

Università degli Studi di Napoli Federico II

Facoltà di Medicina e Chirurgia



Dottorato di Ricerca in

Fisiopatologia Clinica e Medicina Sperimentale

XXIV Ciclo 2008-2011

Coordinatore: Prof. Gianni Marone

Tesi di Dottorato

*Studio della funzione del recettore dell'urochinasi nell'adesione,
migrazione e proliferazione cellulare: identificazione
di un nuovo inibitore.*

RELATORI

Ch.mo Prof. Gianni Marone

Ch.ma Prof.ssa Nunzia Montuori

CANDIDATO

Dott.ssa Vincenza Elena Anna Rea

INDICE

1	INTRODUZIONE.....	2
1.1	Il sistema di attivazione del plasminogeno.....	2
1.2	Il plasminogeno e la plasmina.....	3
1.3	Gli attivatori del plasminogeno.....	4
1.4	Gli inibitori degli attivatori del plasminogeno.....	6
1.5	L'uPAR: un versatile regolatore del segnale.....	7
1.6	Struttura del recettore dell'urochinasi.....	8
1.7	Interazioni molecolari ed attività dell'uPAR di membrana.....	9
1.8	Interazioni molecolari ed attività della forma solubile dell'uPAR.....	12
1.9	Il sistema uPA-uPAR: rilevanza in patologia.....	13
1.10	Nuove Metodiche Computazionali: il Virtual Screening (VS).....	15
1.11	Il cristallo dell'uPAR.....	16
1.12	Scopo del lavoro sperimentale.....	17
2	MATERIALI E METODI.....	18
2.1	Preparazione del recettore e dei suoi ligandi per gli studi di "Virtual Screening".....	18
2.2	Studi di Virtual Screening.....	18
2.3	Reagenti.....	19
2.4	Inibitori chimici.....	20
2.5	Colture cellulari.....	20
2.6	Preparazione dei plasmidi esprimenti le varie forme di uPAR.....	21
2.7	Trasfezioni.....	22
2.8	Western Blot.....	22
2.9	Saggi di adesione cellulare.....	23
2.10	Saggi di migrazione cellulare.....	23
2.11	Coimmunoprecipitazione.....	24
3	RISULTATI.....	25
3.1	Identificazione di piccole molecole dirette verso l'interazione uPAR/FPR e verso il legame uPAR-VN attraverso studi di Structure-Based Virtual Screening (SB-VS).....	25
3.2	Cellule HEK-293 trasfettate con cDNA codificanti per varie forme di uPAR esprimono il recettore.....	27
3.3	Cellule uPAR-293 e D2D3-293 mostrano un'aumentata adesione alla vitronectina.....	27
3.4	Quattro composti delle due serie di potenziali inibitori selezionati mediante VS diminuiscono l'adesione cellulare alla VN.....	28
3.5	Due delle molecole individuate mediante virtual screening sono specifiche per l'uPAR ma non per la VN.....	28
3.6	Effetti degli inibitori specifici per l'uPAR sulla migrazione delle cellule uPAR-293.....	29
3.7	Effetti degli inibitori specifici per l'uPAR sulla migrazione di cellule leucocitarie della linea KG1 30	
3.8	Effetti degli inibitori specifici per l'uPAR sulla migrazione di cellule mononucleate di sangue periferico (PBMC).....	31
3.9	Gli inibitori selezionati inibiscono l'interazione strutturale uPAR/fMLP-Rs.....	31
4	CONCLUSIONI.....	32
5	BIBLIOGRAFIA.....	36

1 INTRODUZIONE

1.1 Il sistema di attivazione del plasminogeno

L'importanza delle proteasi nella modulazione e nell'attivazione di processi fisiologici, come la fibrinolisi, l'angiogenesi, lo sviluppo embrionale, e patologici, quali l'infiammazione e la progressione tumorale, è nota da tempo e numerose sono le cascate enzimatiche coinvolte identificate e caratterizzate.

Molti di tali processi dipendono dall'abilità delle cellule di migrare e invadere i tessuti. Le cellule, per poter migrare, non solo devono essere in grado di degradare localmente la matrice extracellulare (ECM) circostante ma devono anche regolare rigidamente la loro adesione alle cellule adiacenti e all'ECM. L'ECM è una complessa rete di macromolecole che forma una sorta d'impalcatura di sostegno per cellule e tessuti ed è costituita da proteine strutturali come collagene ed elastine, da complessi glicoproteici come proteoglicani e da proteine adesive, quali fibronectina (FN), laminina (LM) e vitronectina (VN).

Gli studi degli ultimi anni hanno consentito di ampliare il concetto di ECM da semplice struttura meccanica a fonte di segnali importanti per la forma, il movimento e la vita della cellula. Le diverse componenti proteiche della matrice, infatti, non solo costituiscono una base di ancoraggio per le cellule, ma partecipano all'invio di diversi segnali all'interno della cellula che ne modulano proliferazione, apoptosi, migrazione, differenziamento.

Tra i vari sistemi proteolitici in grado di modificare l'ECM e di modulare tali segnali, il sistema di attivazione del plasminogeno ricopre sicuramente un ruolo di primaria importanza. Tale sistema porta alla formazione di plasmina, potente serin-proteasi ad

ampio spettro d'azione, capace di promuovere efficacemente la degradazione della matrice. Il sistema include numerosi componenti: due specifici attivatori del plasminogeno con i loro inibitori, la plasmina e recettori di membrana che permettono di focalizzare l'attività proteolitica di tali enzimi sulla superficie cellulare.

Il sistema di attivazione del plasminogeno è coinvolto non solo nel rimodellamento dell'ECM, e quindi nella regolazione delle interazioni cellula-cellula e cellula-matrice, ma anche, nella fibrinolisi intra- ed extra-vascolare (1).

1.2 Il plasminogeno e la plasmina

Il plasminogeno è uno zimogeno di circa 92 kDa presente nel plasma e prodotto prevalentemente a livello epatico. E' costituito da una singola catena polipeptidica di 791 aminoacidi (aa), con un dominio carbossi-terminale, contenente la regione catalitica, e 5 domini chiamati "Kringles" (K1-K5) all'estremità opposta. La regione N-terminale termina con un residuo di acido glutammico (Glu-plasminogeno) che può essere eliminato grazie alla rimozione di un peptide di circa 8 kDa; tale rimozione dà origine al Lys-plasminogeno, terminante appunto con una lisina. Il plasminogeno, in entrambe le forme, è inattivo dal punto di vista proteolitico e viene attivato a plasmina mediante idrolisi del legame peptidico tra arginina-560 e valina-561 da parte di attivatori specifici (PA); l'enzima attivo è costituito pertanto da due catene polipeptidiche, la catena A e la catena B, legate da un ponte disolfuro; la catena A contiene il sito catalitico dell'enzima (1).

La plasmina idrolizza legami lisina-arginina e, oltre a svolgere un ruolo chiave nella fibrinolisi intra ed extravascolare (1), è in grado di degradare vari componenti della matrice extracellulare come collagene (CG), LM, FN, VN e proteoglicani, sia direttamente che attraverso l'attivazione di metalloproteasi latenti; tale degradazione

della matrice contribuisce al rilascio in forma attiva di fattori di crescita come il bFGF e il TGF- β .

Il plasminogeno e la plasmina, inoltre, possono interagire a bassa affinità, mediante i loro domini “kringle”, con recettori presenti sulla superficie cellulare di monociti, granulociti, linfociti, piastrine, cellule endoteliali e fibroblasti (2). Il legame a tali recettori protegge l'enzima attivato dall'azione dei suoi inibitori specifici, poiché il sito di legame per il recettore coincide con il sito di legame con gli inibitori (3).

1.3 *Gli attivatori del plasminogeno*

Il plasminogeno è convertito in plasmina da due attivatori specifici: l'urochinasi (uPA) e l'attivatore tissutale (tPA). Essi sono codificati da geni diversi: il gene dell'uPA è collocato nella porzione terminale del cromosoma 10, mentre quello per il tPA si trova nella porzione pericentromerica del cromosoma 8. Entrambi appartengono alla famiglia delle serin-proteasi, presentano un'omologia di sequenza del 40% e hanno un'organizzazione “modulare” simile. La regione C-terminale contiene il sito catalitico dell'enzima, questo è seguito da una struttura “Kringles” (presente in singola copia nell'uPA e in doppia copia nel tPA); nella regione N-terminale è presente un dominio omologo al fattore di crescita epiteliale (EGF) denominato growth factor domain (GFD), seguito, solo nel tPA, da un dominio “finger”.

L'uPA è una proteasi a serina capace di attivare, con un singolo taglio proteolitico, il plasminogeno presente nel plasma in forma enzimaticamente inattiva. Questo processo porta alla formazione di plasmina, una proteasi serinica ad ampia specificità (4).

Negli ultimi anni, vari studi hanno dimostrato che l'uPA può indurre una cascata di reazioni intracellulari indipendenti dalla sua attività catalitica; tali effetti sono mediati dal legame dell'uPA ad uno specifico recettore di membrana, l'uPAR.

L'uPA è, dunque, una molecola bifunzionale: dalla parte C-terminale ha il dominio catalitico, da quella N-terminale il dominio di legame al suo specifico recettore, attraverso il quale può stimolare crescita, motilità, adesione cellulare e trascrizione di specifici geni. Ciò suggerisce implicazioni importanti per la biologia dei tumori: l'incrementata produzione di uPA e del suo recettore da parte delle cellule tumorali ne può infatti accrescere la capacità invasiva, sia fornendo alla cellula un'attività proteolitica di superficie, sia stimolandone crescita e motilità.

Alla complessità funzionale dell'uPA corrisponde la sua complessità strutturale. Si tratta infatti di una glicoproteina costituita da una serie di domini strutturalmente e funzionalmente distinti: il GFD, omologo al fattore di crescita epidermico EGF (aa 1-45), responsabile del legame al recettore specifico; il dominio denominato "kringle" (aa 45-135), possibile responsabile delle interazioni con le proteine della matrice extracellulare; il dominio catalitico (aa 158-411), coinvolto nell'attività proteolitica di superficie, separato dal "kringle" mediante il cosiddetto "peptide di connessione" (aa 135-158) che contiene il sito di attivazione del proenzima.

Il prodotto primario di traduzione è una glicoproteina di 431 aminoacidi (pre-pro-urochinasi), secreta contestualmente alla rimozione di un peptide segnale e all'aggiunta di gruppi fosforici e glicosidici. La forma extracellulare o pro-uPA è una glicoproteina di 411 aminoacidi a catena singola, con un peso molecolare di circa 50 KDa, priva di attività catalitica. Lo zimogeno viene poi attivato da un singolo taglio proteolitico tra la lisina 158 e l'isoleucina 159, operato dalla plasmina e dalla catepsina B. L'enzima attivo è costituito da due catene polipeptidiche tenute insieme da un ponte disolfuro: la catena A, che comprende la porzione amino-terminale con il sito di legame al recettore specifico di membrana, e la catena B, che comprende la porzione carbossi-terminale, contenente il sito catalitico. L'isolamento dei prodotti di degradazione dell'uPA, dopo l'attivazione con la plasmina, ha consentito l'identificazione di un secondo sito di

taglio, dopo la lisina 135, che determina il rilascio di un frammento amino-terminale (ATF, “Amino Terminal Fragment”) che conserva la capacità di legare il recettore specifico ed è privo del dominio catalitico.

Il tPA è prodotto anch'esso come proenzima a singola catena (527 aa) ma, a differenza della pro-uPA, è enzimaticamente attivo. Il taglio proteolitico tra arginina-275 e isoleucina-276 porta alla formazione di una molecola a due catene, tenute insieme da un ponte disolfuro, che ha un'attività enzimatica 10-50 volte superiore a quella del suo precursore (5).

Pur avendo ambedue la capacità di determinare la formazione della plasmina, il tPA e l'uPA presentano funzioni diverse. Il tPA è coinvolto prevalentemente nei fenomeni di trombolisi, la sua attività, infatti, è fortemente aumentata dal legame con la fibrina. L'uPA, che invece opera come enzima extravascolare fibrina-indipendente, è coinvolta in fenomeni che prevedono la degradazione dell'ECM e la migrazione cellulare.

1.4 Gli inibitori degli attivatori del plasminogeno

L'attività proteolitica degli attivatori del plasminogeno viene selettivamente inibita da due inibitori appartenenti alla famiglia delle serpine (inibitori delle serin proteasi), il PAI-1 e il PAI-2. I PAI reagiscono con il tPA e con l'uPA a due catene, ma non con la pro-uPA a singola catena, e possono legare l'uPA sia in forma libera che legata al suo recettore.

Entrambi sono delle glicoproteine a singola catena di circa 50kDa e sono codificati da due geni distinti, localizzati rispettivamente sul cromosoma 7 e sul cromosoma 18. Il PAI-1 viene sintetizzato e secreto in forma attiva, ma viene rapidamente inattivato, a meno che non si associ a cofattori fisiologici come l'eparina o la VN che ne stabilizzano la conformazione attiva. Il PAI-1 può interferire con processi di adesione e migrazione

cellulare dipendenti da VN, poiché il suo sito di legame sulla VN è adiacente al sito di legame per i recettori integrinici (6,7).

Il PAI-2 ha la caratteristica di essere secreto solo parzialmente in forma glicosilata, rimanendo per lo più non glicosilato all'interno della cellula (8). A livello funzionale è meno efficace del PAI-1 nell'inibire i PA, al punto da far ipotizzare l'esistenza di altri substrati. Il PAI-2, inoltre, protegge la cellula dall'apoptosi indotta dal TNF-alfa (9) e induce bassi livelli di interferone- α/β autocrino (10).

1.5 L'uPAR: un versatile regolatore del segnale

Il recettore per l'urochinasasi (uPAR) è un recettore di membrana ad ancora glicosil-fosfatidil-inositolica (GPI) coinvolto in numerosi eventi fisiologici e patologici che richiedono il rimodellamento della matrice extracellulare, quali embriogenesi, infiammazione, invasione e metastasi tumorale (11).

Il ruolo tradizionale dell'uPAR era considerato la focalizzazione dell'attività proteolitica dell'uPA alla superficie cellulare (11); tuttavia, negli ultimi anni, gli sono state attribuite anche altre attività. Infatti, la stimolazione di uPAR regola l'adesione, la migrazione e la proliferazione cellulare (12, 13), protegge da apoptosi e anoikys (14-16) e induce la transizione epitelio-mesenchimale (EMT) (17), indipendentemente dall'attività enzimatica dell'uPA.

L'uPAR gioca un ruolo essenziale in tali processi, legando direttamente una proteina dell'ECM, la VN e regolando, attraverso interazioni strutturali e funzionali, lo stato di attivazione delle integrine, e quindi l'adesione ad altri componenti dell'ECM, quali CG e FN. Inoltre, l'uPAR regola la migrazione e la proliferazione cellulare attraverso l'interazione con i recettori dell'N-formilmethionil-leucil-fenilalanina (fMLF) e con i recettori di diversi fattori di crescita (11, 12).

1.6 *Struttura del recettore dell'urochinasi*

L'uPAR è stato descritto per la prima volta nel 1985 (18,19) su monociti umani e sulla linea cellulare di leucemia promielocitica U-937, ma l'isolamento della proteina purificata e il sequenziamento del DNA si sono ottenuti solo nel 1990 (20,21).

L'uPAR è una glicoproteina a singola catena che lega l'uPA con alta affinità ($K_d=10^{-10}$ M), concentrando l'attività dell'enzima alla superficie cellulare. Il recettore è in grado di legare con la stessa affinità anche la forma inattiva dell'urochinasi (pro-uPA), facilitandone quindi l'attivazione.

L'uPAR è sintetizzato come singola catena polipeptidica di 313 aminoacidi e subisce un processo di maturazione post-traduzionale nel corso del quale, all'estremità C-terminale, viene rimosso un peptide di 30 aminoacidi ed aggiunta una coda GPI (22). Tale coda è essenziale per l'ancoraggio del recettore alla membrana plasmatica; l'uPAR è quindi privo delle regioni transmembrana e citoplasmatica. L'ancora GPI conferisce all'uPAR un'estrema mobilità lungo la membrana cellulare e consente la sua associazione a microdomini della membrana plasmatica ricchi di colesterolo, detti "lipid rafts", che sono implicati in eventi di trasduzione del segnale attivati da integrine, costituendo una piattaforma che concentra ed ancora mediatori di segnali intracellulari.

Il peso molecolare dell'uPAR è compreso tra 50 e 60 kDa; l'eterogeneità è dovuta alla presenza di 5 siti potenziali di N-glicosilazione che modulano l'affinità del recettore per i propri ligandi.

