



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO
Dipartimento di Farmacia

Dottorato di ricerca
in **Biologia dei Sistemi**

Ciclo **XIV Nuova Serie** — Anno di discussione **2016**

Coordinatore: Chiar.mo Prof. *Antonietta Leone*

***“Regolazione post-trascrizionale
dell’espressione del recettore
dell’urochinasi”***

settore scientifico disciplinare di afferenza: **MED/04**

Dottorando

Tutore

Dott. *Anna Li Santi*

Chiar.mo Prof. *Pia Ragno*

INDICE

ABSTRACT	1
SOMMARIO	2
CAPITOLO I	3
IL RECETTORE DELL'UROCHINASI (uPAR)	3
1.1 IL SISTEMA DI ATTIVAZIONE DEL PLASMINOGENO	3
1.2 STRUTTURA DEL RECETTORE DELL'UROCHINASI (uPAR).....	5
1.3 LIGANDI E FUNZIONI DELL'uPAR.....	7
1.3.1 Funzioni proteolitiche.....	7
1.3.2 Funzioni non proteolitiche dell'uPAR	8
CAPITOLO II	12
REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE DI uPAR	12
2.1 REGOLAZIONE TRASCRIZIONALE DELL'uPAR.....	12
2.2 REGOLAZIONE POST-TRASCRIZIONALE DELL'uPAR.....	13
2.2.1 RNA BINDING PROTEIN e uPAR.....	13
2.2.2 microRNA	15
CAPITOLO III	19
IDENTIFICAZIONE, CONVALIDA E CARATTERIZZAZIONE DEI miRNA CHE BERSAGLIANO L'uPAR	19
3.1 INTRODUZIONE	19
3.2 RISULTATI.....	19
3.2.1 IDENTIFICAZIONE DI miRNA CHE REGOLANO L'ESPRESSIONE DI uPAR.....	19
3.2.2 I miRNA SELEZIONATI BERSAGLIANO LA 3'UTR DI uPAR.....	21
3.2.3 I LIVELLI DI uPAR E DEI miRNA SELEZIONATI SONO INVERSAMENTE PROPORZIONALI IN CELLULE DI AML.....	22
3.2.4 I miRNA SELEZIONATI REGOLANO L'ESPRESSIONE DI uPAR NELLE LINEE CELLULARI DI AML.....	25
3.2.5 I miRNA SELEZIONATI POSSONO REGOLARE MIGRAZIONE E	

INVASIONE DI CELLULE DI AML	27
3.2.6 I miRNA SELEZIONATI INFLUENZANO LA PROLIFERAZIONE DI CELLULE THP-1	29
3.2.7 ANALISI DEI LIVELLI DI ESPRESSIONE DI uPAR E DEI miRNA SELEZIONATI NEI BLASTI DI PAZIENTI AFFETTI DA AML.....	30
3.3 DISCUSSIONE.....	31
CAPITOLO IV.....	32
ATTIVITA' DI COMPETING ENDOGENOUS RNA (ceRNA) DELL'uPAR NELLE AML.....	32
4.1 INTRODUZIONE	32
4.2 RISULTATI	34
4.2.1 L'IPERESPRESSIONE DELLA 3'UTR DI uPAR AUMENTA L'ESPRESSIONE DI uPAR	34
4.2.2 LA 3'UTR DI uPAR REGOLA L'ESPRESSIONE DEL GENE REPORTER AD ESSA ASSOCIATO IN CELLULE KG1	36
4.2.5 L'EFFETTO DELLA 3'UTR DI uPAR E' INIBITO DAL SUO ANTISENSO	38
4.2.6 IDENTIFICAZIONE E CONVALIDA DI ALTRI miRNA SPECIFICI PER uPAR.....	39
4.2.4 LA 3'UTR DI uPAR REGOLA L'ESPRESSIONE DI BERSAGLI DEI miRNA SELEZIONATI DIVERSI DA uPAR.....	41
4.3 DISCUSSIONE.....	43
CAPITOLO V.....	45
CONCLUSIONI	45
5.1 CONCLUSIONI.....	45
CAPITOLO VI.....	47
6.1 MATERIALI.....	47
6.1.1 REAGENTI.....	47
6.2 METODI.....	47
6.2.1 COLTURE CELLULARI.....	47
6.2.1 RACCOLTA CAMPIONI DA PAZIENTI.....	47
6.2.3 WESTERN BLOT.....	48

6.3.5 COSTRUZIONE PLASMIDI REPORTER.....	48
6.2.6 SAGGIO DI LUCIFERASI.....	49
6.2.7 TRASFEZIONI.....	49
6.2.8 SAGGI DI MIGRAZIONE CELLULARE E INVASIONE.....	49
6.2.9 SAGGIO DI PROLIFERAZIONE CELLULARE.....	49
6.2.10 ANALISI STATISTICA.....	50
BIBLIOGRAFIA.....	51

ABSTRACT

The urokinase type plasminogen activator (uPAR) is a three domain GPI-anchored cell surface receptor. uPAR expression is strongly up-regulated and represents a negative prognostic factor in various tumors, including hematologic malignancies. uPAR expression is post-transcriptionally regulated by RNA binding proteins (RBPs). RBPs bind specific sequences in the 3'untranslated region (3'UTR) of uPAR-mRNA, stabilizing or destabilizing the transcript. The 3'UTR of transcripts from a large number of genes includes target sequences also for small translational repressors RNAs (miRNAs). miRNAs play key roles in many cellular pathways; their aberrant expression is a common feature of various malignancies. We selected three miRNAs *miR-146a*, *miR-335* and *miR-622* that could bind the 3'UTR of uPAR-mRNA; these three miRNAs, as reported in literature, are expressed in CD34⁺ HSC or in acute myeloid leukemia (AML) cells and can act as oncosuppressors by inhibiting oncogene expression. We found that selected miRNAs regulate uPAR expression by directly targeting its 3'UTR in AML cell lines. Indeed, uPAR expression is reduced by their overexpression and increased by their specific inhibitors. Overexpression of selected miRNAs impaired cell migration, invasion and proliferation of AML cell lines. Interestingly, we found an inverse relationship between uPAR expression and *miR-146a* and *miR-335* levels in AML blasts. This suggests their possible role in regulating uPAR expression also *in vivo*. We also investigated the capability of uPAR-3'UTR to act as competing endogenous RNA (ceRNA). We showed that uPAR-3'UTR overexpression up-regulates uPAR expression and expression of other targets of selected miRNAs; these results suggest that uPAR-3'UTR may recruit selected miRNAs, allowing translation of their targets, thus acting as ceRNA

SOMMARIO

Il recettore dell'urochinasi (uPAR), è costituito da tre domini ed è ancorato sulla superficie cellulare mediante una coda glicosil-fosfatidil-inositolica (GPI). L'espressione di uPAR è fortemente aumentata e rappresenta un fattore prognostico negativo in vari tipi di tumore, inclusi quelli del compartimento ematologico. L'espressione di uPAR può essere regolata a livello post-trascrizionale da RNA binding proteins (RBP). Le RBP legano specifiche sequenze nella regione non tradotta al 3' (3'UTR) dell'mRNA di uPAR, stabilizzandolo o destabilizzandolo. Nella 3'UTR dei trascritti di un vasto numero di geni sono presenti sequenze di legame per piccoli RNA che agiscono da repressori traduzionali (miRNA). I miRNA hanno un ruolo importante in svariati processi cellulari e l'alterazione della loro espressione è una caratteristica comune nei tumori. Abbiamo selezionato tre miRNA, *miR-146a*, *miR-335* e *miR-622*, potenzialmente in grado di bersagliare l'mRNA di uPAR e, come riportato in letteratura, espressi in cellule staminali ematopoietiche CD34⁺ e/o in cellule di leucemia mieloide acuta (AML), con attività di oncosoppressori. Abbiamo dimostrato che questi tre miRNA regolano l'espressione di uPAR bersagliando direttamente la 3'UTR del suo trascritto. In linee cellulari di AML, l'iperespressione di questi tre miRNA riduce l'espressione di uPAR mentre i loro specifici inibitori aumentano l'espressione del recettore. L'iperespressione dei tre miRNA selezionati, inoltre, influenza migrazione, invasione e proliferazione di linee cellulari di AML. È interessante notare che vi è una relazione inversa fra l'espressione di uPAR e i livelli di *miR-146a* e *miR-335* nei blasti di pazienti di AML; questa osservazione suggerisce un loro possibile ruolo nella regolazione dell'espressione di uPAR anche *in vivo*. Abbiamo inoltre analizzato la capacità della 3'UTR di uPAR di agire da competing endogenous RNA (ceRNA). Abbiamo dimostrato che l'iperespressione della 3'UTR di uPAR aumenta l'espressione di uPAR e di altri bersagli dei miRNA selezionati. Tali risultati suggeriscono che la 3'UTR di uPAR potrebbe sequestrare i miRNA selezionati, consentendo la traduzione dei loro bersagli.

CAPITOLO I

IL RECETTORE DELL'UROCHINASASI (uPAR)

1.1 IL SISTEMA DI ATTIVAZIONE DEL PLASMINOGENO

Il recettore dell'attivatore del plasminogeno di tipo urochinasasi (uPAR) è una molecola centrale nel sistema di serin-proteasi che costituiscono il sistema di attivazione del plasminogeno. Il plasminogeno è presente nel plasma e nei fluidi extracellulari sotto forma di zimogeno. In seguito a taglio proteolitico del legame Arg₅₆₁-Val₅₆₂ il plasminogeno è convertito in plasmina. La plasmina può legare la fibrina, così come il plasminogeno, promuovendone la degradazione, quindi ha un ruolo centrale nella trombolisi (Ragno, 2006). La plasmina tuttavia è una serin-proteasi ad ampio spettro, essa, infatti, è in grado di degradare direttamente anche molti componenti della matrice extracellulare (ECM) e di attivare metalloproteasi della matrice (MMPs), le quali, a loro volta, hanno come substrato componenti dell'ECM; quindi, l'attivazione del plasminogeno promuove anche la degradazione dell'ECM. Gli attivatori fisiologici del plasminogeno sono due serin-proteasi estremamente specifiche: l'attivatore del plasminogeno di tipo tissutale (tPA) e l'attivatore del plasminogeno di tipo urochinasasi (uPA). L'attività enzimatica, sia della plasmina che dei suoi attivatori, è regolata da inibitori. Il più potente inibitore della plasmina è l' α_2 -antiplasmina, gli inibitori dell'uPA sono il plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) e il plasminogen activator inhibitor-2 (PAI-2). Il PAI-1, secreto nella sua forma attiva, viene regolarmente inattivato a meno che non legni la vitronectina (VN), presente in larghe quantità nel plasma e nell'ECM, che ne stabilizza la conformazione attiva (Ragno, 2006) (Fig.1.1).

Il tPA lega la fibrina con alta affinità attraverso il dominio specifico Kringle-2. Il legame di tPA e plasminogeno alla fibrina amplifica in modo significativo la conversione del plasminogeno in plasmina. Per questo motivo il tPA ha un ruolo centrale nella fibrinolisi (Rijken e Lijnen, 2009).

L'uPA, invece, non lega la fibrina ma uno specifico recettore cellulare, l'uPAR. L'uPA, prodotta in forma inattiva di pro-uPA, lega l'uPAR, sul quale viene attivata da varie proteasi, inclusa la stessa plasmina. L'uPA, attivando localmente il plasminogeno, promuove la degradazione dell'ECM, permettendo alla cellula di muoversi attraverso di essa. Il sistema di attivazione del plasminogeno mediato da uPA, quindi, più che nella fibrinolisi, ha un ruolo cruciale nella migrazione cellulare (Rijken e Lijnen, 2009), processo biologico alla base di eventi strettamente correlati al cancro quali invasione tissutale, infiammazione, angiogenesi e metastasi.

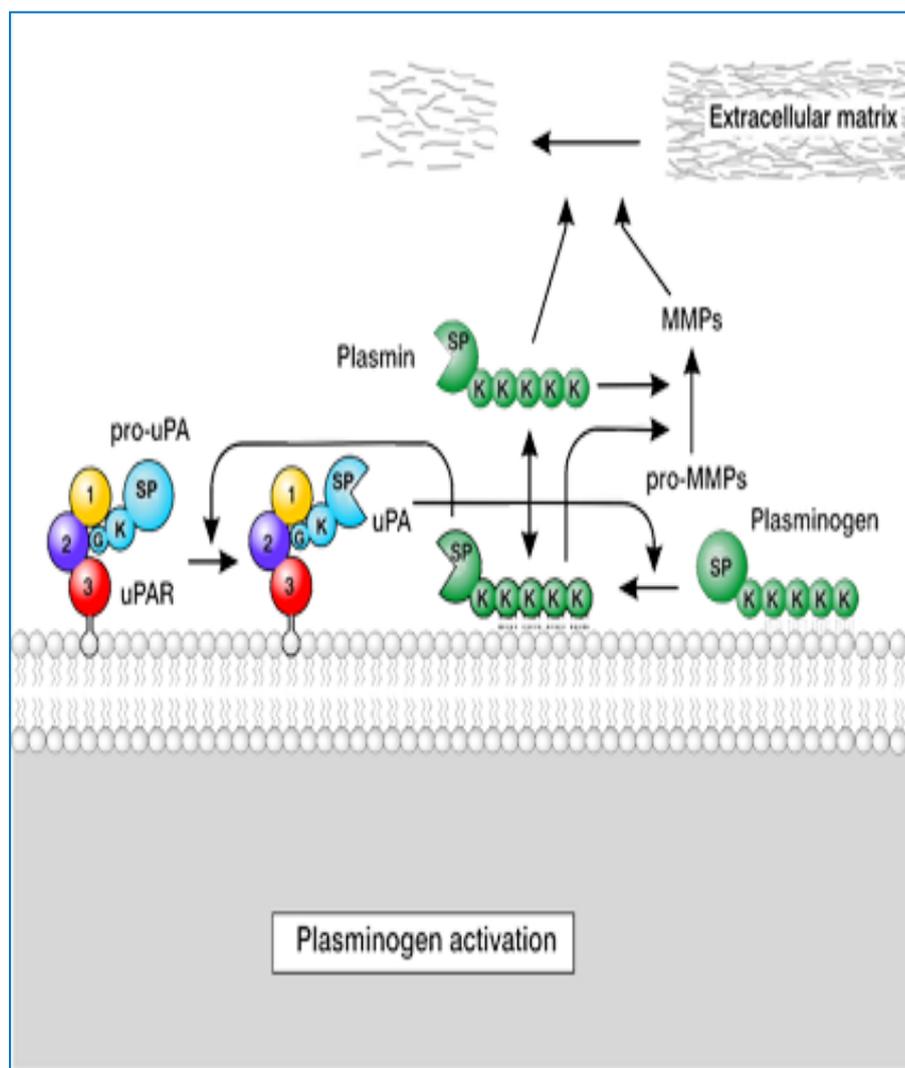


Figura 1.1 Il sistema di attivazione del plasminogeno. L'uPAR lega la pro-uPA concentrandola per l'attivazione. L'uPA attiva il plasminogeno in plasmina che degrada la matrice extracellulare direttamente o indirettamente, mediante attivazione delle metalloproteasi della matrice (MMPs).

