

ABSTRACT

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

SOMMARIO

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