L'uPAR è costituito da tre domini strutturali di circa 90 aminoacidi, denominati, a partire dall'estremità N-terminale, D1, D2, D3 e caratterizzati dalla presenza di residui cisteinici filogeneticamente conservati che formano ponti disolfuro intramolecolari (Figura 1). Il dominio D3 ancora il recettore alla membrana tramite la coda GPI, il

dominio D2 connette il dominio D3 al dominio N-terminale D1, il quale interagisce con l'ATF dell'uPA.

L'uPAR può essere rilasciato nel plasma in forma solubile (suPAR) in seguito all'azione delle fosfolipasi C o D che determinano il taglio della coda GPI.

Sia la forma di membrana che quella solubile del recettore possono subire un ulteriore taglio, che genera forme tronche dell'uPAR di membrana (c-uPAR) o solubile (c-suPAR), prive del dominio D1, e non più in grado di legare l'uPA (Figura 2).

Il rilascio del dominio D1 avviene in seguito ad un taglio proteolitico nella regione di connessione, "linker" tra il dominio D1 e D2, ad opera di numerose proteasi tra cui la tripsina, chimotripsina, elastasi, catepsina G, plasmina e l'uPA stessa. Quest'ultima taglia nei siti arg83-ala84 e arg89-ser90. Il taglio nel primo sito porta all'esposizione di un epitopo, corrispondente agli aminoacidi 88-92 (SRSRY), coinvolto nella migrazione cellulare (Figura 3). Il taglio nel secondo sito distrugge tale regione (23).

1.7 Interazioni molecolari ed attività dell'uPAR di membrana

L'identificazione dei recettori transmembrana che cooperano con l'uPAR ha contribuito a delucidare i meccanismi di segnalazione cellulare uPAR-dipendenti. Sebbene siano stati proposti numerosi co-recettori, i più importanti sono, senza dubbio, i recettori appartenenti alla famiglia delle integrine e i recettori per l'fMLF, un peptide di origine batterica, che funge da forte chemoattrattante per i leucociti (24).

Diversi studi hanno dimostrato la capacità dell'uPAR di associarsi alle integrine appartenenti alle famiglie beta1, beta2 e beta3. Da tale interazione scaturiscono importanti conseguenze funzionali che possono variare nei differenti tipi cellulari (13-17, 25). Recentemente, i siti di legame per le integrine sono stati individuati nel dominio

D2 dell'uPAR (residui 130-142, peptide D2A) (26) e nel dominio D3 (residui 240-248) (27).

Il peptide D2A in forma solubile abolisce la co-immunoprecipitazione uPAR/integrina α v- β 3 e uPAR/integrina α 5- β 1, indicando che il recettore può legarsi ad entrambe le integrine; inoltre, il peptide D2A mostra un'attività chemiotattica, che richiede l'integrina α v- β 3 e attiva le vie di segnalazione α v- β 3-dipendenti. La sequenza specifica individuata nel dominio D3 dell'uPAR lega l'integrina α 5- β 1, la sostituzione di un singolo aminoacido in quella regione (S245A) ostacola il legame dell'uPAR all'integrina purificata (26).

L'interazione dell'uPAR con le integrine richiede che il recettore sia integro; è necessario il dominio D1 (28), così come per il legame all'uPA e alla VN.

L'importanza delle interazioni uPAR-integrine è stata documentata anche *in vivo* attraverso un peptide sintetico (P25), che interferisce con la formazione dei complessi uPAR-integrina. La somministrazione di P25 in topi nudi ha determinato una significativa riduzione delle localizzazioni ossee di cellule di carcinoma mammario MDA-MB-231 (25).

L'interazione uPAR-integrine sembra svolgere anche un ruolo cruciale nella regolazione della permeabilità renale (29). Infatti, il segnale indotto da uPAR in podociti porta alla perdita urinaria di proteine, attraverso un meccanismo che include l'attivazione dell'integrina α v- β 3.

L'interazione uPAR-integrine attiva la via delle chinasi dipendenti dal segnale mitogenico (MAPK), in particolare le chinasi indotte dal segnale extracellulare (ERK 1/2), con il coinvolgimento della tirosin chinasi non recettoriale src, delle tirosin-chinasi della famiglia src (Hck, Fgr, Fyn) e della chinasi associata alle adesioni focali (FAK). In cellule Hep-3, la riduzione dell'espressione di uPAR o la distruzione dell'interazione uPAR-integrina α 5- β 1 inattiva la via di ERK (30), causando l'arresto del ciclo

cellulare in G_0/G_1 ed innescando la quiescenza tumorale. Al contrario, l'iper-espressione di uPAR genera, attraverso le integrine, un segnale mitogenico, dipendente dall'attivazione della via di ERK, con inibizione di p38 MAPK, che, invece, sopprime la crescita ed ha un effetto pro-apoptico (31).

L'uPAR di membrana interagisce funzionalmente anche con recettori accoppiati a proteine G (GPCR) coinvolti nella chemiotassi, in particolare con la famiglia dei recettori per l'fMLF (FPR), individuati dapprima nei leucociti e successivamente in diversi tipi cellulari, comprese le cellule epiteliali (32,28).

La famiglia degli FPR comprende il recettore ad alta affinità, FPR1, e i suoi omologhi FPR2 e FPR3. L'FPR2 ha un'affinità per l'fMLF molto bassa; è invece attivato efficacemente da altre molecole, tra cui la lipossina A_4 , l'amiloide A, diversi peptidi e, come recentemente dimostrato, dall'annessina 1. L'FPR3 mostra un'elevata omologia con gli altri due recettori ma non lega fMLF e condivide solo alcuni ligandi con l'FPR2 (32).

Differenti proteasi, tra cui la tripsina, la chimotripsina, l'elastasi, la catepsina G, la plasmina e l'uPA stessa possono tagliare l'uPAR nella regione "linker" tra i domini D1-D2 (23). La scissione favorisce il rilascio del complesso uPA-D1, lasciando alla superficie cellulare forme tronche di uPAR (c-uPAR).

Queste forme di c-uPAR, in base al sito di taglio, possono mostrare dal lato N-terminale una sequenza particolare, SRSRY, (aminoacidi 88-92), dotata di attività chemotattica (23). La sequenza SRSRY media l'interazione funzionale dell'uPAR di membrana con gli FPR. In cellule epiteliali, tale interazione è necessaria sia per l'attività di FPR1 che per quella dell'uPAR; infatti, cellule trasfettate con una forma tronca di uPAR, priva dell'SRSRY, non sono in grado di migrare verso un gradiente di fMLF, così come non lo sono cellule uPAR negative, anche se esprimono FPR1. Inoltre, la migrazione cellulare uPA-dipendente richiede anch'essa l'interazione funzionale dell'uPAR con l'FPR1

(28). Anche l'uPAR intero può interagire con gli FPR; l'esposizione del dominio chemotattico avviene per un cambio conformazionale del recettore, dopo il legame dell'uPA (33).

L' uPAR può anche interagire con i recettori dei fattori di crescita, quali il recettore per il fattore di crescita epidermico (EGFR) e il recettore del fattore di crescita derivato dalle piastrine-beta (PDGFR-beta), che sembrano mediare il segnale proliferativo associato all'uPAR (34,35).

1.8 Interazioni molecolari ed attività della forma solubile dell'uPAR

La forma solubile dell'uPAR (suPAR) è stata individuata sia *in vitro* che *in vivo* (36). L'aumento dei livelli sierici di suPAR è stato osservato in pazienti affetti da varie malattie, tra cui vari tipi di cancro (36). Il rilascio dell'uPAR dalla superficie cellulare può essere dovuto all'azione della fosfolipasi glicosil-fosfatidil-inositolo specifica C o D (37) o di proteasi, come plasmina e catepsina G (38). I ligandi del suPAR sono gli stessi dell'uPAR: molecole extracellulari, come uPA, HKA e VN, e molecole della superficie cellulare, come le integrine beta1 e beta2; diventa però incapace di interagire con gli FPR (24).

Metalloproteasi, catepsina G ed elastasi possono tagliare il suPAR in corrispondenza della regione linker D1-D2, così come accade all'uPAR ancorato alla membrana plasmatica, favorendo il rilascio del dominio DI e producendo una forma tronca di suPAR (c-suPAR) che espone la specifica sequenza SRSRY dotata di attività chemiotattica (39). Il c-suPAR è stata rilevato nel siero di individui affetti da diversi tipi di cancro e in malattie neurologiche (36).

Il c-suPAR, o peptidi derivati da esso ed esponenti la sequenza SRSRY, legano e attivano l'FPR2 nei monociti, stimolando così la loro migrazione (39) (Figura 4).

Negli ultimi anni, è stata dimostrata la capacità di c-suPAR di attivare altri recettori dell'fMLF in diversi tipi cellulari. Esso lega ed attiva l'FPR in cellule staminali ematopoietiche (HSC) (40) e in cellule epiteliali della linea HEK-293 (28) e il peptide da esso derivato, uPAR₈₄₋₉₅, induce la migrazione dei basofili, attivando sia l'FPR2 che l'FPR3 (41).

Come ligando dei recettori dell'fMLF, il c-suPAR è anche in grado di attivare vie di segnalazione cellulare, inducendo l'attivazione di protein chinasi C (PKC) ed ERK-1/2 (42). Recentemente, è stato segnalato un ruolo per il c-suPAR nella mobilitazione delle cellule staminali ematopoietiche, suggerendo le funzioni biologiche *in vivo* di questa molecola derivata dall'uPAR (43).

1.9 Il sistema uPA-uPAR: rilevanza in patologia

La scoperta che l'uPAR può regolare le funzioni di varie famiglie di integrine e l'attività di recettori di chemochine e di fattori di crescita ha suggerito nuovi potenziali ruoli per l'uPAR nella fisiopatologia.

Un ruolo importante riveste l'elevata espressione dell'uPAR nella regolazione dell'aggressività e della progressione tumorale. Essa è predittiva di una maggiore aggressività della malattia in alcuni tipi di cancro (44-46); infatti, sia le cellule tumorali circolanti che quelle localizzate nel midollo osseo sovra-esprimono uPAR (47). Inoltre, in cellule tumorali circolanti è stata descritta la simultanea amplificazione genica di uPAR e HER2/neu (48). Nel carcinoma gastrico, l'espressione di uPAR sulle cellule tumorali localizzate nel midollo osseo è predittiva della capacità proliferativa di queste cellule e di una ridotta sopravvivenza dei pazienti (49).

Crescenti evidenze sperimentali dimostrano che il sistema uPA-uPAR riveste un ruolo cruciale anche nelle malattie infiammatorie acute e croniche. E' noto anche che il

sistema di attivazione del plasminogeno è coinvolto nello sviluppo dell'infiammazione articolare nell'artrite indotta dal collagene e che l'infiltrazione di cellule infiammatorie nelle articolazioni sinoviali è ridotta nei topi con deficit di plasminogeno, suggerendo che uPA e plasminogeno sono importanti mediatori di infiammazione articolare (50). È stato recentemente descritto che il decremento dell'espressione di uPAR mediante trattamento con oligonucleotidi antisenso in fibroblasti sinoviali di pazienti con artrite reumatoide riduce l'invasione della cartilagine umana in vitro ed *in vivo* (51).

L'uPA è un potente agente chemiotattico per neutrofili e monociti (52,53), l'espressione dell'uPAR è altresì richiesta per la chemiotassi verso fMLF (39-41) e per la degranolazione di monociti e granulociti.

L'effetto chemiotattico esplicito dall'uPA sulle cellule infiammatorie richiede il suo legame con l'uPAR; l'uPAR, a sua volta, subisce cambiamenti conformazionali che permettono l'esposizione del dominio chemiotattico e l'interazione con gli FPR (28, 40, 41).

È stato recentemente dimostrato dal nostro gruppo di ricerca che la chemiotassi dipendente da uPA in granulociti basofili è legata all'esposizione del dominio chemiotattico dell'uPAR e alla sua interazione con gli FPR2 e FPR3 (41).

Quindi, molecole capaci di inibire l'interazione dell'uPAR con gli FPR sarebbero un efficiente mezzo per inibire il reclutamento e l'attivazione cellulare in patologie come i disordini allergici (asma bronchiale, dermatite atopica, rinite allergica, ecc.), nelle quali i basofili, infiltrando i siti di flogosi, rivestono un ruolo preminente, o in malattie infiammatorie con cospicua infiltrazione e danno cellulare, come l'artrite reumatoide.

1.10 Nuove Metodiche Computazionali: il Virtual Screening (VS)

Queste considerazioni ci hanno spinto a ricercare delle piccole molecole solubili in grado di inibire l'interazione dell'uPAR con gli FPR. Attualmente, le piccole molecole solubili costituiscono una delle opzioni terapeutiche più attraenti, sia per la loro biodisponibilità per via orale sia per i bassi costi di produzione.

I potenziali inibitori sono stati selezionati da un database di strutture tridimensionali mediante l'utilizzo di metodi computazionali o "Virtual Screening" (VS). Il VS è una nuova tecnica computazionale usata nel "drug discovery" (54). Essa consiste in una rapida selezione di ampie librerie virtuali di composti organici solubili (anche 10^6 composti) allo scopo di identificare quelle molecole (hit compounds) che possano legarsi più favorevolmente ad un dato bersaglio molecolare, di solito rappresentato da una proteina recettoriale o da un enzima. I composti sottoposti a "screening" vengono classificati ed ordinati sulla base dell'algoritmo del software a disposizione e soprattutto sulla base di una funzione di "scoring" costituita da diversi termini energetici entropici che tengono conto dell'energia elettrostatica, di Van der Waals, delle interazioni idrofobiche e di altre componenti del complesso ligando-bersaglio. La maggior parte dei software oggi a disposizione inoltre è capace di prefiltrare le librerie di composti secondo criteri "drug-like" come il peso molecolare, il logP (permeabilità attraverso le membrane cellulari) ed il numero di legami rotabili e di rimuovere gruppi funzionali reattivi (come ad esempio epossidi, alidi, isocianati, fosfine, metalli di transizione, diazocomposti etc.) (55).

Lo scopo di questa nuova metodica è quello di identificare "nuovi scaffold" potenzialmente attivi su un determinato bersaglio molecolare da poter poi successivamente sviluppare ed ottimizzare per la progettazione di nuovi farmaci (56).

Il Virtual Screening è una tecnica che può essere di due tipi:

- Ligand Based Virtual Screening (LB-VS): in questo caso, data una serie di ligandi noti, strutturalmente diversi, attivi contro il bersaglio in esame, viene generato un modello farmacoforico da adoperare come base per la ricerca di nuovi farmaci (57).
- Structure Based Virtual Screening (SB-VS): in questo secondo caso, si parte dal sito attivo di una proteina bersaglio e librerie di composti appartenenti a database commerciali (Zinc, MayBridge, Asinex, etc.) vengono sottoposte a “docking” nella regione di legame del bersaglio molecolare e classificate secondo la funzione di “scoring” del software (58).

1.11 Il cristallo dell'uPAR

Il nostro studio ha tratto vantaggio dalla recente risoluzione della struttura cristallina della forma solubile dell'uPAR legata ad un peptide antagonista e al frammento aminoterminale (ATF) dell'uPA (59). E' stato confermato che l'uPAR si compone di tre domini che, con un tipico triplo ripiegamento, delimitano una cavità centrale in cui è legata l'uPA; l'ampia superficie esterna del recettore è disponibile all'interazione con altri recettori della superficie cellulare per formare un complesso multiproteico dinamico di segnalazione.

La nostra ricerca di inibitori si è focalizzata sul dominio funzionale importante per le interazioni con gli FPR, ovvero la sequenza SRSRY (a.acidi 88-92), e sul dominio di legame alla VN. Tale sito di legame comprende tre amminoacidi (W32, R58, I63) nel D1 e due amminoacidi (R91, Y92) nella regione che unisce D1 e D2 (60). Infatti, questi ultimi due residui amminoacidici sono coinvolti anche nell'interazione uPAR/FPR (Figure 1 e 5).

1.12 Scopo del lavoro sperimentale

Nelle patologie infiammatorie l'uPAR svolge un ruolo determinante nel regolare la chemotassi delle cellule del sistema immunitario nel sito di malattia attraverso la sua interazione con i recettori per l'fMLF (FPR).

Abbiamo quindi ricercato piccole molecole solubili in grado di inibire l'interazione uPAR/FPR da usare come potenziali farmaci. Attualmente, le piccole molecole solubili costituiscono una delle opzioni terapeutiche più attraenti, sia per la loro bio-disponibilità per via orale sia per i bassi costi di produzione.

I potenziali inibitori sono stati selezionati mediante l'utilizzo di un metodo computazionale, il "Virtual Screening". Esso consiste in una rapida selezione di ampie librerie virtuali di composti organici solubili allo scopo di identificare le molecole che possano legarsi più favorevolmente ad un dato bersaglio molecolare.