1.2 STRUTTURA DEL RECETTORE DELL'UROCHINASASI (uPAR)

Il recettore dell'uPA (uPAR) fu identificato nel 1985, ma la proteina fu purificata successivamente, nel 1990. L'uPAR viene trascritto come un polipeptide a singola catena di 335 amminoacidi, con all'estremità N-terminale un peptide segnale di 22 residui e all'estremità C-terminale un segmento di 30 residui che, nella fase di maturazione della proteina, viene rimosso, per permettere l'attacco alla Gly₂₈₃ di una coda di glicosil-fosfatidilinositolo (GPI) (Blasi e Sidenius, 2009) (Fig.1.2). La presenza della coda GPI ha un ruolo molto importante nel regolare le funzioni del recettore. Infatti, la coda GPI conferisce grande mobilità al recettore sulla membrana cellulare e gli permette di associarsi a microdomini della membrana plasmatica ricchi in colesterolo detti "lipid rafts" (Montuori e Ragno, 2009).

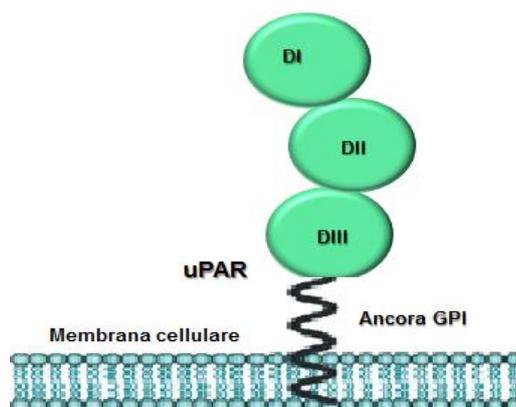


Figura 1.2 Maturazione del recettore dell'urochinasasi. L'uPAR è trascritto come un polipeptide di 335 a.a., la rimozione di 30 a.a. carbossiterminali permette l'aggancio di una coda di glicosifosfatidil-inositolo (GPI) che lo ancora alla superficie cellulare.

L'uPAR maturo di membrana è una proteina fortemente glicosilata, composta da tre domini omologhi denominati rispettivamente DI, DII e DIII. Ciascuno di questi tre domini è formato da circa 90 residui amminoacidici (Fig. 1.3).

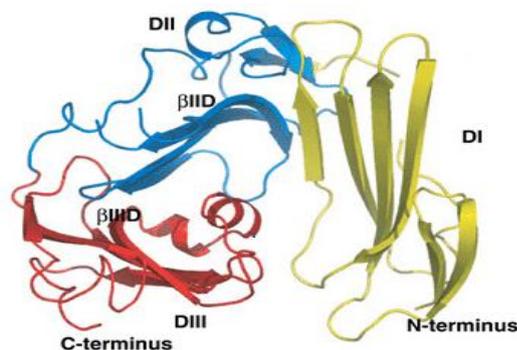


Figura 1.3 Struttura dell'uPAR. L'uPAR maturo di membrana è composto da tre domini di circa 90 residui ciascuno (DI, DII e DIII).

Nel dominio DI è presente la principale regione di legame dell'uPAR all'uPA, tuttavia, anche gli altri due domini partecipano a questo legame, benché in misura minore. Si può quindi affermare che, affinché l'uPAR legga efficacemente l'uPA, sono necessari tutti e tre i domini (Behrendt *et al.*, 1995; Kjaergaard *et al.*, 2008). I tre domini dell'uPAR sono uniti fra di loro da regioni linker. La regione che collega il dominio DI al DII è fortemente esposta all'azione di proteasi e, in seguito a taglio proteolitico, il dominio DI viene rilasciato in forma solubile, lasciando una forma tronca del recettore ancorata alla membrana cellulare (Høyer-Hansen *et al.*, 2001). Varie sono le proteasi in grado di tagliare la regione linker DI-DII, in base alla proteasi ed al suo sito di taglio, l'uPAR tronco di membrana può o meno esporre una sequenza N-terminale SRSRY, corrispondente ai residui amminoacidici 88-92, coinvolta nella migrazione cellulare (Fig.1.4).

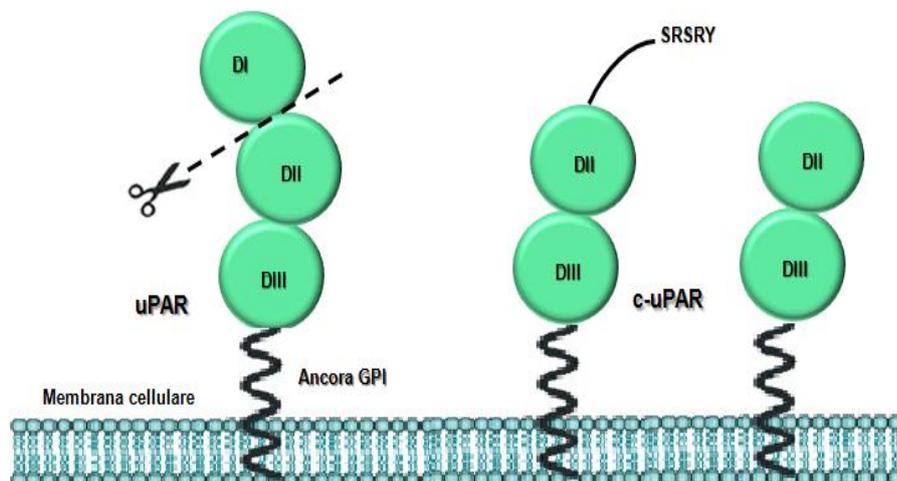


Figura 1.4 Forme tronche di uPAR. Varie proteasi possono tagliare la regione di connessione fra il dominio DI e DII, determinando la formazione di forme tronche di uPAR (c-uPAR) con esposta o meno la sequenza SRSRY (a.a. 88-92).

L'ancora GPI che lega il recettore alla membrana cellulare, inoltre, può essere bersaglio dell'azione di fosfolipasi C o D, determinando il rilascio dalla superficie cellulare di uPAR solubile nella forma intera o nelle forme tronche (Ploug, *et al.*, 1992) (Fig. 1.5).

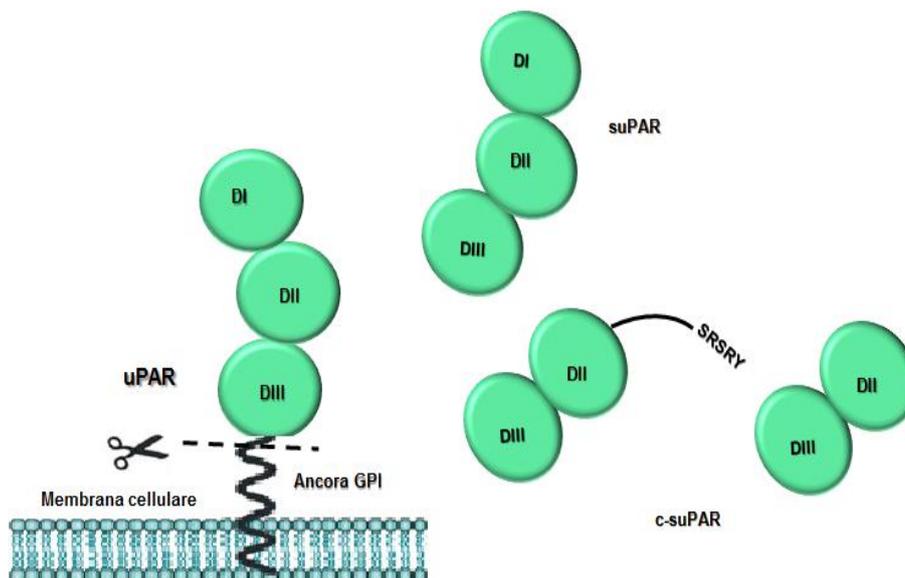


Figura 1.5 Forme solubili di uPAR. Il taglio dell'ancora GPI operata da fosfolipasi C o D determina la formazione di uPAR intero solubile (suPAR) o di forme tronche di uPAR solubile (c-suPAR).

1.3 LIGANDI E FUNZIONI DELL'uPAR

Le funzioni dell'uPAR sono prevalentemente suddivise in due gruppi:

- Funzioni proteolitiche
- Funzioni non proteolitiche

1.3.1 Funzioni proteolitiche

Le funzioni proteolitiche dell'uPAR sono legate all'attività proteolitica del suo ligando principale, l'uPA. L'uPAR, infatti, regola la proteolisi pericellulare concentrando l'attività proteolitica dell'uPA sulla superficie cellulare. L'uPA è secreto da numerosi tipi cellulari in forma inattiva, la sua attivazione avviene sull'uPAR in seguito a taglio proteolitico operato da diverse proteasi come la callicreina, le catepsine B ed L e anche la plasmina (Carriero e Stoppelli, 2011). L'uPA attiva è formata da due catene legate da un ponte disolfuro. La catena N-terminale (catena A) presenta il dominio EGF-like, che contiene il sito di legame all'uPAR. Dalla catena N-terminale può essere rilasciato, in seguito ad ulteriore taglio proteolitico, il frammento ammino-terminale (ATF, residui 1-135) che non presenta alcuna attività enzimatica, ma ha elevata affinità di legame all'uPAR (Carriero e Stoppelli, 2011). L'attività proteolitica risiede, infatti, nella catena C-terminale (catena B). L'uPA, quindi, è una molecola bifunzionale in cui attività proteolitica e attività di legame alla superficie cellulare sono funzioni totalmente separate fra di loro e completamente indipendenti (Carriero e Stoppelli, 2011).

L'uPAR, quindi, lega l'uPA, che a sua volta lega il suo substrato, il plasminogeno, anch'esso legato alla superficie cellulare mediante recettori a bassa affinità, attivandolo. La conseguenza è un forte incremento dell'attività proteolitica pericellulare che permette alla cellula di migrare attraverso l'ECM (Fig. 1.6) (Blasi e Sidenius, 2009).

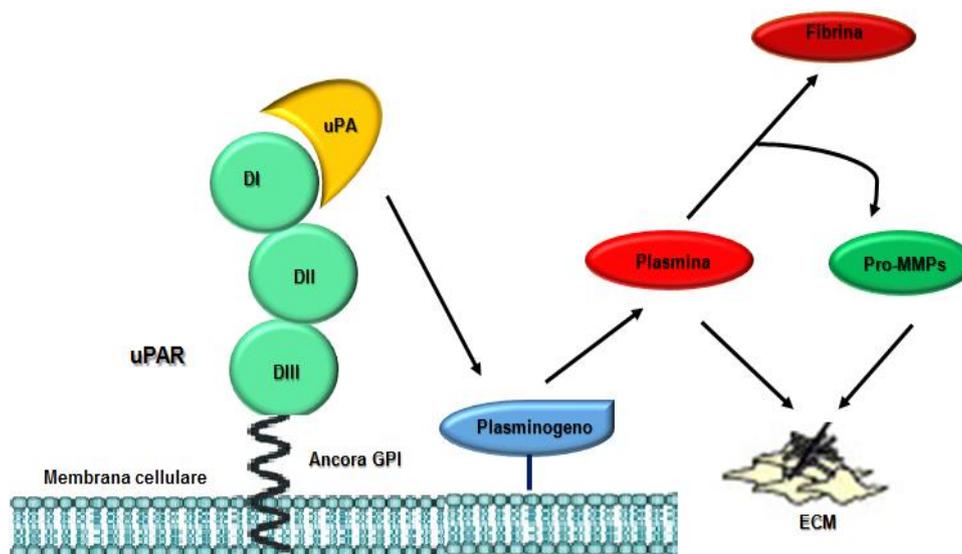


Figura 1.6 Funzioni proteolitiche dell'uPAR. L'uPAR lega l'uPA concentrandone l'attività proteolitica. L'uPA attiva il plasminogeno in plasmina promuovendo la degradazione diretta o indiretta della matrice extracellulare.

L'uPAR è in grado di concentrare l'uPA sulla superficie cellulare proprio in quei distretti in cui la sua funzione è maggiormente richiesta, come ad esempio a livello di siti di contatto cellula-cellula oppure cellula-ECM, favorendo così il meccanismo di migrazione cellulare. Inoltre, l'uPA, attivando il plasminogeno, regola la biodisponibilità di fattori di crescita come il TGF- β (Blasi e Sidenius, 2009).

1.3.2 Funzioni non proteolitiche dell'uPAR

Adesione

Una delle principali attività dell'uPAR non legata alla proteolisi extracellulare è la regolazione dell'adesione delle cellule all'ECM. L'uPAR, infatti, è un recettore non integrinico ad alta affinità per la vitronectina (VN) (Kjøller e Hall, 2001). La regolazione dell'adesione cellulare alla VN da parte dell'uPAR è stata dimostrata in diverse tipologie di cellule, inclusi monociti, fibroblasti, cellule epiteliali e cellule della muscolatura liscia (Blasi e Carmeliet, 2001). La VN è un componente dell'ECM ed è particolarmente abbondante nei tessuti tumorali. I siti di legame per la VN sono presenti prevalentemente sul dominio DI, ma, anche in questo caso, come nel caso del legame all'uPA, è necessario che l'uPAR sia nella sua forma intera per un legame

efficiente (Blasi e Sidenius, 2009). Affinchè l'uPAR possa inviare segnali pro-adesivi in seguito ad interazione con la VN, è comunque necessario l'aiuto di partners di segnale. L'uPAR, infatti, è ancorato alla membrana cellulare mediante una coda GPI, quindi non può segnalare all'interno della cellula. Partners di segnale dell'uPAR sono le integrine, alle quali l'uPAR si associa sulla superficie cellulare. Le integrine sono recettori cellulari transmembrana, formati dalla dimerizzazione di due subunità, α e β . Esse hanno il compito di ancorare le cellule all'ECM o tra di loro e possono captare i segnali provenienti dall'ambiente esterno, trasducendoli all'interno di essa. Numerosi studi hanno permesso di identificare sull'uPAR i siti di legame per le integrine. I principali siti di legame alle integrine sono presenti nel dominio DII e DIII, tuttavia, l'interazione uPAR/integrine necessita, come per il legame all'uPA e alla VN, di tutti e tre i domini dell'uPAR (Montuori e Ragno, 2009) (Fig.1.7).

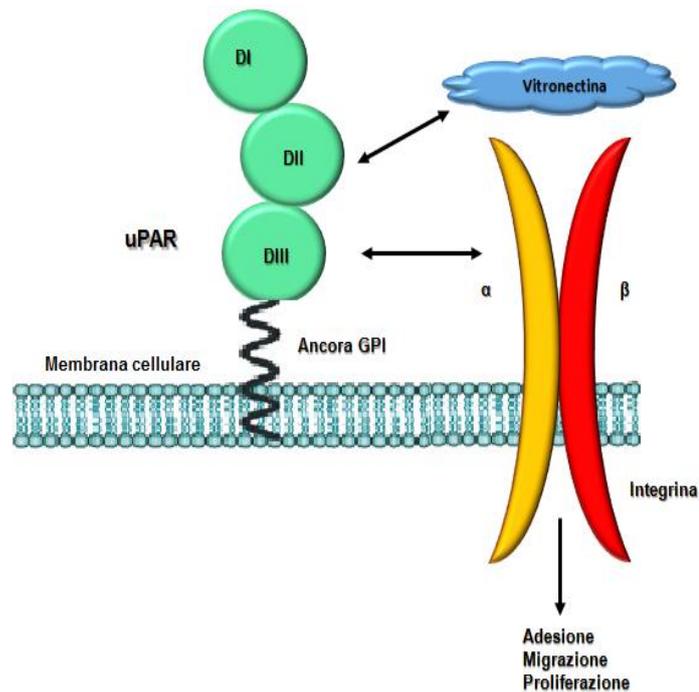


Figura 1.7 L'uPAR regola l'adesione cellulare. L'uPAR lega la vitronectina e si associa alle integrine, modificando la capacità delle cellule di aderire all'ECM.

