese) o non stratificate (adese). Dopo 8 ore le cellule adese e non-adese vengono raccolte e analizzate per il livello di apoptosi mediante saggio ELISA. Viene anche determinato il livello di apoptosi spontanea nei campioni di controllo.

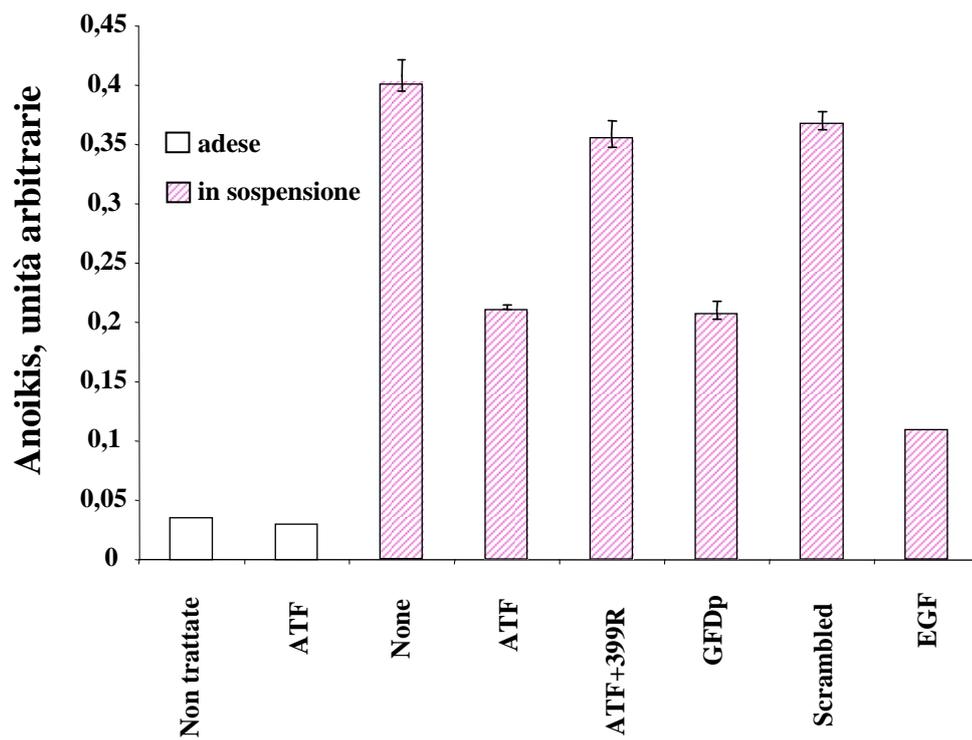


Figura 8. Coinvolgimento del recettore uPAR nell'effetto anti-anoikis dell'uPA. Cellule RPE vengono sottoposte a forzato distacco nelle condizioni già descritte nella legenda della figura 7. Quando indicato, le cellule vengono preincubate per 30 minuti con l'anticorpo policlonale anti-uPAR. Il livello di anoikis viene quantificato mediante saggio ELISA.

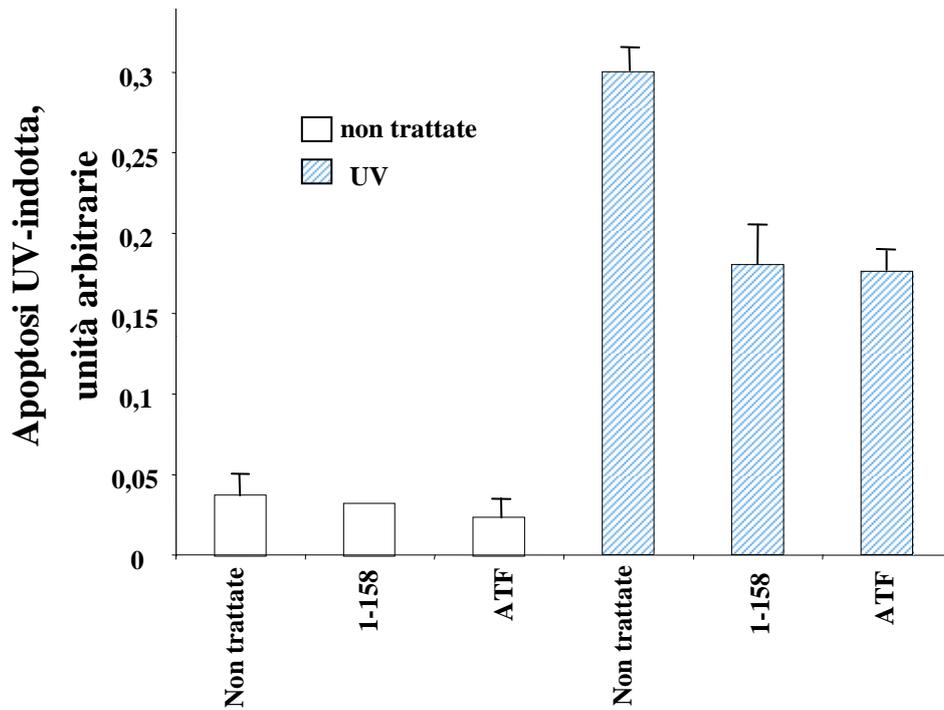


Fig. 9 Protezione dall' apoptosi UV-indotta da parte della regione amino-terminale dell'uPA. Cellule RPE (3×10^5) sono irradiate con luce UV, con un'energia pari a 100 mJ e tenute in coltura per 24 ore in assenza di siero. Le cellule, una volta staccate dalla piastra mediante tripsinizzazione, vengono lisate e analizzate per il livello di morte cellulare mediante ELISA.