La nostra ricerca di inibitori si è focalizzata sul dominio funzionale dell'uPAR importante per le interazioni con gli FPR, ovvero la sequenza SRSRY (a.acidi 88-92), e sul dominio di legame alla VN. Infatti, questi due domini condividono due residui aminoacidici (R91, Y92). Inoltre, l'adesione cellulare mediata dall'interazione uPAR-VN facilita anch'essa il richiamo di cellule dell'immunità innata nei siti dell'infiammazione (61).

Le molecole che hanno soddisfatto le interazioni chiave (legami H, interazioni ioniche e idrofobiche) sono state selezionate come possibili ligandi e i composti con lo "score" più elevato sono stati successivamente caratterizzati *in vitro*, attraverso saggi biologici, per i loro effetti su adesione, migrazione e proliferazione cellulare.

Poiché l'uPAR è fortemente espresso in diverse patologie neoplastiche e infiammatorie, ci aspettiamo che una nuova terapia basata sull'utilizzo di tali piccole molecole possa essere specifica e poco tossica.

2 MATERIALI E METODI

2.1 Preparazione del recettore e dei suoi ligandi per gli studi di “Virtual Screening”

Le coordinate della struttura cristallina del recettore dell'uPAR complessata con un inibitore peptidico competitivo di urokinase-type plasminogen activator (uPA), alla risoluzione di 2.7Å è stata scaricata dalla Protein Data Bank (PDB ID code 1YWH). I residui della proteina sono stati processati attraverso il Protein Preparation Panel di Maestro, secondo l'approccio di default, aggiungendo idrogeni e parametri atomici definiti da OPLS di default (62). Infine è stata effettuata una minimizzazione dei soli idrogeni adoperando come campo di forza OPLS2005 attraverso l'utility IMPREF di Maestro. Un set di 4.485, composti scaricato dall'NCI database è stato adoperato per gli studi di virtual screening dopo essere stato sottoposto al modulo LigPrep di Maestro allo scopo di considerare tutti i possibili stati di protonazione e tautomerizzazione dei ligandi. Questo processo ha portato ad ottenere 7.256 strutture rispetto ai 4.485 composti di partenza. La libreria di composti in esame, è stata prefiltrata adoperando le seguenti proprietà drug-like: peso molecolare (100-600D), *Daylight ClogP* (da -2.00 a +6.00) e numero di legami rotabili (≤ 15).

2.2 Studi di Virtual Screening

Tutte le strutture sono state sottoposte a docking e classificate attraverso la Virtual Screening Workflow di Maestro. Il virtual screening è stato condotto usando dapprima il modulo dell'High Thrighoutput Virtual Screening che ha mantenuto il 10% dei

migliori composti. I 442 composti top ranked sono stati poi sottoposti nuovamente a docking adoperando il modulo Glide Standard Precision (SP) che a sua volta ha mantenuto il 10% delle migliori molecole (62). Queste ultime sono state poi processate attraverso Glide Extra Precision (XP) che le ha riclassificate nelle loro pose migliori. In sostanza Glide effettua una ricerca conformazionale completa del ligando determinando tutte le possibili orientazioni (pose) per ciascun conformero a più bassa energia nel sito di legame considerato. Durante il processo, vengono considerati tutti i possibili gradi torsionali del ligando, mantenendo fissa la conformazione della proteina. La “scoring function SP” è applicata per classificare le pose considerando le interazioni idrofobiche ed elettrostatiche, legami idrogeno, clash sterici, energia interna e di desolvatazione del ligando e possibili interazioni di molecole di acqua all'interno del sito attivo. Nella modalità XP, le pose sono successivamente rilassate attraverso minimizzazioni energetiche complete. Pertanto le pose più accurate derivanti da questo processo provvedono ad una più dettagliata valutazione dei contributi derivanti da eventuali molecole di acqua esplicite nel binding site e da interazioni idrofobiche.

2.3 Reagenti

L'anticorpo policlonale di coniglio anti-uPAR 399 è stato fornito dall'American Diagnostica (Greenwich, CT, USA), gli anticorpi monoclonali anti-uPAR R2 e R4 sono stati gentilmente forniti dalla Dr. G. Hoyer-Hansen (The Finsen Centre, Copenhagen, Denmark); l'anticorpo policlonale di coniglio anti-FPR è stato fornito dalla Santa Cruz Biotechnology (CA, USA). Gli anticorpi secondari anti-immunoglobuline di topo e di coniglio coniugati alla perossidasi di rafano sono stati forniti dalla BIORAD (Richmond, CA, USA). Il kit di rivelazione per chemiluminescenza, ECL (Enhanced Chemio-Luminescence), è stato fornito dall'Amersham Biosciences (Little Chalfont, England). I

filtri in PVDF (poli-vinil-difluoruro) per Western Blot sono stati forniti dalla Millipore (Windsor, MA, USA). La proteina A Sepharose per gli esperimenti di coimmunoprecipitazione è stata fornita dalla GE Healthcare (Uppsala, Sweden). Il CG è stato prodotto dalla Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), la LM e la VN dalla Becton Dickinson Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA), la FN dalla Roche (Indianapolis, IN, USA). I filtri per chemiotassi sono prodotti dalla Corning (Lowell, MA, USA). Le piastre per i saggi di adesione cellulare sono state fornite dalla Nunc (Roskild, Denmark); le piastre per gli esperimenti di proliferazione cellulare sono state fornite dalla BD Falcon, il reagente “CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay” è stato fornito dalla Promega (Madison, WI, USA).

2.4 Inibitori chimici

I composti individuati mediante “virtual screening” sono stati sciolti in dimetilsolfossido (DMSO) alla concentrazione di 0,01 M. Per la realizzazione degli esperimenti sono stati diluiti 1:200 nel mezzo di incubazione delle cellule ed usati ad una concentrazione finale di 50 μ M. Come controllo negativo è stato usato il DMSO alla diluizione 1:200 che, in esperimenti paralleli condotti in assenza del veicolo, è risultata essere non tossica per le cellule.

2.5 Colture cellulari

Per la realizzazione degli esperimenti sono state utilizzate diverse linee cellulari. Cellule umane embrionali di rene (Human Embryonic Kidney, HEK-293 cells) uPAR-negative sono state transfettate con un vettore plasmidico vuoto (pcDNA3), denominate V-293 e utilizzate come controllo negativo; cellule uPAR-293, sono state transfettate con il vettore pcDNA3 in cui è stato inserito il cDNA codificante per l'uPAR; cellule D2D3-

293, ovvero cellule 293 transfettate con il vettore pcDNA3 in cui è stato inserito il cDNA codificante per il dominio 1 e il dominio 2 dell'uPAR e contenente la sequenza chemotattica SRSRY; cellule scD2D3-293, ovvero cellule 293 transfettate con il vettore pcDNA3 in cui è stato inserito il cDNA codificante per il dominio 1 e il dominio 2 dell'uPAR non contenente la sequenza chemotattica (28). Queste linee cellulari sono state coltivate in DMEM -Dulbecco's Modified Eagle Medium- (GIBCO, Gaithersburg, MD, USA) con aggiunta di FBS (siero fetale bovino) al 10% e Geneticina (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) diluita alla concentrazione di 0,5 mg/ml.

Sono state inoltre utilizzate cellule leucocitarie della linea KG1, esprimenti l'uPAR e gli FPR, coltivate in terreno di coltura RPMI con aggiunta di FBS al 10%.

2.6 Preparazione dei plasmidi esperimenti le varie forme di uPAR

La regione codificante del cDNA dell'uPAR (nt 44-1061), precedentemente clonata nel sito EcoRI del vettore pBluescript, gentilmente fornita dalla Dr. P. Stoppelli (IGB, Napoli, Italia) è stata da questo escissa mediante digestione con l'enzima di restrizione EcoRI. Il risultante frammento, di circa 1000 bp, è stato purificato ed è stata allestita una reazione di ligasi con il vettore di espressione eucariotico pcDNA3 con resistenza a Geneticina (G418), digerito anch'esso con l'enzima EcoRI e defosforilato. Il plasmide risultante è stato chiamato uPAR-pcDNA3 ed utilizzato per le successive trasfezioni. uPAR cDNA (nucleotide -3 / 1018) è stato clonato nel sito theEcoRI di pcDNA3, e il plasmide risultante è stato nominato uPAR-pcDNA3.

Il plasmide D2D3-pcDNA3 è stato generato da amplificazione di due diverse regioni del cDNA dell'uPAR: la regione corrispondente al nucleotide -43-65, codificante il peptide leader e la regione corrispondente ai nucleotidi 315-1008, codificante per i domini 2 e 3,

e contenente il peptide P88-92. Il plasmide risultante conteneva un cDNA codificante il peptide leader legato ai residui 84-313.

Il plasmide scD2D3-pcDNA3 è stato preparato dal D2D3-pcDNA3 per amplificazione e contiene il peptide leader legato ai residui 95-313.

2.7 Trasfezioni

Per le trasfezioni è stato scelto il metodo della lipofezione. Il reagente usato, la Lipofectamina (Invitrogen), contiene lipidi cationici che interagiscono con le molecole anioniche del DNA, formando complessi che vengono captati dalle cellule.

Le cellule sono state piastrate il giorno prima della trasfezione su piastre da 100 mm. 10 µg di uPAR-pcDNA3, D2D3-pcDNA3, scD2D3-pcDNA3 o di pcDNA3 di controllo, sono stati diluiti in 800 µg di DMEM senza siero ed aggiunti ad una soluzione contenente 60 µg di lipofectamina in 800 µg di DMEM senza siero. La miscela è stata poi incubata per 45 minuti a temperatura ambiente, sono stati aggiunti 6,4 ml di DMEM senza siero e la miscela di trasfezione così ottenuta è stata stratificata sulle cellule.

Dopo 5 ore di incubazione a 37°C, 5% di CO₂, sono stati aggiunti alla piastra 8 ml di DMEM contenente il 20% di FBS. Il mezzo di trasfezione è stato sostituito dopo 24 ore con DMEM contenente FBS al 10%. Per ottenere trasfettanti stabili, le cellule sono state coltivate in DMEM contenente FBS al 10% e Geneticina ad una concentrazione di 1,5 mg/ml. Dopo circa 15 giorni di selezione, le cellule sono state trasferite in mezzo di coltura contenente Geneticina diluita a 0,5 mg/ml.

2.8 Western Blot

Le cellule sono state lisate in PBS (0,08 M NaCl, 0,002 M KCl, 0,0115 M Na₂HPO₄, 0,002 M KH₂PO₄, pH 7,2) contenente Triton X-100 all'1%, in presenza di inibitori delle

proteasi e delle fosfatasi (Sigma). La concentrazione proteica dei lisati è stata determinata mediante un dosaggio colorimetrico (Biorad). 10 µg di proteine totali sono state sottoposte a separazione elettroforetica su gel SDS-poliacrilammide e trasferiti su membrane PVDF. Le membrane sono state incubate per 20 ore a 4 °C con un anticorpo policlonale anti-uPAR (American Diagnostica, Stamford, CT), diluito 1:1000, o con un siero non immune, come controllo negativo. I filtri sono stati ulteriormente incubati per 30 minuti a temperatura ambiente con un anticorpo secondario anti-coniglio coniugato a HRP. La reazione è stata evidenziata con il kit di rivelazione ECL.

2.9 Saggi di adesione cellulare

I saggi di adesione sono stati realizzati su piastre Nunc da 96 pozzetti a fondo piatto. I pozzetti utilizzati sono stati incubati con 1 µg di VN, o altre proteine dell'ECM, quali LM, CG, FN, per 20 ore a 4°C, oppure con 100 µl di BSA 1% denaturata al calore, come controllo negativo. Le cellule sono state staccate con tripsina, risospese in DMEM contenete FBS al 10% e quindi incubate per 1 ora a 37°C, 5% CO₂, per favorire la ricostituzione del recettore. Le cellule sono state poi lavate con DMEM, contate, distribuite nei pozzetti della piastra alla densità di 10⁵ cellule/pozzetto e incubate per 1 ora a 37°C. Le cellule aderenti, dopo un lavaggio con PBS, sono state colorate con 0,5 % crystal violetto. Il colorante è stato poi eluito e l'assorbanza dell'eluato misurata mediante lettore ELISA ad una lunghezza d'onda di 540 nm.

Le cellule KG1 sono state invece raccolte direttamente, contate e piastrate come sopra.

2.10 Saggi di migrazione cellulare

I saggi di migrazione cellulare sono stati realizzati utilizzando la tecnica della camera di Boyden. In sintesi, cellule uPAR-293 sono poste a migrare, per 4 ore a 37 °C, 5% di

CO₂, in camere di Boyden, utilizzando filtri di policarbonato con pori di diametro 8 micron rivestiti con 10 µg/ml di fibronectina verso un gradiente di uPA (5×10^{-9} M), di fMLF (1×10^{-8} M), di un agonista degli fMLF-Rs, il peptide WKYVM (peptide W) (1×10^{-9}), in presenza delle molecole inibitorie da testare o DMSO, come controllo negativo. Cellule V-293, uPAR-negative, sono poste a migrare verso mezzo di coltura contenente siero di vitello bovino (FBS) al 10%, in presenza delle molecole inibitorie da testare o di DMSO, come controllo negativo. Le cellule sulla superficie inferiore del filtro sono fissate, colorate e contate. Alcuni esperimenti di migrazione sono stati effettuati anche con la linea leucocitaria KG1 e con mononucleati da sangue periferico su filtri di diametro 5 micron.

2.11 Coimmunoprecipitazione

Cellule uPAR-293 (2.5×10^6 /campione) sono state lavate con un tampone di stabilizzazione dei microtubuli (PIPES 0.1 M, pH 6,9, glicerolo 2 M, EGTA 1mM, MgAc 1 mM) ed estratte in PBS contenente Triton X-100 all'1% con l'aggiunta di inibitori di proteasi e fosfatasi. Il residuo insolubile, arricchito in proteine associate al citoscheletro, è stato quindi solubilizzato in RIPA (NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, acido deossicolico 1%, SDS 0.1%, Triton X-100 1%, inibitori di proteasi e fosfatasi) e preincubato con siero non-immune e proteina A-sefariosio al 10%, per 2 ore a 4°C. Dopo centrifugazione, il surnatante è stato incubato con l'anticorpo specifico anti-uPAR (R4) o con siero non-immune per 2 ore a 4°C. Dopo 30 minuti di incubazione con la proteina A-sefariosio, gli immunocomplessi sono stati eluiti e sottoposti a Western blot, utilizzando un anticorpo specifico diretto contro l'FPR.

3 RISULTATI

3.1 Identificazione di piccole molecole dirette verso l'interazione uPAR/FPR e verso il legame uPAR-VN attraverso studi di Structure-Based Virtual Screening (SB-VS)

Al fine di identificare nuovi potenziali candidati in grado di interferire con l'associazione uPAR/FPR e con il legame dell'uPAR alla VN, è stata usata una tecnica di screening virtuale attraverso il software GLIDE (Grid-based Ligand Docking from Energetics) (61). L'algoritmo presente in GLIDE approssima una ricerca sistematica di posizioni, orientazioni e conformazioni dei ligandi nel sito attivo del target usando una serie di filtri gerarchici. Prima di iniziare la ricerca di piccole molecole capaci di distruggere l'associazione uPAR/FPR e il legame uPAR-VN, dapprima è stato identificato il sito presente sull'uPAR al quale si lega l'FPR (23) e quello a cui si lega la VN (59). E' stato dimostrato che il sito specifico per l'FPR è collocato tra i residui 88-92 del "linker" D2-D3 dell'uPAR, mentre quello per la VN comprende tre amminoacidi (W32, R58, I63) nel D1 e due amminoacidi (R91, Y92) nella regione che unisce D1 e D2. Pertanto, le simulazioni di docking sono state condotte sulla struttura cristallina del recettore di uPAR complessata con un inibitore peptidico competitivo di uPA, alla risoluzione di 2.7Å (PDB ID code *IYWH*).

Gli studi di virtual screening sono stati condotti adoperando le strutture tridimensionali di 4.485 composti provenienti da un subset del database del National Cancer Institute (NCI). Questo set di strutture è stato preparato per il docking attraverso il modulo

LigPrep di Maestro (Schrödinger) al fine di calcolare tutti i possibili stati di ionizzazione, tautomeria e stereoisomeria dei composti. I 4.485 composti sono stati identificati dall'*Open NCI Database (Development Therapeutics Program Web site)* attraverso un prefiltering dello stesso database utilizzando le seguenti proprietà “drug-like”: peso molecolare (100-600D), *Daylight ClogP* (da -2.00 a +6.00) e numero di legami rotabili (≤ 15). Per questo progetto, è stato adoperato la *Virtual Screening Workflow* di Maestro (Schrödinger Suite 2008) attraverso un protocollo multistep. Ciascuna delle molecole processate da LigPrep del nostro database è stata sottoposta a docking all'interno del sito di legame del target.