L'uPAR, inoltre, si associa anche a vari tipi di integrine, regolandone l'attività e favorendo o meno l'adesione a substrati anche diversi dalla VN (Ragno, 2006).

Migrazione

Un'altra importante attività dell'uPAR è la regolazione della migrazione cellulare anche attraverso meccanismi indipendenti dall'attività proteolitica dell'uPA. Già nel 1988 fu osservato che l'uPA è in grado di inviare direttamente segnali promigratori all'interno della cellula (Fibbi *et al.*, 1988) indipendentemente dalla sua attività catalitica; infatti anche l'ATF, stimolando l'uPAR, induce migrazione cellulare direzionale. L'uPA e l'ATF inducono l'attivazione di vie di segnale che includono SRC, FAK, JACK/STAT1 (Sidenius e Blasi, 2003) oppure le piccole GTPasi Rho e Rac (Alfano *et al.*, 2012). Nella migrazione indotta da uPA è coinvolta anche una famiglia di recettori specializzati nella chemiotassi ovvero i recettori per il peptide formilato di origine batterica (fMLF) (Resnati *et al.*, 2002). È interessante notare che anche la migrazione verso fMLF richiede l'espressione di uPAR (Montuori *et al.*, 2002). Attualmente sono noti tre recettori per l'fMLF (fMLF-R), il recettore ad alta affinità FPR (FPR1), il recettore a bassa affinità FPR-LIKE-1 (FPR2), il recettore che presenta omologia con gli altri due ma che non lega l'fMLF (FPR3) (Ragno, 2006). Una delle prime evidenze sperimentali dell'esistenza di una correlazione fra uPAR ed fMLF-R è stata l'osservazione che la forma solubile e tronca di uPAR, con esposta la sequenza SRSRY, è ligando di FPR2 e rappresenta un potente agente chemiotattico per le cellule che esprimono tale recettore (Resnati *et al.*, 2002). Successivamente fu dimostrato che questa forma di uPAR tronca e solubile è in grado di indurre migrazione cellulare anche attivando gli altri due fMLF-R. La forma tronca e solubile di uPAR, quindi, è considerata ligando dei recettori dell'fMLF, ma non può legare gli altri ligandi specifici (uPA, VN). La forma intera e solubile di uPAR, invece, lega uPA e VN ma non lega gli fMLF-R, probabilmente perché la sequenza di legame SRSRY, in quella conformazione, è mascherata dal dominio DI. Successivamente è stato evidenziato che gli fMLF-R interagiscono anche con la forma intera dell'uPAR di membrana. Infatti, l'uPAR di membrana ha una conformazione tale da esporre la sequenza SRSRY, che gli permette l'interazione con gli fMLF-R, anche senza la rimozione del DI (a differenza dell'uPAR solubile) (Høyer-Hansen *et al.*, 2001). Gli fMLF-R si sono rivelati partners di segnale importanti per l'uPAR, al pari delle integrine, nel processo di migrazione cellulare. Infatti, l'uPAR, che può legare fMLF-R e integrine $\beta 1$ (Tang *et al.*, 2008), sembra fare da ponte tra i due recettori sulla superficie cellulare. È stato proposto che l'uPAR leghi e attivi i recettori per l'fMLF, che, a loro volta, modulerebbero lo stato di attivazione delle integrine $\beta 1$, regolando la migrazione cellulare (Fig. 1.8) (Gorrasi *et al.*, 2014).

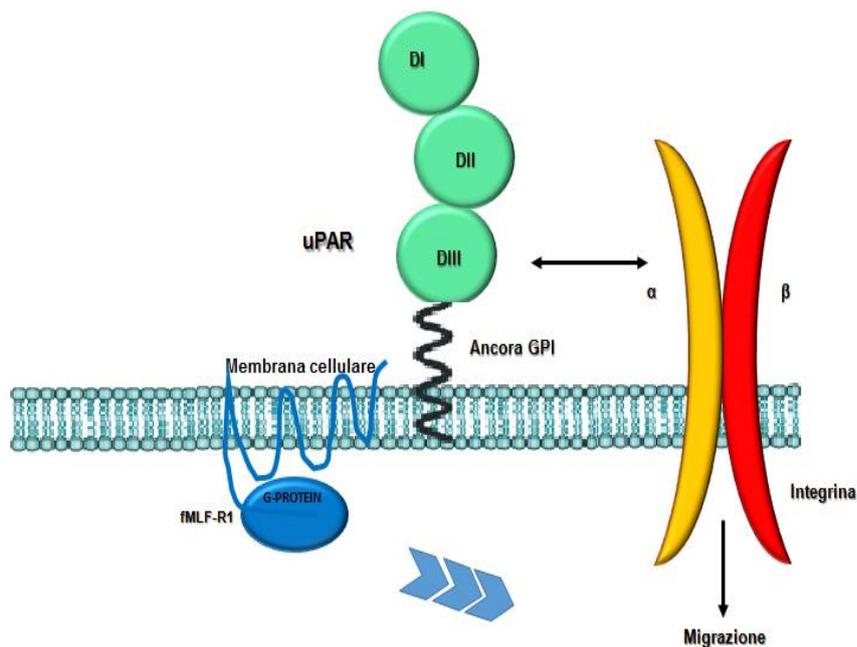


Figura 1.8 L'uPAR nella migrazione cellulare. L'uPAR, quando espresso, recluta i recettori dell'fMLF e le integrine sulla superficie cellulare, utilizzandoli per l'invio di segnali pro-migratori.

Proliferazione cellulare e apoptosi

L'uPAR è coinvolto anche nei processi di proliferazione cellulare e apoptosi (Alfano *et al.*, 2005). Una delle prime evidenze sperimentali di un possibile coinvolgimento nella proliferazione cellulare è stata l'osservazione che l'inibizione del legame uPAR-uPA, mediante specifici anticorpi, determinava una riduzione della capacità di crescita cellulare (Kirchheimer *et al.*, 1989); tale osservazione è stata poi seguita da numerose evidenze sperimentali. Molti sono anche i lavori che riguardano la relazione esistente tra apoptosi e uPAR. Il silenziamento di uPAR induce apoptosi di cellule di glioblastoma. La capacità di inibire apoptosi da parte dell'uPAR è probabilmente collegata alla sua capacità di attivare vie di segnalazione RAS/MAPK/ERK, in vari tipi cellulari. Una relazione importante è stata osservata tra uPAR e BCL-2 (proteina anti-apoptotica), in grado di incrementare reciprocamente la loro espressione (Hildenbrand *et al.*, 2008; Tarighi *et al.*, 2015).

CAPITOLO II

REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE DI uPAR

L'uPAR è espresso in diversi tessuti e tipi cellulari normali come monociti, granulociti, megacariociti, cellule endoteliali, fibroblasti, cellule epiteliali, cheratinociti e trofoblasti placentali (Nagamine *et al.*, 2005). L'espressione di uPAR può essere regolata da vari fattori tra i quali promotori tumorali, citochine, ormoni e fattori di crescita (Montuori *et al.*, 2003). L'uPAR è iperespresso e rappresenta un fattore prognostico negativo in diversi tipi di tumore come nel carcinoma gastrico, polmonare e mammario. Esso, infatti, è coinvolto nella progressione tumorale, nell'angiogenesi e nella formazione delle metastasi. È stato recentemente dimostrato che l'iperespressione di uPAR caratterizza le cellule di tumore circolanti in carcinomi mammari con coinvolgimento linfonodale (Markiewicz *et al.*, 2014). L'espressione di uPAR, fortemente incrementata nel processo infiammatorio, può essere regolata negativamente da anti-infiammatori non steroidei come gli inibitori della COX-2, che determinano ridotta espressione di uPAR con conseguente effetto anti-metastatico (Silva *et al.*, 2012).

2.1 REGOLAZIONE TRASCRIZIONALE DELL'uPAR

Il gene dell'uPAR è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 19 (Børghlum *et al.*, 1992), è composto da sette esoni e sei introni ed è lungo circa 23 kb (Casey *et al.*, 1994). Gli esoni 2-3, 4-5 e 6-7 codificano rispettivamente per il dominio DI, DII e DIII. Nella regione al 5', con attività di promotore, non sono presenti i convenzionali siti di inizio trascrizione TATA e CAAT Box (Wang *et al.*, 1995), ma sono state identificate, invece, sequenze ricche in CG, che sono correlate con i fattori di trascrizione AP-1, AP-2, C-Jun, NFκB, PEA3 e Sp1, fattori trascrizionali che mediano la trascrizione basale del gene (Nagamine *et al.*, 2005). In particolare è stato osservato che l'attività di SP1 è cruciale nella regolazione dell'espressione di uPAR in cellule di cancro al seno. L'uPA, ligando specifico dell'uPAR, è anch'esso in grado di regolare l'espressione di uPAR proprio attraverso l'incremento del fattore SP1 (Zannetti *et al.*, 2000). SP1 è anche coinvolto nell'aumento della trascrizione di uPAR indotta dall'iperespressione di BCL-2 in cellule di carcinoma mammario (Triscioglio *et al.*, 2004). Altri fattori trascrizionali, invece, regolano negativamente l'espressione di uPAR; il fattore trascrizionale PEA3, ad esempio, è il mediatore della riduzione dell'espressione di uPAR indotta dall'integrina β3. Il sito di legame per PEA3, quindi, agisce come elemento di silenziamento (Hapke *et al.*, 2001). È stato dimostrato che l'iperespressione della proteina β3-endonexina determina una riduzione dell'attività del promotore di uPAR in quanto la β3-endonexina interagisce direttamente con il complesso di trascrizione p50/p65 competendo con il fattore trascrizionale NFκB il quale non può più legare e attivare il promotore di uPAR (Besta *et al.*, 2004).

2.2 REGOLAZIONE POST-TRASCRIZIONALE DELL' uPAR

A partire dagli anni ottanta sono state riportate numerose osservazioni riguardanti la regolazione della stabilità dell'mRNA. Sono state individuate, infatti, famiglie di proteine in grado di legare e regolare l'emivita dell'mRNA, le RNA binding proteins (RBP). All'inizio degli anni novanta, inoltre, nei laboratori di Ambros e Ruvkun, sono stati individuati piccoli RNA non codificanti anch'essi coinvolti nella regolazione post-trascrizionale dell'mRNA, detti microRNA (miRNA). miRNA e RBP sono funzionalmente interdipendenti fra di loro, in alcuni casi cooperano fra di loro mentre in altri casi competono (Keene, 2010).

2.2.1 RNA BINDING PROTEIN e uPAR

Le RBP (Fig. 2.1) sono espresse nelle cellule eucariotiche; la maggior parte di esse è in grado di legare specifiche sequenze presenti in più di un mRNA, regolandone, in tal modo, localizzazione, espressione e funzione (Keene, 2010).

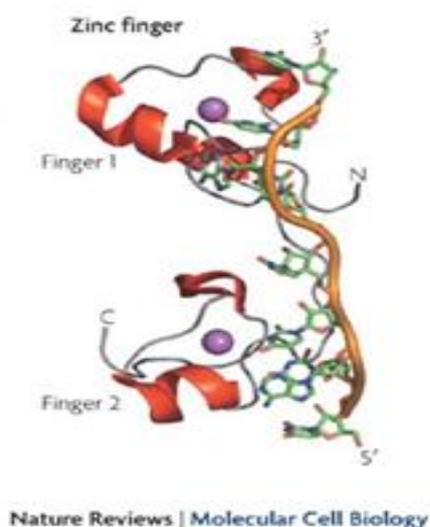


Figura 2.1 RNA binding protein. I due domini Finger della proteina TIS11d complessati allo zinco legano un AU-rich RNA element. Le alfa eliche sono in arancio e i foglietti beta in rosso. L'atomo di zinco in viola.

Le RBP possono legare sequenze dell'mRNA sia nella regione codificante, sia nella regione non codificante, inducendo la stabilizzazione o la degradazione del trascritto. Nella regione non tradotta al 3' (3'UTR) dell'mRNA di molte proteine sono presenti gli AU-rich elements (ARE), che rappresentano un punto di attacco per le RBP (Montuori *et al.*, 2003). Molte proteine come citochine, oncoproteine, fattori di crescita, che hanno un ruolo importante sia nella patogenesi del cancro sia nell'infiammazione cronica, hanno mRNA ricchi in ARE (Khabar, 2010). L'mRNA di citochine, prodotto transientemente durante la risposta infiammatoria, può essere stabilizzato grazie alla regolazione post-trascrizionale operata dalle RBP portando ad una risposta infiammatoria cronica. Anche nel caso del cancro, alterata stabilità di

mRNA specifici può favorire non soltanto l'oncogenesi, ma anche vari processi correlati alla progressione tumorale, quali invasione tissutale, metastasi, angiogenesi, ipossia (Khabar, 2010).

È interessante sottolineare che vari componenti del sistema di attivazione del plasminogeno possono essere regolati a livello post-trascrizionale da RBP.

Il PAI-1 nell'uomo può essere trascritto in due forme di diversa lunghezza. La forma più lunga contiene da 3 a 6 copie del pentamero AUUUA nella sua 3'UTR ed è meno stabile di quella più corta. La stabilità dell'mRNA del PAI-1 può essere influenzata da fattori di crescita, citochine ed ormoni attraverso meccanismi post-trascrizionali legati a RBP. La proteina osteogenica-1, membro della famiglia delle proteine morfogeniche, ad esempio, può aumentare l'espressione di PAI-1 inducendo la stabilizzazione del suo trascritto (Montuori *et al.*, 2003). Anche l'insulin growth factor (IGF-1) può indurre stabilizzazione di entrambe le forme di mRNA del PAI-1 (Nagamine *et al.*, 2005). Shetty *et al.* hanno invece descritto, in cellule di mesotelioma, la presenza di una proteina citoplasmatica che lega specificamente una sequenza di 33 nt nella 3'UTR dell'mRNA del PAI-1, destabilizzandolo (Shetty *et al.*, 2009).

Anche l'uPA, principale ligando dell'uPAR, può essere regolata post-trascrizionalmente da RBP. Un esempio di tale regolazione coinvolge la proteina p53, oncosoppressore comunemente definito "guardiano del genoma", che viene indotta e attivata in risposta a vari tipi di stress e regola la riparazione del DNA e l'apoptosi. p53 può interagire con una sequenza di 35 nt nella 3'UTR dell'mRNA dell'uPA, destabilizzandolo (Shetty *et al.*, 2008). Oltre p53, anche la ribonucleotide reductase M2 (RRM2) può destabilizzare l'mRNA dell'uPA. Le due RBP possono legare due siti indipendenti sulla 3'UTR dell'mRNA dell'uPA; tuttavia, recentemente, è stato evidenziato che, in realtà, p53 influenza l'interazione di RRM2 con l'mRNA dell'uPA (Shetty, *et al.*, 2012). Un esempio di RBP che invece stabilizza l'mRNA dell'uPA è la proteina HuR. HuR è prevalentemente localizzata nel nucleo ma, in condizioni particolari, trasloca nel citoplasma dove influenza positivamente la stabilità degli mRNA bersaglio. In cellule di cancro al seno fortemente metastatico sono stati riscontrati elevati livelli di HuR, determinati da elevati livelli della MAPK p38 e, parallelamente, è stata osservata aumentata stabilità di mRNA di uPA (Irigoyen *et al.*, 1998).

