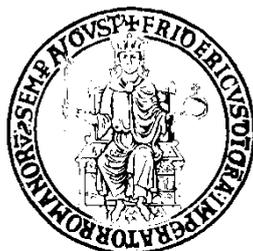


**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI**

**“FEDERICO II”**



**DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZA DEL FARMACO**

**XXII CICLO**

**PROGETTAZIONE, SINTESI E STUDI**

**CONFORMAZIONALI DI PEPTIDI ATTIVI SUL**

**SISTEMA UROCHINASI**

**Dott. <sup>ssa</sup> Cristina Marcozzi**

**TUTOR:**

**Prof. P. Grieco**

**COORDINATORE:**

**Prof. <sup>ssa</sup> M. V. D'Auria**

## INDICE

### CAPITOLO I

<i>1.1 Introduzione</i>	<i>pag. 6</i>
<i>1.2 Adesione Cellulare</i>	<i>pag. 7</i>
<i>1.2.1 Molecole di adesione</i>	<i>pag. 9</i>
<i>1.3 Migrazione cellulare</i>	<i>pag. 10</i>
<i>1.3.1 Rottura dei punti di adesione</i>	<i>pag. 15</i>
<i>1.4 Integrine</i>	<i>pag. 16</i>
<i>1.4.1 Il ruolo delle integrine nella progressione tumorale</i>	<i>pag. 25</i>
<i>1.5 Il ruolo delle proteasi nell'invasione tumorale e nelle metastasi</i>	<i>pag. 27</i>

### CAPITOLO II

<i>Impostazione della ricerca</i>	<i>pag.31</i>
<i>2.1 Sistema di attivazione del plasminogeno.</i>	<i>pag. 32</i>
<i>2.2 Il recettore per l'urochinasi umana (uPAR)</i>	<i>pag. 33</i>
<i>2.3 L'attivatore del plasminogeno di tipo urinario: urochinasi</i>	<i>pag. 37</i>

### CAPITOLO III

<i>Metodiche di sintesi</i>	<i>pag. 46</i>
<i>3.1 Sintesi peptidica in fase solida</i>	<i>pag. 47</i>
<i>3.2 Purificazione dei peptidi</i>	<i>pag. 51</i>
<i>3.3 Caratterizzazione dei peptidi</i>	<i>pag. 51</i>

## CAPITOLO IV

<i>Parte farmacologica</i>	<i>pag. 55</i>
<i>4.1 Saggi di migrazione per chemiotassi</i>	<i>pag. 56</i>
<i>4.2 Colture cellulari utilizzate</i>	<i>pag. 57</i>
<i>4.3 Esecuzione del saggio di chemiotassi</i>	<i>pag. 58</i>
<i>4.4 Risultati dei saggi di chemiotassi</i>	<i>pag. 59</i>
<i>4.4.1 Effetti di Ac-KA6-NH<sub>2</sub> e Ac-144-158-CPp sulla migrazione basale e sulla migrazione CPp-dipendente</i>	<i>pag. 61</i>
<i>4.4.2 Effetti di Ac-KA6-NH<sub>2</sub> sulla migrazione cellulare dipendente da Ac-144-158-CPp e da CPp</i>	<i>pag. 63</i>
<i>4.4.3 Il peptide Ac-KA6-NH<sub>2</sub> inibisce la migrazione verso altri chemioattrattanti non correlati al sistema urochinasi</i>	<i>pag. 66</i>
<i>4.4.4 Migrazione CPp-dipendente, effetti della sostituzione al sito 138 con Glu</i>	<i>pag. 68</i>
<i>4.5 Esecuzione dei saggi di binding</i>	<i>pag. 72</i>
<i>4.5.1 Binding di Ac-KA6-NH<sub>2</sub>, Ac-144-158-CPp e CPpE138 alla superficie cellulare</i>	<i>pag. 72</i>

## CAPITOLO V

<i>Studi strutturali</i>	<i>pag. 76</i>
<i>5.1 Analisi conformazionale di molecole di interesse biologico mediante dicroismo circolare</i>	<i>pag. 77</i>
<i>5.2 Analisi conformazionale mediante dicroismo circolare dei peptidi sintetizzati</i>	<i>pag. 79</i>
<i>5.3 Analisi conformazionale di molecole di interesse biologico</i>	

---

<i>mediante NMR</i>	.	.	.	.	.	.	.	<i>pag. 84</i>
<i>5.4 Risultati NMR</i>	.	.	.	.	.	.	.	<i>pag. 87</i>
<u><i>CAPITOLO VI</i></u>								
<i>Conclusioni</i>	.	.	.	.	.	.	.	<i>pag. 103</i>
<i>Abbreviazioni</i>	.	.	.	.	.	.	.	<i>pag. 109</i>
<i>BIBLIOGRAFIA</i>	.	.	.	.	.	.	.	<i>pag. 111</i>

**CAPITOLO I**

## *1.1 Introduzione*

La capacità adesiva di una cellula è una caratteristica fondamentale non solo per l'interazione cellula-cellula, ma anche per l'interazione cellula-ambiente extracellulare. In particolare l'adesione alla matrice extracellulare (ECM) è fondamentale per la regolazione della morfologia e dell'omeostasi dei tessuti, nonché in alcune condizioni che richiedono un'adesione dinamica al substrato. La migrazione cellulare, ad esempio, richiede una modulazione altamente coordinata dei contatti fra le cellule ed i tessuti circostanti.

Adesione e migrazione cellulare caratterizzano una grande varietà di eventi fisiologici e patologici come lo sviluppo embrionale, la guarigione dalle ferite ma anche la formazione di metastasi durante la progressione tumorale.

L'Urochinasasi (uPA) e il suo recettore uPAR sono due proteine coinvolte nei processi di adesione e migrazione cellulare e la loro sovraespressione è notoriamente associata alla migrazione ed alla proliferazione, nonché all'aumento della capacità metastatica delle cellule tumorali.

L'uPAR non agisce isolatamente: tutte le sue funzioni biologiche sono dipendenti dall'interazione con un complesso di altre proteine della matrice extracellulare.

Recenti studi riportano come uno dei fattori essenziali affinché uPAR promuova l'adesione e la migrazione cellulare è l'interazione con la proteina dell' ECM vitronectina. Quest'ultima è una delle principali proteine che promuovono l'adesione cellulare.

Appare quindi evidente come sia importante identificare le interazioni che il complesso uPA/uPAR sviluppa con le proteine dell'ECM ed i relativi meccanismi molecolari che regolano la trasduzione del segnale e la migrazione cellulare. [Madsen et al., 2008; Sidenius et al., 2002].

Ricollocare il sistema uPA/uPAR all'interno di un determinato processo biologico significa anche identificare la localizzazione di queste proteine e come queste interazioni siano regolate nel tempo ed a seconda delle trasformazioni a cui la cellula va incontro.

## *1.2 Adesione cellulare*

L'adesione cellulare costituisce un sofisticato sistema di comunicazione alternativo a quello mediato dal rilascio di messaggeri solubili quali: ormoni, neurotrasmettitori, citochine. Si tratta di un meccanismo altamente complesso ed allo stesso tempo molto versatile, tanto da essere coinvolto in una varietà di processi che regolano l'omeostasi tissutale mediante interazioni con l'ECM. L'adesione cellulare viene realizzata attraverso l'interazione di coppie di recettori espressi reciprocamente dalle cellule che prendono parte al processo (figura 1). Un ruolo rilevante nel garantire e modulare questa sorta di "dialogo" è svolto dalle cosiddette molecole di adesione [Ingber et al., 1991].

Si tratta prevalentemente di glicoproteine di membrana con una porzione extracellulare che interagisce con il microambiente circostante, ed una regione intracitoplasmatica, che modula l'assemblaggio e l'organizzazione funzionale del citoscheletro [Damsky et al., 1992]. Queste molecole, oltre ad essere coinvolte nei processi di adesione cellulare,

svolgono una funzione cruciale nel trasdurre e modulare una serie di segnali chimici, meccanici e metabolici, diretti in modo bidirezionale dallo spazio intracellulare verso l'interstizio e viceversa (“*inside-out*”, “*outside-in*” signalling) [Ginsberg et al., 1992; Schlaepfer et al., 1994].

Il fenomeno di adesione cellula-cellula e cellula-ECM è cruciale in diversi processi biologici come la differenziazione e la proliferazione cellulari, le risposte infiammatorie o più in generale immunitarie, l'apoptosi nonché nella trasformazione neoplastica e nella formazione di metastasi [Burrige et al., 1996].

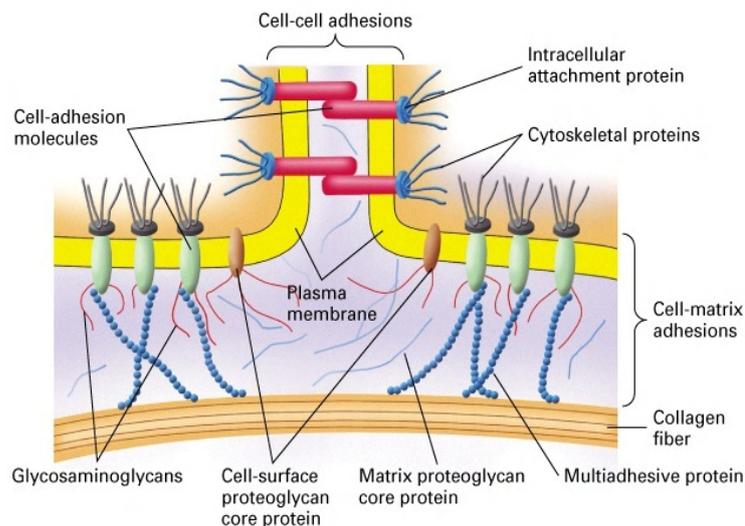


Figura 1 Adesione cellula-cellula e cellula-matrice extracellulare.

### 1.2.1 Molecole di adesione

Le matrici extracellulari di un organismo animale sono composte da differenti combinazioni di proteine fibrose, quali diversi tipi di collagene, acido ialuronico, glicoproteine e proteoglicani (figura 2).

Queste macromolecole sono secrete dalle cellule immerse nella matrice. Le quantità relative dei diversi tipi di macromolecole e la loro organizzazione variano enormemente da tessuto a tessuto, facendo assumere alla matrice caratteristiche fisico-chimiche adatte alla funzione che ognuno di essi deve svolgere.

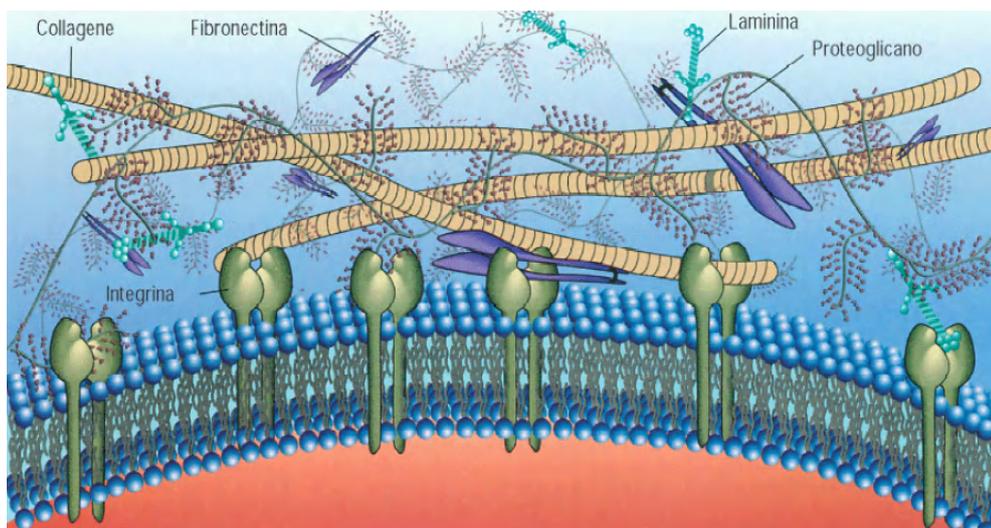


Figura 2 Modello di matrice extracellulare.

Tra le varie molecole coinvolte nei processi di adesione cellulare rivestono particolare importanza:

- fibronectina: e' una delle molecole responsabili del collegamento tra la matrice e la

superficie cellulare. E' una glicoproteina dimerica che possiede siti di attacco sia per il collagene che per i glicosamminoglicani (GAG). Ha un'estremità che presenta un'alta affinità per una famiglia di proteine intrinseche di membrana: i recettori per la fibronectina. E' presente ad alte concentrazioni sulla superficie delle cellule connettivali;

- laminina: è presente in particolare nelle lamine basali dove è assemblata sotto forma di reticoli e lega le integrine (cfr. tabella 1);
- tenascina: è un complesso di sei catene polipeptidiche unite da ponti disolfuro che si proiettano a raggiera da un punto centrale; contiene più siti di legame per le integrine;
- vitronectina: è una glicoproteina adesiva multifunzionale presente sia in circolo che in differenti tessuti. Interviene nella regolazione dell'adesione cellulare, della difesa immunitaria e nell' invasione cellulare. Strutturalmente è caratterizzata da un elevato contenuto in struttura  $\beta$  e presenta molti siti di legami per le integrine, collagene, componenti di complemento, perforina, plasminogeno, recettore per l'urochinasasi (uPAR).

### *1.3 Migrazione cellulare*

La migrazione cellulare è un processo articolato e strettamente correlato all'adesione cellulare. Richiede, infatti, la coordinazione continua tra fasi alterne di formazione di punti di adesione al substrato e di distacco da questo.

Come altre risposte biologiche, la migrazione viene regolata dal bilancio tra meccanismi agonisti ed antagonisti, sostenuti sia da specifiche molecole solubili che da *pathways* intracellulari diversi.

La migrazione è essenziale per una gran varietà di fenomeni biologici come: la morfogenesi embrionale; la riparazione e la rigenerazione tissutali; la risposta immunitaria ed infiammatoria. E' inoltre coinvolta in patologie come: l'aterosclerosi; l'osteoporosi; malattie infiammatorie croniche come l'artrite reumatoide e nella progressione tumorale.

Le molecole che intervengono nell'adesione sono generalmente coinvolte anche nel movimento cellulare, in quanto l'assemblaggio ed il "disassemblaggio" dinamico delle adesioni focali sono parte integrante del meccanismo di migrazione cellulare.

La formazione di contatti adesivi delle cellule con la matrice, durante l'adesione e la migrazione cellulare, è associata alla formazione di actina filamentosa, quest'ultima regolata da un sistema complesso. Tra i recettori di adesione ed il citoscheletro vi sono specifiche proteine di connessione (vinculina, paxillina, talina etc.) nonché protein-chinasi (FAK, Src etc.) che assicurano la trasduzione del segnale associata ad adesione e migrazione [Lauffenburger et al., 1996].

La migrazione cellulare può essere assimilata ad un processo ciclico che ha inizio, in presenza di un fattore stimolante, con l'acquisizione da parte della cellula di una morfologia polarizzata. L'aumento della polimerizzazione dell'actina globulare (actina G) in actina filamentosa (actina F) produce una netta distinzione tra la parte anteriore e quella posteriore della cellula. In questa fase si verifica anche la formazione di protrusioni di filamenti di actina nella direzione di migrazione. Si tratta in genere di strutture laminari e robuste, note come lamellipodi, oppure di strutture filiformi ed

appuntite, note come filipodi.

Tali protrusioni sono stabilizzate dall'adesione all'ECM o con cellule adiacenti mediante recettori transmembranari legati al citoscheletro. I punti di adesione funzionano come siti di trazione che consentono alla cellula di spostarsi ed in seguito vengono "disassemblati" nella parte posteriore della cellula, favorendone così il distacco e quindi l'ulteriore spostamento.

Durante la formazione dei complessi focali, vengono assemblati alcuni *clusters* proteici già preformati all'interno del citoplasma. Altre proteine subentrano progressivamente in seguito ad eventi di regolazione: questo è il caso della paxillina che è sovrabbondante nelle adesioni nascenti, mentre l'actinina risulta maggiormente espressa in punti di adesione più vecchi [Webb et al., 2002].

Nonostante le fasi del processo migratorio siano comuni a diversi tipi di cellule, possono esserci alcune differenze anche a seconda della tipologia di tessuto: cellule come i leucociti, migrano in maniera molto rapida e mostrano alcuni piccoli raggruppamenti di integrine e molteplici piccoli complessi focali sul fronte di migrazione. La formazione di queste adesioni stabilizza i lamellipodi mediandone l'attacco all'ECM e di conseguenza contribuisce ad una migrazione efficiente. Cellule che presentano *clusters* di integrine di dimensioni maggiori risultano strettamente adese e generalmente non migrano oppure si muovono molto lentamente.

La velocità di migrazione è funzione della forza di adesione esercitata dalle cellule, queste ultime infatti devono essere in grado di formare nuove strutture di adesione nella

parte anteriore e, contemporaneamente, di indebolire tali strutture nella parte posteriore. Studi condotti su cellule che esprimono quantità crescenti di molecole adesive di tipo integrinico mostrano un aumento della velocità di migrazione, fino al raggiungimento di un valore critico oltre il quale questa velocità diminuisce probabilmente a causa della ridotta capacità della cellula di staccarsi dal substrato.

Tali esperimenti confermano modelli matematici che suggeriscono come la massima velocità di migrazione sia raggiunta a livelli intermedi di forza adesiva [Holly et al., 2000].

La forza di adesione è determinata da diversi parametri come: la densità di ligandi di adesione; la densità di recettori espressi sulle cellule e l'affinità degli stessi ligandi per i rispettivi recettori [Lauffenburger et al., 1996].

La variazione di ognuno di questi singoli parametri si ripercuote notevolmente sull'efficienza di spostamento.

La forza trasmessa ai siti di adesione deriva dall'interazione della miosina II con filamenti di actina (figura 3).

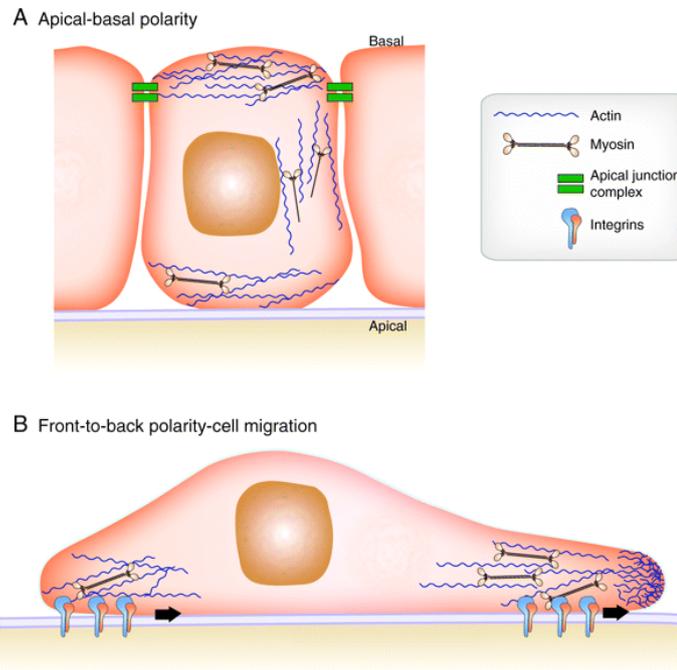


Figura 3 La polarizzazione cellulare produce un riarrangiamento del citoscheletro di actina e miosina.

Come mostrato in figura (A) la miosina è concentrata nella parte apicale della cellula dove può partecipare all'assemblamento ed alla rottura delle giunzioni apicali (rettangoli verdi). Nella fase di migrazione (B) si stabilizza la polarizzazione anteriore e posteriore della cellula. L'estensione di lemellipodi sul fronte di migrazione avviene in seguito all'aggiunta di monomeri di actina sulle diramazioni della rete.

L'attività della miosina II è modulata dalla fosforilazione della catena leggera della miosina (MLC) ad opera della dalla MLC-chinasi (MLCK).

La MLCK, a sua volta, è regolata dalla concentrazione intracellulare di calcio [Riento et al., 2003]. La fosforilazione di MLC attiva la miosina producendo un incremento di contrattilità e quindi la produzione di tensione ai siti di adesione. Nelle cellule in fase di

migrazione, le forze maggiori vengono esercitate verso i complessi focali sul fronte di migrazione ed alla regione posteriore che deve ritrarsi [Balaban et al., 2001].

### *1.3.1 Rottura dei punti di adesione*

La rottura dei punti di adesione si verifica sia sul fronte di migrazione, dove è seguita dalla formazione di nuove protrusioni, sia sul retro della cellula dove produce una ritrazione. Sul lato anteriore della cellula, l'adesione viene rotta alla base di una protrusione, solo quando si è formato un nuovo punto di adesione sul fronte di migrazione. Alcune adesioni permangono e si trasformano in strutture più stabili e di dimensioni maggiori. Ancora poco è noto a tale proposito, ma sia le chinasi che le fosfatasi sembrano essere coinvolte nella regolazione, nella stabilità e nel turnover dell'adesione [Larsen et al., 2003].

Cellule che non esprimono tirosina chinasi (FAK) o Src mostrano adesioni di dimensioni maggiori e migrano scarsamente [Alahari et al., 2002]. Dagli studi emergono evidenze a favore di un meccanismo in cui l'attivazione delle chinasi FAK e Src accompagna la formazione di un *signalling* complesso di adesione che a sua volta media l'attivazione localizzata di Rac ed ERK. Questi segnali contribuiscono alla rottura dei punti di adesione sul fronte di migrazione [Turner et al., 2001; Brahmbhatt et al., 2003].

Anche sul fronte posteriore della cellula le adesioni devono essere disassemblate. L'alta tensione esercitata sul lato posteriore della cellula sembra favorire il distacco in quanto

potrebbe essere sufficiente per rompere fisicamente il legame tra l'integrina ed il citoscheletro di actina. Il risultato è che l'integrina resta indietro rispetto alla cellula che si muove oltre.

Diversi studi evidenziano il coinvolgimento della miosina II in questa fase. La regolazione dell'espressione di miosina II e della sua organizzazione è fondamentale ai fini di una migrazione efficiente in quanto il rilascio dell'adesione sul retro della cellula è in qualche modo correlato ad una aumentata produzione di protrusioni sul fronte anteriore [Worthylake et al., 2003].

FAK, Src e altri agenti regolatori come la concentrazione intracellulare di calcio, implicati nel rilascio delle adesioni sul fronte, agiscono allo stesso modo anche che sul retro della cellula. La tensione generata nelle cellule durante lo spostamento, a causa del legame posteriore, può essere sufficiente ad aprire i canali del calcio sensibili allo stimolo meccanico dello stiramento [Lee et al., 1999].

Target potenziali per il calcio sono le fosfatasi come la calcineurina e proteasi come la calpaina, coinvolte nel *cleavage* di proteine che prendono parte alle adesioni focali: integrine, talina, vinculina e FAK. [Hendey et al., 1992; Glading et al., 2002].

#### *1.4 Integrine*

Le interazioni cellula-cellula e cellula-ambiente extracellulare sono processi selettivi mediati da proteine transmembrana classificate sulla base di criteri strutturali e funzionali in quattro gruppi principali: caderine, selectine, membri della superfamiglia delle immunoglobuline ed integrine [Burrige et al., 1996] (figura 4).

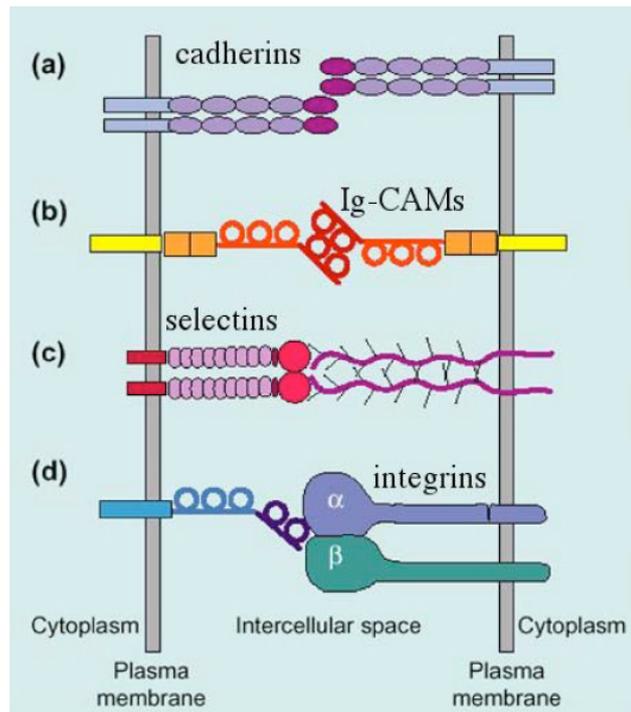


Figura 4 Alcune molecole coinvolte nell'adesione cellulare.

Nonostante siano molti i recettori coinvolti nei processi finora descritti, le integrine rappresentano i principali promotori della migrazione. Queste ultime funzionano da “sostegno” della cellula che migra poiché ne consentono l’adesione all’ECM o ad altre cellule e trasducono il segnale all’interno mediante legami con i filamenti di actina [Geiger et al., 2001].

Le integrine, pertanto, funzionano sia come siti di trazione verso cui le cellule si spostano, sia come sensori meccanici che trasmettono informazioni verso l’interno della cellula in modo da modulare la dinamica del citoscheletro [Lauffenburger et al., 1996; Beningo et al., 2001; Galbraith et al., 2002].

Dal punto di vista strutturale le integrine sono degli eterodimeri transmembrana costituiti da due subunità glicoproteiche  $\alpha$  e  $\beta$  unite tra loro [Arnaout et al., 2005]. Le subunità  $\alpha$  variano in dimensioni da 120 a 180 Kd e ciascuna è legata in maniera non covalente con una subunità  $\beta$  le cui dimensioni sono comprese tra i 90 ed i 110 Kd. Entrambe le catene sono caratterizzate da un importante dominio extracellulare, una zona idrofobica transmembranaria e da una corta coda citoplasmatica. I domini N-terminali delle due subunità si associano a formare la testa che contiene il sito di legame al substrato, attraverso la sequenza RGD, mentre i segmenti C-terminali attraversano la membrana citoplasmatica e mediano l'interazione con il citoscheletro e con le proteine segnale.

Le integrine possono essere isolate oppure organizzate in strutture note come emidesmosomi che rientrano nella classe delle giunzioni di membrana.

La maggior parte delle integrine è espressa su una grande varietà di cellule e ciascuna cellula può esprimere contemporaneamente diversi tipi di integrine. Ad oggi sono state identificate 18 subunità  $\alpha$  e 8 subunità  $\beta$ , pertanto teoricamente la loro associazione potrebbe dare origine a più di 100 eterodimeri di integrine. In realtà, sono state individuate solo 24 combinazioni diverse tra le subunità  $\alpha$  e  $\beta$ .

Molte subunità  $\alpha$  possono associarsi con un solo tipo di subunità  $\beta$ . Ad esempio, nei leucociti sono espresse sia la subunità  $\beta_1$  che la  $\beta_2$ , ma ciascuna subunità  $\alpha$  si associa solo con una delle due. Pertanto, si possono distinguere delle sub-famiglie, caratterizzate dalla presenza della medesima subunità  $\beta$ . Tuttavia esistono diverse subunità  $\alpha$  ( $\alpha_4$ ,  $\alpha_6$ ,  $\alpha_v$  etc.) che possono associarsi con più di una subunità  $\beta$ , in

particolare  $\alpha_v$ .