Nel primo step è stato effettuato un docking rapido attraverso il modulo dell'High Throughput Virtual Screening, trattenendo il 10% delle migliori molecole. Tali composti sono stati poi sottoposti ad un docking con Glide Standard Precision (SP), che ha mantenuto a sua volta il 10% delle migliori molecole. Infine nel terzo step, tutti i risultanti composti dal docking Glide Standard Precision, sono stati sottoposti ad un docking più accurato con il modulo Glide Extra-Precision (XP) la cui funzione di scoring considera alcune componenti energetiche aggiuntive che tengono conto dei legami idrogeno e delle interazioni aromatiche e riclassificati secondo la stessa (62). L'intero processo è riportato schematicamente nella workflow in (Figura 6).

Alla fine dell'intero processo, sono stati ottenuti 44 composti top ranked per l'interazione uPAR/FPR e 48 per il legame uPAR-VN che sono stati analizzati visivamente per il miglior fit nel sito di legame ed il loro docking score. Tra essi, ne sono stati scelti 31 per l'interazione uPAR/FPR e 41 per il legame uPAR-VN che sono stati successivamente sottoposti a saggi biologici *in vitro* al fine di valutarne l'attività biologica.

3.2 Cellule HEK-293 transfettate con cDNA codificanti per varie forme di uPAR esprimono il recettore

Per ottenere un sistema cellulare che esprimesse elevati livelli di uPAR sono state transfettate cellule HEK-293, uPAR-negative, con il cDNA codificante per l'uPAR; tali cellule sono state chiamate uPAR-293. Come controllo negativo, cellule HEK-293 sono state transfettate con il vettore vuoto pcDNA3 e denominate V-293. Inoltre cellule HEK-293 sono state transfettate con due forme tronche di uPAR, prive del dominio 1 e contenenti (D2D3-uPAR) o non contenenti (scD2D3-uPAR) il dominio chemotattico SRSRY (a.acidi 88-92) di interazione con gli FPR.

Abbiamo verificato mediante Western blot con un anticorpo policlonale anti-uPAR che le proteine fossero effettivamente espresse nei lisati cellulari (Figura 7).

3.3 Cellule uPAR-293 e D2D3-293 mostrano un'aumentata adesione alla vitronectina

Per dimostrare che i composti individuati mediante virtual screening interferissero effettivamente con l'interazione uPAR/FPR e con il legame uPAR-VN, abbiamo valutato la loro capacità di inibire l'adesione cellulare *in vitro* alla VN.

In cellule uPAR-293, l'adesione cellulare alla VN è mediata dal legame dell'uPAR a quest'ultima, attraverso il suo sito specifico, e alla successiva interazione dell'uPAR, attraverso la regione SRSRY, con l'FPR1 e con l'integrina $\alpha_v\beta_5$, che trasduce il segnale all'interno della cellula (42). Quindi composti diretti contro il sito di legame dell'uPAR per la VN e contro il dominio di interazione del recettore con gli FPR dovrebbero inibire l'adesione cellulare alla VN.

Abbiamo prima dimostrato che l'elevata espressione di uPAR, in cellule uPAR-293, incrementava effettivamente l'adesione cellulare alla VN, rispetto alle cellule di

controllo V-293 (Fig.8). Un lieve, ma significativo, incremento di adesione alla VN si osservava anche in cellule D2D3-293, contenenti il dominio SRSRY di interazione con l'FPR1 e con l'integrina $\alpha_v\beta_5$; la rimozione del dominio chemotattico, nelle cellule scD2D3-293, aboliva tale incremento (Figura 8).

3.4 Quattro composti delle due serie di potenziali inibitori selezionati mediante VS diminuiscono l'adesione cellulare alla VN

Successivamente, abbiamo eseguito esperimenti di adesione cellulare alla VN in presenza o assenza delle molecole selezionate mediante VS. Cellule uPAR-293 sono state pretrattate con i potenziali inibitori (5×10^{-6} M) e con DMSO, come controllo negativo, per 30 minuti e quindi testate per adesione cellulare alla VN in piastre da 96 pozzetti.

Tra le varie molecole testate, nessun composto di quelli predetti inibire l'interazione uPAR/FPR è risultato attivo (non mostrato); mentre, quattro composti di quelli predetti inibire il legame uPAR-VN hanno determinato una sostanziale riduzione dell'adesione di cellule uPAR-293 alla VN, rispetto alle stesse cellule trattate con il solo solvente (DMSO) (Figura 9).

3.5 Due delle molecole individuate mediante virtual screening sono specifiche per l'uPAR ma non per la VN

In esperimenti successivi, abbiamo valutato la specificità per l'uPAR dei quattro composti individuati analizzando il loro effetto sull'adesione alla VN di cellule uPAR-293 e utilizzando come controllo negativo cellule transfettate con il solo vettore vuoto, V-293 o con le forme tronche del recettore D2D3-293 e scD2D3-293.

Come si osserva in Figura 10A, solo due dei composti identificati esercitavano un'azione inibitoria significativamente più alta su cellule uPAR-293, rispetto ai controlli; tali composti erano identificati dalle sigle NSC2805 (composto n°6) e NSC305798 (composto n°37).

Per verificare la specificità di substrato dei due inibitori identificati, le due molecole attive sono state testate in esperimenti di adesione *in vitro* di cellule uPAR-293 a quattro diverse componenti della matrice extracellulare: VN, FN, LM e CG.

Sorprendentemente, entrambi i composti risultavano attivi anche nell'inibire l'adesione cellulare alle altre principali proteine della matrice extracellulare (Figura 10B).

3.6 Effetti degli inibitori specifici per l'uPAR sulla migrazione delle cellule uPAR-293

La capacità dei due inibitori identificati di ridurre, anche in maniera statisticamente significativa, l'adesione cellulare a tutte le proteine della matrice extracellulare, ci ha spinto ad ipotizzare che tali molecole potessero legare l'uPAR in corrispondenza della regione coinvolta nel legame alla VN, interferendo però anche nell'interazione con gli FPR. Infatti, due aminoacidi (R91, Y92), localizzati nella regione "linker" D2-D3, sono in comune tra i due siti di legame alla VN e agli FPR; inoltre, l'interazione uPAR/FPR è necessaria per modulare l'attività integrinica (42, 63). Ciò spiegherebbe la riduzione dell'adesione cellulare a tutte le matrici indotta dagli inibitori selezionati e avrebbe conseguenze rilevanti non solo nei processi di adesione, ma anche di migrazione cellulare, nei quali sia gli FPR che l'uPAR rivestono un ruolo di primaria importanza.

Il nostro obiettivo successivo è stato quindi dimostrare che le due molecole individuate fossero in grado di inibire specificamente la migrazione di cellule uPAR-293. In tali cellule, sia la migrazione cellulare uPA-dipendente che fMLF-dipendente richiede

l'espressione e l'interazione funzionale dell'uPAR con l' FPR1 (28). A tale scopo, sono stati eseguiti esperimenti di chemiotassi in camere di Boyden, su cellule uPAR-293 e cellule V-293, come controllo. Sono stati utilizzati come chemoattrattanti il frammento aminoterminale dell'uPA (ATF), ligando specifico dell'uPAR, il tripeptide formilato fMLF, ligando di FPR1 e siero fetale bovino (FBS); infatti le cellule V-293 non esprimono l'uPAR e, di conseguenza, non migrano verso uPA e verso agonisti degli FPR (28).

Il trattamento con gli inibitori non determinava alcuna variazione nella migrazione cellulare indotta da FBS in cellule V-293. Gli inibitori esercitavano, invece, un effetto notevole sulle migrazione indotta da uPA e fMLF in cellule uPAR-293; inoltre essi inibivano anche la migrazione di cellule uPAR-293 verso FBS, il cui maggiore componente chemoattrattante è la VN. (Figura 11A e B).

3.7 Effetti degli inibitori specifici per l'uPAR sulla migrazione di cellule leucocitarie della linea KG1

Per dimostrare che i due composti fossero attivi anche su cellule non transfettate con uPAR, abbiamo scelto di condurre altri esperimenti di chemiotassi utilizzando una linea cellulare leucocitaria, le cellule KG1, che esprimono costitutivamente sia l'uPAR che gli FPR1 e FPR3 (40,43).

In tali esperimenti, le cellule sono state preincubate con gli inibitori o con il solo tampone, come controllo, e successivamente indotte a migrare in risposta a stimoli quali uPA e agonisti degli FPR, fMLF o peptide W.

La figura 12 mostra i risultati di tre esperimenti in cui la preincubazione delle cellule KG1 con i due inibitori riduce drasticamente l'effetto chemiotattico indotto da tutti gli stimoli utilizzati.

3.8 Effetti degli inibitori specifici per l'uPAR sulla migrazione di cellule mononucleate di sangue periferico (PBMC)

Esperimenti di chemiotassi sono stati eseguiti anche su cellule primarie, in particolare, su cellule mononucleate di sangue periferico (PBMC), esperimenti costitutivamente sia l'uPAR che tutti gli FPR (32).

Anche in questo caso abbiamo evidenziato che entrambe le molecole erano capaci di bloccare la chemiotassi di PBMC indotta dalla stimolazione con uPA, fMLF e peptide W. Inoltre, come controllo di specificità, abbiamo dimostrato che entrambi i composti non esercitano alcun effetto sulla chemotassi leucocitaria indotta da RANTES, che non è un ligando di uPAR o degli FPR, ma un ligando del recettore per chemochine CCR5 (Figura 13).

3.9 Gli inibitori selezionati inibiscono l'interazione strutturale uPAR/fMLP-Rs

Allo scopo di dimostrare che le due molecole individuate agissero inibendo l'interazione strutturale tra uPAR e FPR, abbiamo eseguito un esperimento di co-immunoprecipitazione. Abbiamo così evidenziato l'esistenza di una interazione strutturale tra l'uPAR e l'FPR nelle cellule trattate con il solo solvente (DMSO); tale interazione è ridotta dalla preincubazione delle cellule con i due inibitori.

La riduzione dell'interazione uPAR/FPR è da attribuire esclusivamente al trattamento delle cellule con i due composti e non ad una differente espressione dell'FPR, come dimostra la presenza della stessa quantità di FPR presente in tutti i lisati di partenza. (Figura 14).

4 CONCLUSIONI

Il recettore per l'urochinasi (uPAR) è un recettore con molteplici ruoli e funzioni.

In primo luogo, l'uPAR localizza l'attività proteolitica dell'urochinasi (uPA) sulla superficie cellulare; poi, esso lega direttamente una proteina della matrice extracellulare, la vitronectina (VN) e interagisce con integrine e recettori di chemotassi, regolando quindi adesione e migrazione cellulare.

Ciò comporta importanti conseguenze nei sistemi biologici in cui tale recettore risulta iperespresso: infiammazione, rimodellamento tissutale e patologie neoplastiche. Infatti, l'uPAR è considerato un fattore prognostico negativo in numerosi tumori umani (44-46), tra cui il carcinoma della mammella, del polmone, dell'ovaio e della prostata, in cui promuove la proliferazione e la sopravvivenza delle cellule tumorali nel sito metastatico.

Crescenti evidenze sperimentali dimostrano che il sistema uPA-uPAR riveste un ruolo cruciale anche nelle malattie infiammatorie acute e croniche. L'uPA è un potente agente chemiotattico per neutrofilo e monociti (52,53), l'espressione dell'uPAR è altresì richiesta per la chemiotassi verso fMLF (39-41) e per la degranolazione di monociti e granulociti. E' noto anche che il sistema di attivazione del plasminogeno è coinvolto nello sviluppo dell'infiammazione articolare (50) e nell'artrite reumatoide (51).

Il mio lavoro sperimentale si è focalizzato sulla possibilità di inibire le attività uPAR-mediate, ricercando piccole molecole solubili per un possibile uso in future terapie anti-infiammatorie e anti-neoplastiche.

La nostra ricerca di inibitori dell'uPAR si è focalizzata sul dominio funzionale importante per le interazioni con i recettori per l'fMLF, gli FPR, coinvolti nella chemiotassi di cellule infiammatorie, e sul dominio di legame alla VN. L'interazione funzionale dell'uPAR di membrana con gli FPR, mediata dalla sequenza SRSRY

(a.acidi 88-92), è necessaria sia per l'attività degli FPR che per quella dell'uPAR, quindi sia per la chemotassi verso fMLF che verso uPA (28, 40, 41). Il sito di legame per la VN comprende tre amminoacidi (W32, R58, I63) nel D1 e due amminoacidi (R91, Y92) nella regione che unisce D1 e D2 (60). Questi ultimi due residui amminoacidici ricadono proprio nella regione SRSRY (a.acidi 88-92). Inoltre, l'adesione cellulare mediata dall'interazione uPAR-VN facilita anch'essa il richiamo di cellule dell'immunità innata nei siti dell'infiammazione (61).

È stato utilizzato un approccio basato sulla struttura del recettore, recentemente risolta a livello cristallografico, e su studi di "virtual screening" (VS), che permettono di selezionare molecole in base alla loro struttura tridimensionale e alla loro affinità di legame con il bersaglio molecolare. Mediante VS sono state identificate 31 molecole per l'interazione uPAR/FPR e 41 molecole in grado di interagire con l'uPAR in corrispondenza del sito di legame con la VN. Tali composti sono stati successivamente sottoposti a saggi biologici *in vitro* al fine di valutarne l'attività biologica.

Come modello, sono state usate cellule epiteliali HEK-293 transfettate con l'uPAR, cellule uPAR-293, che sovraesprimono il recettore in maniera funzionalmente attiva sulla superficie cellulare. In tali cellule, l'interazione uPAR/FPR è necessaria per la migrazione verso uPA e verso fMLF, così come accade in cellule infiammatorie (40,41). Lo screening iniziale è stato effettuato mediante saggi di adesione cellulare *in vitro* alla VN. In cellule uPAR-293, l'adesione cellulare alla VN è mediata dal legame diretto dell'uPAR, attraverso il suo sito specifico, e alla successiva interazione del recettore, attraverso la regione SRSRY, con l'FPR1 e con l'integrina $\alpha_v\beta_5$, che trasduce il segnale all'interno della cellula (42). Quindi composti diretti contro il sito di legame dell'uPAR per la VN e contro la sequenza SRSRY dovrebbero inibire l'adesione cellulare alla VN.

Tra le varie molecole testate, nessun composto di quelli predetti inibire l'interazione uPAR/FPR è risultato attivo. Dalla serie di molecole dirette invece sul legame uPAR-VN ne sono state selezionate quattro in grado di inibire notevolmente l'adesione cellulare alla VN, rispetto alle stesse cellule trattate con il solo solvente (Figura 9).

Successivamente, abbiamo dimostrato che soltanto due delle quattro molecole identificate risultavano specifiche per l'uPAR, analizzando il loro effetto sull'adesione alla VN di cellule uPAR-293 e utilizzando come controllo negativo cellule uPAR-negative, o cellule esprimenti forme tronche del recettore prive del solo dominio D1, in cui è localizzato il sito di legame alla VN, o prive sia del D1 che dell'SRSRY (Figura 10A).

I due inibitori selezionati, pur essendo specifici per l'uPAR, data l'assenza di effetto su cellule uPAR-negative, inibivano però l'adesione cellulare non solo alla VN, ma a tutte le più importanti proteine della matrice extracellulare (Figura 10B). Ciò ci ha spinto ad ipotizzare che tali molecole potessero legare l'uPAR in modo da interferire non solo con il legame alla VN, ma anche con l'interazione dell'uPAR con gli FPR, necessaria per la modulazione dell'attività integrinica (63).

Le due molecole inibitorie identificate sono state quindi testate in esperimenti di migrazione cellulare *in vitro*; infatti l'interazione uPAR/FPR è necessaria per la chemotassi sia dipendente da uPAR che da FPR. I due composti selezionati riducevano drasticamente la chemiotassi indotta sia da agonisti dell'uPAR, sia da ligandi specifici per gli FPR. Tale effetto è stato dimostrato prima in cellule transfettate con uPAR e, quindi, esprimenti elevati livelli di recettore (Figura 11), e successivamente in cellule della linea leucocitaria KG1 (Figura 12) e cellule primarie, come mononucleati da sangue periferico (PBMC) (Figura 13), esprimenti costitutivamente l'uPAR e gli FPR.

Infine, per dimostrare che le due molecole individuate agissero inibendo l'interazione strutturale tra uPAR e FPR, è stato eseguito un esperimento di co-immunoprecipitazione,

in cui abbiamo evidenziato l'esistenza di una interazione strutturale tra i due recettori. Tale interazione è ridotta dalla preincubazione delle cellule con i due inibitori (Figura 14).

Il nostro lavoro proseguirà analizzando l'efficacia dei composti identificati *in vivo* su modelli murini di malattie infiammatorie croniche e di neoplasie umane.