La proteina HuR è in grado di legare anche l'mRNA di uPAR, stabilizzandolo (Tran *et al.*, 2003). Una delle prime evidenze di una regolazione post-trascrizionale dell'uPAR è stata ottenuta in studi su cellule di carcinoma del polmone. In queste linee cellulari la stimolazione con fattori pro-infiammatori come l'LPS o il TGF- β , determina un aumento della stabilità dell'mRNA di uPAR (Lund *et al.*, 1995). Successivamente fu evidenziata una ridotta stabilità dell'mRNA di uPAR dovuta a una proteina citoplasmatica di circa 50 kDA, che lega un sito di 51 nt nella regione codificante dell'mRNA di uPAR; tale proteina è stata identificata come la fosfoglicerato-chinasi (PGK) (Shetty *et al.*, 2004). L'uPA che, come detto, può regolare l'espressione di uPAR a livello trascrizionale, può aumentare la sua espressione anche attraverso meccanismi post-trascrizionali. L'uPA, infatti, regola l'espressione di uPAR a livello post-trascrizionale promuovendo il legame di un fattore stabilizzante alla regione codificante dell'uPAR (Montuori *et al.*, 2003). L'espressione di uPAR, inoltre, può essere regolata anche da p53 mediante un meccanismo post-trascrizionale. Il coinvolgimento di p53 in un meccanismo di regolazione post-trascrizionale era suggerito dall'osservazione che sul promotore di

uPAR mancano siti di legame per p53 e la riduzione di p53 correla con un aumento della stabilità di uPAR. P53, infatti, interagisce con una sequenza di 37 nt nella 3'UTR dell'mRNA di uPAR, destabilizzandolo (Shetty *et al.*, 2007).

2.2.2 *microRNA*

Mediatori chiave della regolazione post-trascrizionale sono i microRNA (miRNA). Il primo miRNA è stato scoperto nel 1993; due studi indipendenti, infatti, scoprirono la reale natura del trascritto del gene *lin-4* di *C. elegans* che fu definito small non coding RNA (ncRNA). Qualche anno più tardi, sempre in *C. elegans*, fu scoperto un altro ncRNA, *let-7*. *Lin-4*, *let-7* e tanti altri, successivamente scoperti, erano in grado, attraverso interazioni RNA-RNA con la regione non tradotta al 3' (3'UTR) del gene bersaglio, di regolare l'espressione genica. Questi ncRNA sono stati poi individuati anche in altri organismi e sistemi cellulari e furono denominati microRNA (miRNA) (Di Leva *et al.*, 2014).

I miRNA sono piccoli RNA non codificanti di circa 21-25 nt (Ambros *et al.*, 2003); la loro biogenesi avviene in più fasi, che iniziano nel nucleo e si concludono nel citoplasma. Essi vengono trascritti come precursori primari (Pri-miRNA) nel nucleo, con il cappuccio al 5' e la coda poli-A al 3'. I pri-miRNA vengono processati da DROSHA/DGCR8 in strutture a forcina dette pre-miRNA. I pre-miRNA vengono esportati nel citoplasma e processati dall'enzima DICER in doppi filamenti di circa 22 nt. Il doppio filamento si associa alle proteine della famiglia delle Argonate (AGO), formando il complesso RISC. In questa sede, uno dei due filamenti rimane associato ad AGO formando il miRNA maturo mentre l'altro filamento viene degradato. Il complesso RISC dirige il miRNA maturo sulla 3'UTR del messaggero bersaglio (Fig. 2.2).

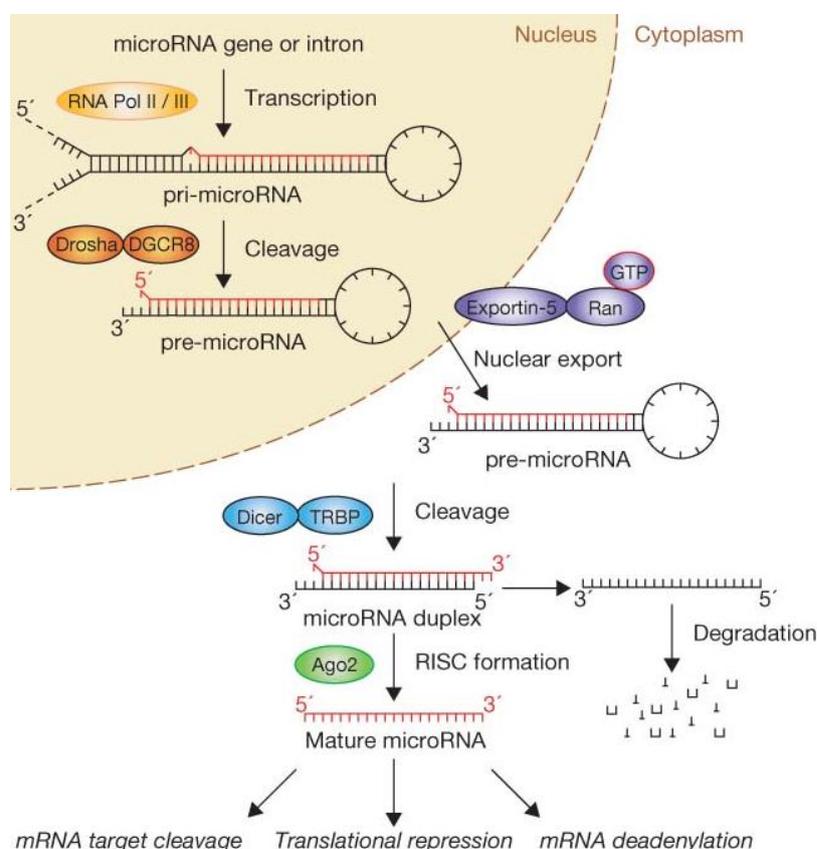


Figura 2.2 Biogenesi dei miRNA

I miRNA si appaiano per complementarietà, totale o parziale, a siti presenti nella 3'UTR dell'mRNA bersaglio. Se il miRNA maturo presenta complementarietà quasi totale con il messaggero bersaglio generalmente ne determina la degradazione tramite le endonucleasi del RISC. Se, invece, la complementarietà non è totale e quindi l'appaiamento è parziale, il miRNA determina il blocco della traduzione, senza alterazioni quantitative dell'mRNA bersaglio (Bartel, 2004). L'attività dei miRNA quindi, riveste grande importanza nella regolazione di numerosi processi fisiologici e patologici.

In un lavoro di Croce *et al.*, fu dimostrato che il cluster *miR 15a/16-1* è spesso deletato in alcune forme di leucemia linfatica cronica (CLL) (Calin *et al.*, 2002). Questo dette il via ad una serie di studi che hanno conferito ai miRNA un ruolo nella patogenesi del cancro. I miRNA, infatti, intervengono nella regolazione di tutti gli aspetti della biologia della cellula tumorale, come autosufficienza nell'invio di segnali di crescita, insensibilità ai segnali anti-proliferativi, insensibilità ai segnali pro-apoptotici, capacità di replicazione incontrollata e neo-angiogenesi (Di Leva *et al.*, 2014). I miRNA possono funzionare da oncogeni oppure da oncosoppressori. Alcuni miRNA, infatti, determinano il silenziamento genico di oncosoppressori, promuovendo proliferazione ed invasione delle cellule tumorali e angiogenesi, comportandosi quindi

da oncogeni. Altri miRNA possono determinare, invece, il silenziamento genico di prodotti di oncogeni, comportandosi, quindi, da oncosoppressori (Shenouda e Alahari, 2009) (Fig. 2.3).

Tra i miRNA con attività di *oncogeni* un esempio è il cluster *miR-17-92* tra i cui bersagli vi è *PTEN*, importante oncosoppressore, e *Rb2* (Zhang *et al.*, 2007). Un altro *oncomiR* è il *miR-155*, miRNA frequentemente iperespresso in tumori solidi come cancro al seno (Volinia *et al.*, 2006), utero (Wang *et al.*, 2008), adenocarcinoma pancreatico (Lee *et al.*, 2008) e in tumori del compartimento ematologico. Uno tra i più importanti esempi di miRNA che favorisce invasione e metastasi è il *miR-21* (Baranwal e Alahari, 2009), *oncomiR* iperespresso nel cancro della mammella, dove silenzia l'espressione di geni oncosoppressori. Elevati livelli di questo miRNA sono stati ritrovati anche nel glioblastoma multiforme (Baranwal e Alahari, 2009). Il *mir-10b* è un importante miRNA pro-metastatico. Esso, infatti, ha come bersaglio il fattore trascrizionale homeoboxD10 (HOXD10) (O'Day e Lal, 2010) che, a sua volta, regola geni coinvolti nella migrazione cellulare e nel rimodellamento della matrice extracellulare, ma non nella proliferazione cellulare, quindi non ha effetto sulla formazione del tumore primario (Baranwal e Alahari, 2009).

Alcuni miRNA contrastano, invece, la formazione del tumore, regolando negativamente la produzione di fattori pro-tumorali. La ridotta espressione di questi miRNA determina un'eccessiva espressione dei loro bersagli, promuovendo la progressione tumorale (Esquela-Kerscher e Slack, 2006). Tra i miRNA con attività di *oncosoppressori* ritroviamo *miR-15a* e *miR-16-1* la cui espressione è ridotta ed è inversamente correlata a quella di *BCL2* nelle CLL (Cimmino *et al.*, 2005). Ridotta espressione di questi due miRNA si è osservata anche in cancro della prostata e mieloma multiplo. I dati suggeriscono che questi due miRNA hanno come bersaglio *BCL2* ed altri oncogeni e potrebbero essere utilizzati per sopprimere la crescita tumorale nella terapia di vari tumori (Di Leva *et al.*, 2014). Tra i più importanti esempi di miRNA con attività di oncosoppressori, sono i miRNA appartenenti alla famiglia *let-7* (Zhang *et al.*, 2007). Tra i principali bersagli di questi miRNA c'è *RAS*, oncogene iperespresso in almeno il 15-30% dei tumori. miRNA appartenenti a questa famiglia sono normalmente espressi in tessuti sani, la loro ridotta espressione in tessuti tumorali causa l'iperespressione di *RAS*, favorendo la progressione tumorale (Zhang *et al.*, 2007). Anche i miRNA appartenenti alla famiglia *miR-200* sono miRNA oncosoppressori, infatti la loro espressione è spesso ridotta in varie forme di tumore, influenzando transizione epitelio-mesenchimale (EMT), adesione delle cellule tumorali, migrazione, invasione e metastasi (Mongroo e Rustgi, 2010). Anche il *mir-205*, se iperespresso, inibisce migrazione ed invasione cellulare. Elevati livelli di *mir-205* promuovono una regolazione positiva dell'E-caderina, in quanto, un repressore trascrizionale dell'E-caderina è bersaglio di *mir-205*; *mir-205* riduce la motilità e le capacità invasive della cellula (Baranwal e Alahari, 2009).

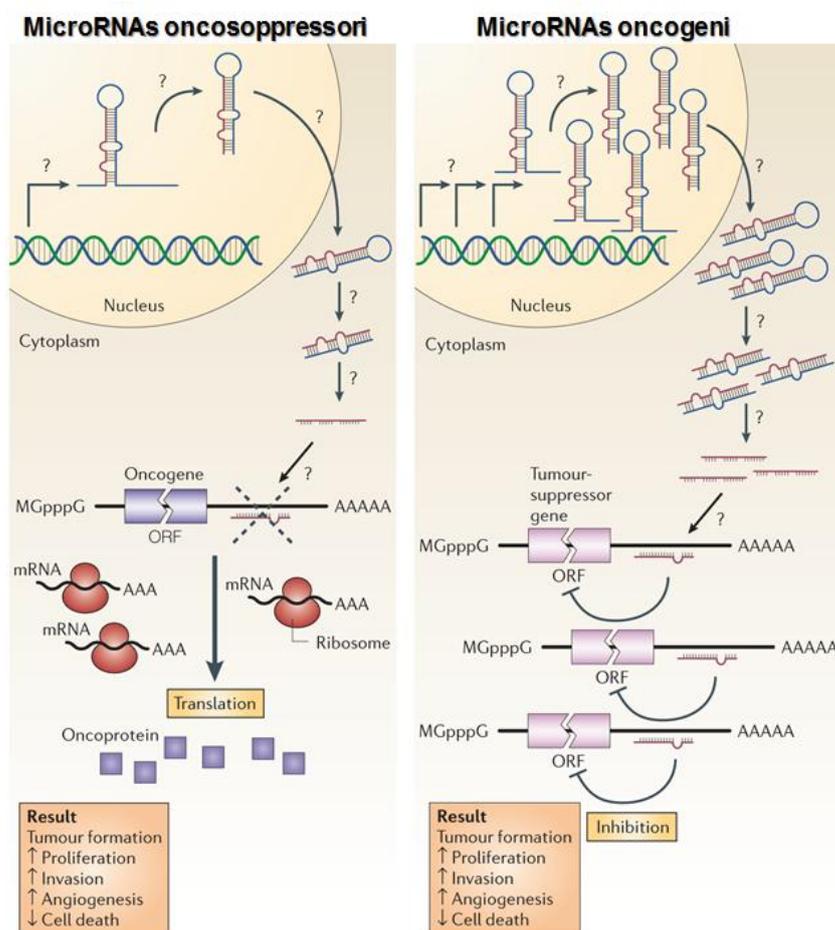


Figura 2.3 miRNA: oncogeni e oncosoppressori. I miRNA oncogeni silenziano geni oncosoppressori, favorendo la formazione del tumore. I miRNA oncosoppressori regolano negativamente la sintesi di oncoproteine, contrastando la formazione del tumore.

miRNA e uPAR

La regolazione dell'espressione di uPAR da parte di miRNA, ad oggi, è stata molto poco studiata. È interessante sottolineare che in cellule di melanoma, il *miR-146a* è in grado di bersagliare la ribonucleoproteina C1/C2, una RBP che, a sua volta, è in grado di regolare l'espressione di uPA e uPAR (Hwang *et al.*, 2012). In tali cellule, quindi, è stata evidenziata, proprio in relazione all'asse uPA/uPAR, la concertazione dei due meccanismi di regolazione post-trascrizionale, quello mediato da RBP e quello mediato da miRNA. Il *miR-146a*, inoltre, sembra avere un ruolo cruciale nella mielopoiesi e nelle AML (Labbaye *et al.*, 2008; Labbaye *et al.*, 2012). Sono stati riportati alcuni miRNA che regolano l'espressione di uPAR ma non ci sono studi per l'identificazione di miRNA che bersagliano direttamente l'mRNA di uPAR e che, quindi, potrebbero avere rilievo anche in ambito clinico.