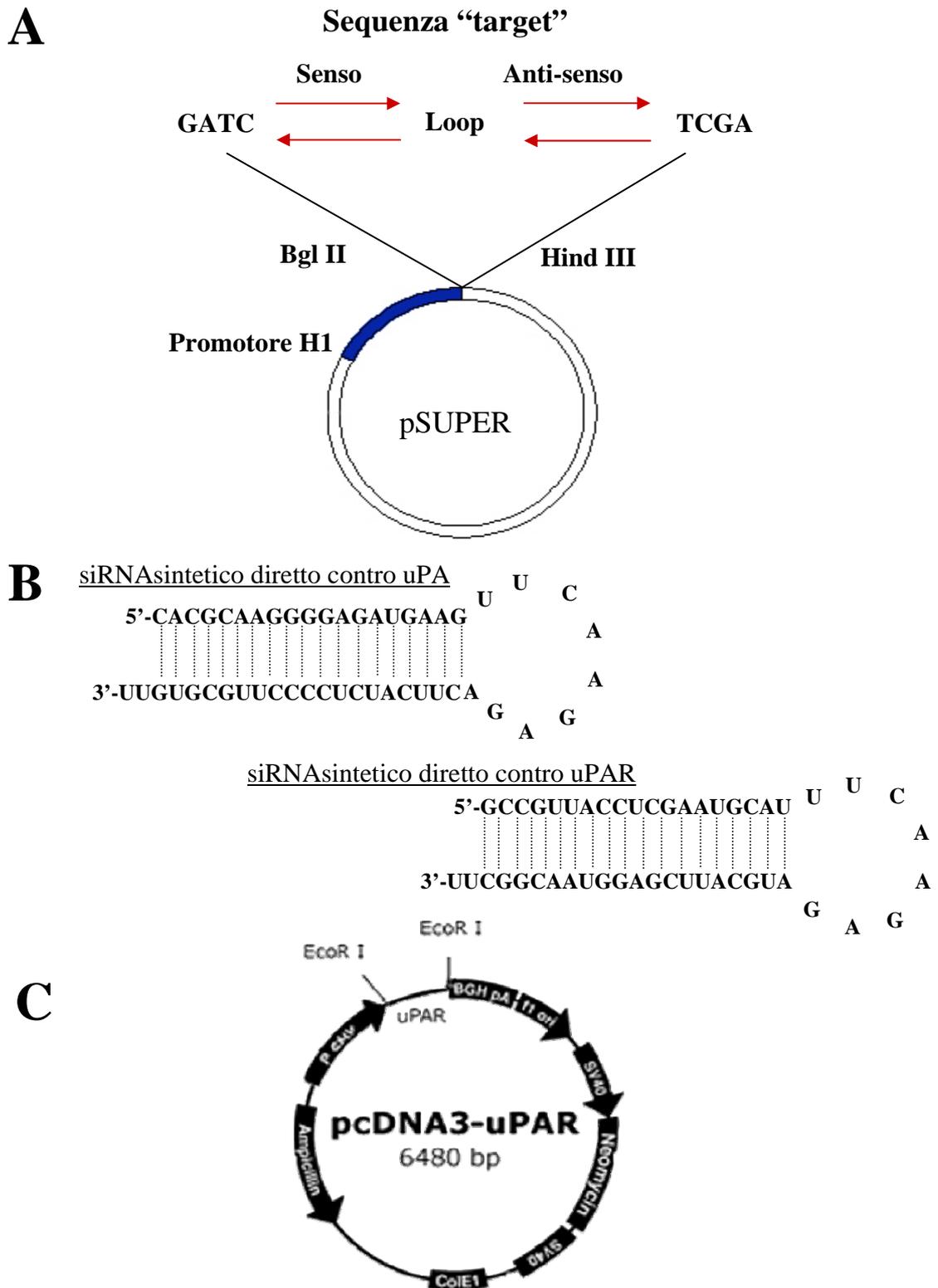


Fig. 10 Vettori utilizzati per il silenziamento dell'uPA e dell'uPAR o per l'iperespressione dell'uPAR. (A) Il vettore pSUPER utilizzato per il silenziamento dell'uPAR, è costruito inserendo a valle del promotore della RNA polimerasi III dell'istone H1 (basi 2235-2483), tra i siti unici Bgl II (al 5') e Hind III (al 3'), un oligo sintetico costituito da due sequenze di 19 bp ripetute ed invertite omologhe ad una regione dell' mRNA dell'uPA o dell'uPAR e separate tra loro mediante un "loop" di 9 bp, che non presenta nessuna omologia con le due sequenze. (B) I vettori, così ottenuti, dirigeranno la sintesi di due trascritti che si ripiegano su se stessi producendo gli siRNA mostrati in figura. Il siRNA indicato per l'uPA corrisponde a quello rivelatosi poi efficace nel silenziamento dell'uPA. (C) Tra le caratteristiche salienti del plasmide pcDNA3, tra i siti EcoRI del quale, è stato clonato il cDNA dell'uPAR, utilizzato per l'iperespressione dell'uPAR, vi sono: A) PCMV, promotore di Citomegalovirus (basi 209- 863); Neomycin, gene per la resistenza alla geneticina o G418 (basi 2151- 2945); Ampicillin, gene per la resistenza all'ampicillina.