Considerevoli progressi sono stati fatti nella definizione dei siti dei ligandi riconosciuti dalle integrine. La specificità di ciascun ligando è data dalla composizione in subunità delle differenti integrine, in particolare sembra dipendere dal dominio extracellulare della subunità  $\alpha$  (tabella 1).

Subunità		Ligandi e Controrecettori	Sito di Attacco
$\beta_1$	$\alpha_1$	collageni, laminina	DGEA
	$\alpha_2$	collageni, laminina	RGD+
	$\alpha_3$	fibronectina, laminina, collageni	EILDV <sup>k</sup>
	$\alpha_4$	fibronectina (V25), VCAM-1	RGD
	$\alpha_6$	laminina	
	$\alpha_7$	laminina	
	$\alpha_8$	?	
	$\alpha_v$	vitronectina, fibronectina	RGD
$\beta_2$	$\alpha_1$	ICAM-1, ICAM-2	
	$\alpha_M$	componente C3b del complemento (inattivo), fibrinogeno, fattore X, ICAM-1	GPRP
	$\alpha_4$	Fibrinogeno, componente C3b del complemento (inattivo)	
$\beta_3$	$\alpha_{Hb}$	fibrinogeno, fibronectina, vitronectina, trombospondina	RGD, KQAGDV
	$\alpha_v$	vitronectina, fibrinogeno, trombospondina, fibronectina, osteopondina, collagene	RGD
$\beta_4$	$\alpha_6$	laminina	
$\beta_5$	$\alpha_v$	vitronectina	RGD
$\beta_6$	$\alpha_v$	fibronectina	
$\beta_7$	$\alpha_4$	fibronectina (V25), VCAM-1	
	$\alpha_{DEL}$	?	EILDV
$\beta_8$	$\alpha_v$	?	

Tabella 1 Classificazione di ligandi e recettori relativi alle integrine.

La porzione intracitoplasmatica della catena  $\alpha$  modula le interazioni con il citoscheletro mediante il legame alle proteine dell'ECM. Una volta realizzata l'adesione, si ha il reclutamento di una serie di proteine-segnale a livello della superficie citoplasmatica delle integrine, che contribuiscono alla formazione delle adesioni focali [Brakebusch et al., 2003].

Questi recettori, quindi, mediano le interazioni tra le proteine che legano l'actina, quali: talina, vinculina e  $\alpha$ -actinina, largamente espresse nelle regioni di contatto cellula-substrato, instaurando in tal modo una connessione indiretta con i microfilamenti di actina del citoscheletro [Burrige et al., 1996; Jockusch et al., 1995].

La subunità  $\beta$  è maggiormente coinvolta nei contatti diretti con le proteine citoscheletriche e quindi nel rimodellamento citoscheletrico. Presenta, inoltre, ripetizioni in tandem di quattro regioni ricche di residui di cisteina, considerate essenziali per il mantenimento della struttura tridimensionale della molecola (figura 5).

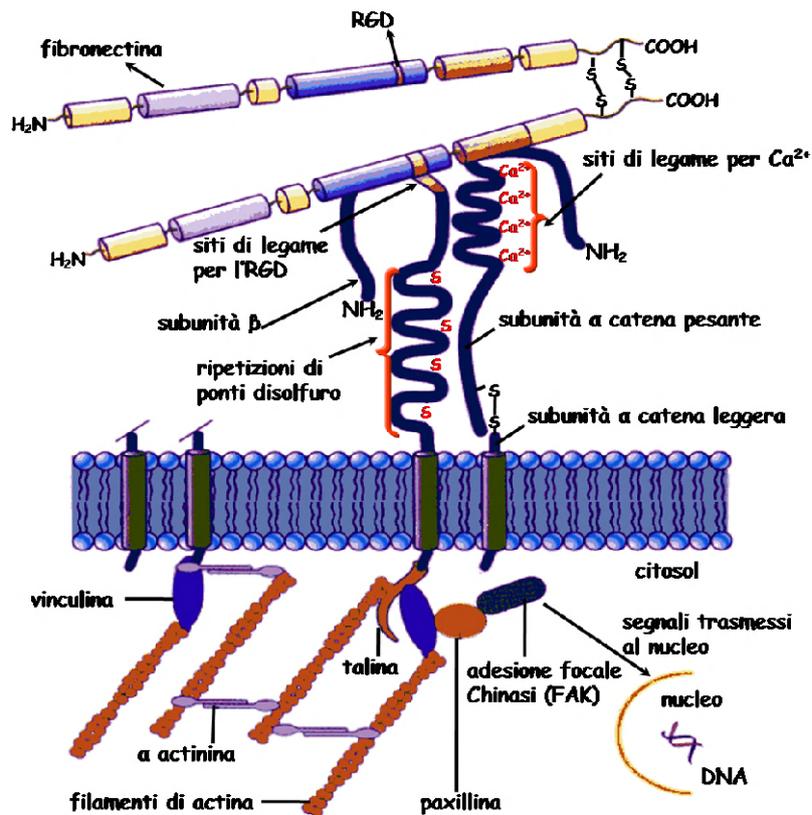


Figura 5 Modello di struttura dell'integrina e di interazione con alcuni ligandi.

I ligandi delle integrine comprendono un gran numero di proteine della matrice extracellulare e contro-recettori che mediano l'adesione cellulare [Juliano et al., 1993]. Nonostante la diversità strutturale di questi ligandi essi hanno in comune un residuo esposto di acido aspartico o glutammico, critico per l'interazione con le integrine, generalmente situato in un'ansa estesa e flessibile. Il primo sito di legame caratterizzato è la sequenza RGD (Arg-Gly-Asp) presente nella fibronectina, nella vitronectina ed in una varietà di altre proteine adesive. Questo tripeptide è riconosciuto da diverse integrine, ad esempio, quasi tutte le  $\alpha_v\beta$  riportate nella tabella 1.

Altre sequenze riconosciute dalle integrine sono la LDV, la KGD e la KQAGD.

La presenza di cationi bivalenti costituisce un fattore che influenza l'interazione fra integrina e ligando. Il residuo di Asp o Glu del ligando forma un complesso ternario con cationi bivalenti legati alla integrina.  $Mg^{2+}$  o  $Mn^{2+}$  sostengono l'interazione con ligandi fisiologici in un ampio *range* di concentrazioni mentre il  $Ca^{2+}$  è attivo a concentrazioni micromolari.

La specificità e l'affinità di una data integrina per un ligando, inoltre, non sono sempre costanti: il legame ad alta affinità delle integrine a ligandi fisiologici richiede un cambiamento conformazionale provocato da segnali che provengono dall'interno della cellula e che agiscono presumibilmente rimuovendo costrizioni esercitate sulle regioni citosoliche delle integrine. L'attivazione delle integrine può anche essere indotta artificialmente, ad esempio per delezione del segmento citoplasmatico. Cambiamenti conformazionali nelle regioni extracellulari sono connessi con l'attivazione e comprendono alterazioni nella carica e nella forma della superficie di interazione con il ligando, che diviene anche più accessibile.

Alcune integrine sono espresse sulla superficie cellulare in una conformazione inattiva e, solo in seguito al legame con un ligando, subiscono una variazione conformazionale in uno stato attivo [Ruoslahti, 1991; Emsley et al., 2000].

Le integrine possono quindi essere considerate come recettori a due vie, che trasducono segnali dall'interno della cellula alla matrice: *inside-out signalling*, e viceversa: *outside-in cell signalling* [Geiger et al., 2001]. Ciò permette alle integrine di mediare numerosi processi biologici, tra cui:

- eventi di fosforilazione di residui di tirosina [Dans et al., 2001] descritti in cellule di carcinoma;
- alcalinizzazione del citoplasma;
- adesione;
- proliferazione;
- migrazione;
- differenziamento ed angiogenesi.

Nella riorganizzazione citoscheletrica un ruolo di primaria importanza viene svolto da alcune proteine dotate di attività “GTP-asi”, le GTP-asi Rac e Rho [Wheeler et al., 2004]. Due sono i meccanismi con cui questi enzimi espletano questa funzione: il primo consiste nell’attivazione di una chinasi che porta alla formazione di fosfatidil-inositolo 4,5-difosfato (PIP2) promuovendo la formazione di F-actina. Il secondo è la conseguenza dell’attivazione, da parte di queste GTP-asi, di una Rho-chinasi che promuove la fosforilazione delle catene leggere della miosina, aumentando la contrattilità dei filamenti del citoscheletro.

Alcuni recettori per fattori di crescita e le integrine agiscono sulla molecola MAP-chinasi, un elemento della trasduzione del segnale proliferativo.

Attraverso MAP-chinasi, le due vie di segnalazione agiscono modulandosi a vicenda e modulando la risposta della cellula agli stimoli esterni (figura 6).

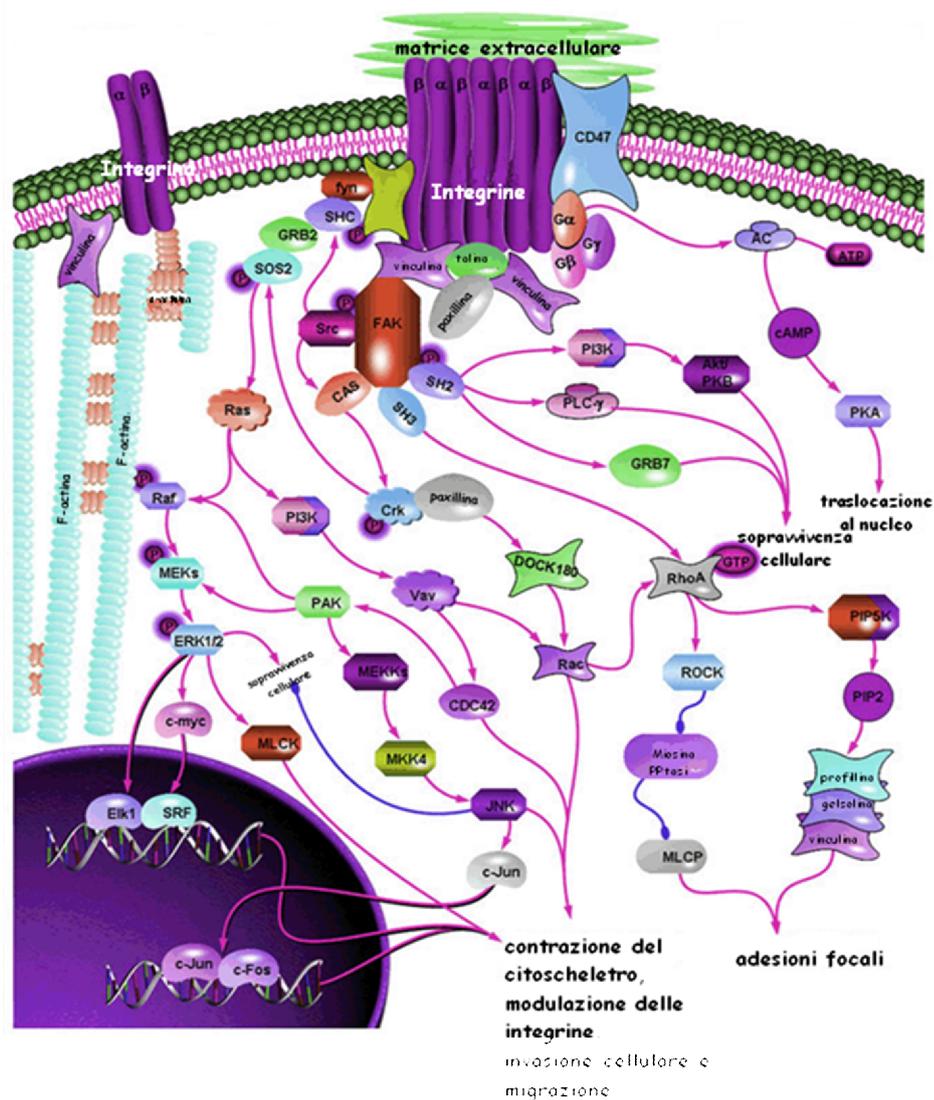


Figura 6 Cascata di reazioni innescata dal legame tra integrine e proteine della matrice.

Le integrine contribuiscono anche al rimodellamento e al *turnover* dei complessi di adesione attivando le tirosin-chinasi delle adesioni focali (FAK) e Src che induce la regolazione della paxillina. L'inibizione o la perdita di componenti di questa via metabolica limita il *turnover* dei complessi di adesione inibendo la migrazione cellulare.

FAK e Src non solo funzionano come chinasi ma, avendo domini capaci di interagire con altre proteine, servono da supporto per il reclutamento a livello della membrana plasmatica di proteine segnale contenenti domini SH2 ed SH3.

Essendo le integrine responsabili anche di parte dell'adesività delle cellule alla matrice, esse consentono alle cellule normali di avere la “percezione” di essere adese alla matrice extracellulare, fornendo quindi un segnale di sopravvivenza. La mancanza di questo segnale comporta la perdita del controllo della crescita cellulare [Vitale et al., 1998].

La mancata interazione fra integrine e matrice, quindi, implica l'attivazione di complesse vie metaboliche (ad es. cooperazione fra integrine e diverse classi di proteasi), le quali portano ad una aumentata motilità delle cellule tumorali e ad aumentata vitalità cellulare per mancanza di apoptosi.

#### *1.4.1 Il ruolo delle integrine nella progressione tumorale*

Alcune delle caratteristiche fondamentali di una cellula, durante la trasformazione neoplastica, riguardano l'acquisizione della possibilità di distaccarsi dal tumore primario, di migrare verso nuovi tessuti formando metastasi ed infine la possibilità di proliferare in maniera indipendente dall'ancoraggio, perdendo l'inibizione da contatto.

E' noto che le integrine sono coinvolte nella regolazione dell'espressione di alcuni geni, pertanto il loro ruolo nel processo neoplastico non si esaurisce con la regolazione dell'adesività e della migrazione, ma coinvolge anche la regolazione della proliferazione e del differenziamento cellulare.

Durante la trasformazione tumorale si verifica spesso la variazione nell'espressione delle integrine, ma anche nella loro conformazione. Le variazioni qualitative e quantitative dei *patterns* di integrine è stata riscontrata sia in vivo che in vitro. Alcune integrine possono essere sovraespresse, altre possono non essere affatto espresse, altre ancora possono essere fosforilate influenzando l'affinità di legame per ligandi del citoscheletro o extracellulari.

Le modifiche di espressione e distribuzione sono specifiche per tipo di cellula tumorale: ad esempio nel carcinoma mammario, della prostata ed in quello del colon si ha una perdita di espressione di  $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$  ed  $\alpha_6\beta_4$ . Al contrario, nell'osteosarcoma e nel rhabdomiosarcoma lo stesso recettore per il collagene  $\alpha_2\beta_1$  è sovraespresso e possiede un ruolo chiave nello sviluppo di metastasi [Mizejewski, 1999].

Questi esempi mostrano come la perdita o l'alterazione dell'espressione dei *patterns* di integrine sembra essere una delle anomalie sottese alla progressione tumorale.

In generale, quindi, la perdita o l'aumento di espressione di integrine risultano indirettamente correlati con la trasformazione maligna e direttamente implicati nella progressione tumorale e nella formazione di metastasi. Inoltre, alcune integrine come  $\alpha_v\beta_3$ , giocano un ruolo importante nel processo angiogenetico, che è noto essere critico per l'accrescimento della massa tumorale [Tucker, 2006].

Particolare rilevanza ai fini di questo lavoro è assunta dall'integrina  $\alpha_v\beta_5$ , che lega la vitronectina nelle fasi di adesione e proliferazione cellulare, e prende parte all'interazione ternaria tra uPA/uPAR- $\alpha_v\beta_5$  (paragrafo 2.2). La coordinazione tra integrine e proteasi ha implicazioni significative sulla regolazione della motilità

associata con lo sviluppo, l'angiogenesi e le metastasi tumorali.

### *1.5 Il ruolo delle proteasi nell'invasione tumorale e nelle metastasi*

Le proteasi sono divise in gruppi in base al carattere del loro sito attivo catalitico: metallo proteasi della matrice (MMPs), proteasi a Serina (SP, sistema di attivazione del plasminogeno uPA), proteasi a Cisteina (CPs).

Le proteasi sono utilizzate in tutto l'organismo per vari processi metabolici e rappresentano uno dei più veloci meccanismi di regolamentazione per "accendere" e "spegnere" processi fisiologici. Esse, infatti, determinano l'emivita di proteine importanti come ormoni, anticorpi, enzimi.

L'attività delle proteasi è fondamentale anche per le interazioni cellula-cellula e cellula-ECM: interviene sia nella fase di adesione che di distacco delle cellule dai tessuti e produce segnali che vengono trasmessi e influiscono sull'espressione genica, sulla proliferazione, sulla differenziazione e la motilità cellulari.

Proteasi a serina, metalloproteasi della matrice e proteasi a cisteina non funzionano come sistemi isolati, ma interagiscono tra loro regolando anche la rispettiva attivazione ed espressione.

Esiste una forte correlazione tra l'invasività di alcune forme tumorali ed il livello di espressione di proteasi. La loro attività, infatti, risulta preliminare per svincolare una cellula dal tessuto di appartenenza, indebolendo i legami con l'ECM, in modo da favorire la migrazione e la formazione di metastasi.

Cellule endoteliali, fibroblasti, cellule che prendono parte alla risposta infiammatoria,

presenti all'interno del tessuto tumorale, costituiscono un microambiente che influenza notevolmente il comportamento delle cellule maligne. Anche le proteine dell'ECM sono coinvolte nell'organizzazione del tessuto tumorale e contribuiscono alla modifica ed al rimodellamento da parte delle proteasi secrete sia dalle cellule normali che tumorali [De Clerck et al., 2004] (figura 7).

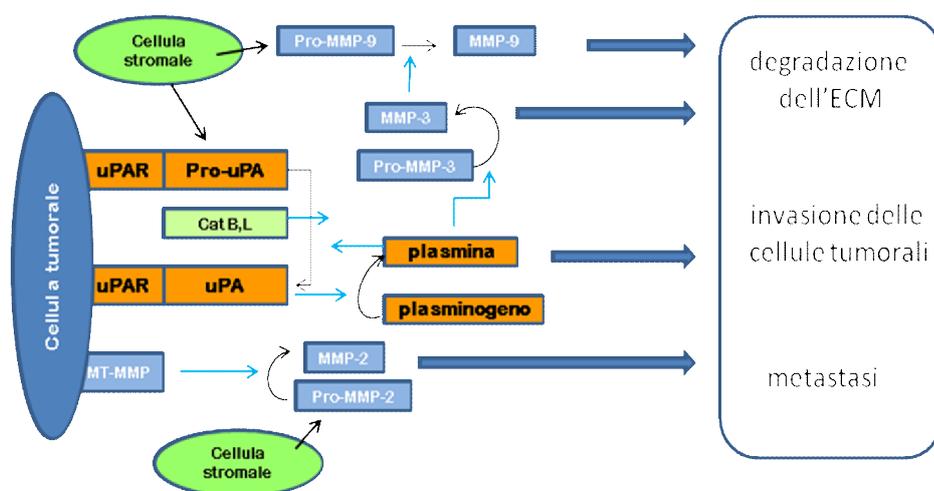


Figura 7 Interazioni del sistema proteolitico associato a tumore.

Per stabilire la connessione tra adesione cellulare ed attività proteolitica è stato dimostrato che l'espressione delle proteasi ed il comportamento delle cellule tumorali, sono entrambi regolati attraverso il reclutamento di recettori delle adesioni cellula-cellula e cellula-matrice.

E' stata dimostrata una correlazione tra l'adesione cellulare mediata da E-caderine e l'espressione di proteasi. Sfruttando un protocollo noto come "*calcium-switch*", sono state formate nuove giunzioni cellula-cellula ed è stata riscontrata una contemporanea

drastica riduzione dei livelli di espressione di uPA e MMP-9. Al contrario, l'inibizione dell'assemblamento di giunzioni mediante anticorpi ha ripristinato l'espressione ai livelli basali delle suddette proteasi.

In cellule già distaccate dalla massa tumorale primaria, l'inibizione dell'adesione si traduce in un incremento dell'invasività mediata proprio dall'aumento di espressione delle suddette proteasi [Munshi et al., 2002].

Altri studi sono stati condotti inducendo l'espressione di integrina  $\alpha_3\beta_1$  nelle cellule di carcinoma squamoso del cavo orale (OSCC) in coltura. I dati raccolti hanno rivelato un incremento dell'espressione di attivatore del plasminogeno di tipo urinario (uPA) e di metallo proteinasi 9 della matrice (MMP-9). L'espressione di uPA indotta dall'integrina richiede l'attivazione della chinasi extracellulare ERK 1/2 ed è accompagnata da una forte redistribuzione dei recettori per l'urochinasi (uPAR) nei siti di espressione dei *clusters* integrinici [Ghosh et al., 2000]. Il controllo dell'espressione delle proteasi da parte delle integrine è conservato nelle cellule prima della trasformazione maligna, ma è perduta nelle cellule altamente invasive di OSCC. Ciò suggerisce come il meccanismo regolatorio dell'espressione, risulti fondamentale per la cellula.

Questi dati indicano che il reclutamento di recettori dell'adesione produce l'attivazione differenziata di *pathways* di segnale che modulano l'espressione delle proteasi. Appare chiara, infine, l'esistenza di una coordinazione tra le proteasi stesse.

L'acquisizione di una nuova morfologia e di una diversa funzionalità da parte delle cellule neoplastiche è seguita dalla neovascolarizzazione della nuova massa tumorale.

Le cellule neoplastiche e, spesso, anche le cellule che circondano la massa tumorale,

iperesprimono metalloproteasi ed attivatori del plasminogeno, oltre che loro specifici inibitori (cfr. paragrafo 2.1) [Brower, 1999]. In particolare, quello che e' stato meglio rapportato al fenotipo neoplastico e' l'attivatore urinario o urochinasi (uPA). Anche il recettore uPAR svolge un ruolo di rilievo, in quanto risulta essere un regolatore della funzionalità integrinica. Dunque, il sistema uPA/uPAR oltre ad essere un regolatore dell'adesione e della migrazione cellulare, é anche un potenziale *target* terapeutico nelle patologie oncologiche [Dublin et al., 2000].

## **CAPITOLO II**

### **Impostazione della ricerca**

## 2.1 Sistema di attivazione del plasminogeno

Il sistema di attivazione del plasminogeno consiste di una cascata enzimatica, coinvolta nel controllo della degradazione della fibrina, nel *turnover* della matrice extracellulare e nell'invasione cellulare.

La conversione del plasminogeno nella forma attiva di plasmina richiede l'attività proteolitica degli attivatori del plasminogeno (PAs) di tipo tissutale (tPA) ed urinario (uPA). La stessa plasmina ha attività proteolitica e può degradare fibronectina, laminina, vitronectina, proteoglicani e fibrina [Stoppelli M.P., 2002].

L'uPA in particolare, è ritenuto il principale promotore della formazione di plasmina nelle fasi di migrazione e di invasione cellulare, sia in condizioni fisiologiche che patologiche.

Gli inibitori dell'attivazione (PAIs) sono parimenti coinvolti nel sistema del plasminogeno, in quanto contrastano l'azione degli attivatori, limitando la formazione di plasmina e di conseguenza la degradazione della fibrina a livello vascolare [Vassalli et al., 1991].

I PAs, così come le altre proteasi del sistema di coagulazione del sangue sono complesse molecole formate anche da larghe regioni non catalitiche che modulano le interazioni con la matrice e le proteine transmembranarie. I recettori di membrana per i componenti del plasminogeno assicurano l'attivazione del sistema sulla superficie cellulare, focalizzando l'attività proteolitica nell'immediato ambiente extracellulare.

## 2.2 *Il recettore per l'urochinasi umana (uPAR)*

L'uPAR è stato identificato per la prima volta sulla superficie di cellule leucemiche umane di tipo linfo-monocitario U937 [Stoppelli M.P. et al., 1985; Stoppelli M.P. et al., 1986].

Successivamente è stata riscontrata la sua espressione sulla superficie di fibroblasti, cellule endoteliali, polimorfonucleati e linee cellulari tumorali di diversa origine [Blasi et al., 2002].

Il recettore uPAR è costituito da una singola catena polipeptidica di 313 aminoacidi, con un peso molecolare di circa 55 KDa, altamente glicosilata ed organizzata in tre domini: D1, D2 e D3. Il dominio D1 contiene il sito di legame ad alta affinità per il dominio GFD dell'uPA (paragrafo 2.3). I domini D2 e D3 aumentano l'affinità per il ligando, probabilmente stabilizzando la struttura terziaria del D1. La regione linker tra questi due domini è coinvolta nel legame alla vitronectina, inoltre tra il D1 e il D2 esiste una regione chemotattica con sequenza SRSRY (residui 88-92) che ha effetto motogeno anche in forma di peptide. Essa favorisce il movimento e la formazione di protrusioni di F-actina in maniera uPAR-indipendente, ma dipendente da FPLI (recettore dell'fMLP) e da  $\alpha_v\beta_5$  [Gargiulo et al., 2005].

uPAR è classificato come proteina "GPI-anchored", ovvero una proteina legata alla membrana mediante un'ancora glicosil-fosfatidil-inositolica. Tale ancoraggio dovrebbe facilitare lo spostamento laterale dell'uPAR in modo da favorirne una localizzazione dinamica ad esempio a livello dei contatti focali.

La forma solubile di uPAR (suPAR) è rilasciata dalla membrana dopo il taglio

proteolitico dell'ancora GPI. Sia uPAR che suPAR possono essere scissi da proteasi a livello della regione linker fra D1 e D2, rilasciando un frammento D2D3. Quest'ultimo lega un recettore accoppiato a proteina G, trasmettendo segnali che facilitano il movimento cellulare secondo gradiente chimico (figura 8) [Blasi et al., 2002].

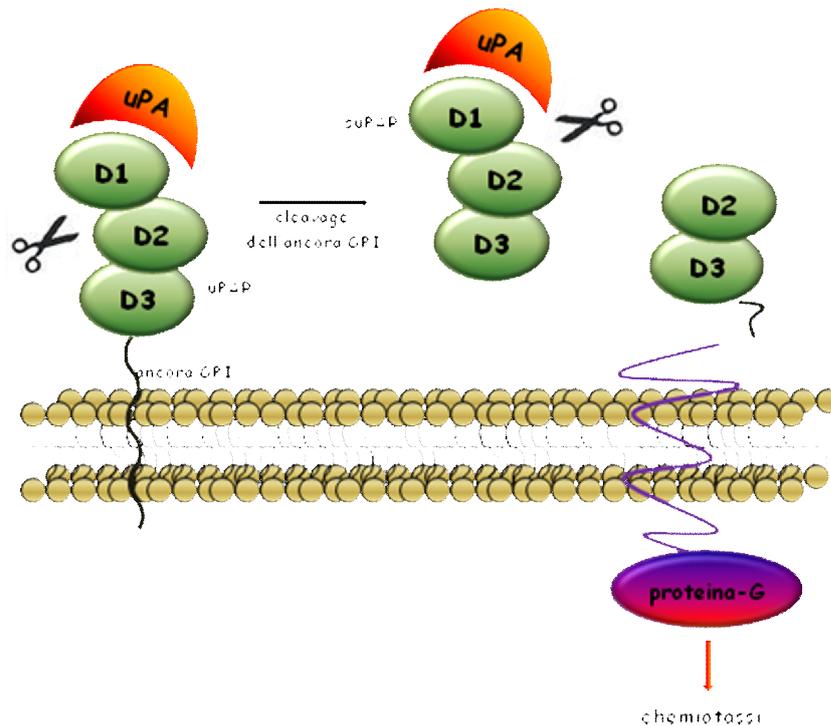
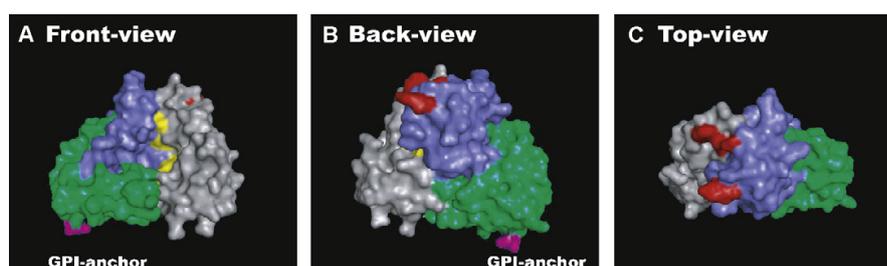


Figura 8 Rappresentazione schematica di uPAR.