5 BIBLIOGRAFIA

1. Castellino FJ, Ploplis VA: Structure and function of the plasminogen/plasmin system. *Thromb Haemost.* 2005 Apr;93(4):647-54. Review.
2. Brownstein C, Falcone DJ, Jacovina A, Hajjar KA. A mediator of cell surface-specific plasmin generation. *Ann N Y Acad Sci.* 2001 Dec;947:143-55.
3. Ellis V, Behrendt N, Dano K: Plasminogen activation by receptor-bound urokinase. A kinetic study with both cell-associated and isolated receptor. *J Biol Chem* 1997; 245: 316-323.
4. Crippa M.P.: Urokinase-type plasminogen activator. *Int J Biochem Cell Biol* 39, 690-4 (2007)
5. Irigoyen JP, Munoz-Cánoves P, Montero L, Koziczak M and Nagamine Y The plasminogen activator system: Biology and regulation. *Cell Mol Life Sci.*1999; 56: 104-132.
6. Seiffert D, Loskutoff DJ: Evidence that type 1 plasminogen activator inhibitor binds to the somatomedin B domain of vitronectin. *J Biol Chem.* 1991; 266(5): 2824-30.
7. Ehrlich HJ, Keijer J, Preissner KT, Gebbink RK and Pannekoek H Functional interaction of plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) and heparin. *Biochemistry* 1991; 30: 1021-1028.
8. Kruithof E K, Baker M S and Bunn C L: Biological and clinical aspects of plasminogen activator inhibitor type 2. *Blood* 1995; 86: 4007-4024.
9. Dickinson JL, Bates EJ, Ferrante A, Antalis TM: Plasminogen activator inhibitor type-2 inhibitor tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis: evidence for an alternate biological function. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 27894-27904.

10. Antalis TM, La Linn M, Donnan K, Mateo L, Gardner J, Dickinson JL et al: The serine proteinase inhibitor (serpin) plasminogen activation inhibitor type-2 protects against viral cytopathic effects by constitutive interferon alpha/beta priming. *J. Exp. Med.* 1998; 187: 1799-1811.
11. Blasi F., Carmeliet P.: uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 932-43 (2002)
12. Ragno P.: The urokinase receptor: a ligand or a receptor? Story of a sociable molecule. *Cell Mol Life Sci* 63, 1028-37 (2006)
13. Alfano D., Franco P., Vocca I., Gambi N., Pisa V., Mancini A., Caputi M., Carriero M.V., Iaccarino I., Stoppelli M.P.: The urokinase plasminogen activator and its receptor: role in cell growth and apoptosis. *Thromb Haemost* 93, 205-11 (2005)
14. Alfano D., Iaccarino I., Stoppelli M.P.: Urokinase signaling through its receptor protects against anoikis by increasing BCL-xL expression levels. *J Biol Chem* 281, 17758-67 (2006)
15. Besch R., Berking C., Kammerbauer C., Degitz K.: Inhibition of urokinase-type plasminogen activator receptor induces apoptosis in melanoma cells by activation of p53. *Cell Death Differ* 14, 818-29 (2007)
16. Hasanuzzaman M., Kutner R., Agha-Mohammadi S., Reiser J., Sehgal I.: A doxycycline-inducible urokinase receptor (uPAR) upregulates uPAR activities including resistance to anoikis in human prostate cancer cell lines. *Mol Cancer* 6, 34 (2007)
17. Lester R.D., Jo M., Montel V., Takimoto S., Gonias S.L.: uPAR induces epithelial-mesenchymal transition in hypoxic breast cancer cells. *J Cell Biol* 178, 425-36 (2007)
18. Vassalli J.D., Baccino D., Belin D.: A cellular binding site for the Mr 55,000 form of the human plasminogen activator, urokinase. *J Cell Biol* 100, 86-92 (1985)
19. 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* 82, 4939-43 (1985)
- 20.** Behrendt N, Rønne E, Ploug M, Petri T, Løber D, Nielsen LS, Schleuning WD, Blasi F, Appella E, Danø K.: The human receptor for urokinase plasminogen activator. NH₂-terminal amino acid sequence and glycosylation variants. *J Biol Chem* 265, 6453-60 (1990)
- 21.** Roldan A.L., Cubellis M.V., Masucci M.T., Behrendt N., Lund L.R., Danø K., Appella E., Blasi F.: Cloning and expression of the receptor for human urokinase plasminogen activator, a central molecule in cell surface, plasmin dependent proteolysis. *EMBO J* 9, 467-74 (1990)
- 22.** Ploug M., Rønne E., Behrendt N., Jensen A.L., Blasi F., Danø K.: Cellular receptor for urokinase plasminogen activator. Carboxyl-terminal processing and membrane anchoring by glycosyl-phosphatidylinositol. *J Biol Chem* 266, 1926-33 (1991)
- 23.** Resnati M., Guttinger M., Valcamonica S., Sidenius N., Blasi F., Fazioli F.: Proteolytic cleavage of the urokinase receptor substitutes for the agonist-induced chemotactic effect. *EMBO J.* 15, 1572-82 (1996)
- 24.** Montuori N., Visconte V., Rossi G-, Ragno P.: Soluble and cleaved forms of the urokinase-receptor: degradation products or active molecules? *Thromb Haemost* 93, 192-8 (2005)
- 25.** Van der Pluijm G., Sijmons B., Vloedgraven H., van der Bent C., Drijfhout J.W., Verheijen J., Quax P., Karperien M., Papapoulos S., Lowik C.: Urokinase-receptor/integrin complexes are functionally involved in adhesion and progression of human breast cancer in vivo. *Am J Pathol* 159, 971-82 (2001)
- 26.** Degryse B, Resnati M, Czekay RP, Loskutoff DJ, Blasi F. Domain 2 of the urokinase receptor contains an integrin-interacting epitope with intrinsic signaling activity: generation of a new integrin inhibitor. *J Biol Chem.* 2005; 280: 24792-803.

- 27.** Chaurasia P., Aguirre-Ghiso J.A., Liang O.D., Gardsvoll H., Ploug M., Ossowski L.: A region in urokinase plasminogen receptor domain III controlling a functional association with alpha5beta1 integrin and tumor growth. *J Biol Chem* 281, 14852-63 (2006)
- 28.** Montuori N., Carriero M.V., Salzano S., Rossi G., Ragno P.: The cleavage of the urokinase receptor regulates its multiple functions. *J Biol Chem* 277, 46932-9 (2002)
- 29.** Wei C., Möller C.C., Altintas M.M., Li J., Schwarz K., Zacchigna S., Xie L., Henger A., Schmid H., Rastaldi M.P., Cowan P., Kretzler M., Parrilla R., Bendayan M., Gupta V., Nikolic B., Kalluri R., Carmeliet P., Mundel P., Reiser J.: Modification of kidney barrier function by the urokinase receptor. *Nat Med* 14, 55-63 (2008)
- 30.** Aguirre-Ghiso JA, Kovalski K, Ossowski L.: Tumor dormancy induced by downregulation of urokinase receptor in human carcinoma involves integrin and MAPK signalling. *J Cell Biol* 1999;147:89-104.
- 31.** P. Chaurasia., M. Mezei, M.Ming Zhou, L.Ossowski :Computer Aided identification of small molecules disrupting uPAR/alfa5beta1 integrin interaction: A new Paradigm for Metastasis Prevention, *Plos one* 2009; 4: e4617
- 32.** Le Y., Murphy P.M., Wang J.M.: Formyl-peptide receptors revisited. *Trends Immunol* 23, 541-8 (2002)
- 33.** Ploug, M., V. Ellis, K. Dano. 1994. Ligand interaction between urokinase-type plasminogen activator and its receptor probed with 8-anilino-1-naphthalenesulfonate. Evidence for a hydrophobic binding site exposed only on the intact receptor. *Biochemistry* 33:8991
- 34.** Liu D., Aguirre Ghiso J., Estrada Y., Ossowski L.: EGFR is a transducer of the urokinase receptor initiated signal that is required for in vivo growth of a human carcinoma. *Cancer Cell* 1, 445-57 (2002)

35. Kiyani J., Kiyani R., Haller H., Dumler I.: Urokinase-induced signaling in human vascular smooth muscle cells is mediated by PDGFR-beta. *EMBO J* 24, 1787-97 (2005)
36. Høyer-Hansen G., Lund I.K.: Urokinase receptor variants in tissue and body fluids. *Adv Clin Chem* 44, 65-102 (2007)
37. Wilhelm O.G., Wilhelm S., Escott G.M., Lutz V., Magdolen V., Schmitt M. et al.: Cellular glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D regulates urokinase receptor shedding and cell surface expression. *J. Cell Physiol* 180, 225-35 (1999)
38. Beaufort N., Leduc D., Rousselle J.C., Magdolen V., Luther T., Namane A. et al.: Proteolytic regulation of the urokinase receptor/CD87 on monocytic cells by neutrophil elastase and cathepsin G. *J. Immunol* 172, 540-9 (2004)
39. Resnati, M., I. Pallavicini, J. M. Wang, J. Oppenheim, C. N. Serhan, M. Romano, F. Blasi: The fibrinolytic receptor for urokinase activates the G protein-coupled chemotactic receptor FPRL1/LXA4R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:1359 (2002)
40. Selleri C, Montuori N, Ricci P, Visconte V, Carriero MV, Sidenius N, Serio B, Blasi F, Rossi G, Ragno P.: Involvement of the urokinase-type plasminogen activator receptor in hematopoietic stem cell mobilization. *Blood* 105, 2198-205 (2005)
41. De Paulis A., Montuori N., Prevete N., Fiorentino I., Rossi F.W., Visconte V., Rossi G., Marone G., Ragno P.: Urokinase induces basophil chemotaxis through a urokinase receptor epitope that is an endogenous ligand for formyl peptide receptor-like 1 and -like 2. *J Immunol* 173, 5739-48 (2004)
42. Gargiulo L, Longanesi-Cattani I, Bifulco K, Franco P, Raiola R, Campiglia P, Grieco P, Peluso G, Stoppelli MP, Carriera MV.: Cross-talk between fMLP and vitronectin receptors triggered by urokinase receptor-derived SRSRY peptide. *J Biol Chem.* 280, 25225-232 (2005)

- 43.** Selleri C, Montuori N, Ricci P, Visconte V, Baiano A, Carriero MV, Rotoli B, Rossi G, Ragno P. In vivo activity of the cleaved form of soluble urokinase receptor: a new hematopoietic stem/progenitor cell mobilizer. *Cancer Res.* 2006; 66: 10885-90.
- 44.** Laufs S., Schumacher J., Allgayer H.: Urokinase-receptor (u-PAR): an essential player in multiple games of cancer: a review on its role in tumor progression, invasion, metastasis, proliferation/dormancy, clinical outcome and minimal residual disease. *Cell Cycle* 5, 1760–1771 (2006)
- 45.** Mazar AP.: Urokinase plasminogen activator receptor choreographs multiple ligand interactions: implications for tumor progression and therapy. *Clin Cancer Res.* 14, 5649–5655 (2008)
- 46.** Allgayer H., Aguirre-Ghiso JA.: The urokinase receptor (u-PAR)--a link between tumor cell dormancy and minimal residual disease in bone marrow? *APMIS.* 116, 602-14 (2008).
- 47.** Pierga JY., Bonneton C., Magdelénat H., Vincent-Salomon A., Nos C. et al.: Real-time quantitative PCR determination of urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) expression of isolated micrometastatic cells from bone marrow of breast cancer patients. *Int J Cancer* 114, 291–298 (2005)
- 48.** Meng S., Tripathy D., Shete S., Ashfaq R., Saboorian H., et al.: uPAR and HER-2 gene status in individual breast cancer cells from blood and tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 17361–17365 (2006)
- 49.** Heiss M.M., Simon E.H., Beyer B.C., Gruetzner K.U., Tarabichi A. et al.: Minimal residual disease in gastric cancer: evidence of an independent prognostic relevance of urokinase receptor expression by disseminated tumor cells in the bone marrow. *J Clin Oncol.* 20, 2005–2016 (2002)
- 50.** Li J, Ny A, Leonardsson G, Nandakumar KS, Holmdahl R, Ny T.: The plasminogen activator/plasmin system is essential for development of the joint

inflammatory phase of collagen type II-induced arthritis. *Am J Pathol.*, 166: 783-92 (2005)

51. Serrati S, Margheri F, Chillà A, Neumann E, Müller-Ladner U, Benucci M, Fibbi G, Del Rosso M.: Reduction of in vitro invasion and in vivo cartilage degradation in a SCID mouse model by loss of function of the fibrinolytic system of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.*, 63: 2584-94 (2011)

52. Gyetko, M. R., R. F. 3rd Todd, C. C. Wilkinson, R. G. Sitrin: The urokinase receptor is required for human monocyte chemotaxis *in vitro*. *J. Clin. Invest.* 93:1380 (1994)

53. Gyetko, M. R., R. G. Sitrin, J. A. Fuller, R. F. 3rd Todd, H. Petty, T. J. Standiford: Function of the urokinase receptor (CD87) in neutrophil chemotaxis. *J. Leukoc. Biol.* 58:533 (1995)

54. Cavasotto C. N. and Abagyan R. A.: Protein flexibility in ligand docking and virtual screening to protein kinases. *Journal of Molecular Biology*, 337, 209–225 (2004)

55. Lipinski C.A, Lombardo F., Dominy B.W., Feeney P.J.: Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev.* 46, 3–26 (2001).

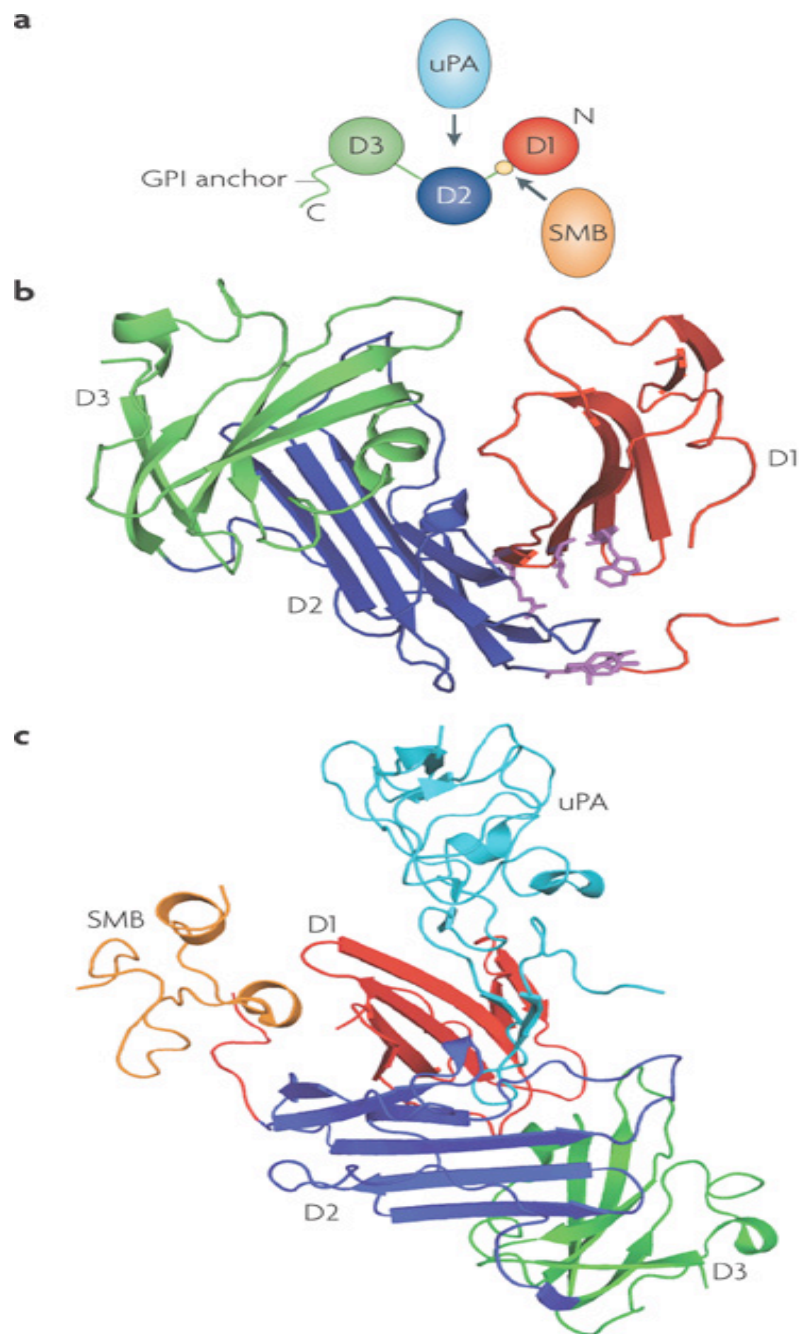
56. Villoutreix B.O., Eudes R., Miteva M.A.: Structure-based virtual ligand screening: recent success stories. *Comb Chem High Throughput Screen.* 12, 1000-16 (2009)

57. Stahura F. L. and Bajorath J.: New methodologies for ligand-based virtual screening. *Current Pharmaceutical Design*, 11, 1189–1202 (2005).