CAPITOLO III

IDENTIFICAZIONE, CONVALIDA E CARATTERIZZAZIONE DEI miRNA CHE BERSAGLIANO L'uPAR

3.1 INTRODUZIONE

L'espressione di uPAR è fortemente aumentata e rappresenta un fattore prognostico negativo in vari tipi di tumore, inclusi quelli del compartimento ematico (Noh *et al.*, 2013). Nelle leucemie mieloidi acute (AML), l'espressione di uPAR è correlata al grado di differenziamento, minore nei sottotipi FAB M0 e massima nei sottotipi FAB M3-M5. L'aumentata espressione di uPAR è correlata ad una maggiore tendenza delle cellule tumorali ad infiltrarsi a livello cutaneo e tissutale (Béné *et al.*, 2004; Lanza *et al.*, 1998). L'espressione di uPAR può essere regolata a diversi livelli, trascrizionale e post-trascrizionale. La regolazione post-trascrizionale dell'espressione di uPAR mediata da RBP è stata intensamente studiata mentre poco è noto di quella mediata dai miRNA.

Il mio studio si è quindi focalizzato sull'identificazione di miRNA in grado di bersagliare l'mRNA di uPAR e, quindi, di regolarne l'espressione. Lo studio è stato effettuato su cellule di AML, dove si osserva una modulazione di espressione di uPAR, dalle AML meno differenziate alle AML più differenziate. Sono stati presi in esame miRNA con attività oncosoppressoria, considerata l'associazione dell'uPAR con il fenotipo tumorale.

3.2 RISULTATI

3.2.1 IDENTIFICAZIONE DI miRNA CHE REGOLANO L'ESPRESSIONE DI uPAR

Sono stati selezionati miRNA predetti *in silico* per uPAR e/o descritti in letteratura come modulatori di espressione di uPAR, con attività di oncosoppressori, ed espressi in cellule staminali ematopoietiche (HSC) o in AML. I tre miRNA selezionati per lo studio sono stati *miR-146a*, *miR-335* e *miR-622*. Innanzitutto, per dimostrare che questi miRNA fossero realmente in grado di regolare l'espressione di uPAR, i precursori sintetici (pre-miRNA) dei tre miRNA o di un miRNA controllo sono stati transientemente trasfettati in cellule HeLa, cellule di cancro della cervice uterina che esprimono costitutivamente elevati livelli uPAR (Montuori *et al.*, 2013). Le cellule sono state poi lisate a 24 e 48 ore dalla trasfezione ed i lisati analizzati mediante Western Blot con anticorpo anti-uPAR. Il Western Blot ha evidenziato che i tre miRNA selezionati sono in grado di ridurre efficacemente l'espressione di uPAR a livello proteico rispetto al miRNA controllo, soprattutto dopo 24 ore di trasfezione (Fig.3.1).

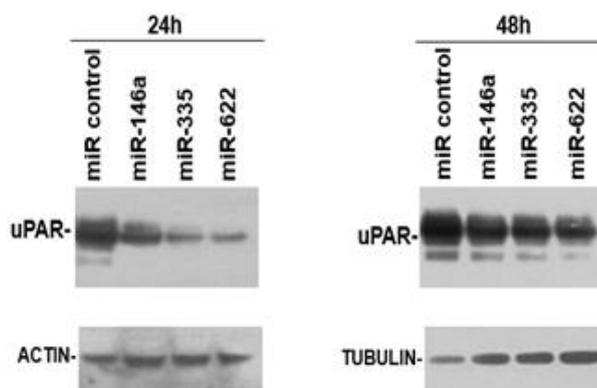


Figura 3.1 I tre miRNA selezionati riducono l'espressione di uPAR a livello proteico. Cellule HeLa sono state trasfettate con i precursori sintetici di *miR-146a*, *miR-335* e *miR-622* o del *miR-controllo*. A 24 e 48 ore dalla trasfezione le cellule sono state lisate ed i lisati analizzati con anticorpo anti-uPAR. Il filtro è stato reibridato con anticorpo anti-actina oppure anti-tubulina come controllo di caricamento.

Poiché i miRNA possono determinare anche la degradazione dell'mRNA bersaglio, è stato esaminato anche il livello di mRNA di uPAR nelle cellule HeLa trasfettate con i precursori dei miRNA selezionati. È stato isolato l'RNA totale e l'mRNA di uPAR è stato analizzato mediante qRT-PCR. I livelli di trascritto di uPAR sono risultati significativamente ridotti nelle cellule HeLa trasfettate con i precursori del *miR-146a* e del *miR-335* rispetto alle cellule trasfettate con il *miR-controllo*. L'iperespressione del *miR-622*, invece, non ha determinato variazioni significative nei livelli del trascritto di uPAR (Fig. 3.2).

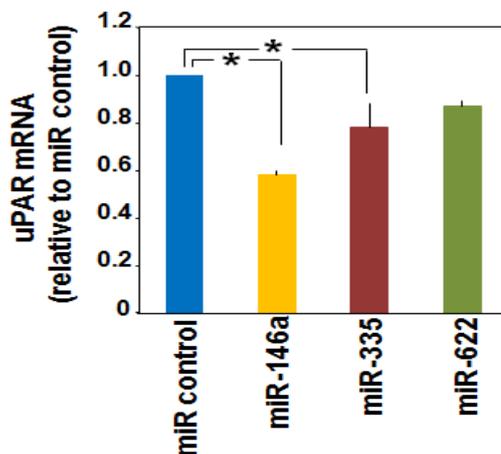


Figura 3.2 Due dei tre miRNA selezionati inducono degradazione dell'mRNA di uPAR. Cellule HeLa sono state trasfettate con i precursori sintetici di *miR-146a*, *miR-335*, *miR-622* o del *miR-controllo*. L'RNA totale è stato estratto in Qiazol e analizzato per qRT-PCR con primers specifici per uPAR. I livelli del trascritto di uPAR sono stati normalizzati sul controllo interno GAPDH. I risultati sono indicati come il rapporto fra i livelli di mRNA di uPAR in cellule trasfettate con i miR selezionati e i livelli dell'mRNA di uPAR in cellule trasfettate con il *miR-controllo*. (*) $p \leq 0,05$, determinata attraverso il t-test di Student.

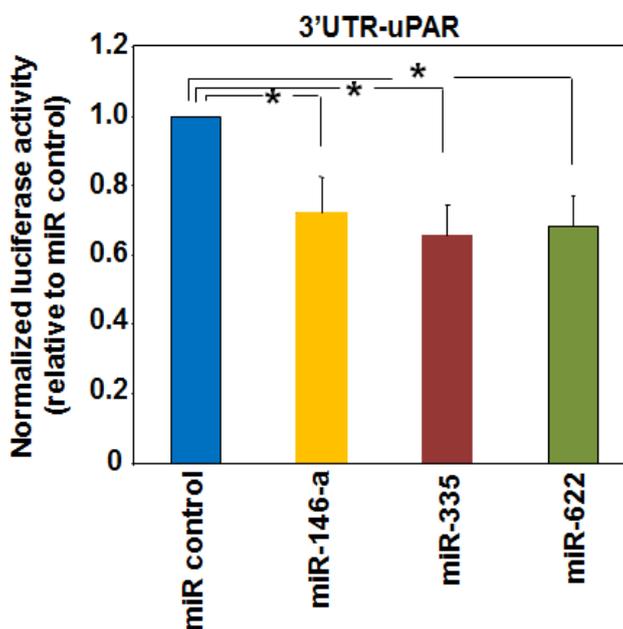


Figura 3.4 L'uPAR è bersaglio diretto dei miRNA selezionati. Il costrutto PGL-3'UTR/uPAR è stato co-trasfettato in cellule HeLa con il PRLSV40 (vettore contenente il gene *renilla*-luciferasi) e con i precursori sintetici dei miRNA selezionati o del miRNA controllo. Dopo 24 ore dalla trasfezione, è stata misurata l'attività luciferasica *firefly*, normalizzata sull'attività luciferasica *renilla*. I valori mostrati rappresentano il rapporto tra i valori ottenuti nelle cellule trasfettate con i miRNA selezionati e i valori ottenuti nelle cellule trasfettate con il miRNA controllo. (*) $p \leq 0,05$, determinata attraverso il t-test di Student.

I dati ottenuti indicano che i tre miRNA selezionati effettivamente bersagliano in maniera diretta la 3'UTR dell'uPAR, regolando l'espressione del gene ad essa associato.

3.2.3 I LIVELLI DI uPAR E DEI miRNA SELEZIONATI SONO INVERSAMENTE PROPORZIONALI IN CELLULE DI AML

Nelle AML, l'espressione di uPAR varia a seconda del sottotipo FAB, con un'espressione maggiore nelle AML più differenziate (M5) e minore in quelle scarsamente differenziate (M0) (Béné *et al.*, 2004). Linee cellulari di AML a diverso grado di differenziamento sono quindi sembrate un sistema adatto sul quale focalizzare gli studi. Gli esperimenti sono stati condotti, in particolare, su cellule KG1 (M0/M1), THP-1 (M5) e U937 (M5). Sono stati quindi esaminati in queste linee cellulari l'espressione di uPAR, a livello di proteina e di mRNA, e i livelli dei miRNA selezionati. Le cellule sono state lisate e i lisati analizzati per Western Blot con anticorpo anti-uPAR, confermando livelli di espressione di uPAR più bassi nelle KG1 (M0) rispetto alle cellule THP-1 e U937 (M5) (Fig. 3.5).

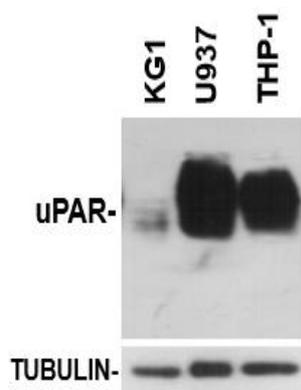


Figura 3.5 Espressione di uPAR in cellule di AML. Le cellule leucemiche sono state lisate e analizzate per Western Blot con anticorpo anti-uPAR. Il filtro è stato poi reibridato con tubulina come controllo di caricamento.

L'espressione di uPAR è stata poi analizzata anche a livello di RNA messaggero. Le cellule leucemiche sono state lisate in Qiazol per l'estrazione dell'RNA totale e successivamente, analizzate per qRT-PCR utilizzando primers specifici per uPAR. In accordo con i risultati del Western Blot, è stato evidenziato che i livelli di espressione di uPAR aumentano nelle cellule THP-1 e nelle U937 (M5) rispetto alle cellule KG1 (M0), anche a livello del messaggero (Fig. 3.6).

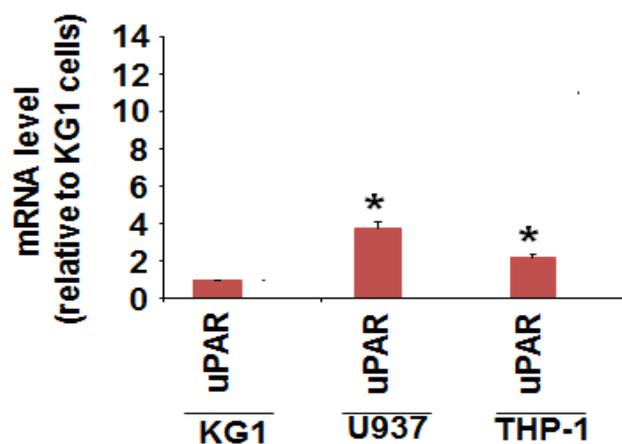


Figura 3.6 Espressione di uPAR in cellule leucemiche. Le cellule sono state lisate in Qiazol e l'RNA totale è stato analizzato mediante qRT-PCR con primers specifici per uPAR e GAPDH come controllo. I livelli dell'mRNA di uPAR sono stati normalizzati sui livelli di GAPDH. I valori sono stati poi riportati come rapporto fra i livelli dell'mRNA di uPAR nelle THP-1 e U937 e i livelli nelle KG1. (*) $p \leq 0,05$, determinata attraverso il t-test di Student.

Successivamente, nelle stesse linee cellulari di AML, sono stati quantizzati anche i livelli di espressione dei tre miRNA selezionati mediante qRT-PCR. I miRNA selezionati sono espressi, anche se in quantità diverse, in tutte e tre le linee cellulari leucemiche. In particolare, nelle cellule THP-1 e U937 i livelli di tali miRNA sono più bassi rispetto ai livelli osservati in cellule KG1 (Fig.3.7).

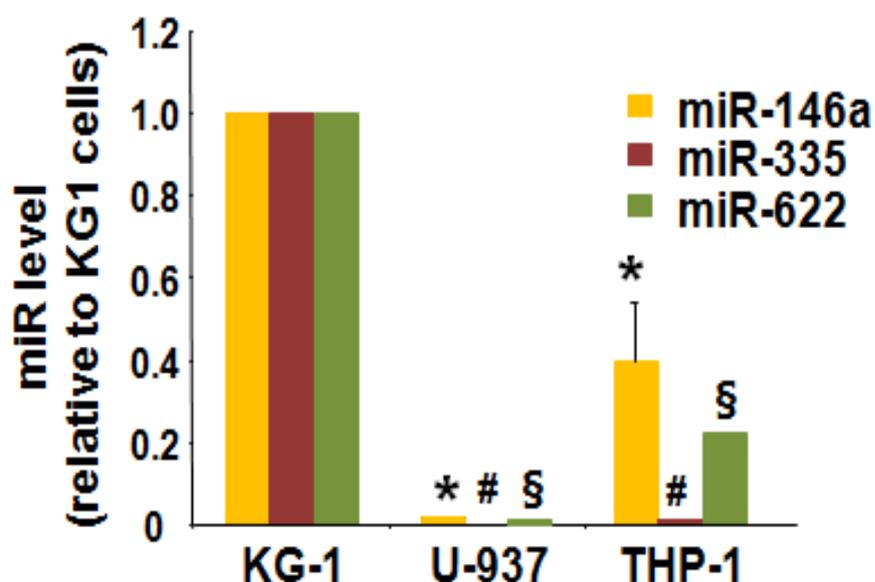


Figura 3.7 Espressione dei miRNA selezionati nelle linee cellulari di AML. Le cellule di AML sono state lisate in Qiazol e l'espressione dei miRNA selezionati analizzata per qRT-PCR, usando RNU6 come controllo interno per normalizzare. I valori sono stati espressi come rapporto fra i livelli di espressione dei tre miRNA nelle cellule THP-1 e U937 e i loro livelli in cellule KG1. (*) $p \leq 0,05$, determinata attraverso il t-test di Student.

Questi risultati indicano quindi una relazione inversa tra l'espressione di uPAR e l'espressione dei miRNA selezionati nelle diverse linee cellulari di AML, suggerendo che tali miRNA potrebbero regolare l'espressione di uPAR nelle linee di AML esaminate.

3.2.4 I miRNA SELEZIONATI REGOLANO L'ESPRESSIONE DI uPAR NELLE LINEE CELLULARI DI AML

Avendo dimostrato livelli opposti di espressione di uPAR e dei miRNA selezionati nelle cellule di AML, abbiamo valutato se effettivamente questi miRNA sono in grado di regolare l'espressione di uPAR in tali linee cellulari. A tale scopo, le cellule THP-1 (M5), che esprimono costitutivamente elevati livelli di uPAR e bassi livelli dei miRNA selezionati, sono state transientemente trasfettate con i precursori dei tre miRNA selezionati o del miRNA controllo. Dopo 48 ore dalla trasfezione, le cellule sono state lisate e i lisati sono stati analizzati per Western Blot con anticorpo anti-uPAR. L'analisi per Western Blot ha evidenziato che tutti e tre i miRNA selezionati sono in grado di ridurre i livelli di uPAR in cellule THP-1, rispetto al miRNA controllo (Fig. 3.8).