A livello delle adesioni focali risulta necessaria l'attività proteolitica uPA-dipendente per l'attivazione del plasminogeno durante le fasi di rimodellamento tissutale e di migrazione cellulare [Ploug et al., 1991; Blasi et al., 1987; Pollanen et al., 1987; Pollanen et al., 1988].

L'uPAR, oltre a svolgere un ruolo legato alla proteolisi, funziona anche come mediatore dell'adesione cellulare e dell'attivazione di una cascata di segnali. Esso, infatti, modula i contatti cellula-matrice sviluppando interazioni dirette con componenti dell'ECM come la vitronectina. Inoltre, sostiene o inibisce il *signalling* cellulare mediato dalle integrine regolandone lo stato di attivazione ed i contatti con fibronectina e collagene [Madsen et al., 2008]. Attraverso un Ala scan dell'uPAR umano è stato possibile definire il sito di binding per la vitronectina [Gardsvoll et al., 2007; Madsen et al., 2007]. L'epitopo è costituito da tre aminoacidi (W32, R58, I63) del dominio 1 e due aminoacidi (R91, Y92) situati nella regione linker tra dominio 1 e dominio 2, questo spiega perché la perdita del dominio 1 mediante cleavage proteolitico inibisce il legame della vitronectina e l'adesione cellulare [Hoyer-Hansen et al., 1997; Sidenius et al., 2000]. La sovrapposizione dei siti di legame per la vitronectina e per l'uPA sulla struttura cristallizzata dell'uPAR dimostra che essi non sono coincidenti (figura 9) e questo spiega come l'uPAR possa legare contemporaneamente queste due proteine [Huai et al., 2006].



**Figura 9** Struttura cristallizzata del recettore umano uPAR (A) La visione frontale mostra la cavità profonda e centrale che costituisce il sito di legame per uPA (R53, A55, Y57, T66 aminoacidi indicati in giallo). (B, C) Le vedute dall'alto e dal basso mostrano il sito di legame per la vitronectina (W32, R58, I63, Y92 aminoacidi indicati in rosso).

La superficie esterna del recettore, inoltre, resta libera ancora per l'interazione con le integrine [Llinas et al., 2005].

I meccanismi molecolari non sono ancora del tutto chiari, ma è evidente che il *signalling* uPAR-dipendente ricade sulle integrine, probabilmente attraverso interazioni laterali uPAR-integrina ed il concomitante *outside-in signalling* o anche attraverso perturbazioni fisiche e meccaniche che si ripercuotono sulle adesioni focali, sulle membrane o sul citoscheletro con le rispettive proteine associate [Madsen et al., 2008].

Numerosi studi confermano che il *signalling* uPAR dipendente sfrutta la cascata integrina/FAK/Src portando ad un incremento di attività di Rac1 ed ERK1/2 [Kjoller et al., 2001].

L'incremento di attivazione di ERK1/2 è stato ripetutamente osservato nelle cellule che esprimono alti livelli di uPAR. Recentemente è stato anche dimostrato che l'attivazione di ERK1/2 indotta da uPA nelle cellule 293/uPAR, dipende dal concomitante legame fra vitronectina e uPAR. In cellule mutanti in cui non si ha tale legame, non viene prodotta alcuna risposta [Madsen et al., 2007].

ERK1/2 *signalling* non solo induce la crescita cellulare, ma regola anche la motilità e l'invasività delle cellule tumorali inducendo la trascrizione genica [Ozanne et al., 2006; Vial et al., 2003].

Particolare importanza in questo contesto è assunta dall'interazione ligando dipendente tra uPAR e integrina  $\alpha_v\beta_5$ . Tale interazione è stata dimostrata mediante impiego di anticorpi anti- $\alpha_v$ , anti- $\beta_5$ , ed anti  $\alpha_v\beta_5$  che hanno prodotto effetti inibitori sui

riarrangiamenti citoscheletrici e sulla migrazione cellulare uPAR-dipendenti. L'associazione uPA-dipendente tra integrina ed uPAR, quindi, altera la specificità del *signalling* di  $\alpha_v\beta_5$  [Carriero et al., 1999].

E' importante sottolineare che l'impiego di anticorpi per  $\alpha_v\beta_5$  e per uPAR blocca la migrazione cellulare, ma l'impiego combinato dei due tipi di anticorpi non produce una sommatoria di effetti inibitori: questo dimostra l'esistenza di una vera e propria cooperatività tra i due recettori e la formazione di un complesso fra i due [Yebra et al., 1996].

La fisiologia dell'uPAR resta alquanto complessa, studi recenti stanno ancora portando in luce aspetti importanti della funzionalità di questo recettore come la sua implicazione nel controllo della proliferazione e della sopravvivenza. Dati recenti dimostrano che l'uPAR protegge svariati tipi cellulari dalla morte programmata o apoptosi indotta da vari stimoli quali le radiazioni UV, il cis-platino e il distacco forzato dalla matrice [Alfano et al., 2006].

### *2.3 L'attivatore del plasminogeno di tipo urinario: urochinasasi*

L'uPA interagisce con il recettore per l'urochinasasi (paragrafo 2.2) innescando l'attività catalitica per l'attivazione del plasminogeno. L'interazione ligando-recettore, inoltre, induce una cascata di reazioni intracellulari che modulano adesione cellulare, motilità, proliferazione nonché trascrizione di specifici geni. Numerosi studi hanno dimostrato l'esistenza di una correlazione tra uPA/uPAR e neoplasie. Molti tumori umani, infatti, presentano una incrementata produzione ed espressione di urochinasasi e del suo recettore

che è correlata con un aumento dell'invasività del tumore.

L'urochinasi umana è sintetizzata come un polipeptide di 431 aminoacidi (pre-pro-uPA). In seguito alla rimozione di un peptide segnale e all'aggiunta di gruppi fosforici e glicosidici, viene secreta, come glicoproteina di 50kDa. La forma extracellulare o pro-uPA è una singola catena di 411 aminoacidi, che viene attivata mediante un singolo taglio proteolitico. L'enzima attivo è costituito da due catene polipeptidiche legate mediante un ponte disolfuro: la catena A (aa 1-158) di circa 18 KDa, che comprende la porzione ammino-terminale, e la catena B (aa 159-411) di circa 33 KDa, che comprende la porzione carbossi-terminale contenente il sito catalitico. Le due catene sono possono essere suddivise in quattro domini (figura 10):

- dominio "growth factor-like" o GFD che contiene la coda N-terminale e la regione EFG (omologo al fattore di crescita epidermico EGF) responsabile del legame con uPAR (aa 1-49);
- dominio Kringle (aa 50-134);
- peptide di connessione o CP (aa 135-158);
- dominio catalitico (aa 159-411), responsabile dell'attività proteasica.

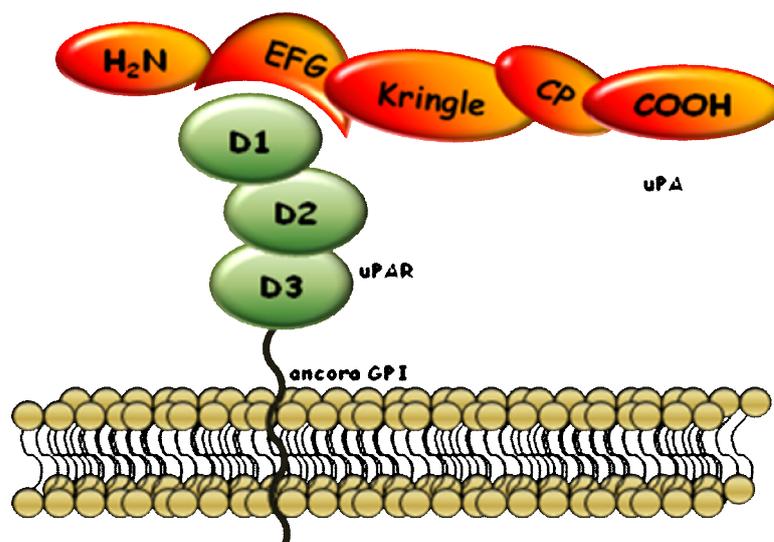


Figura 10 Rappresentazione schematica dell'interazione uPA-uPAR.

Numerose evidenze suggeriscono che il ruolo dell'uPAR sia quello di requisire e concentrare uPA sulla superficie cellulare, favorendo la conversione del plasminogeno in plasmina. I livelli di uPA associata alla membrana, infatti, risultano effettivamente aumentati in corso di neoplasie [Carriero et al., 1994; Andreasen et al., 1997].

L'uPA, come molte altre proteine, può subire alcune modifiche post-traduzionali che influenzano, talvolta in maniera determinante, la sua funzionalità. La pro-uPA prodotta dalla linea cellulare di carcinoma epidermoide A431, è fosforilata a livello della serina 138, localizzata a livello del peptide di connessione, e della serina 303, localizzata nel dominio catalitico [Franco et al., 1997]. In particolar modo è stato dimostrato che la fosforilazione della serina 138 è dipendente dall'attività della protein-chinasi C (PKC), sia *in vivo* che *in vitro* [Franco et al., 1998]. Sia la forma fosforilata che la non

fosforilata dell'uPA mantengono la capacità di attivare il plasminogeno, anche se la fosforilazione rende l'enzima meno sensibile all'inibizione da parte di PAI-1 [Franco et al., 1992].

La fosforilazione della serina non ha effetti sull'affinità di legame per uPAR, molto probabilmente perché sia il residuo Ser<sup>138</sup> che Ser<sup>303</sup> si trovano al di fuori del dominio di legame GFD. Al contrario l'uPA fosforilata (Ser<sup>138</sup> e Ser<sup>303</sup>) e la variante "pseudofosforilata" (Glu<sup>138</sup> e Glu<sup>303</sup>), mostrano una drastica diminuzione della capacità proadesiva e chemiotattica [Franco et al., 1997] pur conservando la capacità di interagire con l'integrina  $\alpha_v\beta_5$  in maniera uPAR-indipendente.

Il sito di fosforilazione più critico sembra essere la Ser<sup>138</sup>, infatti, l'uPA fosforilata o monosostituita con Glu al sito 138, pur legando l'uPAR ad alta affinità, non invia né il segnale chemiotattico, né quello pro adesivo. E' importante notare, infine, che sia uPA 138E/303E che uPA 138E perdono l'attività chemiotattica ed addirittura funzionano come inibitori del movimento cellulare.

Studi più recenti hanno permesso di focalizzare l'attenzione sull'importanza del dominio di connessione dell'urochinasi umana. Tale dominio è stato da sempre considerato come semplice regione di connessione tra domini funzionalmente rilevanti per l'attività biologica dell'urochinasi. Tuttavia, la presenza del sito di fosforilazione Ser<sup>138</sup> all'interno della sequenza del CP, mette in luce la possibilità di un reale coinvolgimento di tale dominio nella modulazione della risposta biologica dipendente dall'urochinasi [Franco et al., 1997; Franco et al., 1998].

Recentemente è stato scoperto il *Connecting Peptide* sviluppa interazioni dirette con l'integrina  $\alpha_v\beta_5$  promuovendo riarrangiamenti nel citoscheletro e modulando la direzione della migrazione cellulare indipendentemente dal legame fra il GFD dell'uPA ed il recettore uPAR. Queste nuove acquisizioni mostrano non solo un nuovo aspetto funzionale per il dominio CP, ma evidenziano come l'uPA possa occupare due diversi recettori di superficie contemporaneamente, agendo come un "ponte molecolare".

L'uPA mantiene la capacità di interagire con l'integrina  $\alpha_v\beta_5$ , anche in assenza di uPAR. In questo caso, tuttavia, l'esposizione della cellula ad uPA non genera né polimerizzazione dell'actina, né attivazione di Src, né migrazione cellulare [Franco et al., 2006].

E' possibile quindi affermare che l'effetto inibitorio della migrazione esercitato da uPA 138E/303E sia mediato proprio dal peptide di connessione, infatti la ridotta espressione di  $\alpha_v\beta_5$  comporta anche una riduzione della sensibilità all'inibizione da parte di uPA 138E/303E.

L'indagine sulla attività biologica prodotta dal sistema CP/uPAR/  $\alpha_v\beta_5$  è stata approfondita mediante l'impiego di un peptide di sintesi noto come *CP peptide* o Cpp, la cui sequenza aminoacidica corrisponde alla struttura primaria della regione del CP endogeno (aa. 135-158). Gli studi effettuati hanno dimostrato come questo polipeptide mantenga la possibilità di legare l'integrina  $\alpha_v\beta_5$ , promuovendo riarrangiamenti del citoscheletro e modulando la direzione di migrazione cellulare. Il Cpp risulta essere attivo in un *range* di concentrazioni comprese tra 1 e 10 pM [Franco et al., 2006]. E' interessante evidenziare che gli effetti riscontrati decadono nelle cellule in cui non si ha

espressione del recettore uPAR, indicando che quest'ultimo è coinvolto nella trasduzione del segnale mediata dal Cpp. In presenza di uPAR, l'esposizione contemporanea al Cpp ed al GFDp (peptide corrispondente alla regione GFD, aa. 12-32), amplifica i riarrangiamenti del citoscheletro e la migrazione cellulare, suggerendo una cooperazione funzionale tra due regioni distinte nella proteina intatta. In presenza di uPAR, l'attività chemiotattica di Cpp e GFDp è bloccata dagli stessi set di inibitori del *signalling*, dimostrando che essi condividono svariati effettori a valle della cascata di trasduzione del segnale.

Per esplorare il meccanismo attraverso il quale il CP induce migrazione, è stata esaminata l'associazione tra Cpp ed  $\alpha_v\beta_5$  ed i suoi effetti sull'interazione dell'integrina con l'uPAR. E' stato evidenziato che l'effetto motogenico del Cpp, preincubato con l'integrina suddetta, è fortemente ridotto. Questo indica che il Cpp lega l' $\alpha_v\beta_5$  in soluzione. La preincubazione di uPA con l'integrina  $\alpha_v\beta_5$  induce chemiotassi al di sotto dei livelli prodotti da GFDp, suggerendo come l'integrina leghi e blocchi una delle due regioni responsabili dell'attività chemiotattica dell'intera sequenza (aa. 1-158). Il confronto fra questi risultati indica che due distinte sequenze cooperano all'induzione della migrazione cellulare: GFD (che lega direttamente l'uPAR) ed il CP (che lega l'integrina  $\alpha_v\beta_5$ ), che comunque necessita dell'espressione dell'uPAR per esercitare una propulsione alla migrazione. E' stato ipotizzato che il *signalling* innescato dall'uPA dipenda dal CP attraverso l'incremento dell'associazione tra uPAR ed integrina. Benché non siano del tutto chiare le precise interazioni molecolari che portano alla formazione del complesso uPAR-integrina ed alla cascata di segnali intracellulari, appare evidente

l'interdipendenza tra i due recettori e l'importanza del ruolo svolto dal CP nella regolazione delle attività cellulari mediate dall'urochinasi.

Non si sa se il blocco con anticorpi del sito di *binding* del CPp all' $\alpha_v\beta_5$  sia da attribuire ad una parziale sovrapposizione o a qualche interazione tra i siti di legame del CPp e della vitronectina o se sia dovuto ad uno effetto allosterico che maschera il sito di legame del CPp. Comunque il blocco del legame integrina-CPp ottenuto mediante anticorpi, suggerisce una parziale sovrapposizione tra il dominio di legame del ligando nativo ed il CPp-*binding domain*.

La rilevanza farmacologica del dominio CP è confermata anche dalla scoperta che un peptide noto come Å6, corrispondente ai residui aminoacidici 136-143 dell'uPA, inibisce la progressione tumorale mostrando spiccate proprietà anti-invasive ed anti-angiogeniche [Guo et al., 2002]. Le evidenti proprietà antineoplastiche dell'Å6 in modelli di glioblastoma multiforme, cancro della prostata e della mammella, hanno condotto al suo impiego in *clinical trials* di fase I e fase II per la terapia anti-cancro dell'epitelio ovarico [Berkenblit et al., 2005; Ghamande et al., 2008].

Partendo da tali conoscenze, è stata approfondita la ricerca sull'importanza della sequenza corrispondente al CP. Per “dissezionare” funzionalmente la regione del CP e per meglio comprenderne il rapporto struttura funzione, è stato utilizzato come peptide di riferimento il CPp (aa 135-158). La prima sequenza sintetizzata è un polipeptide di nove aminoacidi, corrispondente alla porzione N-terminale del CPp (aa. 135-143) al cui interno ricade il residuo di Ser<sup>138</sup>. Tale peptide è stato acetilato sul residuo N-terminale

ed amidato sull'aminoacido C-terminale al fine di ottenere una migliore stabilità alla degradazione da parte di proteasi, è stato così ottenuto l'Ac-KA6-NH<sub>2</sub>. E' stata inoltre sintetizzata la sequenza corrispondente agli aminoacidi 144-158 del CPp (tabella 2). Tali composti sono stati sottoposti a saggi di migrazione cellulare e ne è stato studiato l'effetto, sia in relazione alla migrazione cellulare basale, sia in presenza dell'effetto migratorio indotto dal CPp.

In una seconda fase di lavoro è stata eseguita la sintesi dei peptidi Ac-KA6E138-NH<sub>2</sub> e CPpE138 (tabella 2). Il residuo di Glu è stato introdotto al fine di "simulare" la carica negativa introdotta dalla fosforilazione della Ser138. Anche in questo caso sono stati eseguiti saggi di migrazione cellulare in camere di Boyden, al fine di valutare l'impatto che l'introduzione di una carica negativa può esercitare sull'attività biologica dei suddetti composti. In particolare lo scopo è stato quello di verificare se il Glu<sup>138</sup>, introdotto nella sequenza del CPp, potesse effettivamente mutare o regolare l'attività motogena prodotta in assenza di fosforilazione.

Sono stati inoltre effettuati dei saggi di spiazzamento per ottenere informazioni riguardo al grado di affinità dei composti per il *target* biologico.

La terza fase del progetto è stata incentrata sulla sintesi di peptidi recanti in posizione 138 un residuo di serina fosforilata. I composti Ac-KA6SP138-NH<sub>2</sub> e CPpSP138 (tabella 2) sono stati impiegati in studi strutturali per ottenere informazioni riguardo alla variazione di struttura secondaria che caratterizza i peptidi di partenza, a seguito della fosforilazione.

I peptidi CPp, Ac-KA6-NH<sub>2</sub> ed Ac-144-158-CPp sono stati esaminati mediante

esperimenti di dicroismo circolare ed NMR per valutare la loro strutturazione. E' stata inoltre valutata l'importanza dell'introduzione della carica negativa al sito 138 effettuando esperimenti CD ed NMR sui peptidi a catena lunga CPpE138 e CPpSP138.

Peptide	Sequenza
CPp	H-K-K-P-S-S-P-P-E-E-L-K-F-Q-C-G-Q-K-T-L-R-P-R-F-K-OH
Ac-KA6-NH <sub>2</sub>	Ac-K-K-P-S-S-P-P-E-E-NH <sub>2</sub>
Ac-144-158-CPp	Ac-L-K-F-Q-C-G-Q-K-T-L-R-P-R-F-K-OH
CPpE138	H-K-K-P-E-S-P-P-E-E-L-K-F-Q-C-G-Q-K-T-L-R-P-R-F-K-OH
Ac-KA6E138-NH <sub>2</sub>	Ac-K-K-P-E-S-P-P-E-E-NH <sub>2</sub>
CPpSP138	H-K-K-P-S(PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub> )-S-P-P-E-E-L-K-F-Q-C-G-Q-K-T-L-R-P-R-F-K-OH
Ac-KA6SP138-NH <sub>2</sub>	Ac-K-K-P-S(PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub> )-S-P-P-E-E-NH <sub>2</sub>

Tabella 2 Prospetto dei peptidi sintetizzati.

**CAPITOLO III**

**Metodiche di sintesi**

### 3.1 Sintesi peptidica in fase solida

I peptidi sono stati ottenuti mediante la classica metodica sintetica in fase solida via Fmoc. Tale approccio, eterogeneo, prevede l'impiego di un supporto solido, la resina, in combinazione con una fase liquida, i reagenti, infatti, questi ultimi, sono introdotti in soluzione a concentrazione definita 0,5 M in N,N-dimetilformamide (DMF).

E' stato scelto questo tipo di tecnica sintetica, in quanto considerata la più idonea e facilmente automatizzabile, per l'ottenimento di peptidi di media lunghezza. La sintesi viene eseguita all'interno di reattori o pozzetti i cui setti consentono di operare in corrente inerte d'azoto o argon evitando perdite di materiale. Tale metodica, inoltre, consente di ottenere elevate rese di reazione e prodotti relativamente più puri. Il supporto solido utilizzato è stato accuratamente scelto in base alle caratteristiche chimiche delle sequenze peptidiche da sintetizzare: per i peptidi Ac-144-158-CPp, CPp, CPpE138 e CPpSP138 è stato utilizzato come supporto solido la resina Wang, essendo i composti dotati di un residuo carbossilico terminale. Per la sintesi di Ac-KA6-NH<sub>2</sub>, Ac-KA6E138-NH<sub>2</sub> ed Ac-KA6SP138-NH<sub>2</sub> è stata impiegata la resina Rink-amide al fine di ottenere terminali carbossilici ammidati. Anche il grado di *loading*, espresso come mmol/g è stato selezionato in base alla lunghezza delle catene aminoacidi che da assemblare. Per i peptidi più lunghi (15-24 aa.) sono state adoperate resine con un *loading* di 0,32 mmol/g al fine di ridurre le interazioni laterali tra le catene peptidiche. Il problema delle interazioni, infatti, può causare una riduzione della possibilità di diffusione delle soluzioni di reattivi (aminoacidi e reagenti di coupling) attraverso gli stati di resina. Per i peptidi di dimensioni minori (9 aa.) sono state utilizzate resine con

un un *loading* di 0,74 mmol/g.

Per ogni sintesi sono stati impiegati 300mg di resina precedentemente sottoposta a *sweelling* in 4ml di DMF per una tempo di 2ore. Nel caso delle resine Rink-amide, il primo *step* è stato la rimozione del gruppo protettore Fmoc dal *linker* della resina, mediante impiego di una soluzione al 25% di piperidina in DMF, per circa 30 minuti. Nel caso delle sintesi condotte su resine Wang si è proceduto direttamente con l'accoppiamento del primo aminoacido con l'aggiunta di 1 equivalente di DMAP al fine di facilitare l'ancoraggio alla resina.

L'accoppiamento del primo residuo aminoacidico, così come dei successivi, è stato effettuato tramite attivazione *in situ* in presenza di agenti di *coupling*: HBTU, HOBt, entrambi in un eccesso di 3 equivalenti, in presenza di una base terziaria, DIPEA, in un eccesso di 6 equivalenti, e Fmoc-AA-OH, ortogonalmente protetto in catena laterale, anch'esso in un eccesso di 3 equivalenti. Gli aminoacidi usati per la sintesi dei suddetti composti sono tutti ortogonalmente protetti in catena laterale: (Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH).

Il gruppo N<sup>α</sup>-Fmoc di ogni residuo accoppiato, è stato rimosso mediante l'uso di una soluzione di piperidina al 25% in DMF per una durata di 30 minuti. Sono stati alternati cicli di coupling e di deprotezione, fino all'ottenimento dell'intero peptide ancorato alla resina. Ogni fase di accoppiamento e deprotezione è stata monitorata mediante Kaiser test [Kaiser, et al. 1970]. Tali *steps* sono stati intervallati da lavaggi atti a rimuovere i

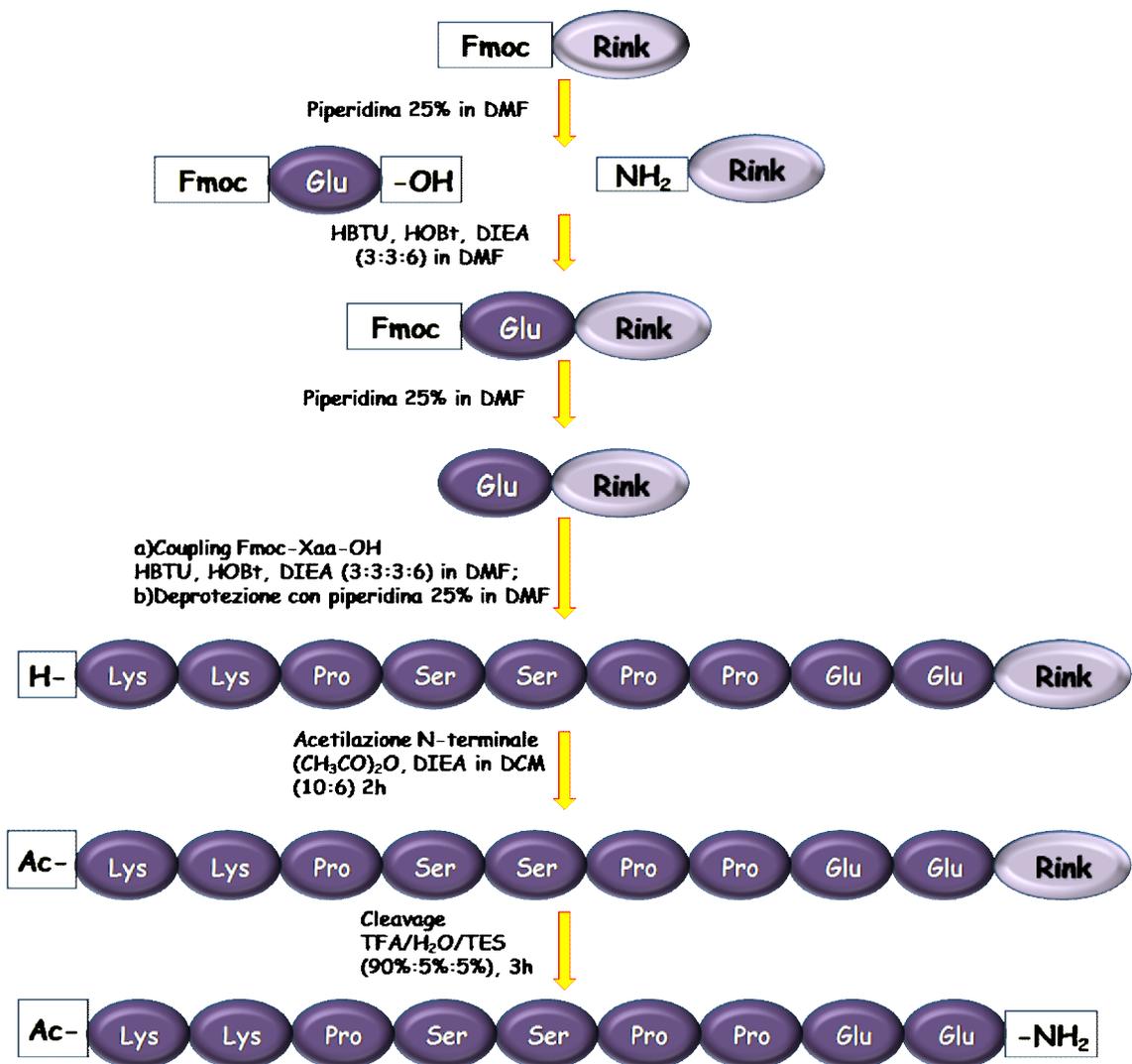
reagenti in eccesso.