58. Lyne P. D.: Structure-based virtual screening: an overview. *Drug Discovery Today*, 7, 1047–1055 (2002).

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

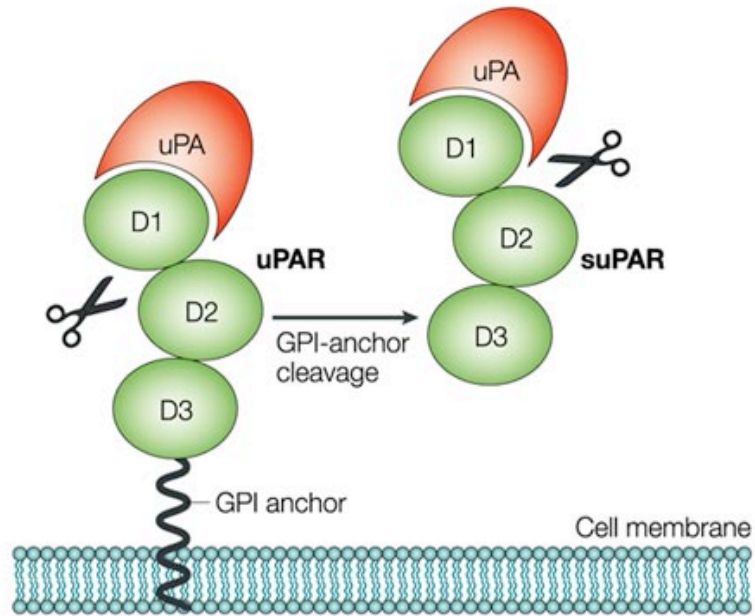
- 60.** Madsen CD, Sidenius N.: The interaction between urokinase receptor and vitronectin in cell adhesion and signalling. *Eur Cell Biol.*, 87, 617-629 (2008)
- 61.** S. Edwards, P.F. Lalor, C. Tuncer and D.H. Adams: Vitronectin in human hepatic tumours contributes to the recruitment of lymphocytes in an alpha v beta3-independent manner. *Br. J. Cancer* , 95: 1545–155 (2006)
- 62.** Eldridge, M. D.; Murray, C. W.; Auton., T. R.; Paolini, G. V.; Mee, R. P.: Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. *J. Comput.-Aided Mol. Des.*, 11, 425–445 (1997)
- 63.** Montuori N, Bifulco K, Carriero MV, La Penna C, Visconte V, Alfano D, Pesapane A, Rossi FW, Salzano S, Rossi G, Ragno P.: The cross-talk between the urokinase receptor and fMLP receptors regulates the activity of the CXCR4 chemokine receptor. *Cell Mol Life Sci.* 68, 2453-67 (2011).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figura 1. STRUTTURA DEL RECETTORE DELL'UROCHINASI (uPAR).

- a. L'uPAR possiede tre domini, denominati, a partire dall'estremità N-terminale, D1, D2, D3; essi sono ripiegati a delimitare una cavità centrale nella quale si inserisce l'urochinasi (uPA). Il dominio D1 lega l'uPA, il D3 contiene l'ancora glicosilfosfatidilinositolica (GPI). Al dominio D2 si lega il dominio di somatomedina B (SMB) della vitronectina (VN).
- b. Rappresentazione in 3D dell'uPAR, la figura mostra i 3 domini in differenti colori.
- c. I tre domini del recettore legano il frammento ammino terminale (ATF) dell'urochinasi e il dominio SMB della VN formando un triplo complesso.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figura 2. RAPPRESENTAZIONE SCHEMATICA DELLE VARIE FORME DI uPAR.

Dal taglio dell'ancora glicosilfosfatidilinositolica (GPI anchor) si ottiene l'uPAR solubile (suPAR). L'uPAR e il suPAR possono essere ulteriormente tagliati nella regione che lega il D1 al D2, con produzione di un recettore tronco, privo del D1 e incapace di legare l'uPA.

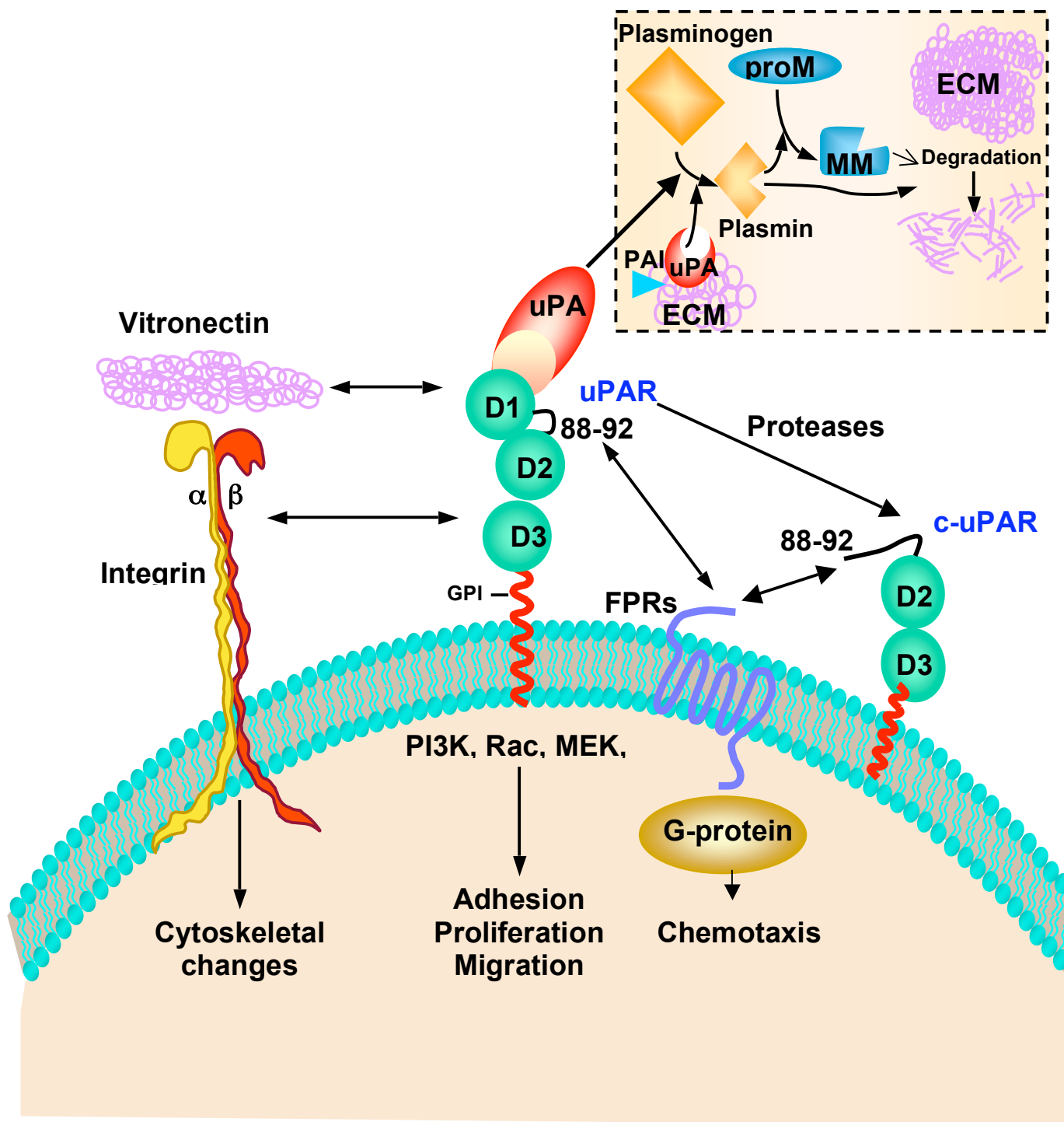


Figura 3. L'uPAR DI MEMBRANA (uPAR) LEGA L'UROCHINASI (uPA) E LA VITRONECTINA E INTERAGISCE CON LE INTEGRINE REGOLANDO ADESIONE, MIGRAZIONE, E PROLIFERAZIONE CELLULARE; LA SUA FORMA TRONCA (c-uPAR) LEGA I RECETTORI DELL'fMLF (FPRs) STIMOLANDO LA CHEMOTASSI.

Dall'azione di proteasi specifiche come tripsina, chimotripsina e uPA, capaci di rimuovere il dominio D1, si produce il c-uPAR, che interagisce con gli FPRs grazie alla sequenza SRSRY (aminoacidi 88-92), dotata di attività chemotattica; tale sequenza è ulteriormente esposta all'azione delle stesse proteasi, che la possono rimuovere.

L'uPAR intero può anch'esso esporre la sequenza SRSRY, grazie a un cambio conformazionale che avviene dopo il legame dell'uPA.

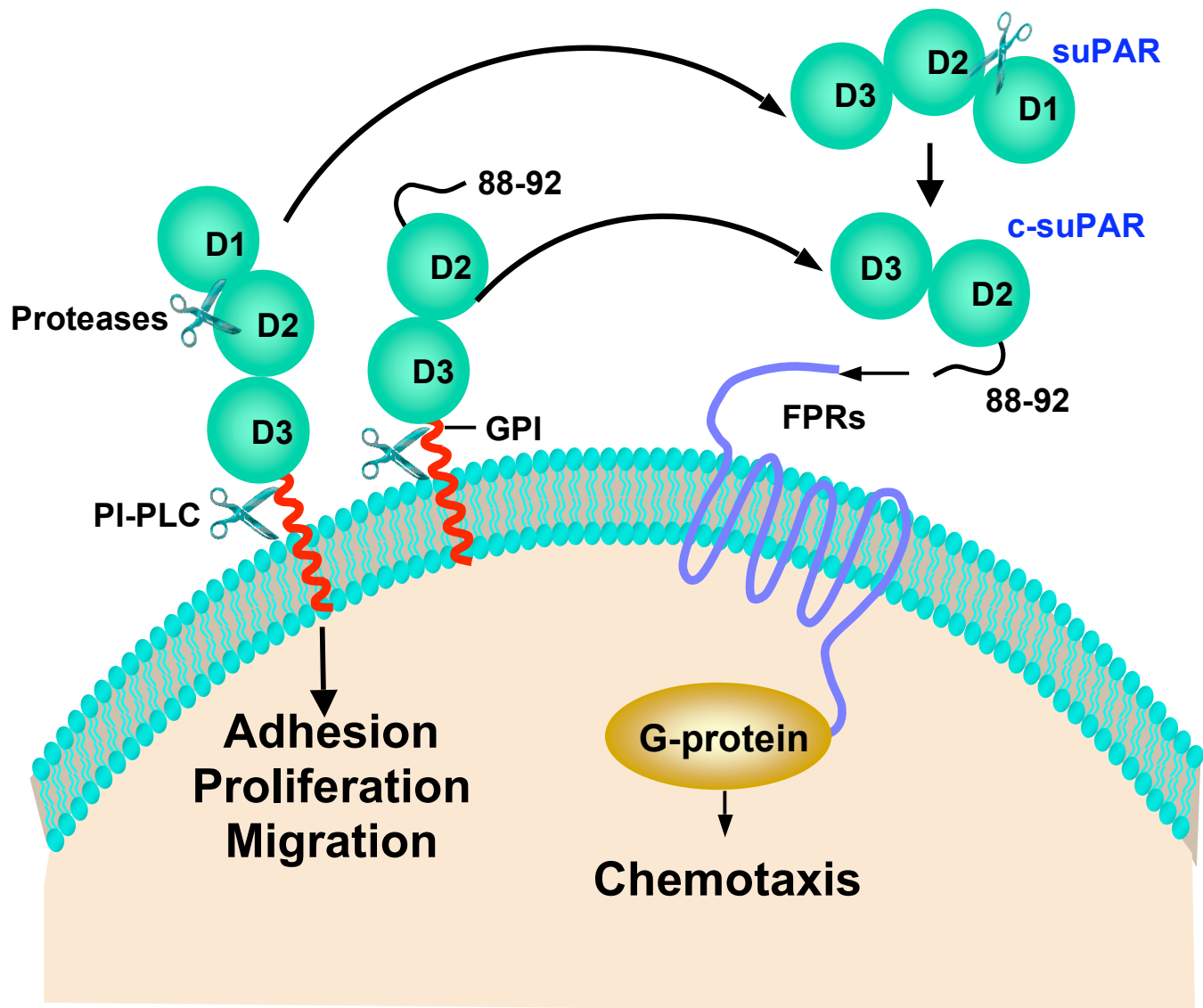


Figura 4. LA FORMA TRONCA DELL'uPAR DI MEMBRANA (c-uPAR) E SOLUBILE (c-suPAR) INTERAGISCONO CON I RECETTORI DELL'fMLF (FPRs) STIMOLANDO LA CHEMOTASSI.

Dall'azione di proteasi e fosfolipasi fosfatidilinositolo specifiche (PI-PLC), si producono c-uPAR e c-suPAR, che interagiscono con gli FPRs grazie alla sequenza SRSRY (aminoacidi 88-92), dotata di attività chemotattica; tale sequenza è esposta da proteasi, come tripsina, chimotripsina e uPA, capaci di rimuovere il dominio D1. L'uPAR intero solubile (suPAR) non espone la sequenza SRSRY e non può legare gli FPRs; quindi, non stimola la chemotassi, ma può legare l'uPA.

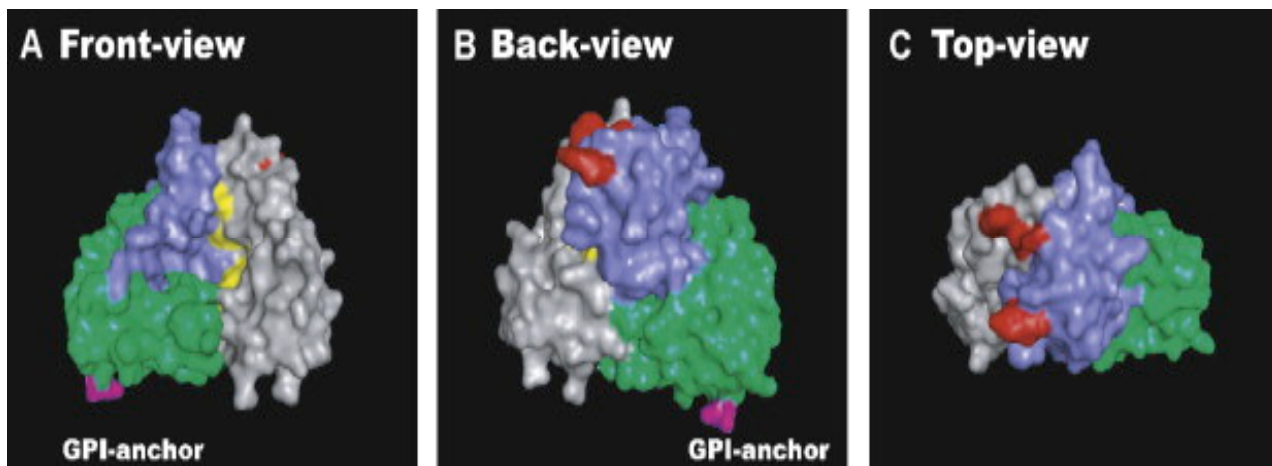


Figura 5. STRUTTURA CRISTALLINA DI uPAR UMANO MOSTRATO COME RAPPRESENTAZIONE DI SUPERFICIE.

I tre domini di uPAR sono indicati con un codice a colori (dominio 1: grigio; dominio 2: blu; dominio 3: verde). (A) La vista frontale mostra la profonda cavità centrale che costituisce sito di legame per l'uPA (R53, A55, Y57, T66 residui indicati in giallo). (B, C) La parte posteriore e la vista dall'alto mostra l'epitopo legante la VN (W32, R58, I63, Y92 residui indicati in rosso). Il residuo R91 non è definito nella struttura cristallina e quindi non è specificato. La posizione dell'ancora GPI è indicata in magenta. I dati sono stati creati utilizzando il programma PyMol (Delano Scientific) con le coordinate 2FD6.