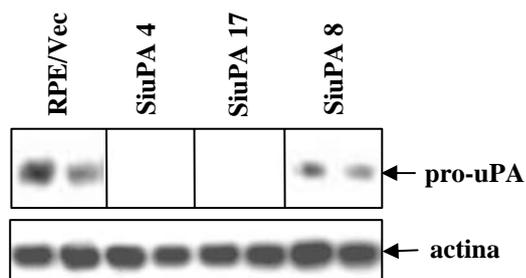
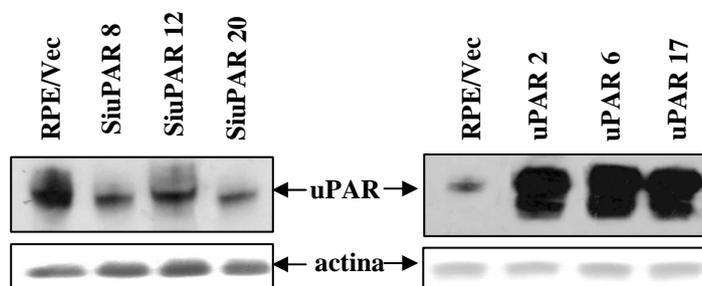


Fig. 11 Modulazione del sistema uPA/uPAR in cloni stabili di cellule RPE. La linea cellulare RPE è stata stabilmente trasfettata sia con il plasmide pSUPER/uPAR (per RNA “silencing”) sia con pcDNA3/uPAR (per l’iperespressione di uPAR). In tutti i casi la linea di controllo ha ricevuto esclusivamente il pcDNA3 (RPE/Vec). Sono stati isolati i singoli cloni (SiuPAR) e testati per il contenuto di uPAR mediante Western-blotting utilizzando un anticorpo monoclonale RII anti-uPAR (pannelli superiori). Per ciascun campione sono stati analizzati 20µg di estratto cellulare totale (come descritto nella sezione dei Materiali e Metodi) ed è stata visualizzata una banda specifica del peso di circa 45kDa. Quando le RPE sono state stabilmente trasfettate con il plasmide pSUPER/uPA (per RNA “silencing”), il livello di espressione dell’ uPA secreta è stato valutato mediante l’analisi di mezzi di coltura dei diversi singoli cloni (SiuPA) raccolti in un periodo di 18 ore (pannello inferiore). Uguali volumi di mezzo vengono concentrati mediante TCA-precipitazione e sottoposti a Western-blotting utilizzando un anticorpo policlonale anti-uPA. In tutti i casi la quantità di proteine separate per elettroforesi viene verificata con un anticorpo anti-actina.