Per la sintesi di sequenze difficili e per le catene polipeptidiche più lunghe si è rivelata particolarmente vantaggiosa la sostituzione del solvente, è stato infatti usato N-metil-2-pirrolidone (NMP), al posto di DMF. Questo solvente, infatti, permette una migliore solvatazione e distensione delle catene laterali del peptide in crescita, conferendo una maggiore possibilità di reagire ai siti liberi del *backbone* [Krishnakumar et al., 2001].

Terminato l'assemblaggio delle catene polipeptidiche, per i composti Ac-KA6-NH<sub>2</sub>, Ac-KA6E138-NH<sub>2</sub>, Ac-KA6SP138-NH<sub>2</sub> ed Ac-144-158-CPP si è preceduto all'acetilazione dell'aminoacido N-terminale. La reazione è stata condotta in DCM a 25°C per 2 h mediante impiego di 10 equivalenti di anidride acetica, 6 equivalenti di DIPEA monitorando costantemente il pH.

Ultimata la sintesi, si è proceduto al *cleavage*, ovvero alla rimozione dei peptidi dalla resina mediante trattamento con soluzione di TFA 90%, TES 5%, H<sub>2</sub>O 5% per 3 h sotto agitazione meccanica. Il trattamento con la suddetta soluzione consente di ottenere la contemporanea deprotezione delle catene laterali degli aminoacidi dai rispettivi gruppi protettori acido sensibili.

L'impiego di tale metodica, tuttavia, può determinare reazioni collaterali a causa degli intermedi cationici prodotti durante il *cleavage*. Per ridurre le reazioni indesiderate, si è rivelato efficace l'impiego di *scavengers* come i trialchilsilani (es. Et<sub>3</sub>SiH o TES) [Pearson et al., 1989]. Le resine sono state successivamente rimosse tramite filtrazione sottovuoto e i prodotti grezzi sono stati precipitati in circa 40ml di etere etilico freddo. Tutti i peptidi essiccati si presentano come polveri bianche.



Schema di sintesi Nello schema sintetico, per semplicità è stata riportata la sola sintesi del peptide Ac-KA6-NH<sub>2</sub>, allo stesso modo sono stati ottenuti gli altri peptidi riportati in tabella 2.

### *3.2 Purificazione dei peptidi*

Tutti i composti sono stati purificati mediante il sistema HPLC Shimadzu preparativo a fase inversa usando una colonna Vydac C-18 (CAT. 218TP 152010; 15  $\mu$ m). Come eluente è stata impiegata una miscela di acqua ed acetonitrile acidificati all'1% con TFA, ad un flusso di 15 ml/min con un gradiente crescente di acetonitrile dal 10% al 50% per 35 minuti. La separazione cromatografica è stata monitorata con un rivelatore UV-Vis ad una lunghezza d'onda di 254 nm. Le frazioni corrispondenti al picco di maggiore intensità sono state raccolte e caratterizzate.

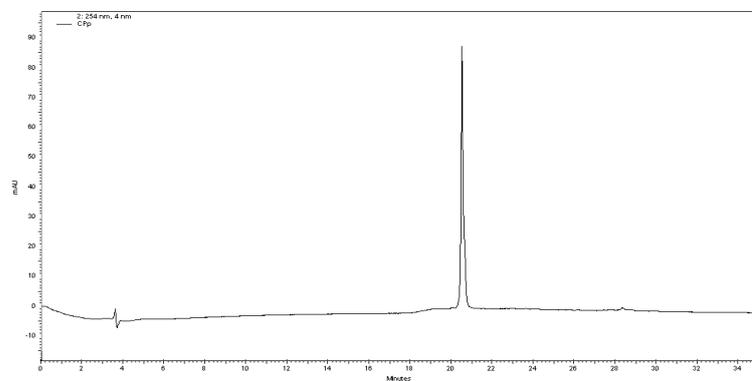
### *3.3 Caratterizzazione dei peptidi*

La caratterizzazione dei composti ottenuti è stata fatta mediante HPLC Shimadzu analitico a fase inversa, con una colonna Vydac C-18 (CAT. 218TP 1010 5  $\mu$ m), usando come eluente una miscela costituita da acqua ed acetonitrile acidificati all'1% con TFA. E' stata impostato il flusso di 1 ml/min con una variazione del gradiente di acetonitrile dal 10% al 90% per 35 minuti (figura 11; tabella 3)

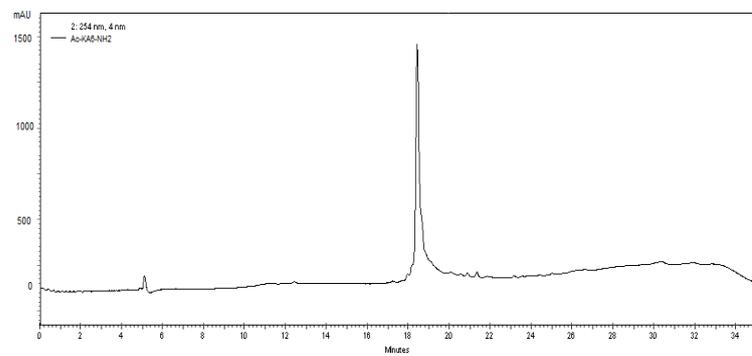
I composti sono stati caratterizzati anche mediante analisi con spettrometro di massa API 2000 a sorgente elettrospray per i peptidi più piccoli, mentre la massa dei peptidi di dimensioni maggiori è stata rilevata utilizzando l'apparecchio MALDI TOF Brucker 2005.

Le frazioni pure sono state raggruppate unite e liofilizzate. I peptidi purificati ottenuti si presentano come polveri bianche.

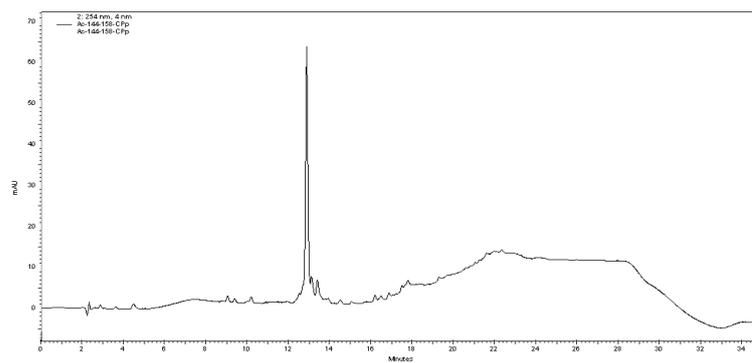
a)



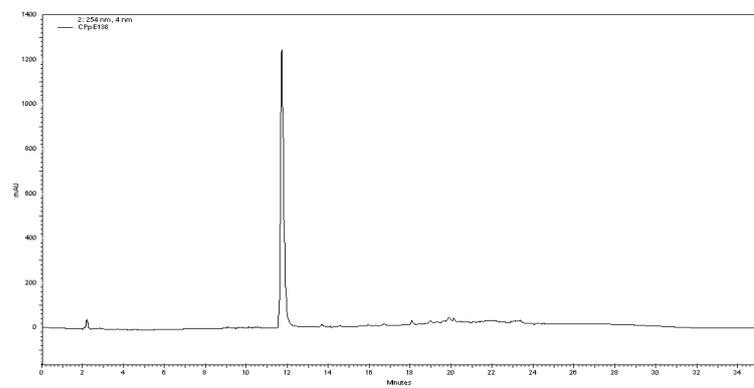
b)



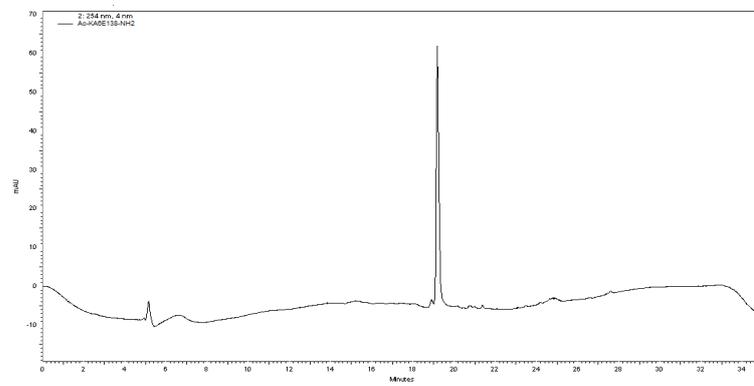
c)



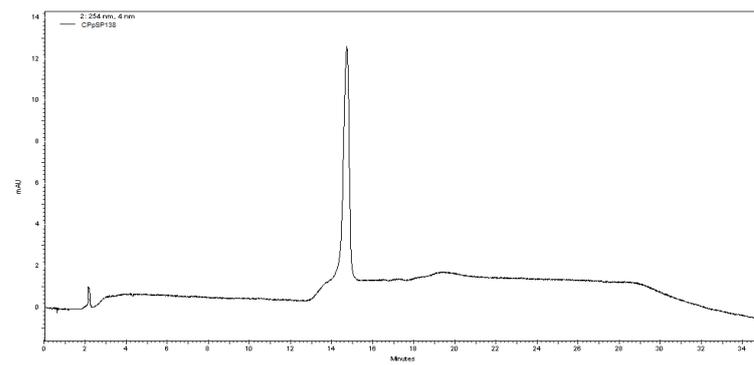
d)



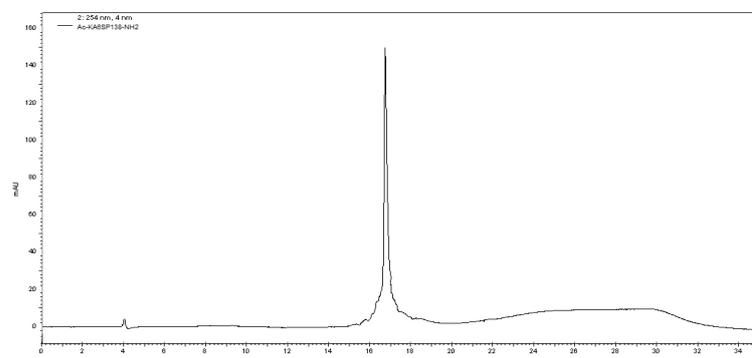
e)



f)



g)



**Figura 11** Cromatogrammi analitici relativi ai composti a) CPp; b) Ac-KA6-NH<sub>2</sub>; c) Ac-144-158-OH; d) CPpE138; e) Ac-KA6E138-NH<sub>2</sub>; f) CPpSP138; g) Ac-KA6SP138-NH<sub>2</sub>.

Peptide	M. w.	HPLC <sup>a</sup>
<b>CPp</b>	<b>2827,54</b>	<b>4,72</b>
<b>Ac-KA6-NH<sub>2</sub></b>	<b>1039,00</b>	<b>3,13</b>
<b>Ac-144-158-CPp</b>	<b>1891,00</b>	<b>4,82</b>
<b>CPpE138</b>	<b>2869,57</b>	<b>4,36</b>
<b>Ac-KA6E138-NH<sub>2</sub></b>	<b>1081,00</b>	<b>3,29</b>
<b>CPpSP138</b>	<b>2908,54</b>	<b>6,4</b>
<b>Ac-KA6SP138-NH<sub>2</sub></b>	<b>1120,00</b>	<b>3,2</b>

**Tabella 3** <sup>a</sup> HPLC  $K' = [(\text{tempo di ritenzione del peptide} - \text{tempo di ritenzione del solvente}) / \text{tempo di ritenzione del solvente}]$  in un gradiente dal 10% di CH<sub>3</sub>CN con 0,1% TFA fino al 90% CH<sub>3</sub>CN in 35 minuti ad un flusso di 1 ml/min con colonna analitica Vydac C18.

**CAPITOLO IV**

**Parte farmacologica**

I peptidi sintetizzati sono caratterizzati da una struttura primaria corrispondente all'intera sequenza del *Connecting Peptide* dell'urochinasi umana o a parte di essa. Alcuni peptidi sono stati modificati allo scopo di generare degli inibitori della migrazione cellulare.

Essendo nota l'attività motogena del peptide Cpp (aa. 135-158) [Franco et al., 2006], quest'ultimo è stato assunto quale termine di paragone in esperimenti di migrazione direzionale in camere di Boyden.

La messa a punto di metodi di studio per questo processo è fondamentale per comprendere a fondo i meccanismi biochimici alla base della locomozione cellulare.

I test di migrazione, inoltre, sono diventati sempre più importanti per lo screening di nuove molecole anti-cancro perché è stata dimostrata una correlazione tra il potenziale migrante in vitro delle cellule tumorali e la loro invasività in vivo. Pertanto, lo studio di fattori coinvolti nel processo di migrazione tumorale è determinante per sviluppare sostanze in grado di contrastare le proprietà metastatiche delle cellule neoplastiche.

#### *4.1 Saggi di migrazione per chemiotassi*

Sono stati messi a punto numerosi test per analizzare la migrazione per chemiotassi, il più utilizzato è il *filter assay* [Boyden, 1962]. Questo test comprende un sistema dotato di un compartimento superiore ed un compartimento inferiore. Applicando un gradiente chemiotattico, le cellule vengono indotte a migrare dalla parte superiore del sistema verso quella inferiore, attraversando una membrana porosa (figura 12).

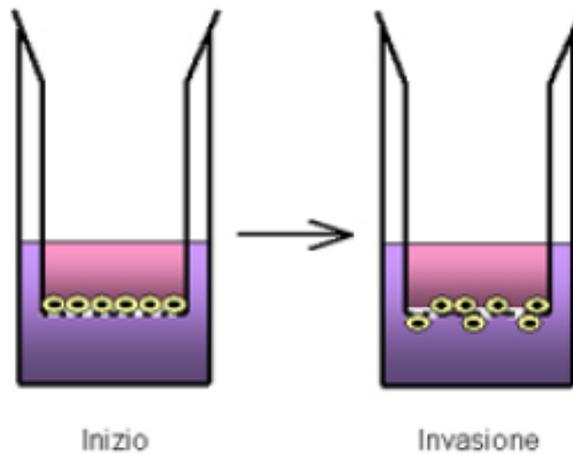


Figura 12 Modello di Camera di Boyden.

La porosità della membrana viene scelta a seconda delle dimensioni delle cellule utilizzate. La larghezza dei pori deve essere sufficientemente piccola da impedire il passaggio passivo delle cellule, ma sufficientemente grande da permetterne la migrazione attiva.

Il test della camera di Boyden include delle varianti in cui la membrana porosa è rivestita dalle proteine della matrice extracellulare (test di invasività) oppure viene ricoperta da un monostrato di cellule (test di migrazione trans-epiteliale).

#### *4.2 Colture cellulari utilizzate*

Sono state utilizzate cellule umane di rene embrionale HEK-293, transfettate stabilmente con il cDNA dell'uPAR (HEK-293/uPAR), mantenute in coltura 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).

### *4.3 Esecuzione del saggio di chemiotassi*

I saggi sono stati eseguiti in camere di Boyden modificate, utilizzando filtri di policarbonato, con pori del diametro di 8  $\mu$ , stratificati con 300  $\mu$ g/ml di collagene di tipo VI [Coates et al., 1992]. Ogni composto è stato testato in triplicato.

I chemioattrattanti sono stati diluiti in DMEM-BSA, utilizzati alle opportune concentrazioni in modo da determinare la formazione di un gradiente chemiotattico. Le sostanze sono state depositate nel compartimento inferiore della camera. Il filtro, stratificato e numerato, è stato posizionato all'interfaccia tra i due compartimenti della cameretta. Le cellule sono state distaccate dalla piastra di coltura mediante soluzione con tripsina allo 0,01% e contate mediante camera di Burkner. Le stesse cellule sono state incubate per 30 minuti a 37°C nel mezzo di coltura con FBS, quindi lavate con 1X PBS per eliminare le tracce di siero che potrebbero fungere da chemioattrattanti, risospese in DMEM/0,1% BSA ed applicate nel compartimento superiore della camera.

Ogni saggio è stato effettuato utilizzando  $15 \times 10^4$  cellule campione. Le camere sono state incubate per 3 ore a 37°C in 5% di CO<sub>2</sub>. Successivamente le cellule sulla superficie superiore del filtro sono state rimosse meccanicamente, i filtri sono stati ripuliti e le camerette disassemblate.

Le cellule migrate, sono state fissate ai filtri per 5 minuti con concentrazioni crescenti di alcool (70%, 90%, 95%) e colorate con ematossilina per 8 minuti.

Le cellule presenti sul lato inferiore del filtro, lungo una diagonale, sono state contate al microscopio ottico invertito (Zeiss) con un ingrandimento 20X e sono state riportate come percentuale del numero di cellule migrate al netto della migrazione basale.

#### *4.4 Risultati dei saggi di chemiotassi*

Tutti i peptidi sintetizzati sono stati sottoposti a saggi di migrazione cellulare in camere di Boyden, dal gruppo di ricerca della Dott.ssa M.P. Stoppelli, presso l'Istituto di Genetica e Biofisica "Adriano Buzzati Traverso" del CNR di Napoli.

Nei saggi in camere di Boyden sono stati adoperati vari chemoattrattanti, tutti indicati in figura. Le cellule che hanno migrato in assenza di chemiotattico, in presenza del solo BSA, sono considerate come il 100%. I risultati sono stati riportati come percentuale sull'asse delle ordinate.

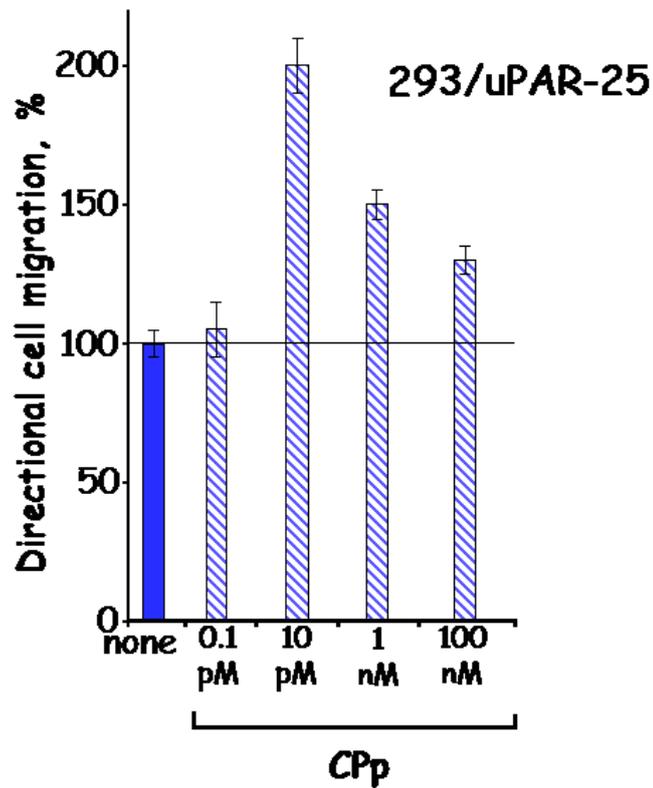


Figura 13 Curva di attività del composto CPp.

Come mostrato in figura 13, il peptide CPp è attivo in un intervallo di concentrazioni che vanno da 1 pM a 10 nM, poi l'attività stimolatoria declina.

La conoscenza delle proprietà anti-invasive ed anti-angiogeniche del peptide denominato Å6, corrispondente agli aminoacidi 136-143 del CP dell'uPA umana [Guo et al., 2002], ha fornito il punto di partenza per l'ulteriore indagine a carico di questa regione. In particolare i peptidi sintetizzati sono volti ad esplorare i residui aminoacidici importanti per l'attività motogena del CP e a indagare le capacità inibitorie della sua porzione amminoterminale.

#### 4.4.1 Effetti di Ac-KA6-NH<sub>2</sub> e Ac-144-158-CPp sulla migrazione basale e sulla migrazione CPp-dipendente

In figura 14 sono riportate le curve di attività relative ai peptidi composto Ac-KA6-NH<sub>2</sub>, corrispondente agli aminoacidi 135-143 del CP dell'uPA umana ed Ac-144-158-CPp, corrispondente agli aminoacidi 144-158 del CP.

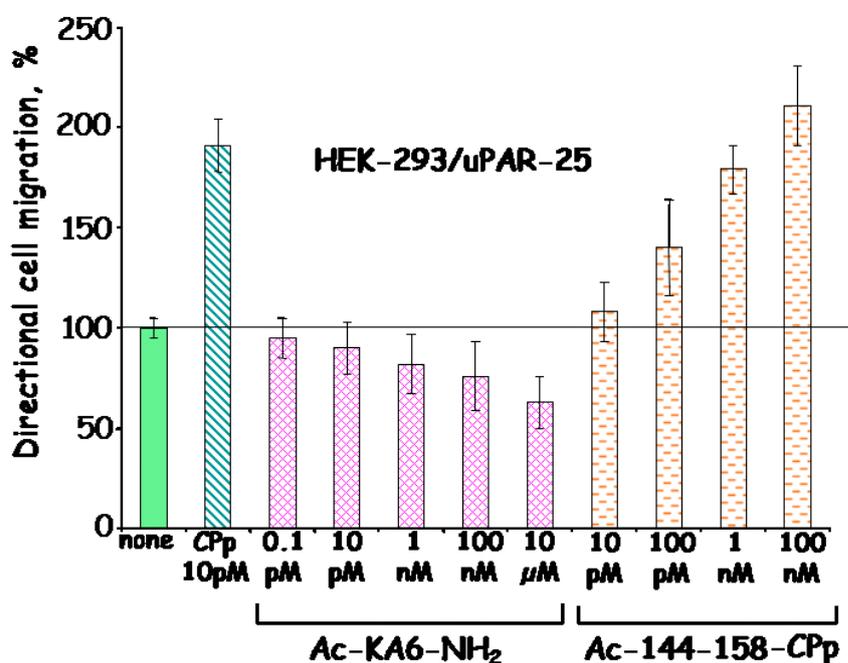


Figura 14 Curva di attività dell'Ac-KA6-NH<sub>2</sub> e Ac-144-158-CPp.

Il controllo è stato effettuato impiegando il CPp alla sua concentrazione di massima attività, esso provoca una forte risposta migratoria.

Per quanto concerne la regione degli aminoacidi 144-158, essa conserva parte dell'attività chemiotattica, con un picco massimo alla concentrazione di 100 nM.

L'effetto migratorio indotto risulta sempre maggiore rispetto al basale, ma è ridotto di circa 100 volte rispetto al Cpp. Al contrario, Ac-KA6-NH<sub>2</sub> non conserva gli effetti di attività stimolatoria del Cpp, anzi a tutte le concentrazioni considerate si riscontra una soppressione della motilità cellulare rispetto al basale.

Nonostante le due sequenze aminoacidiche considerate, siano contigue nella struttura primaria del CP, appare evidente la differenza di attività riscontrata nei saggi di migrazione.

Per verificare se l'effetto inibitorio di Ac-KA6-NH<sub>2</sub> influisca anche sulla migrazione cellulare Cpp-dipendente, è stata analizzata la migrazione delle cellule HEK-293/uPAR-25 in presenza di Cpp 10 pM, incrementando le concentrazioni dei peptidi Ac-KA6-NH<sub>2</sub> e Ac-144-158-Cpp (figura 15).

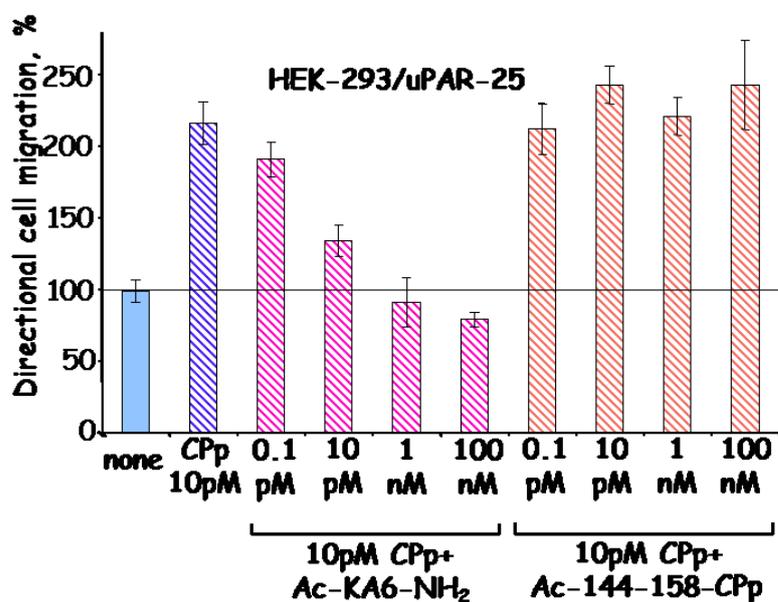


Figura 15 Curve di attività di Ac-KA6-NH<sub>2</sub> e Ac-144-158-Cpp in combinazione con Cpp 10pM.

Come mostrato, l'Ac-KA6-NH<sub>2</sub> inibisce la migrazione Cpp-dipendente alla sua concentrazione di massima attività, ovvero 10 pM. La perdita di potenza rispetto all'attività inibitoria esercitata sulla sola migrazione basale, può essere spiegata da un'interferenza con un meccanismo migratorio attivato dal Cpp.

L'Ac-144-158-Cpp, invece, conserva attività stimolatoria a tutte le concentrazioni considerate. Si può osservare un incremento nella percentuale di cellule che hanno migrato in presenza del solo BSA, ma non si riscontra una vera e propria sommatoria con gli effetti stimolatori prodotti dal Cpp.

#### *4.4.2 Effetti di Ac-KA6-NH<sub>2</sub> sulla migrazione cellulare dipendente da Ac-144-158-Cpp e da Cpp*

Sono stati effettuati saggi di migrazione utilizzando una miscela 1:1 dei peptidi Ac-KA6-NH<sub>2</sub> e Ac-144-158-Cpp, al fine di verificare l'eventuale prevalere dell'attività inibitoria quando il peptide Ac-KA6-NH<sub>2</sub> è estrapolato dal Cpp *in toto* (figura 16).