VIRTUAL SCREENING WORKFLOW

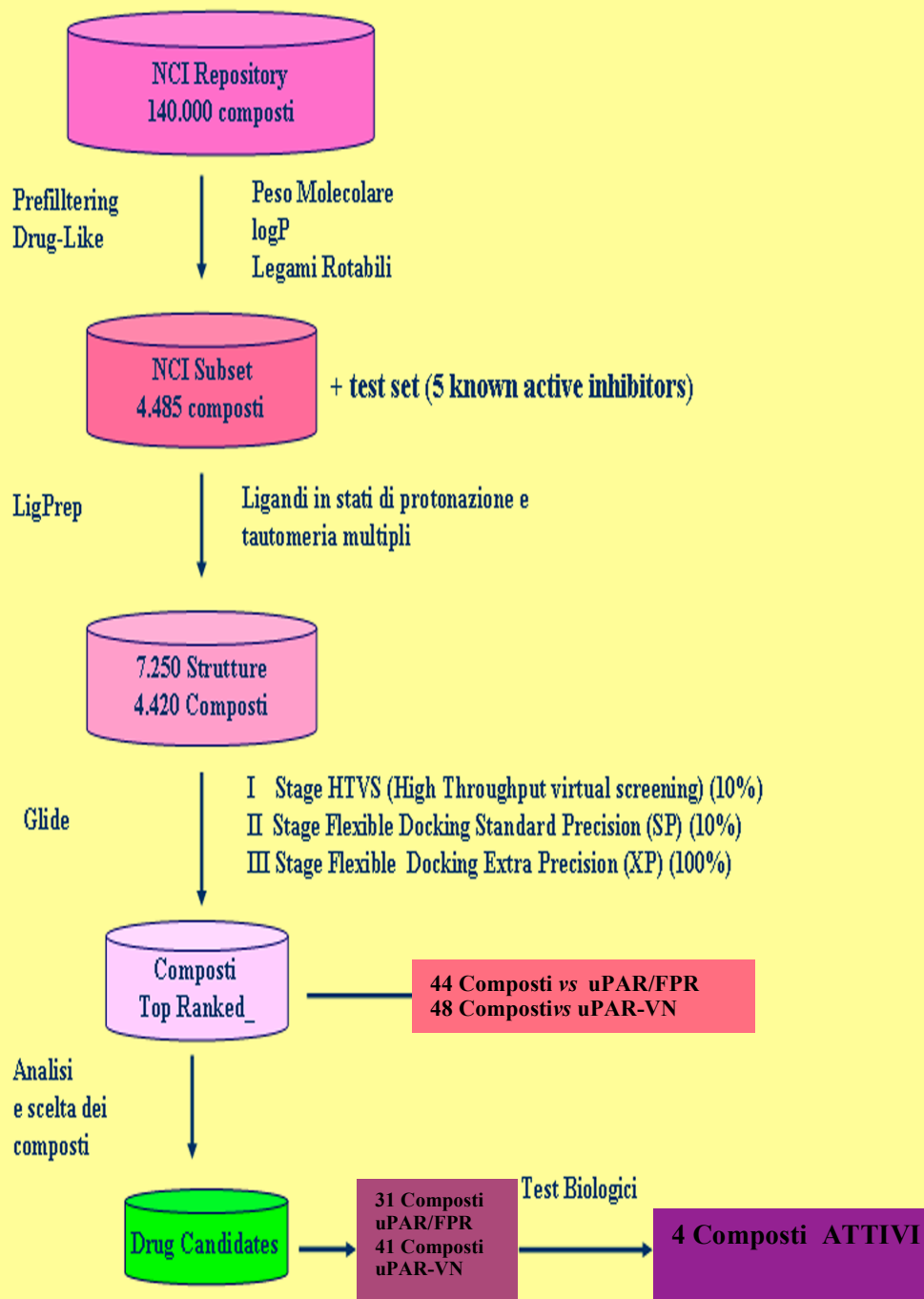


Figura 6. SCHEMA DEL VIRTUAL SCREENING

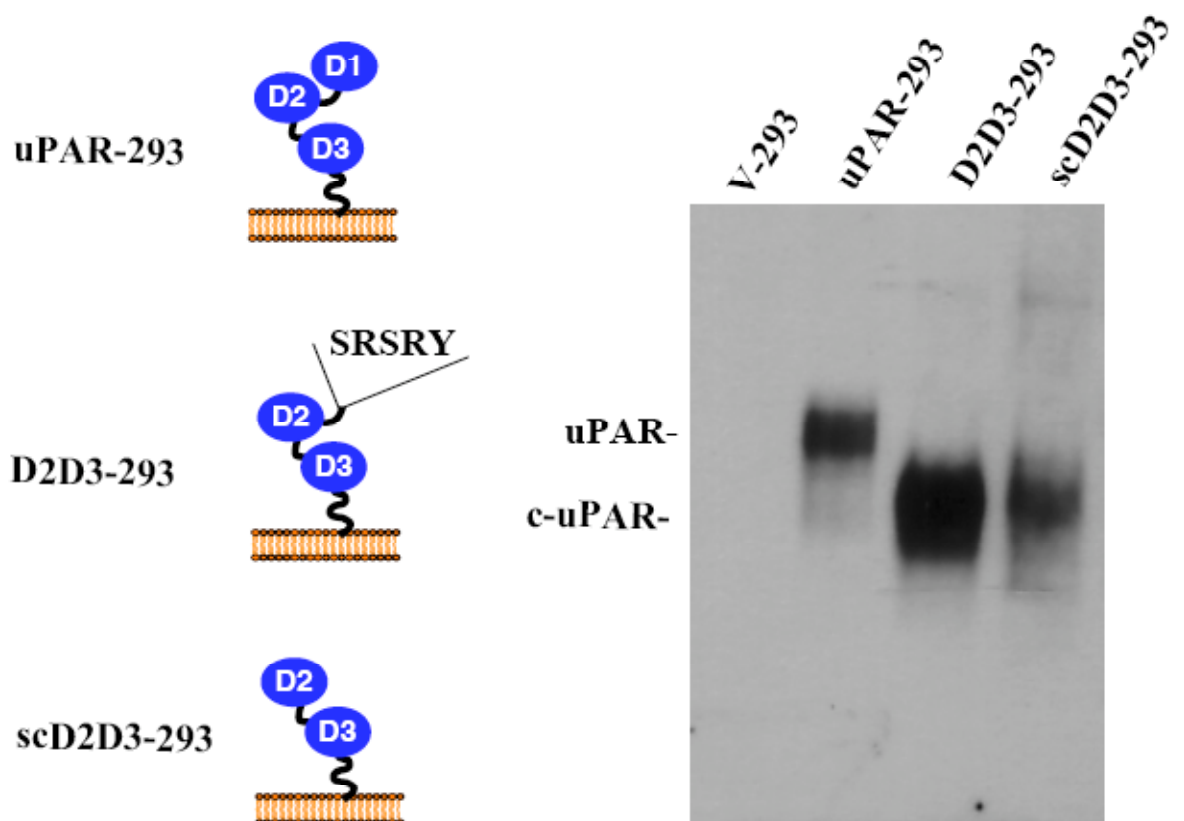


Figura 7. ESPRESSIONE DI uPAR IN CELLULE HEK-293 TRANSFETTATE.

Lisati di cellule HEK-293 transfettate con il vettore pcDNA3 vuoto (V-293), con il plasmide codificante per l'uPAR intero (uPAR-293), con il plasmide codificante per le due forme di uPAR tronco (c-uPAR), contenente (D2D3-293) o non contenente (scD2D3-293) il dominio chemotattico del recettore (SRSRY) sono stati sottoposti a Western blot con anticorpi policlonali anti-uPAR.

Le cellule uPAR-293, D2D3-293 e scD2D3-293 esprimono elevati livelli di uPAR, mentre le cellule V-293, come atteso, sono uPAR negative.

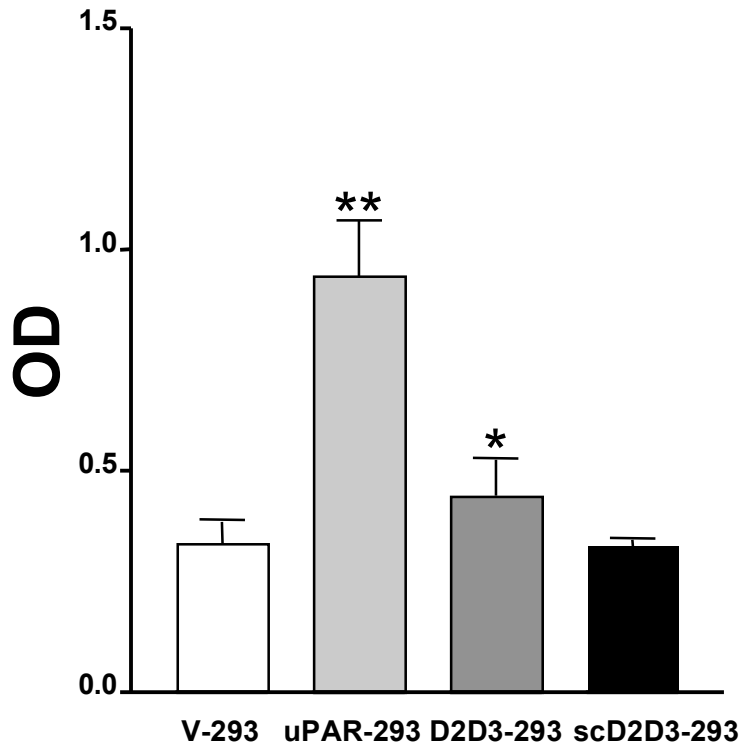


Figura 8. ADESIONE ALLA VN DI CELLULE HEK-293 TRANSFETTATE CON LE VARIE FORME DI uPAR.

Cellule HEK-293 transfettate con il vettore pcDNA3 vuoto (V-293), con il plasmide codificante per l'uPAR intero (uPAR-293), con il plasmide codificante per le due forme di uPAR tronco (c-uPAR), contenente (D2D3-293) o non contenente (scD2D3-293) il dominio chemotattico del recettore (SRSRY) sono stati sottoposti a saggi di adesione cellulare in vitro alla vitronectina (VN). Le cellule aderenti sono state fissate e colorate con cristal-violetto; il colorante è stato eluito e la densità ottica (OD) misurata mediante lettura alla lunghezza d'onda di 540 nm.

Le cellule uPAR-293 mostrano un'incrementata adesione alla VN, statisticamente significativa (** $p < 0.001$), rispetto alle cellule di controllo V-293; un leggero, ma significativo (* $p < 0.05$), incremento di adesione alla VN si osserva anche in cellule D2D3-293, abolito dalla rimozione del dominio chemotattico in cellule scD2D3-293.

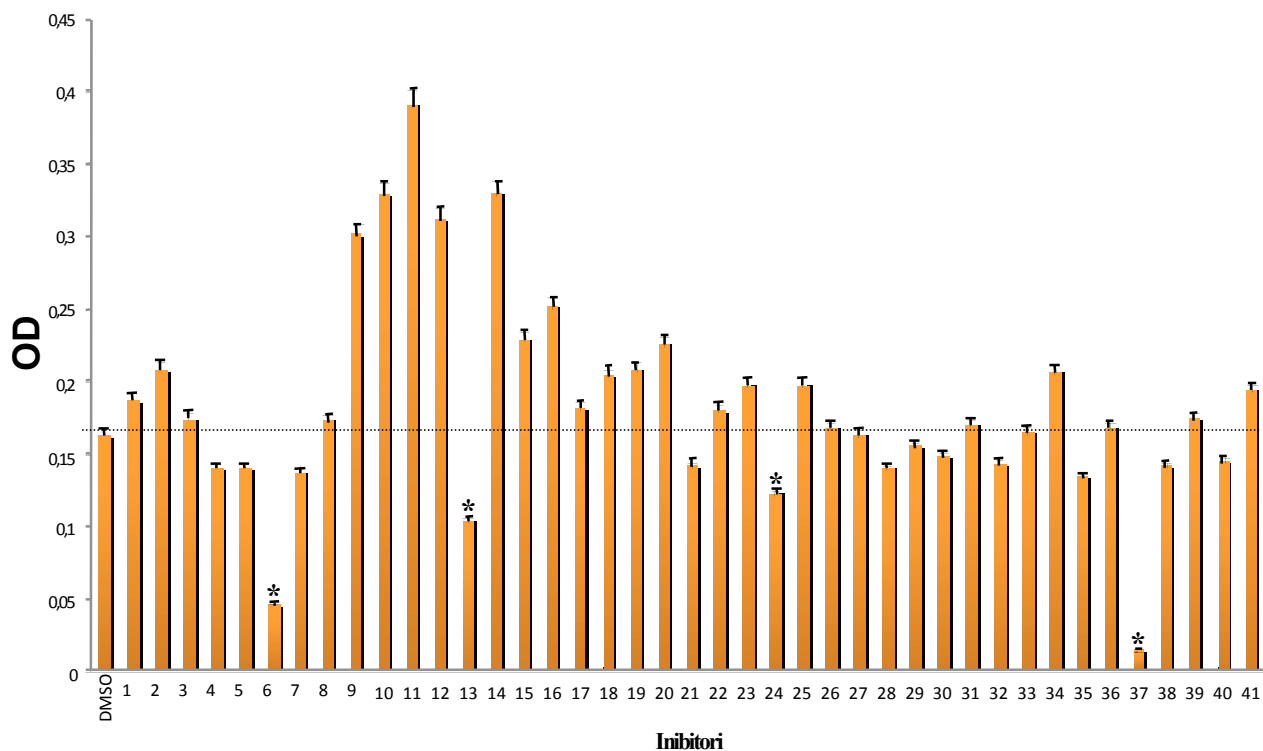
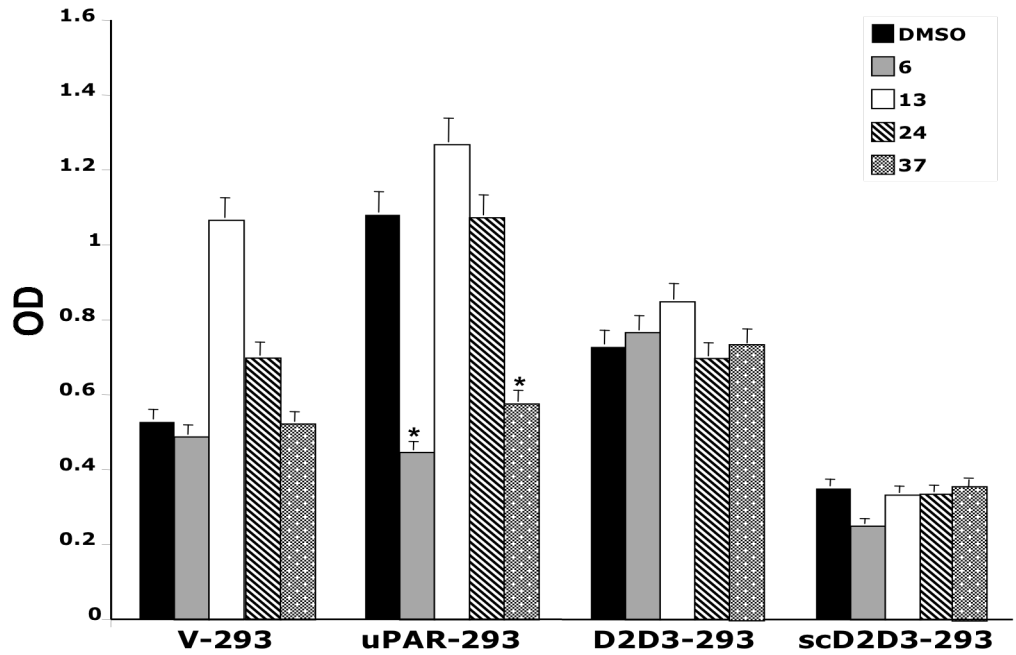


Figura 9. ADESIONE ALLA VN DI CELLULE HEK-293 IN PRESENZA DELLE MOLECOLE SELEZIONATE MEDIANTE VIRTUAL SCREENING E PREVISTE INIBIRE IL SITO DI LEGAME DELL'uPAR ALLA VN.

Cellule uPAR-293 sono state sottoposte a saggi di adesione cellulare in vitro alla VN, in presenza delle molecole selezionate mediante VS e previste inibire il sito diretto di legame dell'uPAR alla VN, o di DMSO, come controllo negativo. Le cellule aderenti sono state fissate e colorate con cristal-violetto; il colorante è stato eluito e la densità ottica (OD) misurata mediante lettura alla lunghezza d'onda di 540 nm. Quattro composti inibivano, in maniera statisticamente significativa (* $p > 0.05$), l'adesione cellulare alla VN, rispetto al controllo col solo veicolo (DMSO).