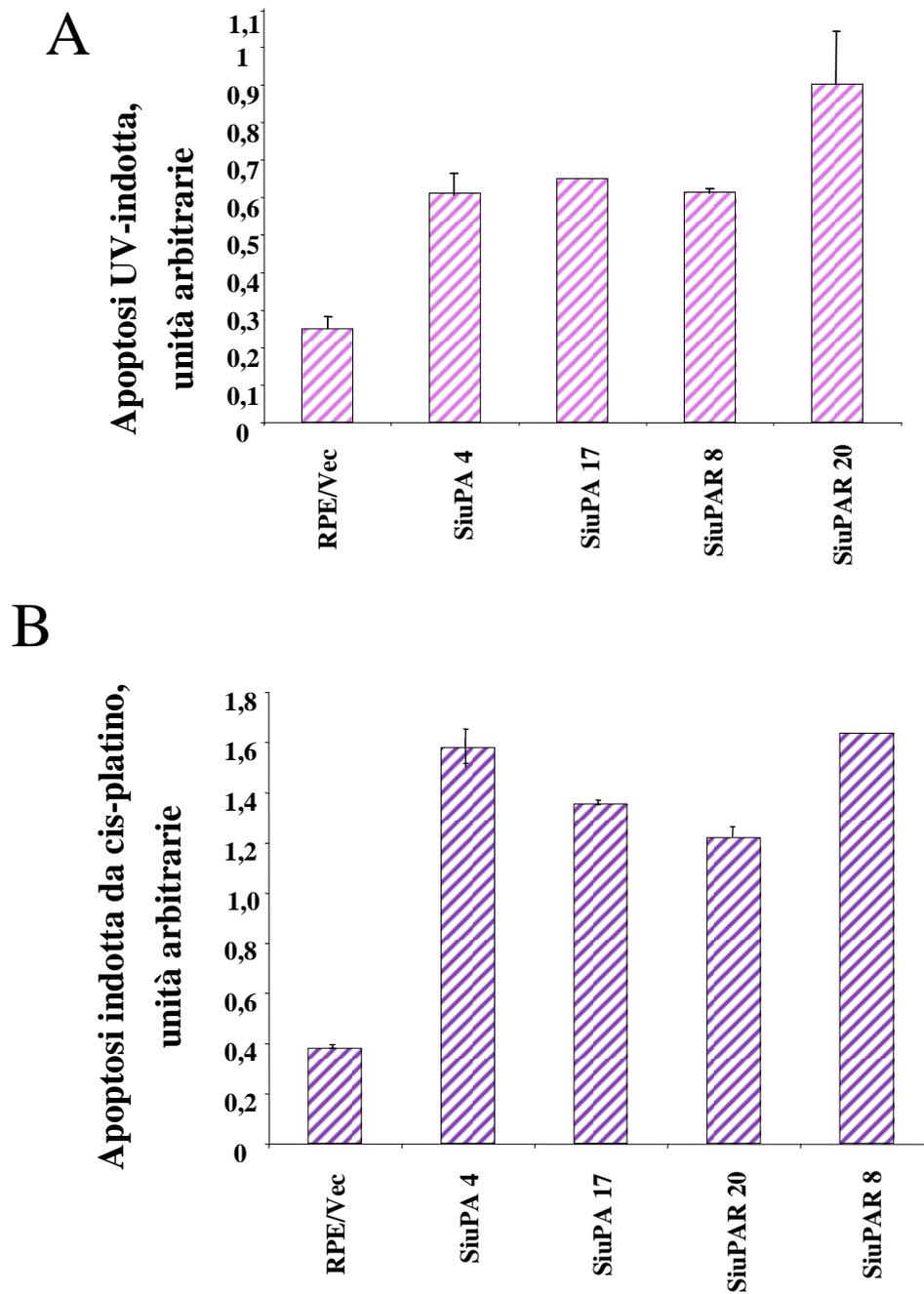


Fig. 12 Sensibilità all'apoptosi dei cloni con ridotta espressione di uPA e uPAR. (A) Cloni stabili SiuPA e SiuPAR o RPE/Vec sono stati esposti a luce UV come descritto in Fig.9. (B) Cloni SiuPAi e SiuPARi, cresciuti alla sub-confluenza in 10% siero in piastre da 24 pozzetti, sono stati tenuti in assenza di siero per 24 ore e incubati con 100 μ M cis-platino per ulteriori 24 ore. In entrambi i casi, le cellule raccolte (5X10⁴/campione) vengono lisate e analizzate per il livello di morte cellulare mediante saggio ELISA. I valori riportati sull'asse delle ordinate corrispondono a letture spettrofotometriche (O.D. 405 nm).