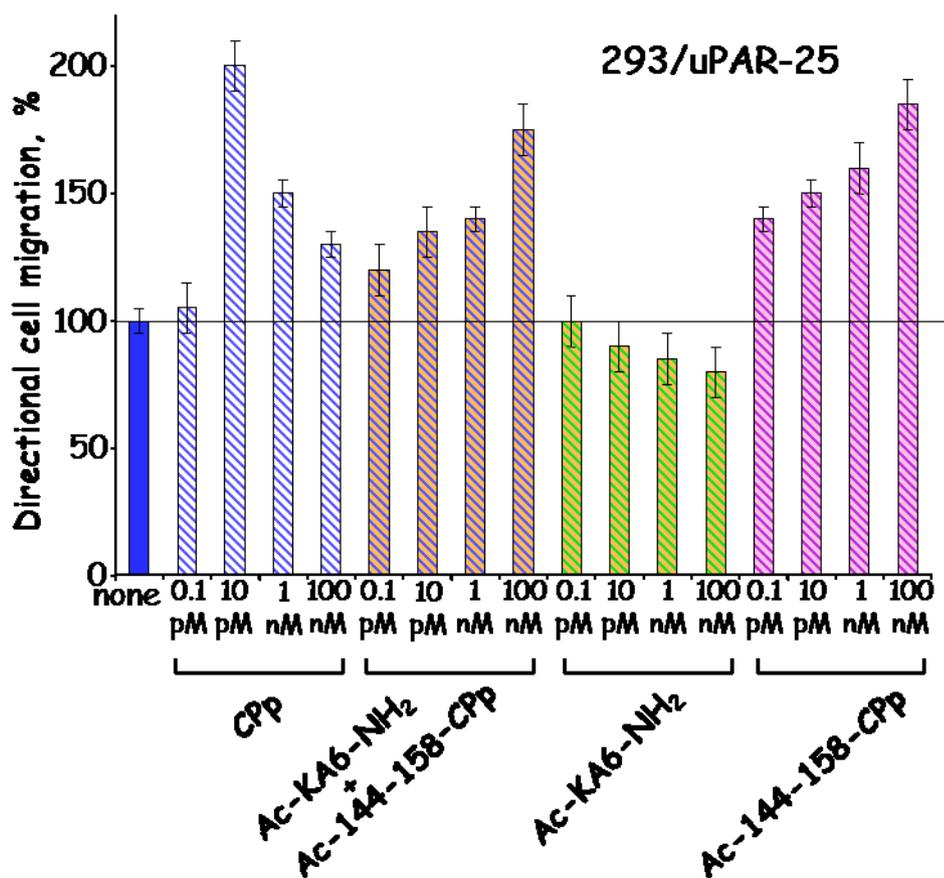


Figura 16 Curve di attività di CPp (blu), Ac-KA6-NH<sub>2</sub> (giallo), Ac-144-158-CPp (viola) e di Ac-KA6-NH<sub>2</sub>+Ac-144-158-CPp (rosa).

Nel saggi di migrazione effettuati con la suddetta miscela è stata riscontrata la prevalenza dell'attività migratoria indotta da Ac-144-158-CPp a tutte le concentrazioni considerate anche se le percentuali di cellule che hanno migrato risulta diminuita rispetto a quelle che hanno migrato in presenza del solo Ac-144-158-CPp.

A questo punto è stata esaminata l'entità di inibizione di migrazione di cellule HEK-293/uPAR-25 verso Cpp e Ac-144-158-Cpp alla loro massima concentrazione attiva, in risposta a livelli crescenti di peptide Ac-KA6-NH<sub>2</sub> (figura 17).

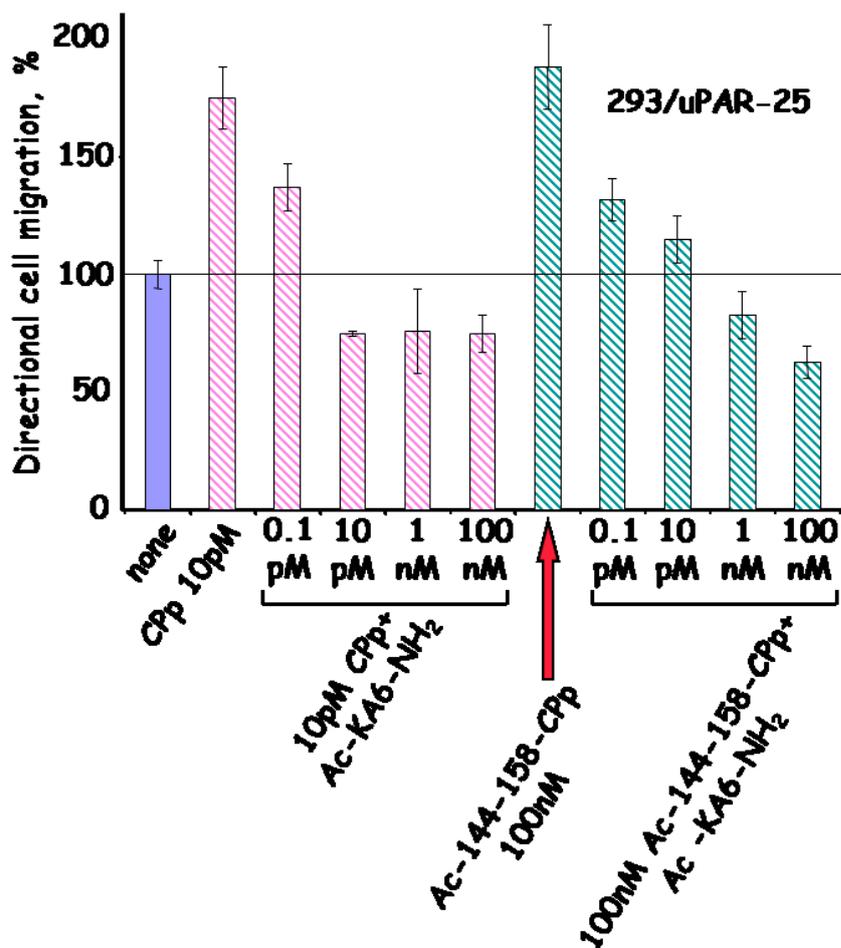


Figura 17 Curve di attività di Ac-KA6-NH<sub>2</sub> in combinazione con Cpp 10 pM e con Ac-144-158-Cpp 100 nM.

Come mostrato in figura, l'inibizione della migrazione sia Cpp che Ac-144-158-Cpp dipendente è dose-dipendente ed è osservabile già a partire da un minimo di

concentrazione di 0,1 pM del peptide ad attività inibitoria. E' importante quindi sottolineare che quando le due subregioni sono separate ed utilizzate in rapporto 1:1, si può riscontrare comunque migrazione cellulare, anche se in percentuale inferiore rispetto all'effetto prodotto dalla sola regione 144-158 o dal peptide di riferimento CPp (figura 16). Al contrario, quando viene mantenuta fissa la concentrazione degli effettori di migrazione e viene aumentata la concentrazione del peptide ad attività inibitoria, si riscontra una chiara diminuzione della percentuale di cellule che hanno migrato. L'effetto inibitorio osservato è dose-dipendente.

#### *4.4.3 Il peptide Ac-KA6-NH<sub>2</sub> inibisce la migrazione verso altri chemioattrattanti non correlati al sistema urochinasi*

Sono stati effettuati saggi di migrazione usando cellule HEK-293/uPAR-25 al fine di verificare se il peptide Ac-KA6-NH<sub>2</sub> sia in grado di inibire la migrazione verso altri chemioattrattanti.

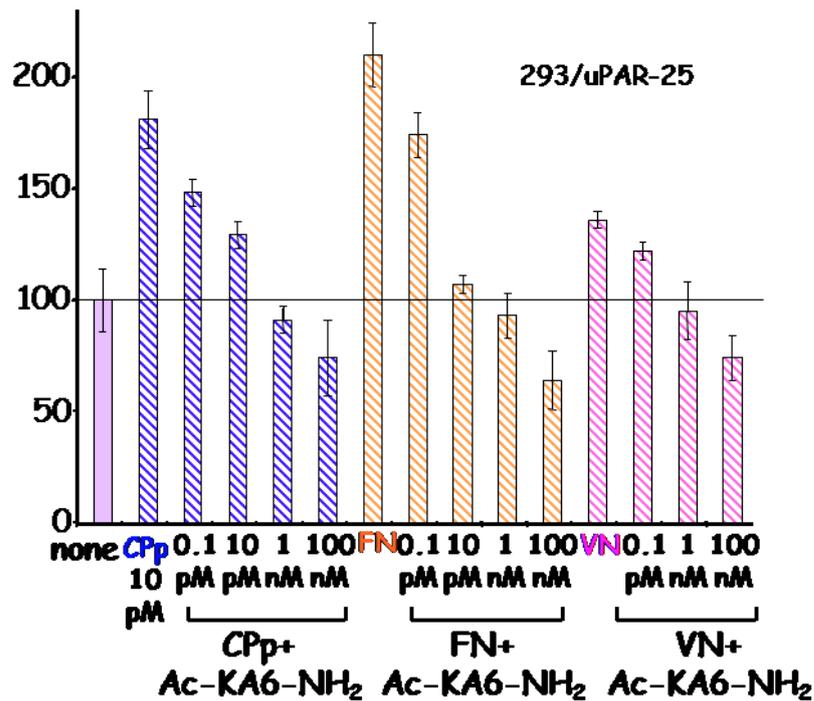


Figura 18 Curve di attività di Ac-KA6-NH<sub>2</sub> in combinazione con CPP 10 pM, Fn, Vn.

A differenza del CPP, fibronectina e vitronectina sono proteine della matrice extracellulare con attività chemiotattica per la tipologia di cellule utilizzata. La miscela equimolare con Ac-KA6-NH<sub>2</sub> ha prodotto una forte inibizione della migrazione dipendente sia da CPP che da FN e VN.

Come noto, il recettore per la vitronectina è l'integrina  $\alpha_v\beta_5$ . Il CP ed CPP sviluppano interazione con questo recettore, indipendentemente dall'uPA e promuovono migrazione cellulare purchè vi sia espressione dell'uPAR. Pertanto, è possibile ipotizzare che l'inibizione da parte di Ac-KA6-NH<sub>2</sub> sulla migrazione VN-dipendente,

coinvolga qualche molecola condivisa dal *pathway* del segnale migratorio, innescato dal legame VN- $\alpha_v\beta_5$ .

Diversamente, la fibronectina interagisce con l'integrina  $\alpha_5\beta_1$ , pertanto l'effetto inibitorio riscontrato, risulta inaspettato. E' ipotizzabile che l'inibizione verso altri chemioattrattanti venga esercitata attraverso un effetto di perturbazione sull'espressione dei vari *clusters* di integrine.

#### *4.4.4 Migrazione Cpp-dipendente, effetti della sostituzione al sito 138 con Glu*

La seconda parte degli studi farmacologici è stata incentrata sull'indagine relativa all'importanza dell'introduzione di una carica negativa in posizione 138. Sono quindi stati esaminati i due composti che al sito 138 presentano, al posto della Ser, un residuo aminoacidico di Glu. In particolare lo scopo è stato quello di verificare se il Glu<sup>138</sup>, introdotto nella sequenza del Cpp, potesse effettivamente mutare o regolare l'attività motogena prodotta in assenza di fosforilazione.

I due peptidi Ac-KA6E138-NH<sub>2</sub> e CppE138 sono stati utilizzati in combinazione con Cpp, in saggi di migrazione su cellule HEK-293/uPAR-25 (figura 19).

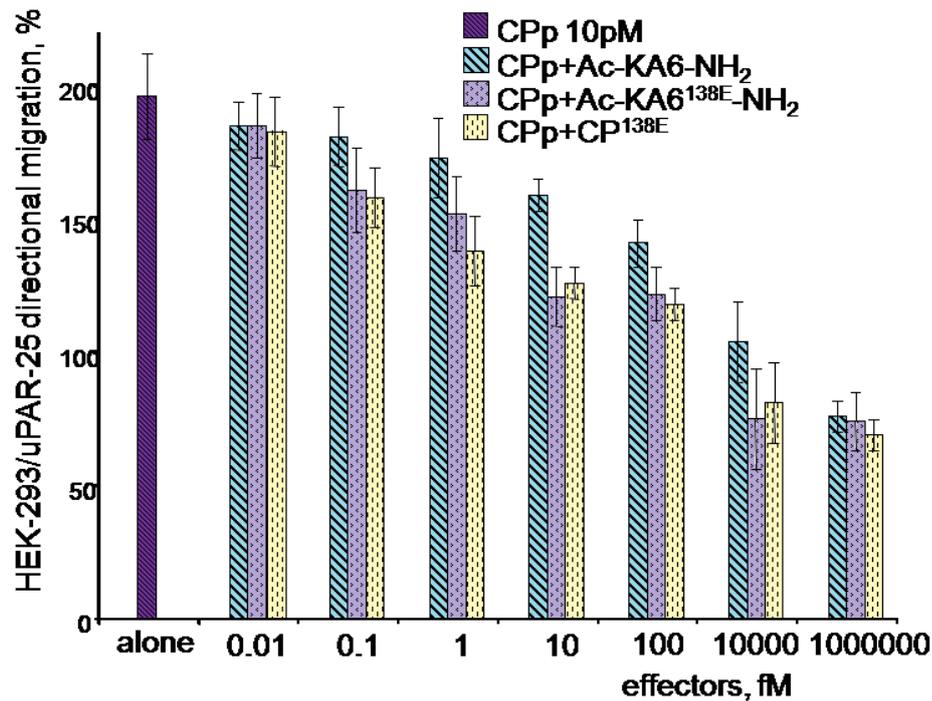


Figura 19 Curve di attività di Cpp 10 pM (viola), Cpp+Ac-KA6-NH<sub>2</sub> (turchese), Cpp+Ac-KA6E138-NH<sub>2</sub> (lilla), Cpp+CPpE138 (ocra).

Come mostrato in figura 19, a tutte le concentrazioni considerate il grado di inibizione prodotto da Ac-KA6E138-NH<sub>2</sub> è sempre superiore rispetto a quello riscontrato utilizzando Ac-KA6-NH<sub>2</sub>. Anche in presenza di CPpE138 si riscontra un buon grado di inibizione a concentrazioni crescenti. I valori ottenuti impiegando Ac-KA6E138-NH<sub>2</sub> e CPpE138 sono più o meno paragonabili alle varie concentrazioni riportate. I risultati ottenuti da questo esperimento hanno validato l'importanza dell'introduzione della carica negativa ai fini dell'ottenimento di molecole ad attività inibitoria per la migrazione cellulare. Il peptide da nove residui aminoacidici di partenza, Ac-KA6-NH<sub>2</sub>, che pure ha presentato attività inibitoria, risulta essere più potente quando sostituito in

posizione 138 con Glu (Ac-KA6E138-NH<sub>2</sub>). Per quanto riguarda il peptide intero Cpp, anch'esso sembra assumere una funzione diversa quando modificato in posizione 138 con Glu (CpPE138). La pseudofosforilazione funziona come un "segnale" all'interno della regione CP (aa. 135-158) dell'uPA, inoltre mette in risalto come la zona N-terminale svolga una importante funzione regolatoria, per la migrazione Cpp dipendente

Partendo da questi dati, è stato affrontato un ulteriore quesito riguardo alla possibilità che il peptide di sintesi CpPE138, potesse produrre effetti inibitori paragonabili a quelli esercitati dall'uPA, modificata in modo da esprimere Glu in posizione 138 (uPA<sup>138E</sup>) [Vocca et al., 2009], sulla migrazione Fn-dipendente.

Sono stati effettuati dei saggi di migrazione (figura 20) utilizzando Cpp e Fn (cfr. figura 18) come controllo, e due miscele di Cpp+CpPE138 e di Fn+uPA<sup>138E</sup> a concentrazioni crescenti.

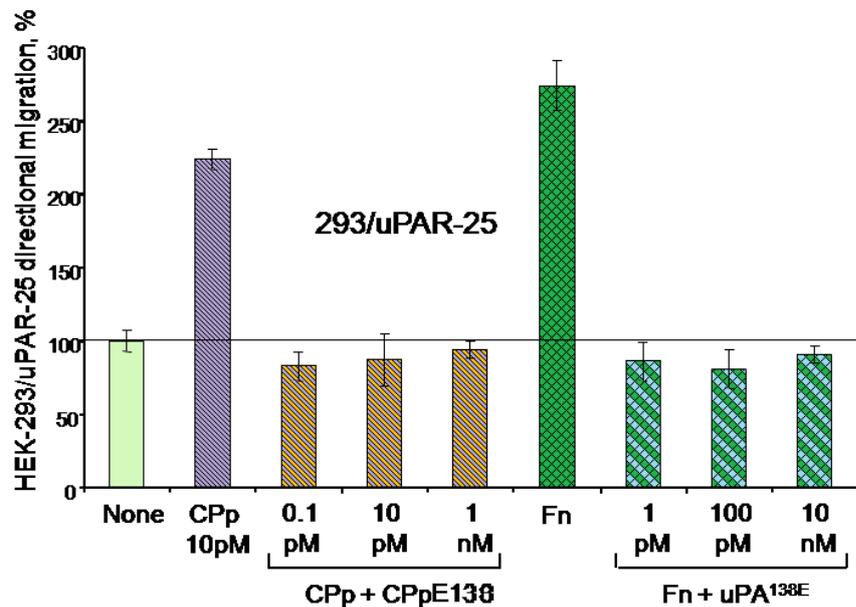


Figura 20 Migrazione cellulare in presenza di BSA (verde), Cpp (lilla), Fn (verde scuro), Cpp+CppE138 (lilla e arancio) e Fn+uPAE138(verde scuro e azzurro).

Come mostrato in figura 20, il CppE138 esercita un effetto inibitorio. La percentuale di cellule che hanno migrato è inferiore rispetto al basale, a tutte le concentrazioni considerate. L'effetto riscontrato, inoltre, risulta inibitorio anche in presenza del meccanismo migratorio indotto da Cpp. Anche uPA<sup>138</sup> svolge attività inibitoria sulla migrazione indotta da Fn, tuttavia è stato indispensabile utilizzare concentrazioni differenti dei due "inibitori" per ottenere risultati paragonabili. Risulta comunque evidente, dai risultati degli esperimenti, l'effetto della pseudofosforilazione, sia per il peptide di sintesi che per quello di espressione.

## 4.5 Esecuzione dei saggi di binding

Per gli studi di binding, sono state raccolte  $2 \times 10^6$  cellule HEK-293, ed incubate per 3 ore a  $4^\circ\text{C}$  con peptide  $^{125}\text{I}$ -marcato in DMEM con 1mg/ml BSA e 10 mM HEPES pH 7.4 (binding buffer). Alla fine del periodo di incubazione le cellule sono state lavate tre volte con il binding buffer e le proteine legate alla superficie cellulare sono state raccolte trattando le cellule con un lavaggio acido (50 mM Glicina-HCl buffer pH 3.0, contenente 0.1 M NaCl) per 2 minuti a temperatura ambiente e quantizzate mediante misurazione con  $\gamma$ -counter di radiazioni  $\gamma$  [Stoppelli et al., 1986]. I risultati sono presentati come media del “binding” specifico  $\pm$  d.s. ed i dati sono rappresentativi di 2 esperimenti indipendenti eseguiti in duplicato.

### 4.5.1 Binding di Ac-KA6-NH<sub>2</sub>, Ac-144-158-CPp e CPpE138 alla superficie cellulare

I saggi di binding su Ac-KA6-NH<sub>2</sub> e Ac-144-158-CPp, sono stati effettuati per verificare se questi peptidi, correlati al CPp, possano legarsi specificamente alla superficie cellulare attraverso interazioni con l'integrina  $\alpha_v\beta_5$ . Si tratta in effetti di saggi di spiazzamento, in questo caso è stato utilizzato il  $^{125}\text{I}$ - $\Delta\text{GFa138E/303E}$  capace di legarsi proprio all'integrina  $\alpha_v\beta_5$  sulla superficie di cellule HEK-293. In presenza di un eccesso di peptidi non marcati, tale legame viene progressivamente ridotto. Il peptide CPp è stato usato come controllo positivo (figura 21).

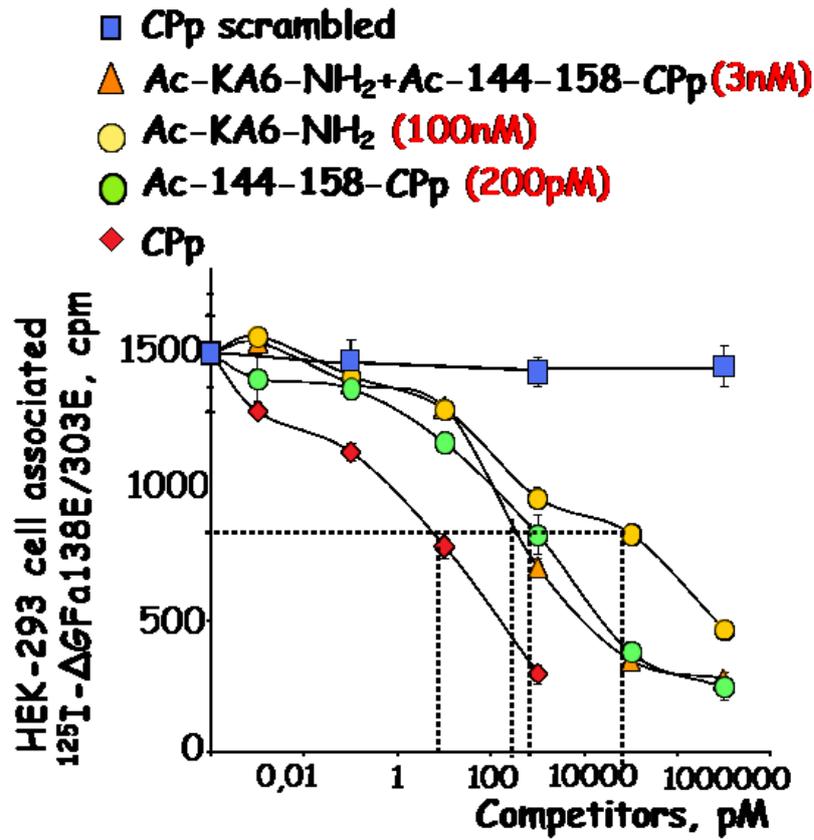


Figura 21 Saggio di binding.

I dati ottenuti mostrano come il Cpp sia in grado di spiazzare il peptide radiomarcato, progressivamente a concentrazioni crescenti. Le subregioni N-terminale e C-terminale mostrano gradi di affinità differenti per il target biologico. In particolare il frammento Ac-144-158-NH<sub>2</sub> risulta essere più affine a tutte le concentrazioni considerate e mostra una  $K_{d_{app}}$  di circa 200 pM, mentre la  $K_{d_{app}}$  del Ac-KA6- NH<sub>2</sub> e' di circa 100 nM. E' stata presa in considerazione anche la miscela 1/1 delle due subregioni del Cpp e l'andamento del grafico ha mostrato come a concentrazioni inferiori a 10 pM i punti

siano praticamente sovrapponibili a quelli dello spiazzamento prodotto dal solo Ac-KA6-NH<sub>2</sub>, mentre subito dopo l'andamento della curva si approssima a quella del singolo peptide Ac-144-158-NH<sub>2</sub>.

E' stata effettuata una prova di spiazzamento anche per il peptide CPpE138 (figura 22).

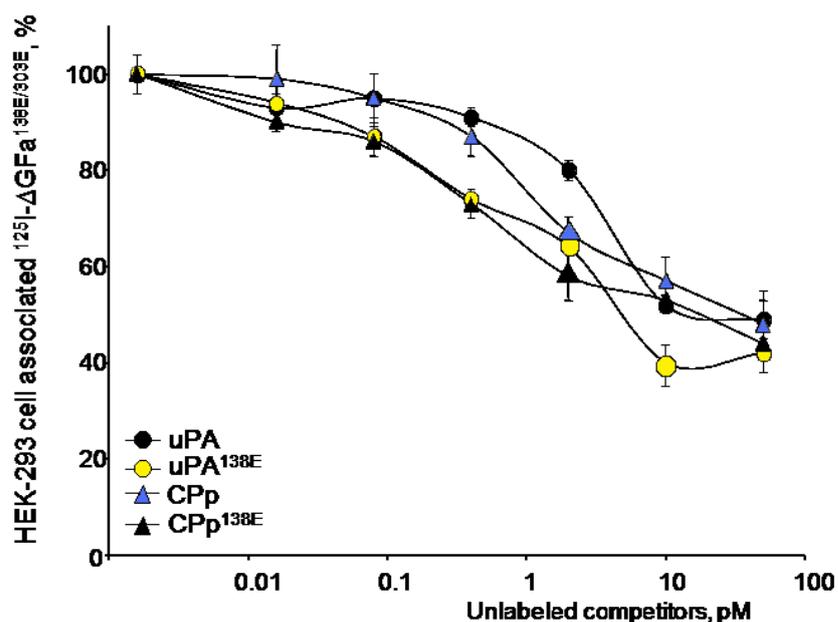


Figura 22 Binding di uPA, uPA<sup>138E</sup>, CPp e CPpE138 alla superficie cellulare.

Il confronto fra uPA e CPp mostra gradi di affinità più o meno comparabili, in tutti i punti riportati nel grafico. Questo comportamento era comunque atteso, in quanto è stata individuata proprio nel CP dell'uPA, la porzione responsabile dell'interazione diretta con l'integrina  $\alpha_v\beta_5$ .

Il Cpp alla sua concentrazione di massima attività, ovvero 10 pM, produce uno spiazzamento di circa il 40% del peptide radiomarcato dalla superficie cellulare. La riduzione relativa al CppE138 10 pM arriva quasi al 50%. Anche per il CppE138 i risultati di spiazzamento forniscono indicazioni valide riguardo all'esistenza di una interazione specifica con la membrana cellulare.

I risultati descritti sono indicativi di interazioni specifiche tra tutti i composti esaminati e la superficie delle cellule HEK-293. Risulta tuttavia singolare il fatto che l'intera sequenza (aa. 135-158) mostri un'affinità maggiore per la superficie cellulare, rispetto alle due subregioni, quando considerate separatamente. E' plausibile ipotizzare che gli aminoacidi strettamente coinvolti nell'interazione Cpp- $\alpha_v\beta_5$  si trovino a cavallo delle due porzioni. Altra possibilità da considerare è che tali aminoacidi non siano contigui nella struttura primaria, ma che si trovino vicini tra loro nella struttura tridimensionale che il Cpp assume in soluzione.

Sono tuttavia indispensabili ulteriori studi di binding per chiarire se i peptidi considerati leghino il recettore sullo stesso sito oppure se siano coinvolti in legami su siti di tipo allosterico. A tal proposito è stata pianificata l'esecuzione di saggi di spiazzamento mediante marcatura con  $^{125}\text{I}$  del Cpp.

**CAPITOLO V**

**Studi strutturali**

La sequenza aminoacidica di un peptide ne determina sia la specifica attività biologica, sia il suo spazio conformazionale; la tendenza del peptide ad assumere una data conformazione, dipende dalla sua costituzione chimica. Uno degli scopi degli studi conformazionali di peptidi in soluzione è proprio la possibile determinazione della conformazione bioattiva. Lo studio della struttura di proteine e peptidi viene generalmente effettuato allo stato solido, per mezzo di metodi diffrattometrici o in soluzione, utilizzando tecniche di dicroismo circolare (CD) e risonanza magnetica nucleare (NMR).