A



B

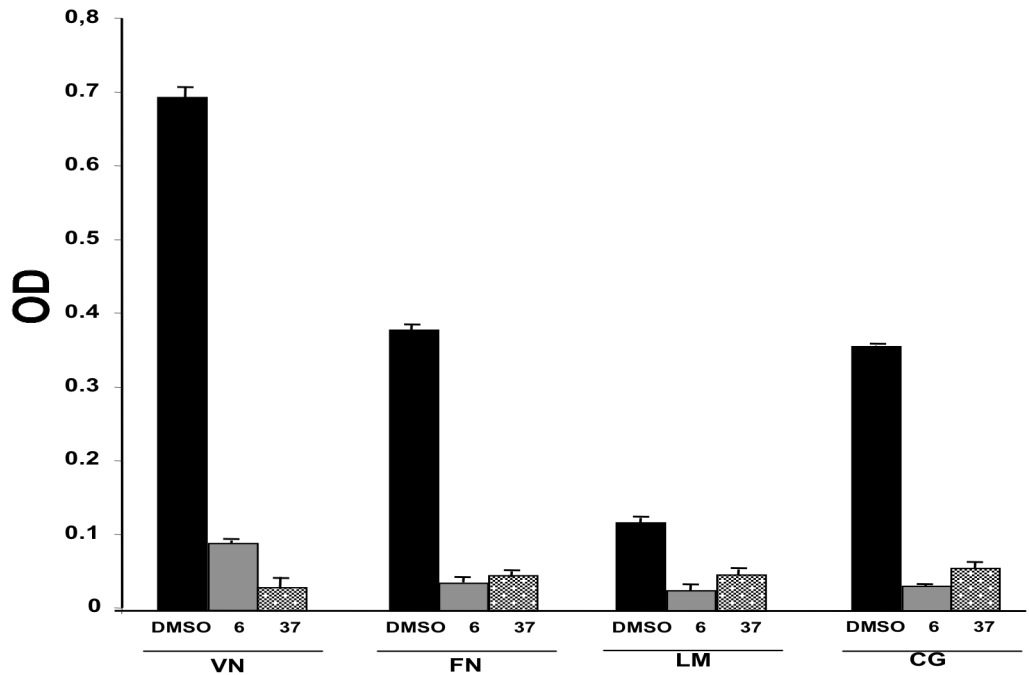
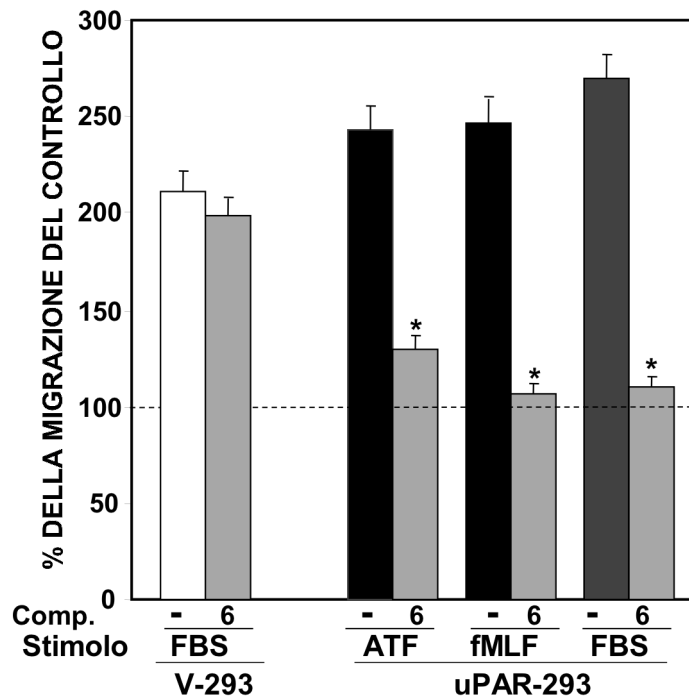


Figura 10. ADESIONE CELLULARE CON GLI INIBITORI SELEZIONATI.

A. Cellule uPAR-negative (V-293), esponenti l'uPAR intero (uPAR-293) e esponenti la forma tronca di uPAR contenente (D2D3-293) o non contenente (scD2D3-293) il dominio chemotattico sono state sottoposte a saggi di adesione cellulare in vitro alla VN, in presenza dei quattro inibitori selezionati (composti n° 6, 13, 24 e 37) o di DMSO. Gli inibitori n° 6 e 37 inibiscono specificamente l'adesione alla VN di cellule uPAR-293 e non esercitano alcun effetto sugli altri tipi cellulari (* p<0.05).

B. Cellule esponenti l'uPAR intero (uPAR-293) sono state sottoposte a saggi di adesione cellulare in vitro alla VN, fibronectina (FN), laminina (LM) e collagene (CG) in presenza dei due inibitori specifici (composti n° 6 e 37) o di DMSO. Gli inibitori n° 6 e 37 inibiscono specificamente l'adesione a tutti i componenti della matrice extracellulare testati.

A



B

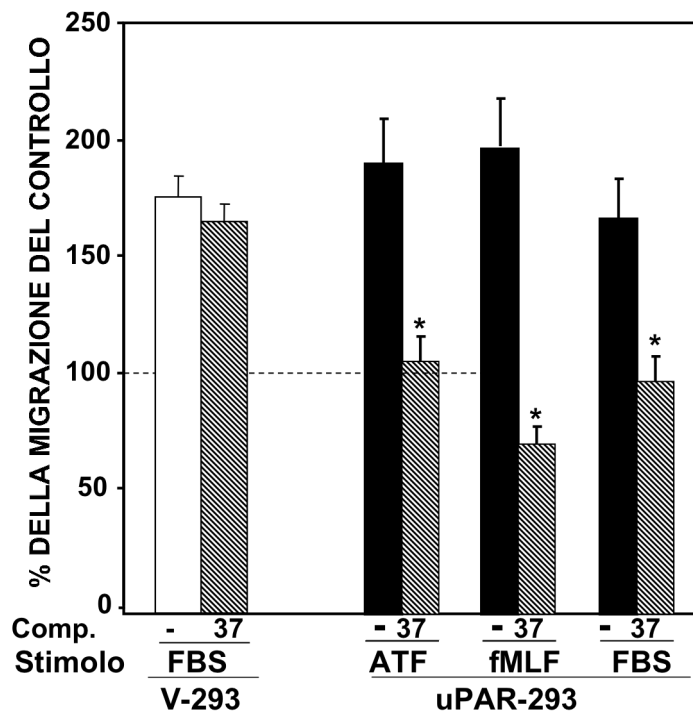


Figura 11. MIGRAZIONE CELLULARE CON GLI INIBITORI SELEZIONATI.

A. Cellule uPAR-negative (V-293) e esprimenti l'uPAR intero (uPAR-293) sono state sottoposte a saggi di migrazione cellulare in vitro verso il frammento aminoterminale dell'uPA (ATF), verso fMLF, verso siero di vitello fetale (FBS) o DMSO in presenza del composto n° 6.

B. Cellule V-293 e uPAR-293 sono state sottoposte a saggi di migrazione cellulare in vitro verso ATF, fMLF e FBS o DMSO, in presenza del composto n° 37.

Gli inibitori n° 6 e 37 inibiscono specificamente la migrazione di cellule uPAR-293 verso tutti gli stimoli e non esercitano alcun effetto sulla migrazione di cellule V-293 (* p<0.05).

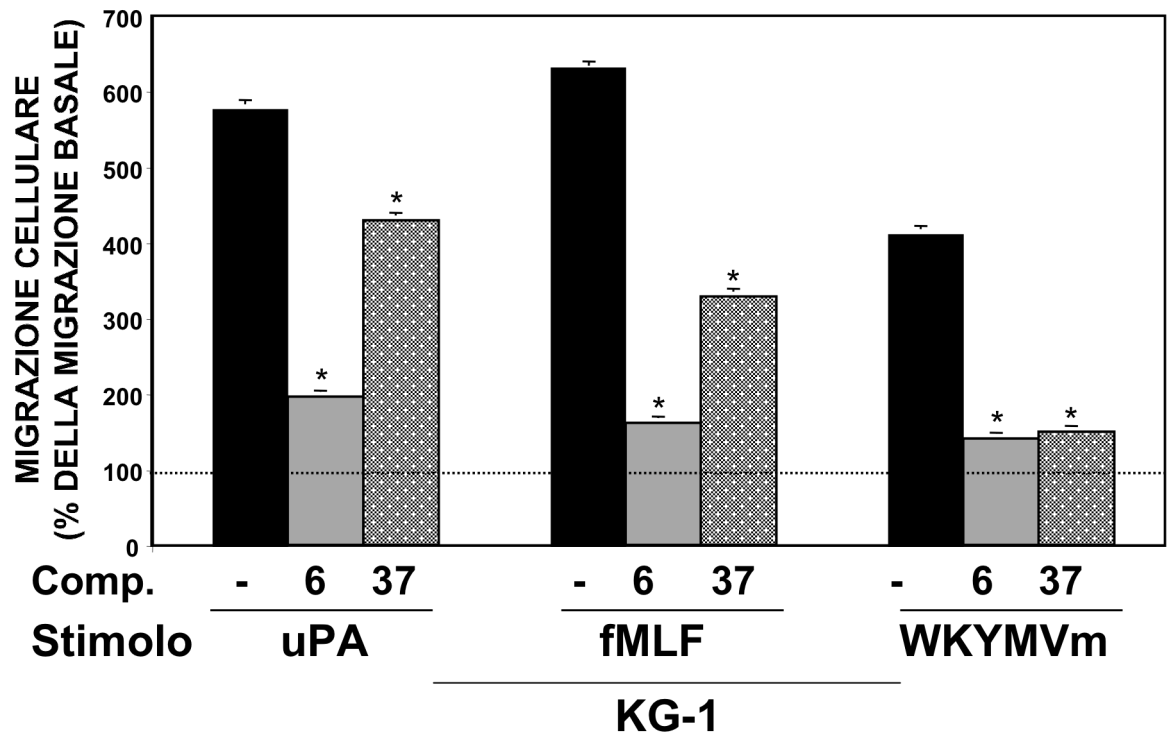


Figura 12. MIGRAZIONE CELLULARE CON GLI INIBITORI SELEZIONATI.

Cellule della linea leucocitaria KG1, esprimenti costitutivamente sia l'uPAR che gli FPR, sono state sottoposte a saggi di migrazione cellulare in vitro verso uPA (5×10^{-9} M), verso agonisti degli FPR, fMLF (1×10^{-8}) e peptide W (WKYMVm) (1×10^{-9}) o DMSO, senza (-) e dopo pretrattamento per 1h a 37°C con gli inibitori selezionati (composti n° 6 e 37) alla concentrazione 5×10^{-6} M. La migrazione cellulare è espressa come percentuale rispetto alla migrazione basale, in assenza di chemoattrattante.

La preincubazione delle cellule con entrambi gli inibitori riduce drasticamente l'effetto chemiotattico indotto da tutti gli stimoli utilizzati.

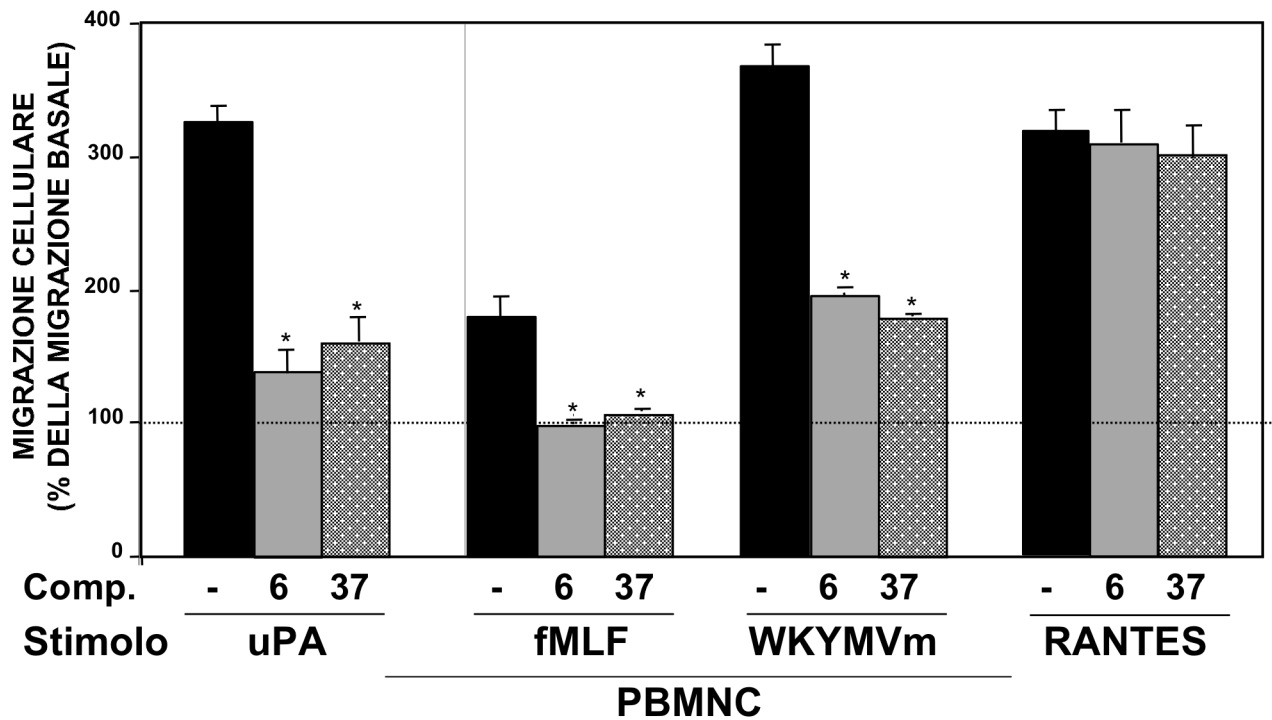


Figura 13. MIGRAZIONE CELLULARE CON GLI INIBITORI SELEZIONATI.

Mononucleati da sangue periferico (PBMNC), esprimenti costitutivamente sia l'uPAR che gli FPR, sono stati sottoposti a saggi di migrazione cellulare in vitro verso uPA (5×10^{-9} M), verso agonisti degli FPR, fMLF (1×10^{-8}) e peptide W (WKYMVm) (1×10^{-9}), verso RANTES (100 ng/ml) o DMSO, senza (-) e dopo pretrattamento per 1h a 37°C con gli inibitori selezionati (composti n° 6 e 37) alla concentrazione 5×10^{-6} M. La migrazione cellulare è espressa come percentuale rispetto all migrazione basale, in assenza di chemoattrattante.

La preincubazione delle cellule con entrambi gli inibitori riduce drasticamente l'effetto chemiotattico indotto dagli stimoli specifici per l'interazione uPAR/FPR, mentre RANTES, ligando specifico del recettore CCR5, non esercita alcun effetto.

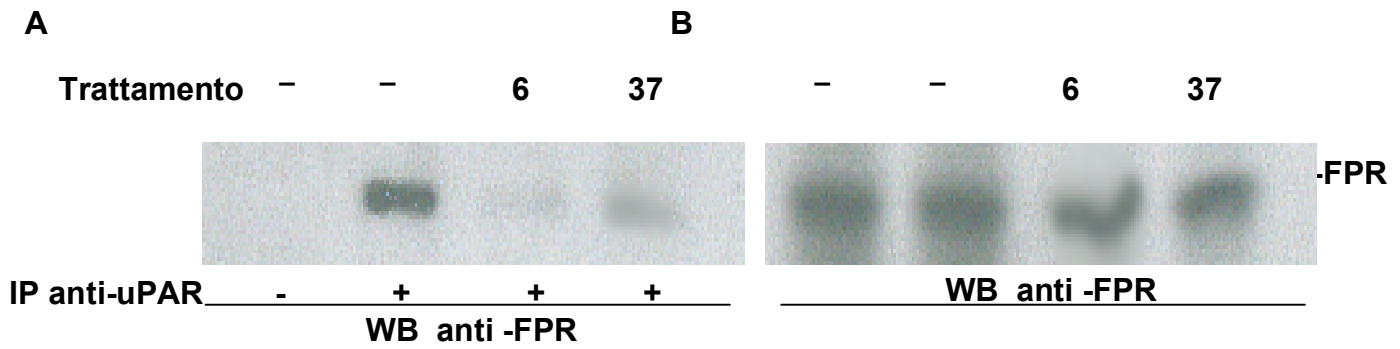


Figura 14. CO-IMMUNOPRECIPITAZIONE DI LISATI DI CELLULE uPAR-293 IN PRESENZA DEGLI INIBITORI DELL'INTERAZIONE uPAR/FPR SELEZIONATI .

A: Immunoprecipitazione (IP) con anticorpi non immuni (-) e anticorpi anti-uPAR (+) di lisati di cellule uPAR-293 dopo trattamento con DMSO (-) e con composti 6 e 37 seguita da Western blot (WB) degli immunoprecipitati con anticorpi anti-FPR.

B: Western blot (WB) con anticorpi anti-FPR di lisati di cellule uPAR-293 dopo trattamento con DMSO (-) e con composti 6 e 37.

La preincubazione delle cellule con i due inibitori selezionati riduce notevolmente l'interazione strutturale tra l'uPAR e l'FPR; la stessa quantità di FPR è presente in tutti i lisati di partenza.