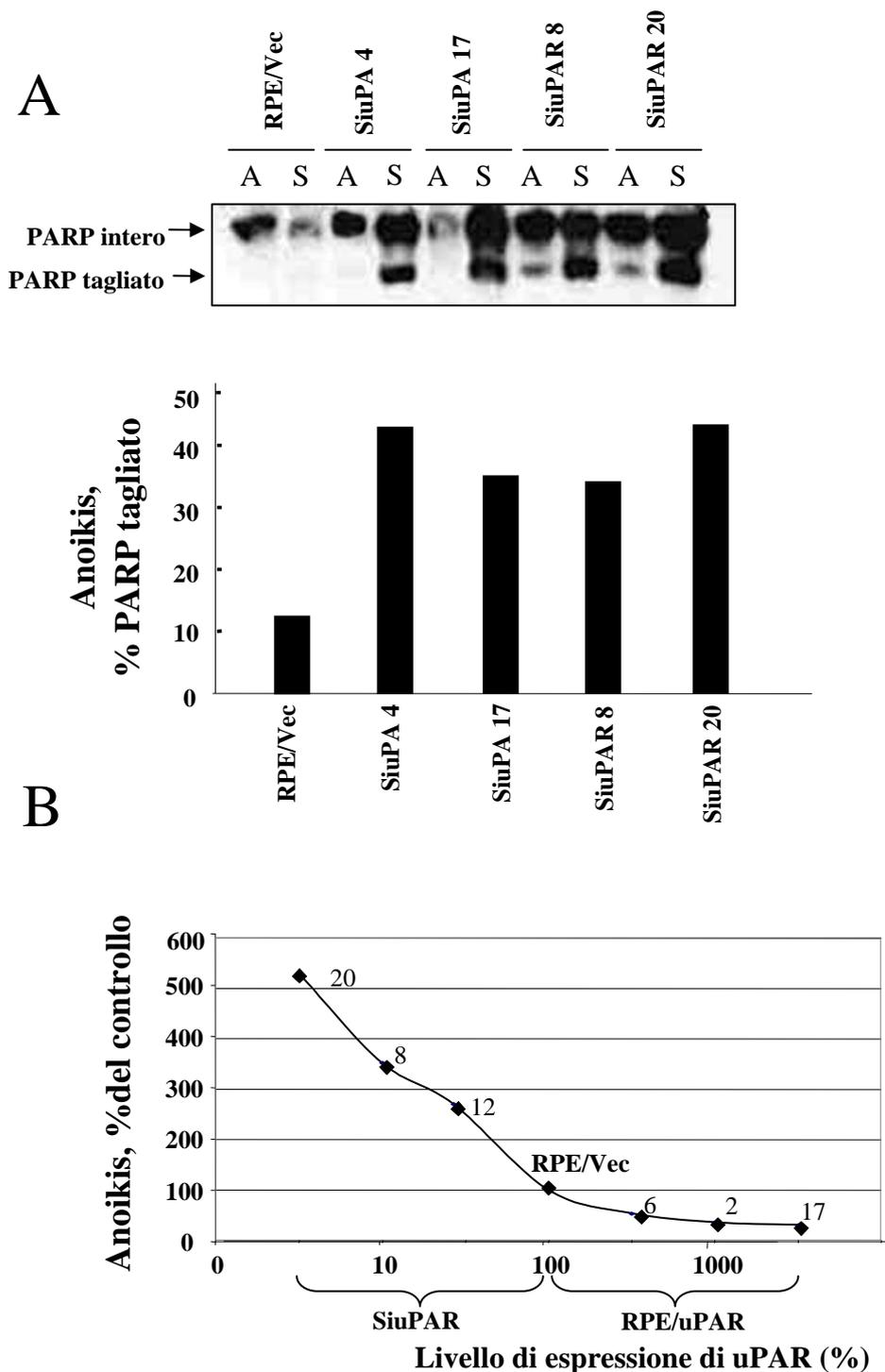


Fig. 13 Correlazione inversa tra la quantità di uPAR e la sensibilità all'anoikis. (A) Uguali quantità di proteine (50µg/campione), estratte da SiuPAR sottoposte a distacco forzato dal substrato (indicati come S=in sospensione) o di controllo (A=adese), sono analizzate mediante Western blotting utilizzando un anticorpo policlonale diretto contro la forma intera e tagliata di PARP, quale rivelatrice di apoptosi in atto. La percentuale di PARP tagliato sul totale viene riportata nell'istogramma in figura per ciascun clone esaminato. (B) Il livello di espressione di uPAR analizzato mediante Western blotting (come descritto nella legenda della Fig.11) è mostrato come percentuale del livello di uPAR delle cellule parentali (RPE/Vec) indicato come 100%. I numeri 20, 8, 12 si riferiscono ai cloni SiuPAR, mentre i numeri 2, 6, 17 ai cloni RPE/uPAR iperesprimenti uPAR. L'anoikis è stata quantizzata mediante saggio ELISA.

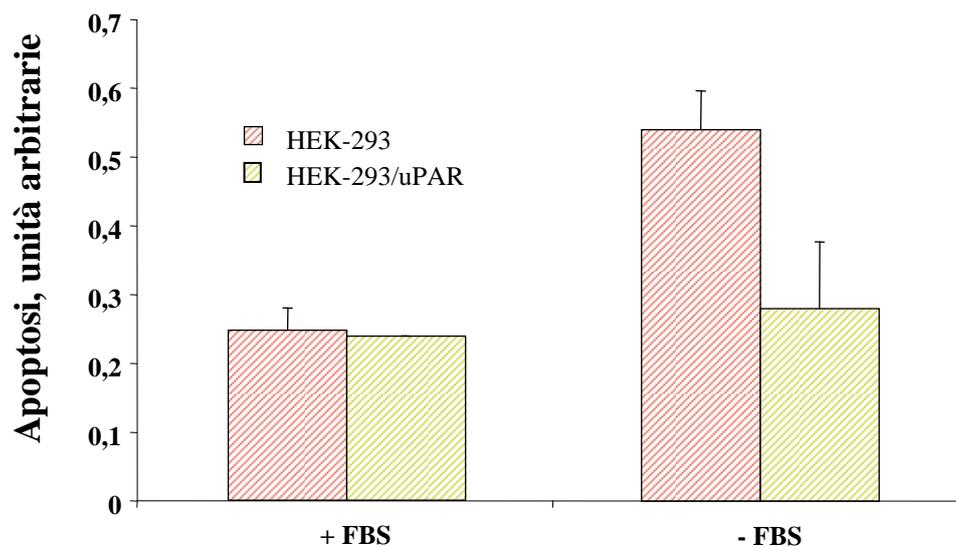


Fig. 14 L'espressione ectopica di uPAR determina protezione dall'apoptosi indotta da assenza di siero. Cellule HEK-293 e HEK-293 iperesprimenti uPAR vengono cresciute alla sub-confluenza in piastre da 24 pozzetti e poi tenute in assenza (-FBS) o in presenza di siero (+FBS) per 24 ore. Le cellule vengono staccate dalla piastra mediante una blanda tripsinizzazione, unite a quelle eventualmente già staccate e analizzate per il livello di morte cellulare mediante ELISA. Per ciascun campione sono state utilizzate 1×10^5 cellule. Le unità riportate corrispondono a letture spettrofotometriche (O.D.405nm).