### *5.1 Analisi conformazionale di molecole di interesse biologico mediante dicroismo circolare*

La spettroscopia CD rappresenta una tecnica molto utilizzata per analizzare la struttura secondaria di peptidi in soluzione. Essa fa parte delle tecniche chiroottiche, cioè di quelle tecniche spettroscopiche che, utilizzando la luce polarizzata, mettono in risalto l'attività ottica delle molecole in esame. Infatti il dicroismo circolare si ha quando cromofori, presenti in un ambiente asimmetrico, interagiscono con la luce polarizzata. Nelle proteine i principali gruppi otticamente attivi sono rappresentati dai legami ammidici del *backbone* peptidico e dalle catene laterali aromatiche.

Polipeptidi e proteine, di solito, presentano regioni in cui i cromofori sono altamente ordinati, originando in tal modo strutture ad  $\alpha$ -elica e/o  $\beta$ -sheet. In base all'orientamento dei legami peptidici, le transizioni ottiche dei legami ammidici possono essere "splittate" in transizioni multiple, inoltre la lunghezza d'onda e l'intensità delle

transizioni possono essere aumentate o diminuite. Su tali presupposti molte strutture secondarie comuni quali:  $\alpha$ -elica,  $\beta$ -turn e  $\beta$ -sheet ripiegati presentano profili di CD caratteristici [Greenfield et al., 1996]. Gli spettri di polipeptidi rappresentativi con le loro conformazioni sono mostrati in figura 23.

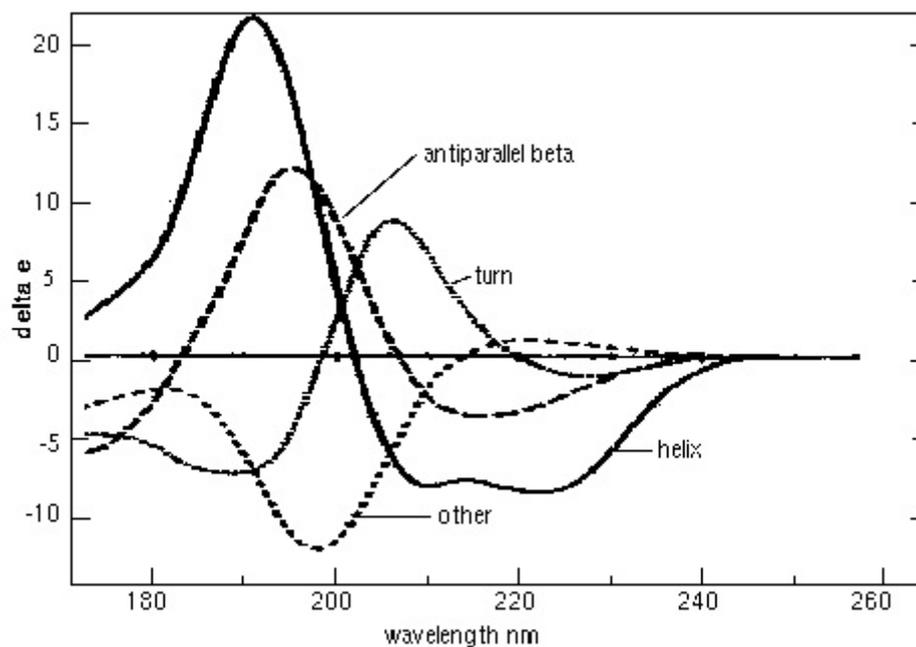


Figura 23 Spettri CD di peptidi rappresentativi.

In particolare, peptidi che si strutturano ad  $\alpha$ -elica presentano due minimi negativi a 222 e 208 nm con valori positivi tra 200 e 190 nm, mentre molecole che assumono una conformazione  $\beta$ -sheet presentano un minimo negativo intorno a 216 nm. Peptidi non strutturati, invece, presentano un tipico spettro CD con minimo intorno a 195 nm.

I risultati ottenuti mediante questa tecnica conferiscono informazioni sulle percentuali di strutture secondarie presenti nei polipeptidi. Anche se non è possibile stabilire la posizione nella sequenza, per cui sono scarsamente utili ai fini del calcolo strutturale,

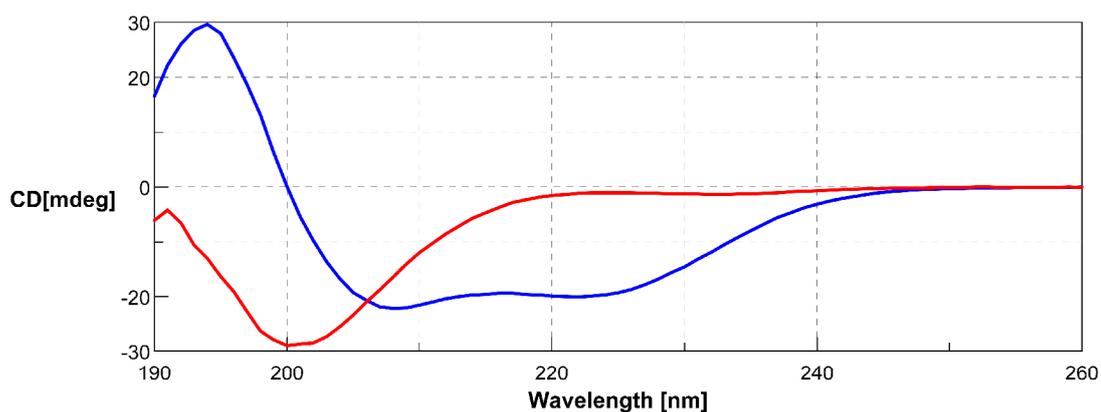
possono essere utilizzati per uno screening iniziale per la scelta del sistema solvente nell'analisi NMR e come controllo dei risultati ottenuti dal calcolo strutturale.

## 5.2 *Analisi conformazionale mediante dicroismo circolare dei peptidi sintetizzati*

Gli studi conformazionali sono stati eseguiti dal gruppo di ricerca del Prof. Carotenuto, presso il Dipartimento di Chimica Farmaceutica e Tossicologica dell'Università degli Studi di Napoli Federico II.

Gli esperimenti CD sono stati eseguiti per valutare la conformazione dei polipeptidi sintetizzati. A questo scopo gli esperimenti sono stati condotti dapprima in sola acqua, poi in una soluzione 1:1 di acqua/esafluoroacetone.

Gli alcoli ed i fluoroalcoli (TFE, HFA), infatti, sono noti per la loro capacità di indurre strutture secondarie in peptidi.



**Figura 24** CPp: CD in H<sub>2</sub>O (rosso) ed H<sub>2</sub>O/HFA 1/1 (blu) a 5°C.

Il CD relativo a C<sub>Pp</sub> presenta il tipico aspetto dei polipeptidi strutturati ad  $\alpha$ -elica con due bande negative rispettivamente a circa 208 nm e circa 222 nm ed una banda positiva a 198 nm.

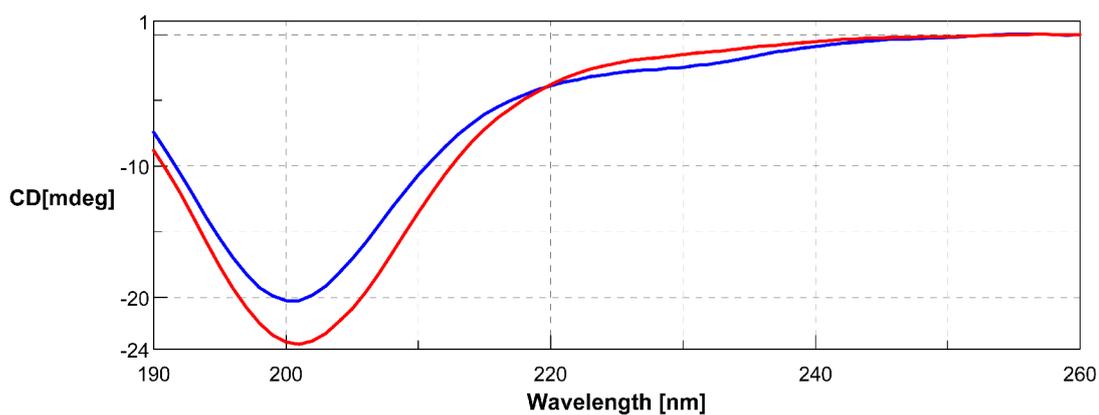


Figura 25 Ac-KA6-NH<sub>2</sub>: CD in H<sub>2</sub>O (rosso) ed H<sub>2</sub>O/HFA 1/1 (blu) a 5°C.

Ac-KA6-NH<sub>2</sub> presenta curve paragonabili in entrambi i solventi adoperati e non si struttura in maniera netta.

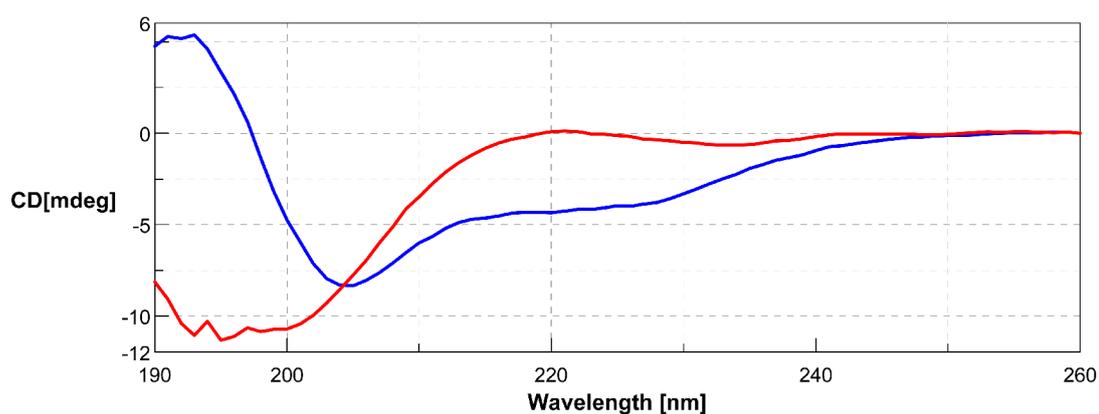


Figura 26 Ac-144-158-CPp: CD in H<sub>2</sub>O (rosso) ed H<sub>2</sub>O/HFA 1/1 (blu) a 5°C.

Nel caso di Ac-144-158-CPp, l'andamento dello spettro di assorbanza in H<sub>2</sub>O è tipico di una struttura *random coil*, quello in H<sub>2</sub>O/HFA 1/1 risulta essere leggermente più strutturato quasi a ricalcare l'andamento di un' $\alpha$ -elica.

A seguito dell'esame dei dati ottenuti mediante dicroismo circolare del CPp e delle due sub-regioni, l'attenzione è stata incentrata sull'esame della struttura secondaria assunta dai due polipeptidi: CPpE138 (figura 27) e CPpSP138 (figura 28) L'introduzione della carica negativa, infatti, può avere una ripercussione sulla strutturazione dell' $\alpha$ -elica osservata nel caso del CPp.

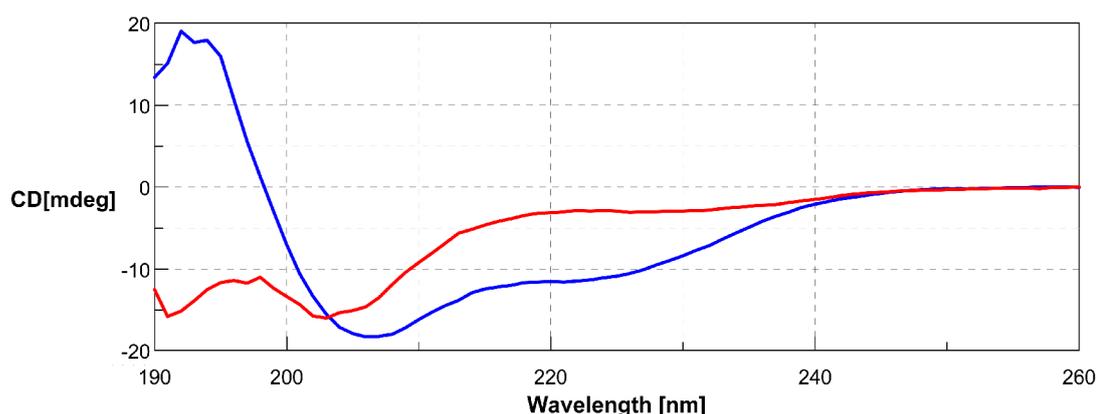


Figura 27 CPpE138: CD in H<sub>2</sub>O (rosso) ed H<sub>2</sub>O/HFA 1/1 (blu) a 5°C.

Il CPpE138 presenta in acqua un andamento della curva di tipo *random coil*. Nella soluzione con HFA si osserva una leggera strutturazione ad  $\alpha$ -elica con due bande negative rispettivamente a circa 208 nm e circa 222 nm ed una banda positiva a 198 nm.

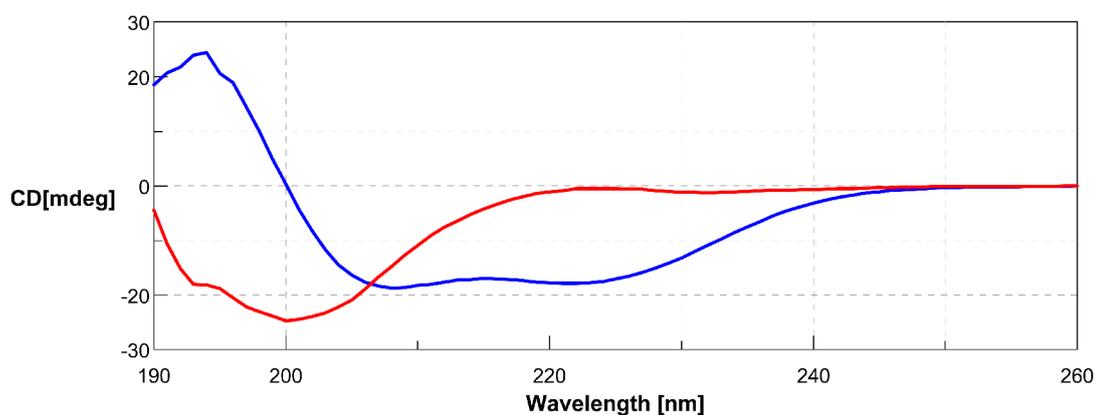


Figura 28 CPpSP138: CD in H<sub>2</sub>O (rosso) ed H<sub>2</sub>O/HFA 1/1 (blu) a 5°C.

Il CPpSP138 in acqua risulta essere sempre non strutturato. Nella soluzione H<sub>2</sub>O/HFA 1/1 l'andamento della curva è assimilabile a quello di un' $\alpha$ -elica contrariamente a quanto atteso sulla base del risultato ottenuto con CPpE138.

I dati relativi al CD sono stati elaborati anche attraverso metodi di calcolo per ottenere le percentuali relative di struttura secondaria per i peptidi sintetizzati. In particolare si è rivelato utile il metodo K2D2. Si tratta di un metodo per stimare la struttura secondaria delle proteine a partire dagli spettri del dicroismo circolare. Esso usa una *self-organized map* (SOM) di spettri CD relativi a proteine a struttura nota, le predizioni di struttura per nuovi peptidi, quindi, sono ottenute sulla base del confronto con le strutture note [Perez-Iratxeta et al., 2008; Andrade et al., 1993].

Le percentuali di  $\alpha$ -elica, di  $\beta$ -turn e di *random coil* sono state calcolate soltanto sulla base degli esperimenti condotti in H<sub>2</sub>O/HFA 1/1 a 5°C. In queste condizioni, infatti, è stata ottenuta una migliore strutturazione di tutte le molecole. Le percentuali relative ai peptidi sottoposti esperimenti di dicroismo circolare sono riportate in tabella 4.

Peptide	K2D2 (190-240 nm)		
	% Helix	% Beta	% Random
<b>CPp</b>	<b>87,59</b>	<b>0,48</b>	<b>11,93</b>
<b>Ac-KA6-NH<sub>2</sub></b>	<b>8,02</b>	<b>22,14</b>	<b>69,66</b>
<b>Ac-144-158-CPp</b>	<b>18,80</b>	<b>26,57</b>	<b>54,63</b>
<b>CPpE138</b>	<b>77,73</b>	<b>0,72</b>	<b>21,55</b>
<b>CPpSP138</b>	<b>80,24</b>	<b>0,62</b>	<b>19,14</b>

Tabella 4 Percentuali di  $\alpha$ -elica, di  $\beta$ -turn e di *random coil* calcolate con K2D2 in base agli spettri in H<sub>2</sub>O/HFA 1/1 a 5°C.

I dati percentuali ottenuti dal calcolo effettuato sono conformi con la strutturazione osservata nei vari esperimenti di dicroismo circolare.

Il CPp presenta una percentuale di 87,59% di  $\alpha$ -elica, mentre le due sub-regioni appaiono meno strutturate presentando percentuali di 8,02% e 18,80% rispettivamente per l'Ac-KA6-NH<sub>2</sub> e per l'Ac-144-158-CPp. L'Ac-KA6-NH<sub>2</sub>, infatti, mostra una scarsa strutturazione (cfr. figura 25) conformemente alla percentuale 69,66% di *random coil* ottenuta mediante calcolo con K2D2.

Per quanto concerne i due peptidi CPpE138 e CPpSP138, le due percentuali di  $\alpha$ -elica hanno valori paragonabili, anche se l'elica del secondo composto risulta più marcata.

### 5.3 *Analisi conformazionale di molecole di interesse biologico mediante NMR*

Il primo passo nello studio strutturale di qualsiasi molecola mediante NMR è quello di assegnare tutte le risonanze relative ai protoni ed, eventualmente, altri nuclei dotati di momento magnetico. Il principale metodo di assegnazione delle risonanze protoniche di peptidi e proteine è quello denominato “sequenziale. Questo metodo utilizzato per la prima volta nello studio della BPTI [Wüthrich et al., 1983], è basato sull'utilizzo di due tipi di esperimenti:

- 1) esperimenti che danno informazioni sulle relazioni lungo i legami.
- 2) esperimenti che danno informazioni sulle relazioni attraverso lo spazio.

Per l'assegnazione del tipo di residuo si utilizzano soprattutto esperimenti di correlazione: COSY [Bax et al., 1985], DQF-COSY [Bax et al., 1985], TOCSY [Jenner et al., 1979] etc. Questi esperimenti permettono di raggruppare le risonanze che appartengono ai singoli aminoacidi, poiché vengono mostrate solo le relazioni intraresiduo, così come permettono di identificare le classi di spin degli aminoacidi cui appartengono. Gli aminoacidi Gly, Ala, Thr, Leu, Ile e Val si considerano a sistema di spin unico, di conseguenza la loro identificazione è abbastanza immediata; Asp, Asn e Cys, insieme ai protoni alifatici di His, Phe, Tyr, e Trp appartengono tutti alla classe del sistema di spin AMX (cioè un protone  $H_\alpha$  e due protoni  $H_\beta$ ); poi si considera il gruppo di Glu, Gln, Met e quello dei sistemi di spin a catena lunga che comprendono Arg, Lys e

Pro. Il più semplice esperimento di correlazione è l'esperimento COSY (spettroscopia di correlazione omonucleare bidimensionale), descritto per la prima volta nel 1976, che mostra solo le correlazioni dirette attraverso i legami. Così, per un residuo avente come protoni NH, H<sub>α</sub>, H<sub>β</sub> e H<sub>γ</sub>, sono presenti correlazioni solo fra l'NH e l'H<sub>α</sub>, l'H<sub>α</sub> ed il H<sub>β</sub>, e tra il H<sub>β</sub> ed il H<sub>γ</sub>. Questo esperimento di base è ora stato superato da esperimenti molto più sofisticati, come ad esempio il DQF-COSY (spettroscopia di correlazione omonucleare bidimensionale con filtro a doppio quanto), che ha il vantaggio di mostrare le diagonali in puro assorbimento di fase. Presi da soli, questi esperimenti che mostrano solo le correlazioni dirette attraverso i legami, sono di utilità limitata, a causa dei problemi di sovrapposizione spettrale; tale sovrapposizione aumenta procedendo dalla regione degli NH e degli H<sub>α</sub> alle catene laterali. Per questo motivo risultano molto utili quegli esperimenti che mostrano anche le correlazioni indirette o relayed, cioè trasmesse in più stadi attraverso i legami, come gli esperimenti COSY-RELAYED o TOCSY. Quest'ultimo esperimento è particolarmente utile in quanto, aggiustando il parametro del tempo di miscelamento, è possibile ottenere, a scelta, correlazioni dirette o a relay singolo, doppio o multiplo; inoltre nel TOCSY le componenti dei multipletti dei *cross-peaks* sono tutte in fase, hanno cioè lo stesso segno, mentre in esperimenti di tipo COSY sono in antifase. Questo comporta che l'esperimento di tipo TOCSY sia notevolmente più sensibile ed offra anche una risoluzione migliore rispetto agli esperimenti di tipo COSY. Una volta identificati i sistemi di spin, si può procedere sistematicamente nella ricerca dei contatti sequenziali tra sistemi di spin vicini. Tali informazioni si ottengono dall'analisi delle regioni degli spettri NOESY [Karplus, 1959] contenenti i *cross-peaks*:

NH-NH, NH-H<sub>α</sub>, NH-H<sub>β</sub>. In pratica si ha bisogno sia del NOESY che del COSY, è necessario, infatti, collegare continuamente le informazioni sulle relazioni attraverso i legami e quelle attraverso lo spazio.

Combinando gli spettri NOESY e COSY, data la simmetria dei due spettri rispetto alla diagonale è possibile riportarli in un unico diagramma come due matrici triangolari. Partendo da una risonanza NH dello spettro COSY è possibile individuare il picco H<sub>α</sub> corrispondente, appartenente allo stesso residuo; alla frequenza di questo H<sub>α</sub> nello spettro NOESY si troverà quasi certamente un picco NH che corrisponde al residuo successivo. Questi due nuclei, infatti, si trovano generalmente abbastanza vicini nello spazio; in particolare la loro separazione spaziale dipende in modo dettagliato dalla struttura secondaria, ed è minima in tratti di struttura di tipo β ma possiamo avere effetti di una certa intensità anche per altre situazioni conformazionali. Continuando a passare dal NOESY al COSY si possono individuare tutti i residui successivi, per lo meno fino ad incontrare una prolina. Anche in questo caso in realtà si può supplire alla mancanza della risonanza NH sfruttando la vicinanza tra protoni δ dell'anello prolinico e l'H<sub>α</sub> del residuo precedente.

Gli effetti Overhauser (NOE) dovuti a distanze H<sub>α</sub>-NH, sono utili soprattutto per l'assegnazione sequenziale di tratti di *β-sheets*; nel caso di tratti elicoidali sono più intensi e più utili diagnosticamente gli effetti derivanti da distanze corte NH-NH.

#### 5.4 Risultati NMR

Gli esperimenti di NMR sono stati eseguiti dal gruppo di ricerca del Prof. Carotenuto, presso il Dipartimento di Chimica Farmaceutica e Tossicologica dell'Università degli Studi di Napoli Federico II.

Gli esperimenti relativi ai peptidi Cpp, CppE138 e CppSP138 sono stati effettuati in H<sub>2</sub>O, prima a 25°C, in seguito a 5°C al fine di ottenere una minore flessibilità conformazionale. Gli spettri sono stati anche effettuati in soluzione H<sub>2</sub>O/HFA 1:1 a 25°C. Purtroppo, gli spettri NMR effettuati in quest'ultima soluzione dei tre peptidi risultano difficilmente interpretabili a causa dello slargamento della maggior parte dei segnali dei protoni amidici.

Le assegnazioni dei *chemical shifts* protonici ottenute in H<sub>2</sub>O sono riportate nelle Tabelle successive. Le tabelle 5, 8, 11 riportano i coefficienti di temperatura dei protoni amidici ( $\Delta\delta/\Delta t$ ). In generale, è possibile affermare che bassi coefficienti di temperatura ( $|\Delta\delta/\Delta t| < 0.003$  ppm/K) indicano una minore esposizione degli NH del backbone al solvente. Ciò comporta che quel protone è probabilmente impegnato nella formazione di legami ad idrogeno intramolecolari e quindi, una maggiore stabilizzazione delle strutture secondarie.

Altro parametro considerato è stato il  $\Delta\delta H\alpha$  cioè la variazione del *chemical shift* del protone alfa in confronto a valori tabulati di peptidi random coil. Tale variazione pure è indicativa della presenza di strutture secondarie.

Tabella 5 Coefficienti di temperatura e variazioni di *chemical shifts*  $H\alpha$  di Cpp in  $H_2O$  a  $5^\circ C$  e  $25^\circ C$ .

N	aa	$H\alpha$ $5^\circ C$	$\Delta\delta H\alpha$	$H\alpha$ $25^\circ C$	$\Delta\delta H\alpha$	$\Delta\delta/\Delta T$ ppm/K
1	K	4,04	-0,02	4,01	-0,05	-
2	K	4,65	0,04	4,63	0,02	-0,005
3	P	4,50	0,07	4,47	0,04	-
4	S	4,46	-0,01	4,44	-0,03	-0,008
5	S	4,79	0,04	4,77	0,01	-0,007
6	P	4,72	0	4,69	-0,03	-
7	P	4,40	-0,03	4,39	-0,04	-
8	E	4,20	-0,12	4,31	-0,01	-0,013
9	E	4,25	-0,07	4,33	0,01	-0,010
10	L	4,28	-0,04	4,27	-0,05	-0,007
11	K	4,23	-0,09	4,21	-0,11	-0,006
12	F	4,61	0	4,62	0,01	-0,008
13	Q	4,32	-0,02	4,32	-0,02	-0,006
14	C	4,45	-0,12	4,44	-0,13	-0,007
15	G	3,98	0,02	3,95	-0,01	-0,007
16	Q	4,31	-0,03	4,27	-0,07	-0,005
17	K	4,35	0,03	4,33	0,01	-0,004
18	T	4,30	-0,07	4,28	-0,09	-0,006
19	L	4,38	0,06	4,35	0,03	-0,009
20	R	4,63	0	4,61	-0,02	-0,008
21	P	4,36	-0,07	4,34	-0,11	-
22	R	4,22	-0,12	4,19	-0,15	-0,007
23	F	4,66	0,05	4,67	0,06	-0,009
24	K	4,12	-0,03	4,17	0,02	0,006

Tabella 6 Assegnazione dei *chemical shifts* H N,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$  di CPp in H<sub>2</sub>O a 5°C.