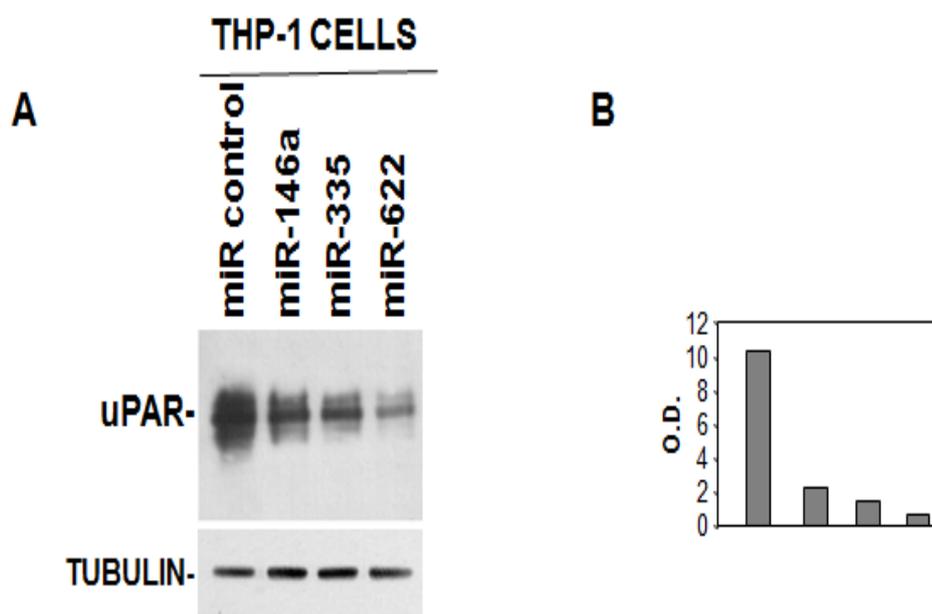


Figura 3.8 I miRNA selezionati riducono i livelli di uPAR in cellule THP-1. Cellule THP-1 sono state transientemente trasfettate con i precursori sintetici di *miR-146a*, *miR-335* e *miR-622* o del *miR-controllo*. Dopo 48 ore le cellule sono state lisate e i lisati sono stati analizzati per Western Blot con anticorpo anti-uPAR. Il filtro è stato poi reibridato con anticorpo anti-tubulina come controllo di caricamento (A). L'intensità delle bande, espressa in O.D., è stata quantizzata mediante analisi densitometrica, i valori riportati in grafico rappresentano il rapporto tra i livelli di uPAR e i livelli di tubulina (B).

Al fine di dimostrare che l'espressione di uPAR è realmente regolata dai miRNA selezionati, espressi endogenamente dalle cellule di AML, sono stati trasfettati in cellule KG1 (M0), che esprimono bassi livelli di uPAR ed elevati livelli endogeni dei suddetti miRNA, inibitori specifici dei miRNA selezionati, locked nucleic acid (LNA) oligonucleotides (ONs). Dopo 24 ore le cellule sono state lisate ed analizzate per Western Blot con anticorpo anti-uPAR. L'analisi per Western Blot ha evidenziato che tutti e tre gli LNA-ONs, specifici per i miRNA selezionati, sono in grado di aumentare i livelli di espressione di uPAR, rispetto all'LNA-ON controllo (Fig. 3.9), evidenziando che i *miR-146a*, *miR-335* e *miR-622* endogeni sono responsabili o contribuiscono alla regolazione negativa dell'espressione dell'uPAR in cellule KG1.

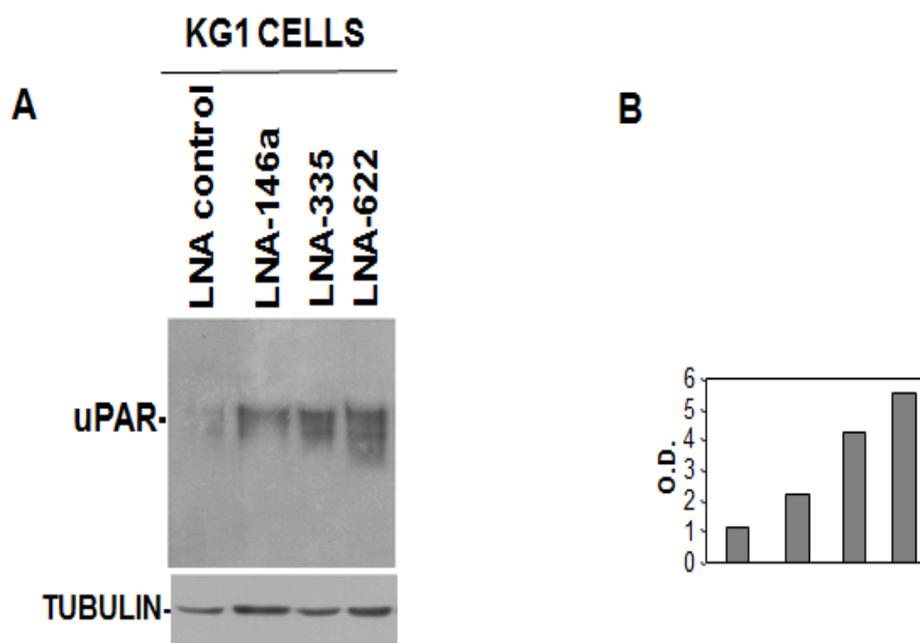


Figura 3.9 I miRNA 146a, 335 e 622 endogeni regolano l'espressione di uPAR in cellule KG1. Cellule KG1 sono state transientemente trasfettate con LNA-ONs specifici per i miRNA selezionati. Dopo 24 ore, le cellule sono state lisate e analizzate per Western Blot con anticorpo anti-uPAR. I filtri sono stati reibridati con tubulina, come controllo di caricamento (A). L'intensità delle bande, espressa in O.D., è stata quantizzata mediante analisi densitometrica, i valori riportati in grafico rappresentano il rapporto tra i livelli di uPAR e i livelli di tubulina (B).

3.2.5 I miRNA SELEZIONATI POSSONO REGOLARE MIGRAZIONE E INVASIONE DI CELLULE DI AML

L'uPAR è una molecola chiave nel dirigere la migrazione direzionale delle cellule (Gorrasi *et al.*, 2014). Poiché i miRNA selezionati regolano l'espressione di uPAR, potrebbero essere quindi in grado di influenzare la migrazione cellulare. Cellule THP-1 che esprimono costitutivamente elevati livelli di uPAR, sono state trasfettate con i precursori sintetici del *miR-146a*, *miR-335* e *miR-622* o del miRNA controllo. Dopo 48 ore le cellule sono state poste a migrare in camere di Boyden verso ATF, ligando dell'uPAR, oppure verso siero, miscela di chemioattrattanti. I saggi di migrazione cellulare hanno evidenziato che l'iperespressione dei tre miRNA riduce significativamente la migrazione di cellule THP-1 (Fig. 3.10).

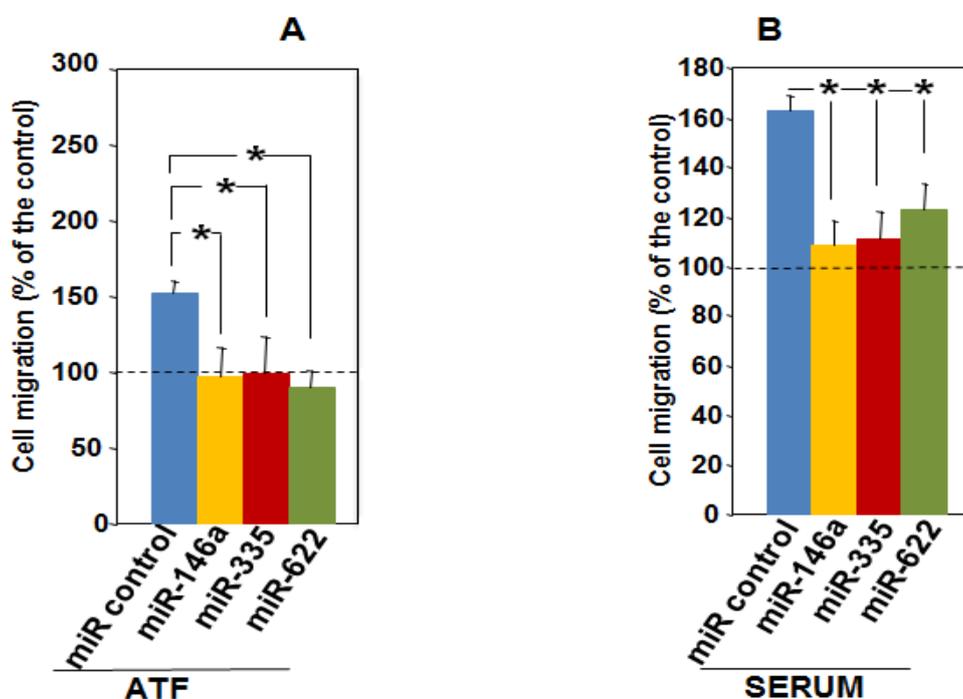


Figura 3.10 I miRNA selezionati regolano la migrazione direzionale di cellule THP-1. Cellule THP-1 sono state transientemente trasfettate con i precursori dei tre miRNA selezionati o del miRNA controllo. Dopo 48 ore le cellule sono state poste a migrare in camere di Boyden verso il frammento aminoterminale dell'uPA (ATF) (A) o verso 10% siero bovino fetale (FBS) (B). Le cellule migrate sono state fissate in etanolo, colorate con ematossilina e contate. I risultati sono espressi come percentuale di cellule migrate verso il chemioattrattante rispetto alle cellule migrate in assenza di chemioattrattante (migrazione basale). (*) $p \leq 0,05$, determinata con il t-test di Student.

È stata infine esaminata la capacità dei tre miRNA di influire sull'invasività delle cellule THP-1. Le cellule THP-1 sono state trasfettate con i precursori dei tre

miRNA o del miRNA controllo e sono state poi poste a migrare verso siero, in camere di Boyden, su filtri ricoperti di Matrigel. Anche in questo caso, i miRNA selezionati riducono l'invasione di cellule THP-1, benchè nel caso del *miR-622* la riduzione non risulti significativa (Fig. 3.11).

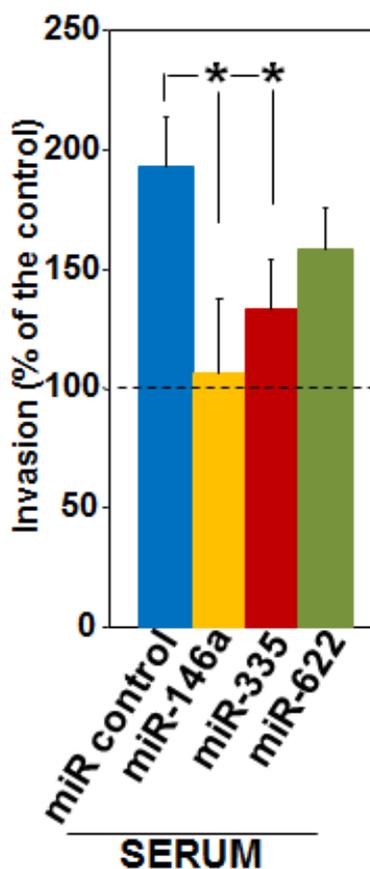


Figura 3.11 I miRNA selezionati regolano l'invasività di cellule THP-1. Cellule THP-1, transientemente trasfettate con i precursori dei miRNA selezionati o del miRNA controllo, sono state poste in camere di Boyden su filtri ricoperti di Matrigel utilizzando il siero come chemioattrattante. Le cellule migrate sono state fissate in etanolo, colorate con ematossilina e contate. I risultati sono espressi come percentuale di cellule migrate verso il chemioattrattante rispetto alle cellule migrate in assenza di chemioattrattante. (*) $p \leq 0,05$, determinata con il t-test di Student.

I miRNA selezionati che bersagliano l'uPAR, quindi, sono in grado di regolare negativamente migrazione e invasività di cellule THP-1; naturalmente è probabile che espletino tali attività regolando l'espressione anche di altri bersagli, oltre l'uPAR, coinvolti in questi specifici processi biologici.

3.2.6 I miRNA SELEZIONATI INFLUENZANO LA PROLIFERAZIONE DI CELLULE THP-1

L'uPAR, stabilendo specifiche interazioni con molecole della superficie cellulare, regola anche la proliferazione cellulare (Alfano *et al.*, 2005). Abbiamo quindi esaminato l'influenza di tali miRNA sulla proliferazione di cellule THP-1. Le cellule THP-1 sono state trasfettate con i precursori dei miRNA selezionati o del miRNA controllo e sottoposte a saggio MTS, che colora le cellule vitali, al tempo 0 o dopo 24 e 48 ore. Il saggio di proliferazione mostra che l'iperespressione dei tre miRNA non influenza il numero di cellule dopo 24 ore dalla trasfezione, ma lo riduce significativamente dopo 48 ore (Fig. 3.12).

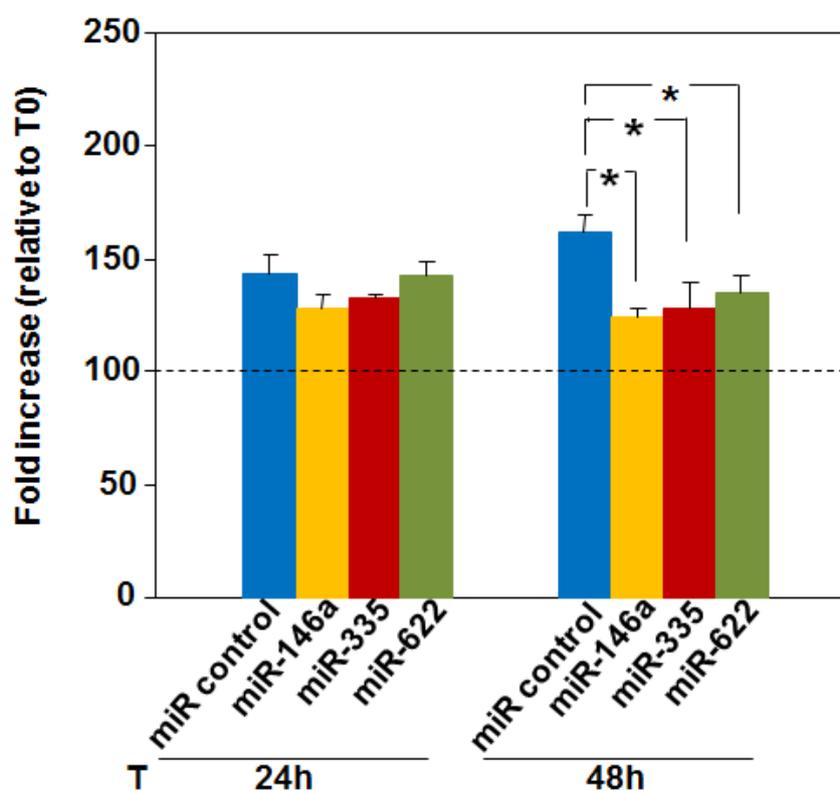


Figura 3.12 I miRNA selezionati influenzano la proliferazione di cellule THP-1. Cellule THP-1 sono state trasfettate con i precursori dei miRNA selezionati o del miRNA controllo, e sottoposte a saggio MTS ai tempi indicati. Dopo 4 ore è stata letta l'assorbanza a 490 nm. I valori sono espressi come rapporto tra le O.D. ottenute ai tempi indicati e le O.D. ottenute al tempo 0. (*) $p \leq 0,05$ determinata mediante t-test di Student.