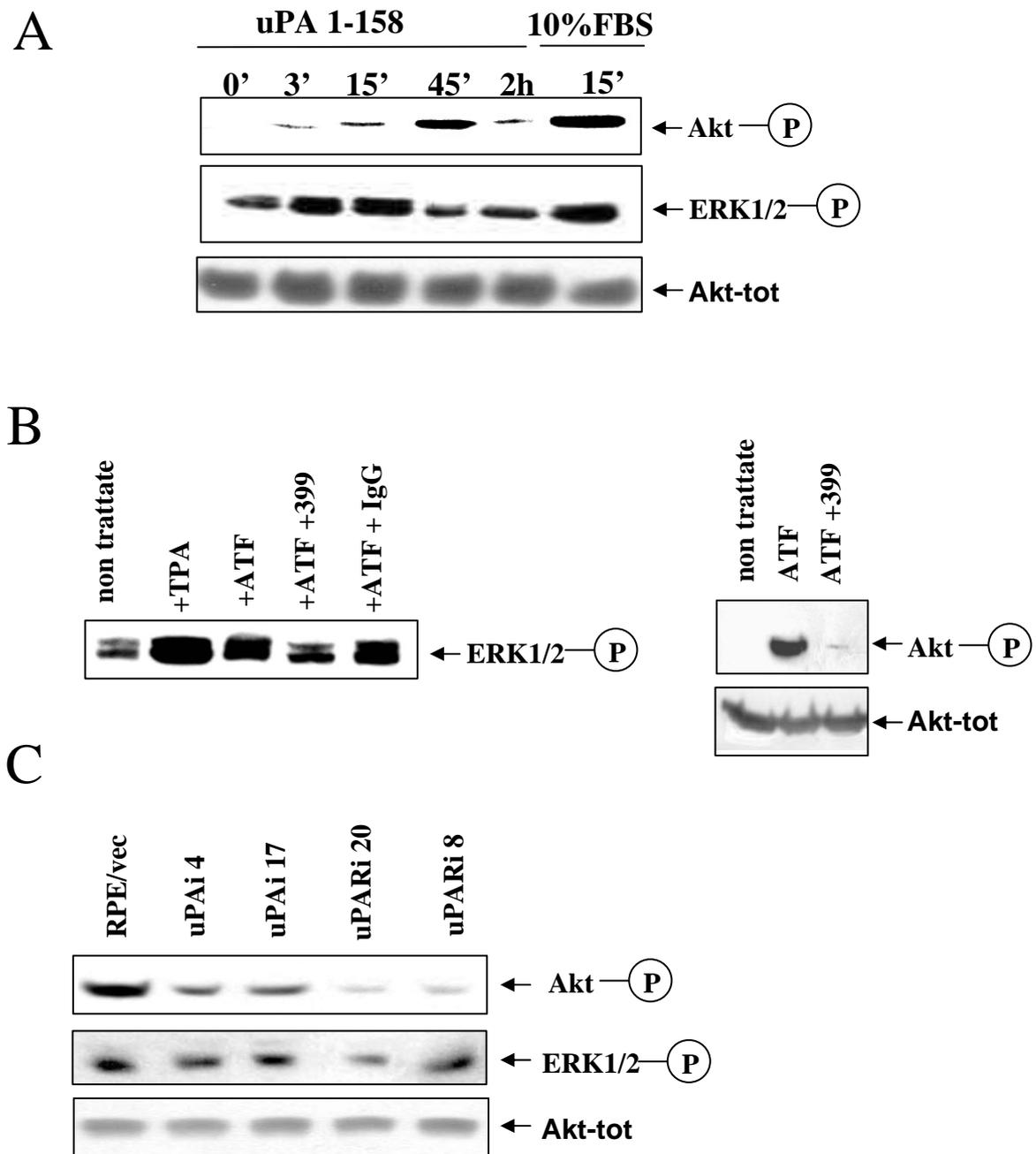
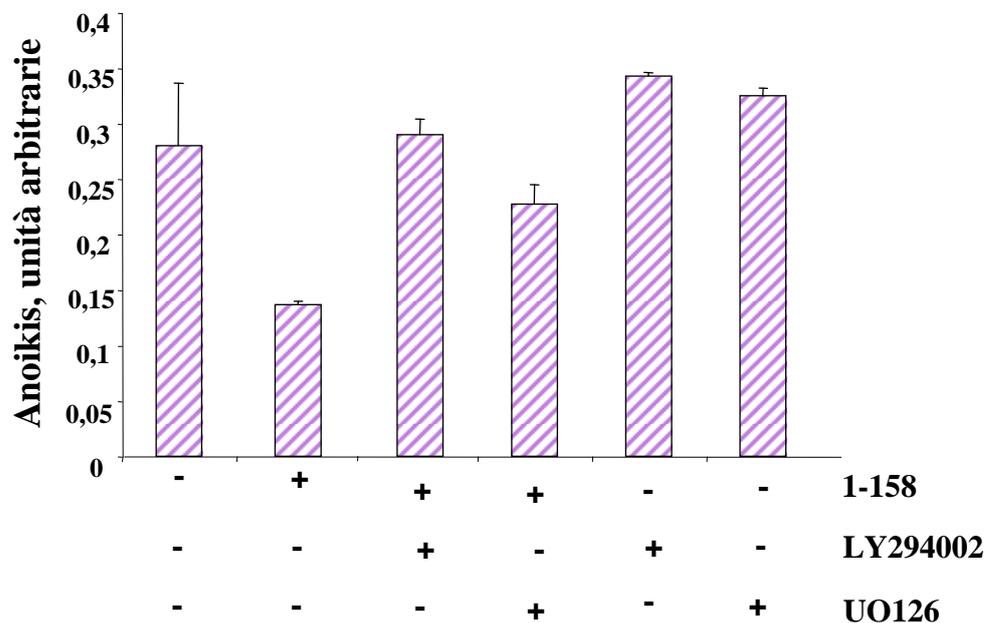


Fig. 15 Attivazione delle chinasi Akt ed ERK 1/2 uPA- e uPAR-dipendente. (A) Cellule RPE (1.5×10^5 /campione) cresciute alla subconfluenza in piastre da 6 pozzetti, sono state esposte a 10nM uPA 1-158 in condizioni di assenza di siero o a 10% FBS per i tempi indicati. Al termine dell'incubazione, viene misurato il livello di fosforilazione di Akt ed ERK1/2 mediante Western blotting utilizzando anticorpi anti-fosfo Akt o anti-fosfo ERK1/2. La quantità di estratto proteico separato su gel viene verificata con anticorpi anti-Akt (Akt-tot). (B) Cellule RPE sono esposte a 10nM ATF o 100ng/ml TPA in assenza o presenza dell' anticorpo policlonale anti-uPAR 399 o di IgG di controllo per 3 minuti (pannello sx) o 45 minuti (pannello dx). Le cellule raccolte vengono poi sottoposte a lisi ed analizzate per il loro contenuto di P-ERK1/2 (sx) o di P-Akt (dx). (C) I cloni cellulari indicati vengono cresciuti (1.5×10^5) in piastre da 6 pozzetti in assenza di siero per 16 ore. Il livello basale di P-Akt, P-ERK1/2 ed Akt totale è stato testato nei cloni SiuPA e SiuPAR e paragonato alle cellule parentali di controllo (RPE/Vec).