N	$\alpha\alpha$	HN 5°C	H $\alpha$ 5°C	H $\beta$ 5°C	ALTRI
1	K	-	4,04	1,91	1,45( $\gamma$ ); 1,72( $\delta$ ); 3,02( $\epsilon$ )
2	K	8,91	4,65	1,85	1,53( $\gamma$ ); 1,78( $\delta$ ); 3,04( $\epsilon$ )
3	P		4,50	1,97-2,37	2,07( $\gamma$ ); 3,69-3,90( $\delta$ )
4	S	8,64	4,46	3,89	-
5	S	8,45	4,79	3,78-3,89	-
6	P	-	4,72	1,94-2,39	2,05( $\gamma$ ); 3,69-3,87( $\delta$ )
7	P	-	4,40	1,94-2,33	2,06( $\gamma$ ); 3,68-3,83( $\delta$ )
8	E	8,70	4,20	1,96-2,03	2,32( $\gamma$ )
9	E	8,56	4,25	1,96-2,05	2,30( $\gamma$ )
10	L	8,33	4,28	1,64	1,53( $\gamma$ ); 0,87-0,94( $\delta$ )
11	K	8,27	4,23	1,69	1,26( $\gamma$ ); 1,30( $\gamma$ ); 2,94( $\epsilon$ )
12	F	8,27	4,61	3,05-3,15	-
13	Q	8,38	4,32	1,97-2,09	2,36( $\gamma$ )
14	C	8,53	4,45	3,11	-
15	G	8,65	3,98	-	-
16	Q	8,32	4,31	1,98-2,10	2,33( $\gamma$ )
17	K	8,58	4,35	1,85	1,46( $\gamma$ ); 1,76( $\delta$ ); 2,99( $\epsilon$ )
18	T	8,23	4,30	4,15	1,19( $\gamma$ )
19	L	8,46	4,38	1,63	1,57( $\gamma$ ); 0,86-0,93( $\delta$ )
20	R	8,47	4,63	1,66-1,83	1,55( $\gamma$ ); 3,22( $\delta$ )
21	P	-	4,36	1,76-2,23	2,00( $\gamma$ ); 3,62-3,79( $\delta$ )
22	R	8,49	4,22	1,57-1,69	1,49( $\gamma$ ); 3,15( $\delta$ )
23	F	8,37	4,66	3,03-3,20	-
24	K	7,93	4,12	1,78	1,36( $\gamma$ ); 1,71( $\delta$ ); 3,00( $\epsilon$ )

Tabella 7 Assegnazione dei *chemical shifts* H N,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$  di Cpp in H<sub>2</sub>O a 25°C.

N	$\alpha\alpha$	HN 25°C	H $\alpha$ 25°C	H $\beta$ 25°C	ALTRI
1	K	-	4,01	1,88	1,42( $\gamma$ ); 1,68( $\delta$ ); 2,98( $\epsilon$ )
2	K	8,82	4,63	1,80	1,49( $\gamma$ ); 1,69( $\delta$ ); 3,01( $\epsilon$ )
3	P	-	4,47	1,95-2,34	2,03( $\gamma$ ); 3,65-3,86( $\delta$ )
4	S	4,49	4,44	3,86	-
5	S	8,31	4,77	3,76-3,86	-
6	P	-	4,69	1,91-2,37	2,03( $\gamma$ ); 3,66-3,83( $\delta$ )
7	P	-	4,39	1,90-2,29	2,03( $\gamma$ ); 3,64-3,80( $\delta$ )
8	E	8,44	4,31	1,97-2,06	2,44( $\gamma$ )
9	E	8,37	4,33	1,96-2,06	2,41( $\gamma$ )
10	L	8,20	4,27	1,58	1,49( $\gamma$ ); 0,85-0,90( $\delta$ )
11	K	8,15	4,21	1,65	1,26( $\gamma$ ); 1,48( $\gamma$ ); 2,92( $\epsilon$ )
12	F	8,11	4,62	3,01-3,16	-
13	Q	8,27	4,32	1,96-2,06	2,29( $\gamma$ )
14	C	8,38	4,44	2,93	-
15	G	8,52	3,95	-	-
16	Q	8,23	4,27	1,96-2,07	2,32( $\gamma$ )
17	K	8,49	4,33	1,81	1,39( $\gamma$ ); 1,73( $\delta$ ); 2,97( $\epsilon$ )
18	T	8,11	4,28	4,13	1,16( $\gamma$ )
19	L	8,28	4,35	1,60	1,49( $\gamma$ ); 0,83-0,90( $\delta$ )
20	R	8,30	4,61	1,65-1,81	1,55( $\gamma$ ); 3,18( $\delta$ )
21	P	-	4,34	1,74-2,21	1,97( $\gamma$ ); 3,60-3,76( $\delta$ )
22	R	8,35	4,19	1,53-1,68	1,46( $\gamma$ ); 3,12( $\delta$ )
23	F	8,19	4,67	3,01-3,17	-
24	K	8,05	4,17	1,78	1,34( $\gamma$ ); 1,67( $\delta$ ); 2,96( $\epsilon$ )

Tabella 8 Coefficienti di temperatura e variazioni di *chemical shifts*  $H_{\alpha}$  di CPeE138 in  $H_2O$  a  $5^{\circ}C$  e  $25^{\circ}C$ .

N	$\alpha\alpha$	$H_{\alpha}$ $5^{\circ}C$	$\Delta\delta H_{\alpha}$	$H_{\alpha}$ $25^{\circ}C$	$\Delta\delta H_{\alpha}$	$\Delta\delta/\Delta T$ ppm/K
1	K	4,03	-0,03	4,04	-0,02	-
2	K	4,64	0,03	4,64	0,03	-0,005
3	P	4,45	0,02	4,44	0,01	-
4	E	4,31	-0,01	4,32	0	-0,005
5	S	4,74	-0,02	4,75	-0,01	-0,006
6	P	4,72	0	4,72	0	-
7	P	4,38	-0,05	4,38	-0,05	-
8	E	4,16	-0,16	4,16	-0,16	-0,004
9	E	4,20	-0,12	4,20	-0,12	-0,007
10	L	4,24	-0,15	4,23	-0,08	-0,007
11	K	4,14	-0,18	4,14	-0,18	-0,05
12	F	4,57	-0,04	4,59	-0,02	N.D.
13	Q	4,33	-0,01	4,31	-0,03	-0,003
14	C	4,44	-0,25	4,45	-0,12	-0,005
15	G	3,96	0	3,97	0,01	-0,004
16	Q	4,30	-0,04	4,33	-0,01	-0,003
17	K	4,36	0,04	4,34	0,01	-0,008
18	T	4,29	-0,08	4,31	-0,06	-0,010
19	L	4,37	0,05	4,38	0,06	-0,004
20	R	4,62	-0,01	4,62	-0,01	-0,006
21	P	4,36	-0,07	4,36	-0,08	-
22	R	4,22	-0,12	4,22	-0,12	-0,006
23	F	4,66	0,05	4,66	0,05	-0,006
24	K	4,12	-0,03	4,13	-0,02	-0,004

Tabella 9 Assegnazione dei *chemical shifts* H N,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$  di CPpE138 in H<sub>2</sub>O a 5°C.

N	$\alpha\alpha$	HN 5°C	H $\alpha$ 5°C	H $\beta$ 5°C	ALTRI
1	K	-	4,03	1,91	1,46( $\gamma$ ); 1,71( $\delta$ )
2	K	8,90	4,64	1,83	1,51( $\gamma$ ); 1,71( $\delta$ )
3	P	-	4,45	1,93-2,34	2,06( $\gamma$ ); 3,67-3,90( $\delta$ )
4	E	8,70	4,31	1,92-2,09	2,31( $\gamma$ )
5	S	8,61	4,74	3,76-3,89	-
6	P	-	4,72	1,95-2,38	2,06( $\gamma$ ); 3,69-3,87( $\delta$ )
7	P	-	4,38	1,94-2,35	2,07( $\gamma$ ); 3,70-3,87( $\delta$ )
8	E	8,85	4,16	2,00	2,30( $\gamma$ )
9	E	8,56	4,20	1,99-2,06	2,32( $\gamma$ )
10	L	8,13	4,24	1,67	1,57( $\gamma$ ); 0,87-0,92( $\delta$ )
11	K	8,03	4,14	1,76	1,22( $\gamma$ ); 1,67( $\gamma$ ); 2,99( $\epsilon$ )
12	F	N.D.	4,57	2,99-3,22	-
13	Q	8,31	4,33	1,99-2,11	2,38( $\gamma$ )
14	C	8,60	4,44	3,03	-
15	G	8,56	3,96	-	-
16	Q	8,25	4,30	1,97-2,08	2,33( $\gamma$ )
17	K	8,62	4,36	1,77	1,43( $\gamma$ ); 1,69( $\delta$ ); 2,98( $\epsilon$ )
18	T	8,32	4,29	4,14	1,20( $\gamma$ )
19	L	8,44	4,37	1,64	1,56( $\gamma$ ); 0,86-0,92( $\delta$ )
20	R	8,48	4,62	1,71-1,83	1,63( $\gamma$ ); 3,20( $\delta$ )
21	P	-	4,36	1,76-2,24	2,01( $\gamma$ ); 3,62-3,80( $\delta$ )
22	R	8,50	4,22	1,57-1,70	1,48( $\gamma$ ); 3,16( $\delta$ )
23	F	8,38	4,66	3,02-3,20	-
24	K	7,93	4,12	1,78	1,35( $\gamma$ ); 1,70( $\delta$ ); 2,99( $\epsilon$ )

Tabella 10 Assegnazione dei *chemical shifts* H N,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$  di CPpE138 in H<sub>2</sub>O a 25°C.

N	$\alpha\alpha$	HN 25°C	H $\alpha$ 25°C	H $\beta$ 25°C	ALTRI
1	K	-	4,04	1,90	1,46( $\gamma$ ); 1,71( $\delta$ )
2	K	8,81	4,64	1,78	1,51( $\gamma$ ); 1,71( $\delta$ )
3	P	-	4,44	1,93-2,33	2,06( $\gamma$ ); 3,67-3,89( $\delta$ )
4	E	8,60	4,32	1,92-2,06	2,32( $\gamma$ )
5	S	8,48	4,75	3,76-3,87	-
6	P	-	4,72	1,95-2,38	2,06( $\gamma$ ); 3,69-3,87( $\delta$ )
7	P	-	4,38	1,94-2,35	2,07( $\gamma$ ); 3,71-3,85( $\delta$ )
8	E	8,76	4,16	2,03	2,31( $\gamma$ )
9	E	8,42	4,20	1,98-2,05	2,62( $\gamma$ )
10	L	7,99	4,23	1,63	1,54( $\gamma$ ); 0,86-0,90( $\delta$ )
11	K	7,94	4,14	1,66	1,22( $\gamma$ ); 1,28( $\gamma$ ); 3,00( $\epsilon$ )
12	F	N.D.	4,59	3,04-3,16	-
13	Q	8,25	4,31	1,99-2,08	2,33( $\gamma$ )
14	C	8,50	4,45	2,93	-
15	G	8,47	3,97	-	-
16	Q	8,20	4,33	1,97-2,08	2,33( $\gamma$ )
17	K	8,46	4,34	1,83	1,46( $\gamma$ ); 1,72( $\delta$ ); 2,98( $\epsilon$ )
18	T	8,13	4,31	4,15	1,18( $\gamma$ )
19	L	8,35	4,38	1,67	1,58( $\gamma$ ); 0,85-0,92( $\delta$ )
20	R	8,35	4,62	1,69-1,83	1,63( $\gamma$ ); 3,21( $\delta$ )
21	P	-	4,36	1,76-2,23	1,97( $\gamma$ ); 3,61-3,79( $\delta$ )
22	R	8,38	4,22	1,57-1,69	1,48( $\gamma$ ); 3,15( $\delta$ )
23	F	8,27	4,66	3,02-3,20	-
24	K	7,85	4,13	1,78	1,34( $\gamma$ ); 1,70( $\delta$ ); 2,99( $\epsilon$ )

Tabella 11 Coefficienti di temperatura e variazioni di *chemical shifts*  $H_{\alpha}$  di CPpSP138 in  $H_2O$  a  $5^{\circ}C$  e  $25^{\circ}C$ .

N	aa	$H_{\alpha}$ $5^{\circ}C$	$\Delta\delta H_{\alpha}$	$H_{\alpha}$ $25^{\circ}C$	$\Delta\delta H_{\alpha}$	$\Delta\delta/\Delta T$ ppm/K
1	K	4,04	-0,02	4,04	-0,02	-
2	K	4,65	0,04	4,64	0,03	-0,006
3	P	4,47	0,04	4,46	0,03	-
4	S( $PO_3H_2$ )	4,54	0,07	4,55	0,08	-0,012
5	S	4,78	0,02	4,78	0,02	0,005
6	P	4,72	0	4,72	0	-
7	P	4,40	-0,03	4,40	-0,03	-
8	E	4,19	-0,13	4,19	-0,13	-0,006
9	E	4,25	-0,07	4,25	-0,07	-0,005
10	L	4,29	-0,03	4,28	-0,04	-0,007
11	K	4,21	-0,11	4,20	-0,12	-0,007
12	F	4,61	0	4,62	0,01	-0,014
13	Q	4,33	-0,01	4,33	-0,01	-0,004
14	C	4,44	-0,25	4,45	-0,12	-0,007
15	G	3,93-3,98	-0,01	3,95	-0,01	-0,007
16	Q	4,31	-0,03	4,31	-0,03	-0,005
17	K	4,33	0,01	4,33	0,01	-0,008
18	T	4,29	-0,08	4,29	-0,08	-0,006
19	L	4,37	0,05	4,37	0,05	-0,007
20	R	4,62	-0,01	4,61	-0,02	-0,007
21	P	4,36	-0,07	4,35	-0,08	-
22	R	4,21	-0,13	4,21	-0,13	-0,007
23	F	4,66	0,05	4,65	0,04	-0,007
24	K	4,12	-0,03	4,12	-0,03	-0,005

Tabella 12 Assegnazione dei *chemical shifts* H N,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$  di CPpSP138 in H<sub>2</sub>O a 5°C.

N	$\alpha\alpha$	HN 5°C	H $\alpha$ 5°C	H $\beta$ 5°C	ALTRI
1	K	-	4,04	1,88-1,94	1,38-1,48( $\gamma$ ); 1,70( $\delta$ ); 3,01( $\epsilon$ )
2	K	8,95	4,65	1,79-1,84	1,52( $\gamma$ ); 1,71( $\delta$ ); 3,01( $\epsilon$ )
3	P	-	4,47	1,94-2,37	2,07-2,11( $\gamma$ ); 3,67-3,93( $\delta$ )
4	S(PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub> )	9,14	4,54	4,04-4,09	-
5	S	8,03	4,78	3,77-3,89	-
6	P	-	4,72	1,94-2,38	2,05( $\gamma$ ); 3,69-3,85( $\delta$ )
7	P	-	4,40	1,94-2,33	2,06( $\gamma$ ); 3,68-3,83( $\delta$ )
8	E	8,77	4,19	1,96-2,02	2,29( $\gamma$ )
9	E	8,60	4,25	1,96-2,05	2,28( $\gamma$ )
10	L	8,32	4,29	1,63	1,51( $\gamma$ ); 0,87-0,94( $\delta$ )
11	K	8,26	4,21	1,65	1,22( $\gamma$ ); 1,27( $\gamma$ ); 2,91( $\epsilon$ )
12	F	8,23	4,61	3,00-3,12	-
13	Q	8,35	4,33	1,95-2,08	2,30( $\gamma$ )
14	C	8,68	4,44	3,11	-
15	G	8,68	3,93-3,98	-	-
16	Q	8,32	4,31	1,98-2,10	2,33( $\gamma$ )
17	K	8,65	4,33	1,83	1,45( $\gamma$ ); 1,76( $\delta$ ); 2,99( $\epsilon$ )
18	T	8,26	4,29	4,14	1,20( $\gamma$ )
19	L	8,50	4,37	1,63	1,56( $\gamma$ ); 0,86-0,92( $\delta$ )
20	R	8,49	4,62	1,67-1,83	1,55( $\gamma$ ); 3,22( $\delta$ )
21	P	-	4,36	1,76-2,23	2,00( $\gamma$ ); 3,62-3,80( $\delta$ )
22	R	8,51	4,21	1,57-1,69	1,48( $\gamma$ ); 3,15( $\delta$ )
23	F	8,40	4,66	3,03-3,20	-
24	K	7,94	4,12	1,78	1,35( $\gamma$ ); 1,71( $\delta$ ); 2,99( $\epsilon$ )

Tabella 13 Assegnazione dei *chemical shifts* H N,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$  di CPpSP138 in H<sub>2</sub>O a 25°C.

N	aa	HN 25°C	H $\alpha$ 25°C	H $\beta$ 25°C	ALTRI
1	K	-	4,04	1,90	1,38-1,47( $\gamma$ ); 1,70( $\delta$ ); 3,01( $\epsilon$ )
2	K	8,33	4,64	1,77-1,85	1,50( $\gamma$ ); 1,71( $\delta$ ); 3,02( $\epsilon$ )
3	P	-	4,46	1,95-2,36	2,05-2,09( $\gamma$ ); 3,67-3,91( $\delta$ )
4	S(PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub> )	8,89	4,55	4,10	-
5	S	8,40	4,78	3,77-3,88	-
6	P	-	4,72	1,92-2,37	2,04( $\gamma$ ); 3,68-3,85( $\delta$ )
7	P	-	4,40	1,93-2,32	2,05( $\gamma$ ); 3,67-3,83( $\delta$ )
8	E	8,64	4,19	1,95-2,02	2,30( $\gamma$ )
9	E	8,49	4,25	1,96-2,04	2,25( $\gamma$ )
10	L	8,18	4,28	1,61	1,52( $\gamma$ ); 0,86-0,92( $\delta$ )
11	K	8,12	4,20	1,63	1,20( $\gamma$ ); 1,25( $\gamma$ ); 2,90( $\epsilon$ )
12	F	8,09	4,62	2,99-3,12	-
13	Q	8,26	4,33	1,59-2,08	2,30( $\gamma$ )
14	C	8,54	4,44	2,93	-
15	G	8,54	3,95	-	-
16	Q	8,22	4,31	1,97-2,10	2,33( $\gamma$ )
17	K	8,49	4,33	1,75-1,84	1,38-1,45( $\gamma$ ); 1,67( $\delta$ ); 2,96( $\epsilon$ )
18	T	8,14	4,29	4,14	1,18( $\gamma$ )
19	L	8,36	4,37	1,61	1,54( $\gamma$ ); 0,85-0,91( $\delta$ )
20	R	8,35	4,61	1,71-1,82	1,47( $\gamma$ ); 3,19( $\delta$ )
21	P	-	4,35	1,75-2,23	2,00( $\gamma$ ); 3,61-3,78( $\delta$ )
22	R	8,38	4,21	1,55-1,68	1,47( $\gamma$ ); 3,14( $\delta$ )
23	F	8,26	4,65	3,03-3,19	-
24	K	7,85	4,12	1,77	1,33( $\gamma$ ); 1,68( $\delta$ ); 2,98( $\epsilon$ )

I valori di  $\Delta\delta H\alpha$  riportati nelle tabelle 5, 8 e 11 sono indicativi di strutture  $\alpha$ -elica nel tratto di peptide che va dal residuo 7 al 12, ad entrambe le temperature considerate. Questi dati confermano quanto già osservato per gli esperimenti di dicroismo circolare. Gli elevati coefficienti di temperatura ottenuti e la mancanza di NOE diagnostici indicano che anche nella regione maggiormente strutturata, predomina una situazione disordinata.

Per quanto concerne le due subregioni del CPP, esse risultano essere poco strutturate già dagli esperimenti CD sia in acqua che HFA. Nel caso dell'NMR gli spettri sono stati acquisiti in H<sub>2</sub>O a 5°C e in soluzione H<sub>2</sub>O/HFA 1:1 a 25°C.

L'utilizzo della miscela H<sub>2</sub>O/HFA 1:1 servirebbe ad indurre una maggiore strutturazione (tabelle 6 e 7). Come si può osservare dai valori di  $\Delta\delta H\alpha$ , entrambi i peptidi non sono strutturati in nessuna delle due soluzioni utilizzate. Anche in questo caso i dati sono coerenti con quanto osservato mediante CD. Evidentemente il taglio tra i residui 9-10 elimina la tendenza del peptide intero a formare un elica nelle regione centrale.

Tabella 14 Assegnazione degli  $H\alpha$  e  $\Delta\delta H\alpha$  di Ac-KA6-NH<sub>2</sub> in H<sub>2</sub>O a 5°C e H<sub>2</sub>O/HFA a 25°C.

N	aa	$H\alpha$ H <sub>2</sub> O 5°C	$\Delta\delta H\alpha$	$H\alpha$ HFA 25°C	$\Delta\delta H\alpha$
1	K	4,25	-0,07	4,33	0,01
2	K	4,62	0,01	4,67	0,06
3	P	4,47	0,04	4,5	0,07
4	S	4,44	-0,03	4,52	0,05
5	S	4,78	0,02	4,84	0,08
6	P	4,72	0	4,68	-0,04
7	P	4,41	-0,02	4,45	0,02
8	E	4,25	-0,07	4,35	0,03
9	E	4,25	-0,07	4,37	0,05

Tabella 15 Assegnazione dei *chemical shifts* H N,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$  di Ac-KA6-NH<sub>2</sub> in H<sub>2</sub>O a 5°C.

N	aa	HN 5°C	$H\alpha$ 5°C	$H\beta$ 5°C	ALTRI
1	K	8,38	4,25	1,76	1,43( $\gamma$ ); 1,69( $\delta$ ); 2,99( $\epsilon$ ); 7,60( $\zeta$ )
2	K	8,63	4,62	1,84	1,50( $\gamma$ ); 1,75( $\delta$ ); 3,01( $\epsilon$ )
3	P	-	4,47	1,96-2,35	2,05( $\gamma$ ); 3,68-3,87( $\delta$ )
4	S	8,58	4,44	3,89	-
5	S	8,40	4,78	3,78-3,90	-
6	P	-	4,72	1,94-2,38	2,05( $\gamma$ ); 3,69-3,86( $\delta$ )
7	P	-	4,41	1,93-2,33	2,05( $\gamma$ ); 3,69-3,82( $\delta$ )
8	E	8,74	4,25	1,95-2,06	2,31( $\gamma$ )
9	E	8,51	4,25	1,94-2,07	2,29( $\gamma$ )

Tabella 16 Assegnazione dei *chemical shifts* H N,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$  di Ac-KA6-NH<sub>2</sub> in H<sub>2</sub>O/HFA a 25°C.

N	$\alpha\alpha$	HN HFA 25°C	H $\alpha$ HFA 25°C	H $\beta$ HFA 25°C	ALTRI
1	K	7,71	4,33	1,70-1,80	1,44( $\gamma$ ); 1,71( $\delta$ ); 3,02( $\epsilon$ )
2	K	7,98	4,67	1,75-1,86	1,50( $\gamma$ ); 1,73( $\delta$ ); 3,04( $\epsilon$ ); 7,51( $\zeta$ )
3	P	-	4,50	2,03-2,37	2,09( $\gamma$ ); 3,64-3,84( $\delta$ )
4	S	8,12	4,52	3,94	-
5	S	7,97	4,84	3,91	-
6	P	-	4,68	1,98-2,39	2,11( $\gamma$ ); 3,71-3,84( $\delta$ )
7	P	-	4,45	1,97-2,31	2,07( $\gamma$ ); 3,68-3,79( $\delta$ )
8	E	8,08	4,35	2,02-2,17	2,53( $\gamma$ )
9	E	8,04	4,37	2,00-2,19	2,49( $\gamma$ )

Tabella 17 Assegnazione degli  $H\alpha$  e  $\Delta\delta H\alpha$  di Ac-144-158-CPp in  $H_2O$  a  $5^\circ C$  e  $H_2O/HFA$  a  $25^\circ C$ .

N	aa	$H\alpha$ $H_2O$ $5^\circ C$	$\Delta\delta H\alpha$	$H\alpha$ $HFA$ $25^\circ C$	$\Delta\delta H\alpha$
10	L	4,22	-0,10	4,18	-0,09
11	K	4,26	-0,06	4,35	0,03
12	F	4,60	-0,01	4,62	-0,01
13	Q	4,32	-0,02	4,30	-0,04
14	C	4,45	-0,12	4,43	-0,14
15	G	3,97	0,01	3,97	0,01
16	Q	4,31	-0,03	4,26	-0,08
17	K	4,34	0,02	4,37	0,05
18	T	4,28	-0,09	4,34	-0,07
19	L	4,36	0,04	4,39	0,08
20	R	4,61	-0,02	4,63	-0,01
21	P	4,35	-0,08	4,37	-0,06
22	R	4,21	-0,13	4,3	-0,04
23	F	4,64	0,03	4,69	0,08
24	K	4,11	-0,21	4,26	-0,02

Tabella 18 Assegnazione dei *chemical shifts* H N,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$  di Ac-144-158-CPp in H<sub>2</sub>O a 5°C.

N	aa	HN H <sub>2</sub> O 5°C	H $\alpha$ H <sub>2</sub> O 5°C	H $\beta$ H <sub>2</sub> O 5°C	ALTRI
10	L	8,34	4,22	1,57-1,63	1,46( $\gamma$ ); 0,86-0,93( $\delta$ )
11	K	8,41	4,26	-	1,26-1,32( $\gamma$ ); 1,66( $\gamma$ )
12	F	8,29	4,60	3,02-3,12	7,23( $\epsilon$ )
13	Q	8,37	4,32	1,93-2,06	2,29( $\gamma$ ); 7,57( $\epsilon$ )
14	C	8,53	4,45	2,95	-
15	G	8,67	3,97		-
16	Q	8,34	4,31	1,98-2,10	2,34( $\gamma$ ); 7,62-6,95( $\epsilon$ )
17	K	8,59	4,34	1,75-1,83	1,40-1,46( $\gamma$ ); 1,67( $\delta$ ); 2,98( $\epsilon$ ); 7,59( $\zeta$ )
18	T	8,24	4,28	4,13	1,18( $\gamma$ )
19	L	8,46	4,36	1,55-1,62	1,82( $\gamma$ ); 0,85-0,91( $\delta$ )
20	R	8,46	4,61	1,72-1,82	1,65( $\gamma$ ); 3,19( $\delta$ )
21	P	-	4,35	1,75-2,23	1,99( $\gamma$ ); 3,61-3,79( $\delta$ )
22	R	8,47	4,21	1,56-1,69	1,47( $\gamma$ ); 3,14( $\delta$ )
23	F	8,35	4,64	3,01-3,19	7,27( $\delta$ ); 7,35( $\epsilon$ )
24	K	7,92	4,11	1,77	1,33( $\gamma$ ); 1,70( $\delta$ )

Tabella 19 Assegnazione dei *chemical shifts* H N,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$  di Ac-144-158-CPp in H<sub>2</sub>O /HFA 25°C.

N	aa	HN HFA 25°C	H $\alpha$ HFA 25°C	H $\beta$ HFA 25°C	ALTRI
10	L	7,62	4,18	1,56-1,63	1,38( $\gamma$ ); 0,87-0,94( $\delta$ )
11	K	7,81	4,35	1,89	1,24-1,57( $\gamma$ ); 1,75( $\gamma$ )
12	F	7,64	4,62	3,06-3,24	7,23( $\epsilon$ )
13	Q	8,08	4,30	2,09-2,17	2,40( $\gamma$ )
14	C	8,11	4,43	3,01	-
15	G	8,28	3,97	-	-
16	Q	8,09	4,26	2,10-2,17	2,41( $\gamma$ ); 7,60-6,93( $\epsilon$ )
17	K	7,71	4,37	1,73-1,92	1,44( $\gamma$ ); 1,62( $\delta$ ); 3,02( $\epsilon$ ); 7,57( $\zeta$ )
18	T	7,64	4,34	4,13	1,25( $\gamma$ )
19	L	7,75	4,39	1,61-1,71	1,61( $\gamma$ ); 0,88-0,94( $\delta$ )
20	R	7,64	4,63	1,78-1,89	1,71( $\gamma$ ); 3,20( $\delta$ )
21	P	-	4,37	1,73-2,22	2,03( $\gamma$ ); 3,54-3,76( $\delta$ )
22	R	7,72	4,3	1,74-1,77	1,62( $\gamma$ ); 3,15( $\delta$ )
23	F	7,63	4,69	3,04-3,21	7,27( $\delta$ ); 7,35( $\epsilon$ )
24	K	7,71	4,26	1,74-1,92	1,44( $\gamma$ ); 1,61( $\delta$ ); 3,03( $\epsilon$ )

**CAPITOLO VI**

**Conclusioni**

In un precedente lavoro pubblicato con la collaborazione del nostro gruppo di ricerca, è stato dimostrato che uPA promuove riarrangiamenti del citoscheletro e migrazione cellulare direzionale in maniera indipendente dal dominio GFD, attraverso una nuova specifica interazione tra il *Connecting Peptide* (aa. 135-158) e l'integrina  $\alpha_v\beta_5$  espressa sulla superficie cellulare. Questa interazione innesca e potenzia il *signalling* e la migrazione cellulare. Il CPp risulta essere attivo in un *range* di concentrazioni comprese tra 1 e 10 pM. E' interessante evidenziare che gli effetti riscontrati decadono nelle cellule in cui non si ha espressione del recettore uPAR, indicando che quest'ultimo è coinvolto nella trasduzione del segnale mediata dal CPp [Franco et al., 2006].