Tali risultati indicano che i tre miRNA possono influenzare anche la proliferazione delle cellule esaminate e, anche in questo caso, non si può escludere che possano farlo bersagliando anche altre molecole, oltre l'uPAR, coinvolte in tale processo biologico.

3.2.7 ANALISI DEI LIVELLI DI ESPRESSIONE DI uPAR E DEI miRNA SELEZIONATI NEI BLASTI DI PAZIENTI AFFETTI DA AML

Sono stati infine analizzati, mediante qRT-PCR, i livelli di espressione di uPAR e dei miRNA selezionati in blasti ottenuti da 10 pazienti affetti da AML e in cellule staminali ematopoietiche CD34⁺ (HSC) ottenute da donatori sani. L'espressione di uPAR è risultata essere alquanto variabile tra i pazienti di AML ma, in ogni caso, significativamente più elevata nei blasti di AML rispetto alle HSC dei donatori sani (Fig. 3.13 A). L'analisi dei livelli dei tre miRNA ha evidenziato che il *miR-146a* è espresso a livelli significativamente più bassi nei blasti di AML rispetto alle cellule dei donatori sani; anche il livello del *miR-335* è più basso nei blasti rispetto alle cellule dei donatori sani, benchè in modo non statisticamente significativo; non è stato possibile, invece, rilevare e quantizzare il *miR-622* (Fig. 3.13 B).

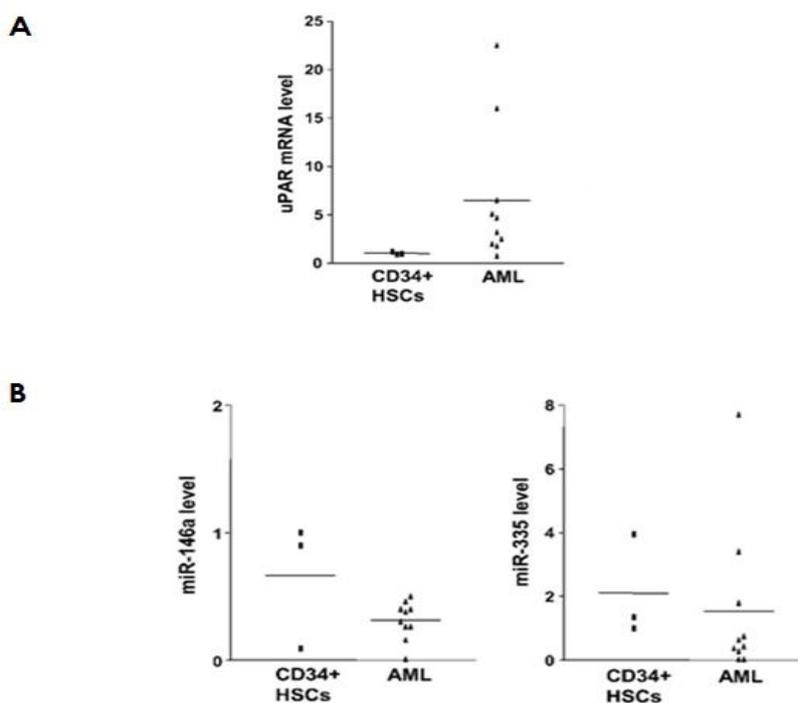


Figura 3.13 Espressione di uPAR e *miR-146a* e *miR-335* in blasti di AML. I blasti ottenuti da dieci pazienti di AML e le HSC CD34⁺ ottenute da donatori sani sono stati lisati in Qiazol. L'espressione di uPAR (A), e dei *miR-146a* e *miR-335* (B) è stata quantizzata per qRT-PCR con primers specifici e normalizzata sui livelli di GAPDH (per uPAR) e RNU6 (per i miRNA).

Tali risultati suggeriscono che i *miR-146a* e *miR-335* potrebbero regolare l'espressione di uPAR anche in vivo.

3.3 DISCUSSIONE

L'espressione di uPAR è fortemente aumentata e rappresenta un fattore prognostico negativo in molti tumori. Il recettore, infatti, è coinvolto in progressione tumorale, angiogenesi e formazione delle metastasi (Furusato *et al.*, 2010; Teicher *et al.*, 2010; Noh *et al.*, 2013). I livelli di uPAR risultano aumentati anche nei tumori del compartimento ematologico. Nelle AML, l'espressione di uPAR varia a seconda del sottotipo, aumentando dalle cellule meno differenziate alle cellule più differenziate (Béné *et al.*, 2004; Lanza *et al.*, 1998). Linee cellulari di AML derivate da diversi sottotipi, quindi, sono sembrate un sistema idoneo al nostro studio, focalizzato sulla regolazione dell'espressione di uPAR mediata da miRNA. Abbiamo selezionato tre miRNA, *miR-146a*, *miR-335* e *miR-622*, predetti *in silico* per uPAR e/o descritti in letteratura come modulatori di espressione di uPAR, con attività di oncosoppressori, ed espressi in HSC o in AML. I miRNA selezionati erano in grado di regolare l'espressione di uPAR e di bersagliare direttamente la 3'UTR di uPAR. Abbiamo quindi evidenziato una correlazione inversa fra l'espressione dei miRNA selezionati e l'uPAR nelle varie linee di AML, dimostrando che tali miRNA sono coinvolti nella regolazione di espressione di uPAR nelle cellule di AML in quanto la loro inibizione specifica determina aumento dell'espressione del recettore. I tre miRNA selezionati, iperespressi nella linea promonocitica THP-1, riducono significativamente la migrazione direzionale di tali cellule, la loro capacità di invadere la matrice extracellulare e la loro proliferazione. Abbiamo infine dimostrato che due dei tre miRNA selezionati, *miR-146a* e *miR-335*, sono espressi anche in blasti di pazienti affetti da AML in quantità inverse rispetto all'espressione di uPAR, risultato che suggerisce che possono regolare l'espressione di uPAR anche *in vivo*.

L'uPAR, fortemente coinvolto in molte tappe della progressione tumorale, è stato ed è attualmente oggetto di numerosi studi focalizzati prevalentemente sulla sua struttura e sulle sue molteplici attività. La regolazione della sua espressione, che aumenta nelle cellule tumorali, è stata studiata sia a livello trascrizionale che post-trascrizionale, tuttavia in letteratura non erano stati ancora descritti miRNA in grado di bersagliare direttamente il suo mRNA. I nostri risultati identificano tre miRNA in grado di farlo e, tra questi, di particolare interesse il *miR-146a*, fortemente coinvolto in sindromi mielodisplastiche e presumibilmente attivo nella regolazione dell'uPAR nelle AML.

CAPITOLO IV

ATTIVITA' DI COMPETING ENDOGENOUS RNA (ceRNA) DELL'UPAR NELLE AML

4.1 INTRODUZIONE

Diversi studi hanno dimostrato che alcuni RNA, codificanti o meno, possono agire da spugne molecolari per miRNA endogeni, agendo da "competing endogenous RNAs" (ceRNA) (Tay *et al.*, 2011). Numerose evidenze sperimentali indicano che esistono diverse tipologie di RNA non codificanti che sembra possano avere un'attività di ceRNA, tra i quali, pseudogeni, long non coding RNA (lnc-RNA) e circular RNA (Tay *et al.*, 2014).

L'mRNA di *PTENP1*, pseudogene di *PTEN*, noto oncosoppressore, è stato uno dei primi ceRNA descritti; esso, infatti, è in grado di legare e, quindi, sequestrare i miRNA che bersagliano l'mRNA di *PTEN*, permettendo la sua traduzione, regolando così positivamente i livelli di espressione di *PTEN* (Fig. 4.1) (Poliseno *et al.*, 2010).

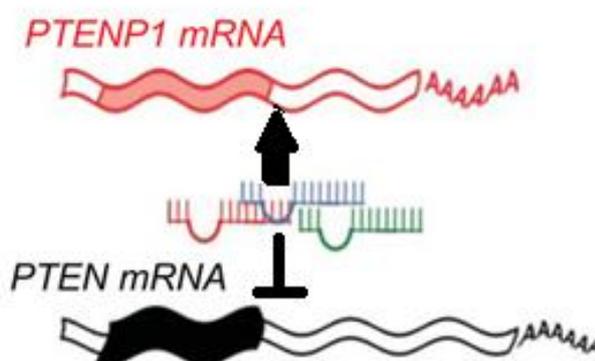


Figura 4.1 Funzione di spugna molecolare di *PTENP1*. *PTENP1*, pseudogene di *PTEN*, lega i miRNA che bersagliano *PTEN*, permettendone la traduzione.

Successivamente è stata dimostrata l'attività di ceRNA anche di altri pseudogeni, fra questi di notevole importanza è *K-RAS1P*, pseudogene di *K-RAS*. L'iperespressione di *K-RAS1P*, che sequestra i miRNA che bersagliano *K-RAS*, determina un aumento dell'espressione di *K-RAS*, noto oncogene, e aumenta notevolmente la capacità proliferativa del tumore (Tay *et al.*, 2014). Questo meccanismo può avere particolare rilevanza nel cancro della prostata e nel carcinoma mammario, nei quali è stata riscontrata un'alterata espressione di tale pseudogene (Kalyana-Sundaram *et al.*, 2012). Un altro studio ha recentemente

evidenziato l'attività di ceRNA dell'mRNA per la proteina "High-mobility group AT-hook 2 (*Hmga2*) nel tumore polmonare (Tay *et al.*, 2014). *Hmga2* è espresso ad elevati livelli nell'adenocarcinoma polmonare metastatico e nella sua 3'UTR sono presenti sette siti conservati di binding per i miRNA della famiglia *let-7*, noti oncosoppressori. Esperimenti condotti sia *in vitro* che *in vivo* hanno dimostrato che l'interazione della 3'UTR di *Hmga2* con i miRNA della famiglia *let-7* ha un importante effetto oncogenico, indipendente dall'effetto sulla progressione tumorale della proteina *Hmga2* (Kumar *et al.*, 2014). Tale interazione consente, infatti, l'espressione di altri bersagli oncogeni dei *miR-let7*, in particolare il transforming growth factor beta (TGF- β) receptor3 (R3), regolando positivamente l'asse TGF- β R3-TGF- β , responsabile dell'espressione di varie altre proteine pro-tumorali (es. *Angptl2*, *Fndc3*, *Hmga1*, *Skil*) (Fig. 4.2) (Tay *et al.*, 2014).

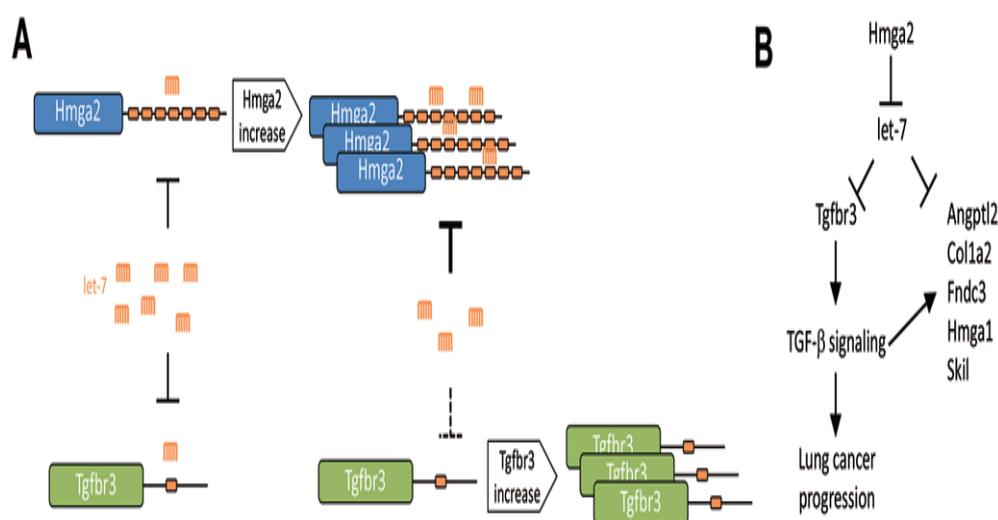


Figura 4.2 Ruolo di ceRNA di *Hmga2*. *Hmga2* è bersaglio di miRNA appartenenti alla famiglia *let-7*, miRNA che bersagliano anche il TGF- β R3. L'aumentata trascrizione di *Hmga2* determina un aumento dei livelli di TGF- β R3 e, indirettamente, di altri bersagli.

Più recentemente, in uno studio di Karreth *et al.*, è stata studiata la funzione di ceRNA dello pseudogene di BRAF, probabilmente legata sia alla regione codificante che alla 3'UTR, ed è stato dimostrato che la sua iperespressione è in grado di indurre linfoma *in vivo* (Karreth *et al.*, 2015).

Avendo noi dimostrato che la 3'UTR di uPAR è diretto bersaglio dei miRNA selezionati, espressi nelle linee cellulari di AML, abbiamo valutato un'eventuale attività di competing endogenous RNA (ceRNA) della 3'UTR di uPAR. Abbiamo quindi ipotizzato che la 3'UTR di uPAR possa competere con il trascritto intero dell'uPAR stesso o con i trascritti di altri bersagli, per il legame ai miRNA selezionati, consentendo così l'aumento della loro traduzione e, quindi, dei loro livelli.

4.2 RISULTATI

4.2.1 L'IPERESPRESSIONE DELLA 3'UTR DI uPAR AUMENTA L'ESPRESSIONE DI uPAR

Abbiamo ipotizzato che la 3'UTR di uPAR possa agire da spugna per miRNA endogenamente espressi che bersagliano uPAR, sequestrandoli e liberando il trascritto intero che può essere tradotto in proteina. La 3'UTR di uPAR, clonata nel vettore PGL, è stata trasfettata in cellule KG1, che esprimono elevati livelli endogeni dei miRNA selezionati e bassi livelli di uPAR; le cellule sono state poi lisate e l'espressione di uPAR è stata analizzata mediante Western Blot con anticorpo specifico, evidenziando che nelle cellule in cui è stata iperespressa la 3'UTR di uPAR vi è un aumento dell'espressione di uPAR stesso rispetto alle cellule trasfettate con il vettore vuoto (Fig. 4.3).

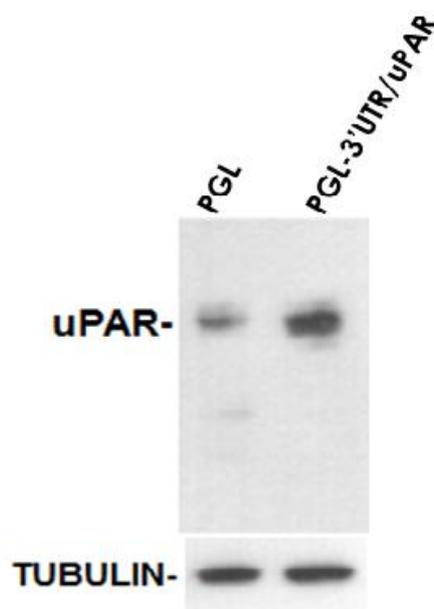


Figura 4.3 L'iperespressione della 3'UTR di uPAR aumenta l'espressione di uPAR. Cellule KG1 sono state transientemente trasfettate con il costrutto PGL-3'UTR/uPAR. Dopo 24 ore dalla trasfezione le cellule sono state lisate e i lisati analizzati mediante Western Blot con anticorpo specifico anti-uPAR. Il filtro è stato poi reibridato con anticorpo anti-tubulina come controllo di caricamento.