A



B

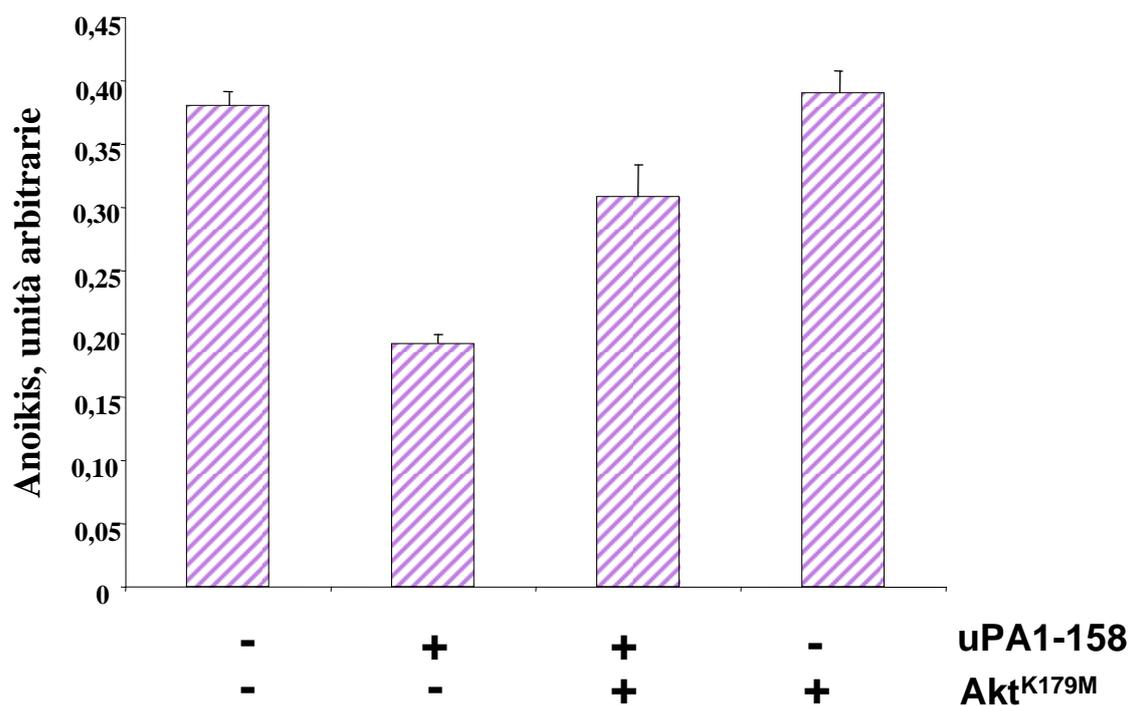


Fig. 16 Effetto degli inibitori LY294002 e UO126 sulla capacità dell'uPA di protezione dall'anoikis. (A) Cellule RPE cresciute in piastre da 24 pozzetti (1×10^5 /campione), sono pre-trattate con 20 μ M di LY294002 o con 50 μ M di UO126 per 1 ora in presenza o assenza di 10nM uPA1-158 e successivamente, come descritto in Fig.7B vengono piastrate su polyHEMA. (B) Cellule RPE sono trasfettate transientemente con un plasmide codificante AktK179M oppure con il vettore pUSE e, dopo 24 ore, sono incubate con 10nM uPA 1-158 per 1 ora; successivamente le cellule RPE vengono incubate in piastre stratificate con poly-HEMA. In entrambi i casi (A,B) il livello di anoikis viene analizzato con il kit ELISA dopo 8 ore di incubazione. I valori indicati corrispondono a letture spettrofotometriche (O.D.405nm).