L'uPA fosforilata o pseudofosforilata inibisce la formazione di protrusioni di F-actina e inibisce fortemente l'invasività in vivo di cellule di carcinoma. Questi effetti sono evidentemente mediati dal legame specifico dell'uPA pseudofosforilata all'integrina  $\alpha_v\beta_5$  proprio attraverso la regione del CP. Tale legame si traduce nel blocco dell'attivazione della trasduzione del segnale dipendente dall'integrina [Vocca et al., 2009].

L'analisi sulla funzionalità del CP è quindi partita dalla "dissezione" della sequenza, al fine di individuare quale fosse la regione responsabile dell'attività regolatoria e quale, quella maggiormente responsabile dell'attività migratoria.

L'analisi dei peptidi derivati dal CP dell'uPA ha rivelato che l'attività chemiotattica di CPp (aa. 135-158) è conservata dalla sua porzione C-terminale, ovvero il peptide Ac-144-158-CPp.

Viceversa, la porzione N-terminale ovvero il peptide Ac-KA6-NH<sub>2</sub>, inibisce la migrazione basale e quella indotta dai meccanismi migratori innescati da Cpp, vitronectina e fibronectina.

Quando i due peptidi sono utilizzati in miscela 1:1, si verifica il prevalere dell'attività stimolatoria per la migrazione, viceversa se la concentrazione dell'N-terminale viene aumentata gradualmente e quella di Ac-144-158-Cpp è mantenuta costante, si verifica una forte diminuzione della percentuale di cellule che migrano.

In virtù dei dati ottenuti, ci si è chiesti se l'interazione dei due composti con la superficie cellulare fosse specifica e se il grado di affinità fosse comparabile a quello del Cpp. I due peptidi Ac-KA6-NH<sub>2</sub> e Ac-144-158-Cpp, pertanto, sono stati utilizzati in saggi di spiazzamento di un peptide radiomarcato che lega l'integrina  $\alpha_v\beta_5$ . I risultati ottenuti hanno dimostrato che i due composti si associano specificamente alla superficie cellulare attraverso interazioni dirette con l'integrina  $\alpha_v\beta_5$ , mostrando rispettivamente una  $K_{d_{app}}$  di 100 nM e 200 pM.

Su questi peptidi sono stati effettuati esperimenti di CD ed NMR al fine di studiare la loro strutturazione. Nel caso del CD, si è rivelato vantaggioso l'impiego di una soluzione H<sub>2</sub>O/HFA 1/1 a 5°C al fine di ottenere una migliore strutturazione. Il Cpp ha mostrato il comportamento tipico di un peptide a struttura secondaria ad  $\alpha$ -elica. Invece, le due subregioni separate non sono strutturate. Verosimilmente, il taglio tra i residui aminoacidici 9-10 elimina la tendenza del peptide intero a formare un elica nelle regione centrale.

I risultati ottenuti dagli esperimenti NMR hanno confermato questo tipo di comportamento conformazionale.

Nella seconda fase del lavoro sono stati sintetizzati nuovi analoghi recanti la sostituzione Glu-Ser<sup>138</sup> con l'intento di verificare se l'attività di Cpp variasse con l'introduzione di una pseudofosforilazione. La carica negativa è stata introdotta anche nel peptide N-terminale, sono stati così ottenuti i due composti CPe138 ed Ac-KA6E138-NH<sub>2</sub>.

Anche questi peptidi sono stati sottoposti a saggi di migrazione in camere di Boyden e, coerentemente con quanto atteso, hanno entrambi mostrato attività inibitoria della migrazione cellulare netta. I saggi, infatti, sono stati eseguiti utilizzando entrambi i peptidi in associazione con Cpp e quindi in funzione di una attività migratoria innescata. Il grado di inibizione riscontrato per entrambi i composti CPe138 ed Ac-KA6E138-NH<sub>2</sub>, risulta piuttosto comparabile e sempre maggiore rispetto all'inibizione indotta da Ac-KA6-NH<sub>2</sub>.

In conclusione è possibile affermare che l'introduzione della carica negativa si è rivelata effettivamente vantaggiosa per l'ottenimento di peptidi ad attività inibitoria della migrazione. Anche il CPe138 è stato utilizzato in saggi di spiazzamento ed il suo comportamento ha confermato lo sviluppo di una interazione specifica con la membrana cellulare, mediata dall'integrina  $\alpha_v\beta_5$ .

E' stata presa in esame la struttura secondaria del peptide CPe138 mediante CD ed NMR. L'introduzione di una carica negativa ha in qualche modo variato la

strutturazione in quanto, sia attraverso CD che attraverso NMR, è stata riscontrata una minore strutturazione ad  $\alpha$ -elica.

La terza fase del lavoro ha riguardato la sintesi di polipeptidi caratterizzati dall'introduzione di un residuo aminoacidico di serina fosforilata in posizione 138 della sequenza, sono stati così ottenuti i composti CPpSP138 e Ac-KA6SP138-NH<sub>2</sub>.

Il composto CPpSP138 è stato sottoposto a studi conformazionali. I risultati relativi a CD hanno rivelato comunque una strutturazione ad  $\alpha$ -elica. I valori calcolati mediante il metodo K2D2 ha fornito un valore intermedio rispetto a quelli ottenuti dai composti CPp e CPpE138.

I risultati presentati hanno chiarito un importante ruolo del peptide CPp riguardo alla regolazione della motilità cellulare. Risulta singolare la coesistenza, all'interno di questa sequenza aminoacidica, di due porzioni a differente attività biologica. La porzione N-terminale (aa. 135-143) mostra attività inibitoria, quando isolata dal resto della sequenza. La sequenza C-terminale (aa-144-158) conserva l'attività migratoria del peptide nativo. Il peptide *in toto* (aa. 135-158) stimola la migrazione cellulare, ma in presenza di una pseudofosforilazione l'attività riscontrata diventa inibitoria. Ad oggi le due molecole più interessanti dal punto di vista dell'attività biologica restano quelle recanti la carica negativa del Glu in posizione 138: CPpE138 e Ac-KA6E138-NH<sub>2</sub>.

Restano tuttavia da confermare le attività biologiche relative ai due peptidi recanti la Ser(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>) in posizione 138 (dati non riportati).

Altro aspetto da approfondire riguarda il sito di legame dei peptidi presentati. E' infatti da accertare, se le molecole presentate leghino l'integrina  $\alpha_v\beta_5$  sullo stesso sito, se abbiano luogo delle interazioni di tipo allosterico o ancora, se i siti di legame siano del tutto indipendenti. A questo scopo sono attualmente in corso dei saggi di spiazzamento del peptide marcato  $^{125}\text{I}$ -CPp.

## *Abbreviazioni*

Boc: t-Butilossicarbonile

BSA: Albumina da Siero Bovino

C: Cisteina

CD: Dicroismo Circolare

DCM: Diclorometano

DIPEA : N,N-Diisopropiletilammina

DMAP: 4-(Dimetilammino)-piridina

DMEM: Dulbecco Modified Eagle Medium

DMF: N,N-Dimetilformammide

E: Acido Glutammico

ECM: Matrice Extracellulare

F: Phe

FBS: Siero Fetale Bovino

Fmoc: 9-Fluorenilmetossicarbonile

Fn: fibronectina

Glu: Acido Glutammico

HBTU: O-Benzotriazol-N,N,N',N'-tertametiluronio- esafluorofosfato

HOBt: 1-Idrossi-benzotriazolo

K: Lisina

L: Leucina

Lys: Lisina

NMP: N-metil-2-pirrolidone

NMR: Risonanza Magnetica Nucleare

OtBu: O-terzbutile

P: Pro

PBS: Phosphate Buffer Saline

Phe: Fenilalanina

Pro: Prolina

Q: Glutammina

R: Arginina

S: Serina

T: Treonina

TES: Trietilsilano

TFA: Acido trifluoroacetico

tPA: attivatore tissutale del plasminogeno

uPA: attivatore urinario del plasminogeno

uPAR: recettore dell'attivatore urinario del plasminogeno

Vn: vitronectina

## **BIBLIOGRAFIA**

- Alahari S.K., Reddig P.J., Juliano R.L. Biological aspects of signal transduction by cell adhesion receptors. *Int. Rev. Cytol.* (2002); 220: 145-184.
- Alfano D., Iaccarino I., Stoppelli MP. Urokinase signaling through its receptor protects against anoikis by increasing BCL-xL expression levels *J. Biol. Chem.* (2006); 281:17758-17767.
- Andrade M.A., Chacón P., Merelo J.J., Morán F. Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network *Protein Engineering* (1993); 6: 383-390.
- Andreasen P.A., Kjoller L., Christensen L. and Duffy M.J. The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis *Int. J. Cancer* (1997); 72: 1-22. Arnaout M.A., Mahalingam B., Xiong J.P. Integrin Structure, Allostery, and Bidirectional Signaling. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* (2005); 21: 381-410.
- Balaban N.Q., Schwarz U.S. , Riveline D., Goichberg P., Tzur G., Sabanay I., Mahalu D., Safran S., Bershadsky A., Addadi L., Geiger B. Force and focal adhesion assembly a close relationship studied using elastic micropatterned substrates *Nature Cell Biol.* (2001); 3: 466-473.
- Bax A., Davis D.G. Mlev-17-based two-dimensional homonuclear magnetization transfer spectroscopy. *J. Magn Reson.* (1985); 65: 355-360.
- Beningo K.A., Dembo M., Kaverina I., Small J.V., Wang Y.L. Nascent Focal Adhesions Are Responsible for the Generation of Strong Propulsive Forces in Migrating Fibroblasts *J. Cell Biol.* (2001); 153: 881-887.
- Benjamin G.B., Bershadsky A., Pankov R., Yamada K.M. Transmembrane Extracellular Matrix–Cytoskeleton Crosstalk. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* (2001); 2: 793-805.
- Berkenblit A., Matulonis U.A., Kroener J.F., Dezube B.J., Lam G.N., Cuasay L.C., Brünner N., Jones T.R., Silverman M.H., Gold M.A. Å6, a urokinase plasminogen activator (uPA)-derived peptide in patients with advanced gynecologic cancer: A phase I trial. *Gynecologic Oncology* (2005); 99: 50-57.

- Blasi F., Carmeliet P. uPAR: a Versatile Signalling Orchestrator *Nature Reviews Mol. Cell Biol.* (2002); 3: 932-943.
- Blasi F., Vassalli J.D., Dano K. Urokinase-Type Plasminogen Activator: Proenzyme, Receptor, and Inhibitors *J. Cell Biol.* (1987); 104: 801-804.
- Boyden S. The Chemotactic Effect of Mixtures of Antibody and Antigen on polymorphonuclear Leucocytes. *J Exp Med.* (1962); 115: 453-466.
- Brahmabhatt A.A., Klemke R.L. ERK and RhoA Differentially Regulate Pseudopodia Growth and Retraction during Chemotaxis *J. Biol. Chem.* (2003); 278: 13016-13025
- Brakebusch C., Fassler R. The integrin-actin connection, an eternal love affair. *The EMBO Journal* (2003); .22: 2324-2333.
- Brower V. Tumor angiogenesis- new drugs on the block. *Nature Biotechnology.*(1999);17: 963-968.
- Burridge K., Chrzanowska-Wodnicka M. Focal adhesions, contractility, and signalling. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* (1996); 12: 463-518.
- Carriero M.V. , Del Vecchio S., Capozzoli M., Franco P., Fontana L., Zannetti A., Botti G., D’Aiuto G., Salvatore M., Stoppelli M.P. Urokinase receptor interacts with  $\alpha_v\beta_5$  vitronectin receptor, promoting urokinase-dependent cell migration in breast cancer *Cancer Research* (1999); 59: 5307-5314.
- Carriero M.V., Franco P., Del Vecchio S., Massa O., D’Aiuto G., Stoppelli M.P. Salvatore M. Tissue distribution of soluble and receptor-bound urokinase in human breast cancer using a panel of monoclonal antibodies. *Cancer Res.*(1994); 54:5445-5454.
- Chapman H.A. Plasminogen activators, integrin and the coordinated regulation of cell adhesion and migration. *Curr. Opin. Cell Biol.* (1997); 9: 714-724.
- Coates T.D., Watts R.G., Hartman R., Howard T.H. Relationship of F-actin distribution to development of polar shape in human polymorphonuclear leukocytes. *J. Cell Biol.* (1992); 117:765-774.

- Damsky C.H., Werb Z. Signal transduction by integrin receptors for extracellular matrix: cooperative processing of extracellular information. *Curr. Opin. Cell. Biol.* (1992); 4: 772-778.
- Dans M., Gagnoux-Palacios L., Blaikie P., Klein S., Mariotti A., Giancotti F. G. Tyrosine Phosphorylation of the  $\beta_4$  Integrin Cytoplasmic Domain Mediates Shc Signaling to Extracellular Signal-regulated Kinase and Antagonizes Formation of Hemidesmosomes. *J. Biol. Chem.* (2001); 276: 1494-1502.
- De Clerck Y.A., Mercurio A.M., Stack M. S., Chapman H.A., Zutter M.M., Muschel R. J., Raz A., Matrisian L.M., Sloane B.F., Noel A., Hendrix M.J., Coussens L., Padarathsingh M. Proteases, Extracellular Matrix, and Cancer A Workshop of the Path B Study Section. *American Journal of Pathology* (2004); 164: 1331-1339.
- Dublin E., Hanby A., Patel N.K., Liebman R., Barnes D. Immunohistochemical Expression of uPA, uPAR, and PAI-1 in Breast Carcinoma. *American Journal of Pathology* (2000); 157: 1219-1227.
- Emsley J., Knight C.G., Farndale R.W., Barnes M.J., Liddington R.C. Structural Basis of Collagen Recognition by Integrin  $\alpha_2\beta_1$ . *Cell* (2000); 101: 47-56.
- Franco P, Vocca I, Carriero M.V., Alfano D., Cito L., Longanesi-Cattani I, Grieco P., Ossowski L., Stoppelli M.P. Activation of urokinase receptor by a novel interaction between the connecting peptide region of urokinase and  $\alpha_v\beta_5$  integrin. *Journal of Cell Science* (2006); 119: 3424-3434.
- Franco P., Iaccarino C., Chiaradonna F., Brandazza A., Iavarone C., Mastronicola M.R., Nolli M.L., Stoppelli M.P. Phosphorylation of human pro-urokinase on Ser138/303 impairs its receptor-dependent ability to promote myelomonocytic adherence and motility. *J. Cell. Biol.* (1997); 137: 779-791.
- Franco P., Massa O., Garcia-Rocha M., Chiaradonna F., Iaccarino C., Correias I., Mendez E., Avila J., Blasi F., Stoppelli M.P. Protein kinase C-dependent in vivo phosphorylation of pro-urokinase leads to the formation of a receptor competitive antagonist. *J. Biol. Chem.* (1998); 273: 27734-27740.

- Franco P., Mastronicola M.R., De Cesare D., Nolli M.L., Wun T.C., Verde P, Blasi F., Stoppelli M.P. Separation and Characterization of Nonphosphorylated and Serine-phosphorylated Urokinase *J. Biol. Chem.* (1992); 267: 19369-19372.
- Galbraith C.G., Yamada K.M., Sheetz M.P. The relationship between force and focal complex development. *J. Cell Biol.* (2002); 159: 695-705.
- Gardsvoll H., Ploug M. Mapping of the vitronectin binding site on the urokinase receptor: involvement of a coherent receptor interface consisting of residues from both domain I and the flanking interdomain linker region. *J. Biol. Chem.* (2007); 282: 13561-13572.
- Gargiulo L., Longanesi-Cattani I., Bifulco K., Franco P., Raiola R., Campiglia P., Grieco P., Peluso G., Stoppelli MP., Carriero MV. Cross-talk between fMLP and Vitronectin Receptors Triggered by Urokinase Receptor-derived SRSRY Peptide. *J. Biol. Chem.* (2005); 280: 25225-25232.
- Geiger B., Bershadsky A., Pankov R., Yamada, K. M. Transmembrane Extracellular Matrix-Cytoskeleton Crosstalk. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* (2001); 2: 793-805.
- Ghamande S.A., Silverman M.H., Huh W., Behbakht K., Ball G., Cuasay L., Würtz S.O., Brunner N., Gold M.A. A phase 2, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of clinical activity and safety of subcutaneous Å6 in women with asymptomatic CA125 progression after first-line chemotherapy of epithelial ovarian cancer. *Gynecologic Oncology* (2008); 111: 89-94.
- Ghosh S., Brown R., Jones J.C., Ellerbroek S.M., Stack M.S. Urinary-type plasminogen activator (uPA) expression and uPA receptor localization are regulated by  $\alpha_3\beta_1$  integrin in oral keratinocytes. *J. Biol. Chem.* (2000); 275: 23869-23876.]
- Ginsberg M.H., Du X., Plow E.F. Inside-out integrin signalling. *Curr. Opin. Cell Biol.* (1992) ; 4: 766-71.
- Glading A., Lauffenburger D.A., Wells A. Cutting to the chase: calpain proteases in cell motility. *Trends Cell Biol.* (2002); 12: 46-54.

- Greenfield N.J. Methods to Estimate the Conformation of Proteins and Polypeptides from Circular Dichroism Data. *Analytical Biochemistry* (1996); 235: 1-10.
- Guo Y.J., Mazar A.P., Lebrun J.J., Rabbani S.A. An Antiangiogenic Urokinase-derived Peptide Combined with Tamoxifen Decreases Tumor Growth and Metastasis in a Syngeneic Model of Breast Cancer. *Cancer Res.* (2002); 62: 4678-4684.
- Hendey B., Klee C.B., Maxfield F.R. Inhibition of neutrophil chemokinesis on vitronectin by inhibitors of calcineurin. *Science* (1992); 258: 296-299.
- Holly S.P., Larson M.K., Parise L.V. Multiple roles of integrins in cell motility. *Exp Cell Res.* (2000); 261: 69-74.
- Hoyer-Hansen G., Behrendt N., Ploug M., Dano K., Preissner K.T. The intact urokinase receptor is required for efficient vitronectin binding: receptor cleavage prevents ligand interaction *FEBS Lett.* (1997); 420: 79-85.
- Huai Q., Mazar A.P., Kuo A., Parry G.C., Shaw D.E., Callahan J., Li Y., Yuan C., Bian C., Chen L., Furie B. Furie B.C., Cines D.B., Huang M. Structure of Human Urokinase Plasminogen Activator in Complex with Its Receptor *Science* (2006); 311: 656-659.
- Ingber D. Integrins as mechanochemical transducers. *Curr. Opin. Cell Biol.* (1991); 3: 841-848.
- Jenner J., Meyer B.H., Bachman P., Ernst R.R. Investigation of exchange processes by two-dimensional NMR spectroscopy. *J. Chem. Phys.* (1979); 71: 4546-4553.
- Jockusch B.M., Bubeck P, Giehl, K., Kroemker M., Moschner J., Rothkegel M., Rudiger M., Schluter K., Stanke G., Winkler J. The molecular architecture of focal adhesions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* (1995); 11: 379-416.
- Juliano, R.L., Haskill, S. Signal transduction from the extracellular matrix. *J. Cell Biol.* (1993); 120: 577-585.
- Kaiser E., Colecott R.L., Bossinger C.D., Cook P.I. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal. Biochem.* (1970); 34: 595-598.

- Karplus M. *J. Chem. Phys.* (1959); 30: 11.
- Kjoller L., Hall A. Rac mediates cytoskeletal rearrangements and increased cell motility induced by urokinase-type plasminogen activator receptor binding to vitronectin. *J. Cell Biol.* (2001); 152: 1145-1157.
- Krishnakumar I.M., Mathew B. Gel-phase synthesis of a difficult sequence peptide on 1,4-butanediol dimethacrylate-crosslinked polystyrene support. *Letters in Peptide Science*(2001); 7: 317-323.
- Larsen M., Tremblay M. L., Yamada K. M. Phosphatases in Cell Matrix Adhesion and Migration. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* (2003); 4: 700-711.
- Lauffenburger D.A., Horwitz A. F., Cell Migration: A Physically Integrated Molecular Process *Cell* (1996); 84: 359-369.
- Lee J., Ishihara A., Oxford G., Johnson B., Jacobson K. Regulation of cell movement is mediated by stretch-activated calcium channels. *Nature* (1999); 400: 382-386.
- Llinas P., Le Du M.H., Gardsvoll H., Dano K., Ploug M., Gilquin B., Stura E.A., Menez A. Crystal structure of the human urokinase plasminogen activator receptor bound to an antagonist peptide *EMBO J.* (2005); 24:1655-1663.
- Madsen C.D., Ferraris G.M., Andolfo A., Cunningham O., Sidenius N. uPAR-induced cell adhesion and migration: vitronectin provides the key. *J. Cell Biol.* (2007); 177: 927-939.
- Madsen C.D., Sidenius N. The interaction between urokinase receptor and vitronectin in cell adhesion and signaling *European Journal of Cell Biology* (2008); 87: 617-629.
- Marion D., Wüthrich K. Application of phase sensitive two-dimensional correlated spectroscopy (COSY) for measurements of  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  spin-spin coupling constants in proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1983); 113: 967-974.
- Mizejewski G.D. Role of integrins in cancer: survey of expression patterns. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* (1999); 222: 124-138.

- Munshi H.G., Ghosh S., Mukhopadhyay S., Wu Y.I., Sen R., Green K.J., Stack M.S. Proteinase suppression by E-cadherin-mediated cell-cell attachment in pre-malignant oral keratinocytes. *J. Biol. Chem.* (2002); 277: 38159-38167.
- Ozanne B.W., Spence H.J., McGarry L.C., Hennigan R.F. Invasion is a genetic program regulated by transcription factors *Curr. Opin. Genet. Dev.* (2006); 16: 65-70.
- Pearson D.A., Blanchette M., Baker M.L., Guindon C.A. Trialkylsilanes as scavengers for the trifluoroacetic acid deblocking of protecting groups in peptide synthesis. *Tetrahedron Lett.* (1989); 30: 2739-2742.
- Perez-Iratxeta C., Andrade-Navarro M.A. K2D2: estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra *BMC Structural Biology* (2008); 8: 25-30.
- Ploug M., Ronne E., Behrendt N., Jensen A.L., Blasi F., Dano K. Cellular Receptor for Urokinase Plasminogen Activator *J. Bio. Chem.*(1991); 266: 1926-1933.
- Pollanen J., Saksela O., Salonen E., Andreasen P., Nielsen L., Dano K., Vaheri A. Distinct Localizations of Urokinase-type Plasminogen Activator and Its Type 1 Inhibitor under Cultured Human Fibroblasts and Sarcoma Cells *J. Cell Biol.* (1987); 104: 1085-1096.
- Pollanen, J., Hedman, K., Nielsen, L.S., Dano, K., Vaheri, A. Ultrastructural Localization of Plasma Membrane-associated Urokinase-type Plasminogen Activator at Focal Contacts *J. Cell Biol.* (1988); 106: 87-95.
- Riento K., Ridley A. J. ROCK: Multifunctional Kinases in Cell Behaviour *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* (2003); 4: 446-456.
- Ruoslahti E. Integrins. *J. Clin. Invest.* (1991); 87: 1-5.
- Schlaepfer D.D., Hanks S.K., Hunter T., van der Geer P. Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature* (1994) ; 372: 786-791.

- Sidenius N., Andolfo A., Fesce R., Blasi F. Urokinase Regulates Vitronectin Binding by Controlling Urokinase Receptor Oligomerization. *The Journal of Biological Chemistry* (2002); 277: 27982-2799.
- Sidenius N., Blasi F. Domain 1 of the urokinase receptor (uPAR) is required for uPAR-mediated cell binding to vitronectin *FEBS Lett.* (2000); 470: 40-46.
- Stoppelli M.P. The Plasminogen Activation System in Cell Invasion. *Madame Curie Bioscience Database, Cancer Metastasis* (2002).
- Stoppelli M.P., Corti A., Soffientini A., Cassani G., Blasi F., Assoian R.K. Differentiation-enhanced binding of the amino-terminal fragment of human urokinase plasminogen activator to a specific receptor on U937 monocytes *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1985); 82: 4939-4943.
- Stoppelli M.P., Tacchetti C., Cubellis M.V., Corti A., Hearing V.J., Cassani G., Appella E., Blasi F. Autocrine saturation of prourokinase receptors on human A431 cells *Cell* (1986); 45: 675-684.
- Tucker G.C. Integrins: Molecular Targets in Cancer Therapy. *Current Oncology Reports* (2006); 8: 96-103.
- Turner C.E., West K.A., Brown M.C., Paxillin-ARF GAP signaling and the cytoskeleton *Curr. Opin. Cell Biol.* (2001); 13: 593-599.
- Vassalli J.D., Sappino A.P. and Belin D. Plasminogen activator/plasmin system *J. Clin. Invest.* (1991); 88: 1067-1072.
- Vial E., Sahai E., Marshall C.J. ERK-MAPK signaling coordinately regulates activity of Rac1 and RhoA for tumor cell motility *Cancer Cell* (2003); 4: 67-79.
- Vitale M., Di Matola T., Fenzi G., Illario M., Rossi G. Fibronectin is required to prevent thyroid cell apoptosis through an integrin-mediated adhesion mechanism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* (1998); 83: 3673-3680.

- Vocca I., Franco P., Alfano D., Votta G., Carriero M.V., Estrada Y., Caputi M., Netti P.A., Ossowski L., Stoppelli M.P. Inhibition of migration and invasion of carcinoma cells by urokinase-derived antagonists of  $\alpha_5\beta_1$  integrin activation. *Int. J. Cancer* (2009);124: 316-325.
- Webb D.J., Parsons T.J., Horwitz A.F. Adhesion Assembly, Disassembly and Turnover in Migrating Cells-Over and Over and Over Again. *Nature Cell Biol.* (2002); 4: E97-E100.
- Wheeler A., Ridley A.J. Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility. *Experimental Cell Research* (2004); 301: 43-49.
- Worthylake R.A., Burridge K. RhoA and ROCK Promote Migration by Limiting Membrane Protrusions. *J. Biol. Chem.* (2003); 278: 13578-13584.
- Yebra M., Parry G.C.N., Stromblad S., Mackman N., Rosenberg S., Muelleri B.M., Cheresh D.A. Requirement of Receptor-bound Urokinase-type Plasminogen Activator for Integrin  $\alpha_5\beta_1$ -directed Cell Migration. *J. Biol.Chem.* (1996); 271: 29393-29399.