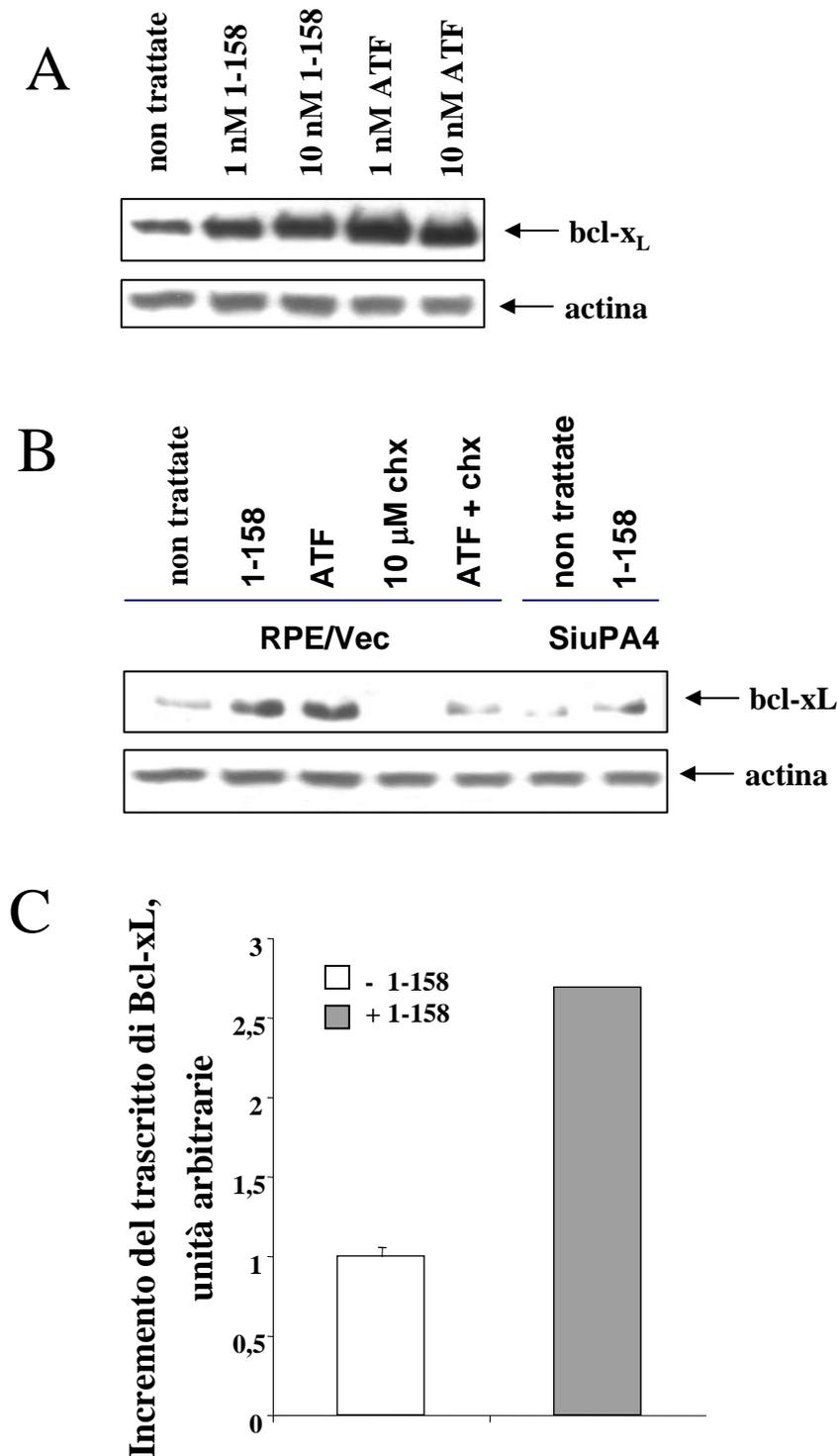


Fig. 17 Neosintesi del fattore anti-apoptotico Bcl-xL in risposta ad uPA. (A) Cellule di controllo RPE/Vec (1×10^5 /campione) vengono incubate per 5 ore in presenza di 10nM uPA 1-158 o ATF e poi analizzate per il livello di espressione di Bcl-xL mediante Western blotting con un anticorpo policlonale anti-Bclx. La banda risultante, del peso molecolare di 26kDa è specifica e corrisponde a Bcl-xL. (B) Cellule RPE/Vec e RPE/SiuPA vengono trattate come descritto in (A). Dove indicato, le cellule sono state trattate con 10 μM cicloesimide per 30min prima dell'esposizione ad uPA 1-158 per 1 ora. Per verificare che in ogni canale vi sia la medesima quantità di proteine, in entrambi i casi si è adoperato un anticorpo anti-actina. (C) 1μg cDNA ottenuto da RNA totale di cellule RPE, incubate in presenza o assenza di uPA 1-158 per 5 ore, viene analizzato mediante Taqman PCR, e le relative quantità di mRNA di Bcl-xL sono determinate dopo normalizzazione verso un controllo interno (mRNA della gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi). I risultati mostrati sono rappresentativi di tre esperimenti in triplicato con le barre che indicano le SD.

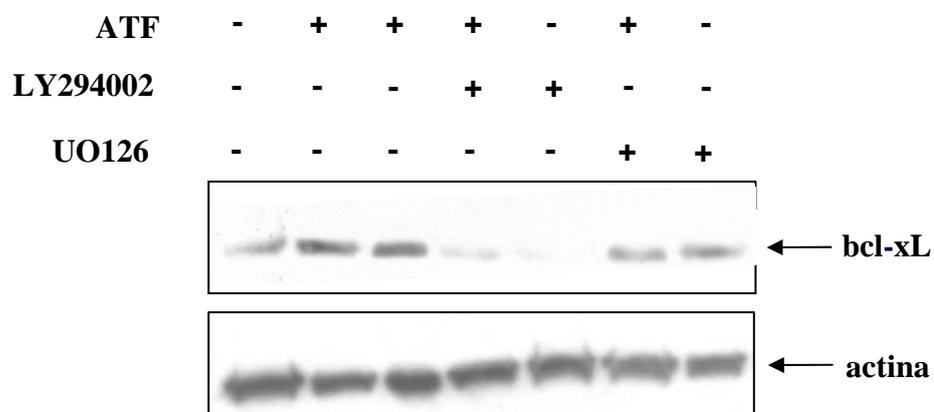


Fig. 18 L'uPA stimola l'espressione di Bcl-xL attraverso la via di trasduzione del segnale PI3K/Akt-dipendente. Cellule RPE cresciute in piastre da 6 pozzetti (2×10^5 /campione), pre-trattate e non con 20 μ M LY294002 o 50 μ M UO126 per 30 minuti, vengono successivamente esposte a 10nM ATF per 5 ore come specificato in figura. Eguali quantità di estratto preparate come descritto in Fig.17, vengono poi analizzate per il livello di Bcl-xL mediante Western blotting. La quantità di proteine separate per elettroforesi per singolo campione viene verificata con un anticorpo anti-actina.