Abbiamo poi verificato se l'aumento dell'espressione di uPAR determinava variazioni della capacità delle cellule KG1 di migrare verso ATF, ligando dell'uPAR privo di attività catalitica. Le cellule KG1 sono state transientemente trasfettate con la 3'UTR di uPAR o con il vettore vuoto. Dopo 24 ore dalla trasfezione, le cellule sono state raccolte e poste a migrare in camere di Boyden verso ATF. I risultati hanno evidenziato un aumento significativo della migrazione verso ATF delle cellule in cui è stata iperespressa la 3'UTR di uPAR rispetto alle cellule trasfettate con il vettore

vuoto (Fig. 4.4 A). Un'aliquota delle cellule trasfettate è stata lisata ed i lisati analizzati mediante Western Blot con anticorpo anti-uPAR per confermare l'aumento dell'espressione di uPAR nelle cellule in cui è stata iperespressa la sua 3'UTR (Fig. 4.4 B).

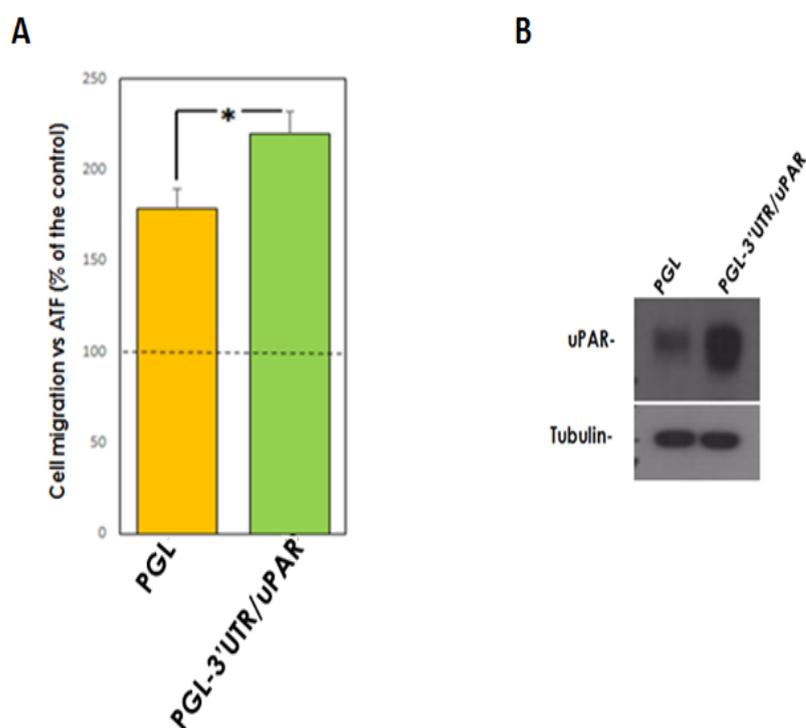


Figura 4.4 La 3'UTR di uPAR aumenta la migrazione cellulare di cellule KG1 verso ATF. Cellule KG1 sono state transientemente trasfettate con costrutto PGL-3'UTR/uPAR. Dopo 24 ore le cellule sono state poste a migrare verso ATF in camere di Boyden. Le cellule migrate sono state poi fissate in etanolo colorate con ematossilina e contate. I risultati sono espressi come percentuale di cellule migrate verso il chemioattrattante rispetto alle cellule migrate in assenza di chemioattrattante. (*): $p \leq 0,05$, determinata con il t-test di Student.

I risultati ottenuti sono coerenti con l'ipotesi che la 3'UTR di uPAR possa competere con l'intero trascritto di uPAR per il legame ai miRNA espressi endogenamente che lo bersagliano, favorendo un aumento dell'espressione di uPAR stesso. L'aumento di espressione di uPAR corrisponde ad un aumento significativo della migrazione cellulare verso il suo ligando specifico.

4.2.2 LA 3'UTR DI uPAR REGOLA L'ESPRESSIONE DEL GENE REPORTER AD ESSA ASSOCIATO IN CELLULE KG1

Abbiamo quindi cercato di dimostrare che il risultato ottenuto nel paragrafo precedente fosse realmente dovuto ad una funzione di spugna molecolare per miRNA endogeni della 3'UTR di uPAR. A tale scopo, sono state utilizzate le stesse cellule KG1 e lo stesso costrutto PGL-3'UTR/uPAR. In tale vettore la 3'UTR di uPAR è stata inserita a valle del codone di stop del gene codificante per la *firefly* luciferasi, la cui espressione verrebbe regolata appunto dalla 3'UTR di uPAR e dai miRNA endogeni che la bersagliano, la cui espressione è stata dimostrata nel capitolo precedente. Le cellule KG1 sono state quindi trasfettate con il costrutto PGL-3'UTR/uPAR e con il plasmide pRLSV40 contenente il gene codificante per la *renilla* luciferasi (utilizzato per normalizzare le differenze di trasfezione). Dopo 24 ore le cellule sono state lisate ed è stata misurata l'attività luciferasica sia *firefly* che *renilla*. Secondo l'ipotesi fatta, se i miRNA endogeni che bersagliano l'uPAR effettivamente legano la 3'UTR di uPAR, si avrà una riduzione dell'espressione della *firefly* luciferasi, rispetto alle cellule trasfettate con il vettore vuoto; in parallelo, gli stessi miRNA dovrebbero lasciare libero il trascritto intero di uPAR che potrà essere tradotto. L'analisi al luminometro ha evidenziato una significativa riduzione dell'attività della *firefly*-luciferasi, normalizzata sull'attività della *renilla*-luciferasi, nelle cellule in cui è stata iperespressa la 3'UTR di uPAR rispetto alle cellule trasfettate con il vettore vuoto (Fig. 4.5 A), indicando che la 3'UTR ha realmente legato i miRNA. L'analisi per Western Blot con anticorpo anti-uPAR degli stessi lisati ha evidenziato che, parallelamente alla riduzione dell'attività luciferasica, nelle cellule in cui era stata iperespressa la 3'UTR di uPAR si osservava un aumento dell'espressione di uPAR rispetto al controllo (Fig. 4.5 B).

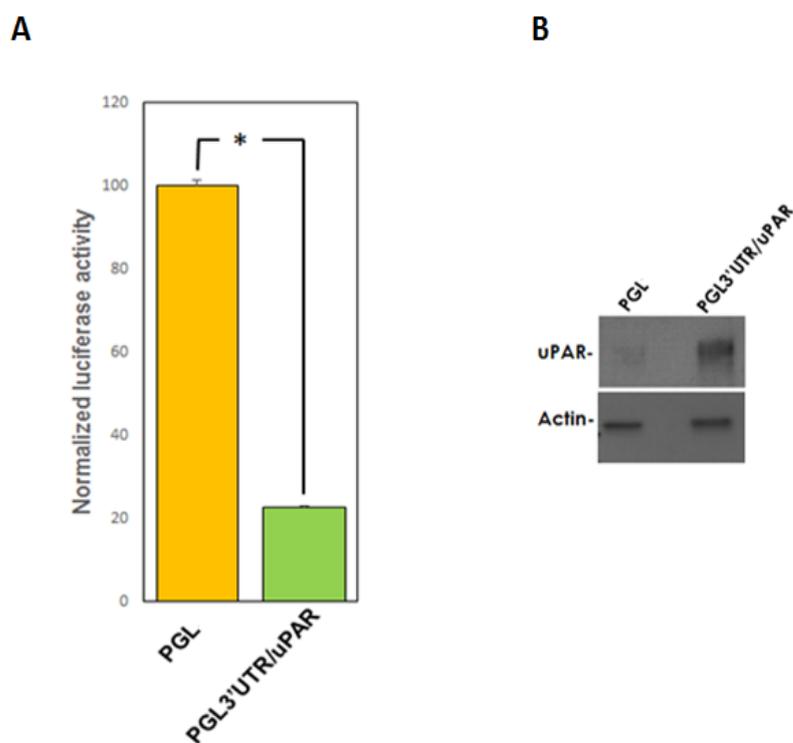


Figura 4.5 La 3'UTR di uPAR regola l'attività del gene reporter ad essa associato. Il costrutto PGL-3'UTR/uPAR è stato co-trasfettato in cellule KG1 con il vettore PRLSV40. Dopo 24 ore dalla trasfezione, è stata misurata l'attività luciferasica *firefly* normalizzata sull'attività luciferasica *renilla*. I valori mostrati rappresentano il rapporto tra i valori ottenuti nelle cellule trasfettate con la 3'UTR di uPAR e i valori ottenuti nelle cellule trasfettate con il vettore vuoto di controllo, (*): $p \leq 0,05$, determinata attraverso il t-test di student (A). I lisati cellulari sono stati anche analizzati mediante Western Blot con anticorpo anti-uPAR; il filtro è stato successivamente reibridato con tubulina, come controllo di caricamento (B).

I risultati ottenuti indicano che la 3'UTR dell'uPAR funge da spugna molecolare, probabilmente per i miRNA endogeni precedentemente identificati, regolando l'espressione del gene ad essa associata e, in parallelo, determina l'incremento di espressione di uPAR.

4.2.5 L'EFFETTO DELLA 3'UTR DI uPAR E' INIBITO DAL SUO ANTISENSEN

Allo scopo di dimostrare la specificità dell'effetto della 3'UTR di uPAR, la sequenza antisense (AS) della 3'UTR di uPAR è stata clonata nello stesso vettore, in modo tale che, venendo trascritta nella sequenza complementare alla 3'UTR di uPAR, le si appai, impedendo il suo legame ai miRNA endogeni.

Le cellule KG1 sono state transientemente trasfettate con il vettore contenente la 3'UTR di uPAR o con il vettore vuoto. Dopo 24 ore dalla trasfezione, le cellule sono state nuovamente trasfettate, con il vettore vuoto o con il vettore contenente l'AS della 3'UTR di uPAR. Dopo altre 24 ore, le cellule sono state lisate ed i lisati cellulari sono stati analizzati mediante Western Blot con anticorpo anti-uPAR. Tale analisi ha evidenziato che la 3'UTR di uPAR aumenta l'espressione di uPAR rispetto al controllo; l'AS della 3'UTR di uPAR non sortisce alcun effetto sull'espressione basale dell'uPAR mentre inibisce l'effetto della 3'UTR di uPAR (Fig. 4.6).

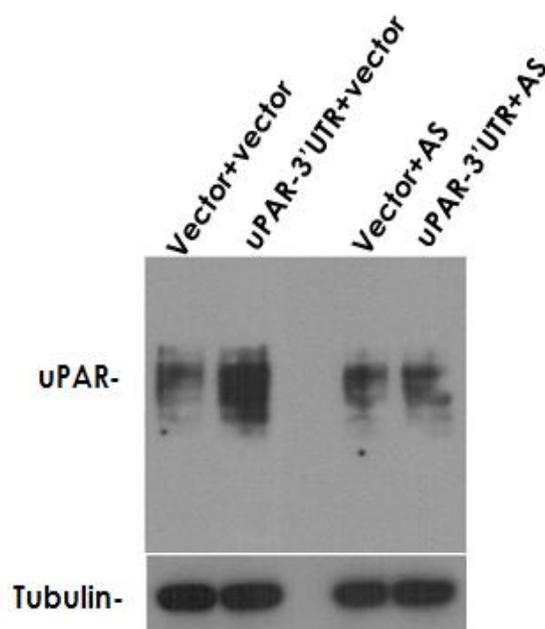


Figura 4.6 La 3'UTR (AS) di uPAR elimina l'aumento dell'espressione di uPAR dipendente dalla 3'UTR. Cellule KG1 sono state transientemente trasfettate con la 3'UTR di uPAR o con un vettore vuoto. Dopo 24 ore dalla trasfezione le cellule sono state ritrasfettate con la 3'UTR (AS) di uPAR o nuovamente con il vettore vuoto. Dopo successive 24 ore, le cellule sono state lisate e i lisati cellulari sono stati analizzati mediante Western Blot con anticorpo anti-uPAR. Successivamente il filtro è stato reibridato con tubulina come controllo di caricamento.

Tale risultato indica la specificità dell'effetto della 3'UTR di uPAR; quando si iperesprime la 3'UTR (AS) di uPAR, infatti, la 3'UTR di uPAR non è più in grado di sequestrare i miRNA e, conseguentemente, non si ha aumento dell'espressione di uPAR.

4.2.6 IDENTIFICAZIONE E CONVALIDA DI ALTRI miRNA SPECIFICI PER uPAR

Nell'intento di identificare nelle cellule KG1 altri miRNA che bersagliano uPAR, è stata effettuata l'analisi per miRNA-seq della linea cellulare KG1, effettuata in collaborazione con il Prof. Weisz (Laboratorio di Medicina Molecolare e Genomica, Unisa). Tale analisi ha evidenziato l'espressione di altri miRNA con descritta potente attività oncosoppressoria, in particolare il *miR-let7d*, i cui livelli di espressione erano simili al *miR-146a*. Abbiamo quindi esaminato la possibilità che *miR-let7d* bersagliasse l'mRNA di uPAR. Il precursore sintetico di *let-7d* è stato trasfettato in cellule HeLa, esprimenti costitutivamente elevati livelli di uPAR. Le cellule sono state poi lisate a 24 e 48 ore dalla trasfezione e i lisati analizzati mediante Western Blot con anticorpo anti-uPAR. I risultati del Western Blot indicano che *miR-let-7d* è in grado di ridurre efficacemente l'espressione di uPAR, in particolare a 48 ore dalla trasfezione (Fig. 4.7).

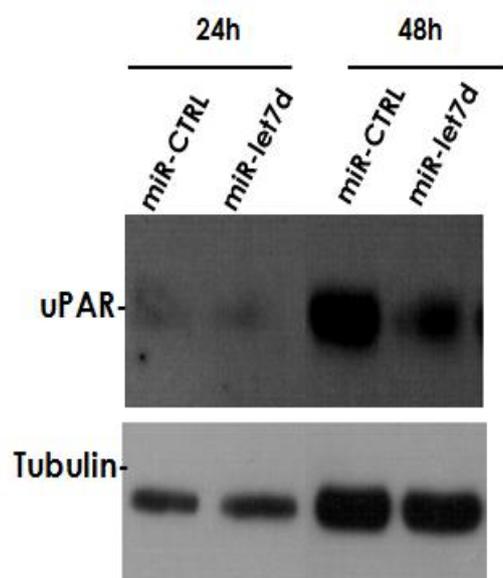


Figura 4.7 *miR-let7d* regola l'espressione di uPAR. Cellule KG1 sono state transientemente trasfettate con il precursore di *miR-let7d* o del *miR-controllo*. Dopo 24 e 48h le cellule sono state lisate e i lisati analizzati mediante Western Blot con anticorpo anti-uPAR. il filtro è stato poi reibridato con tubulina come controllo di caricamento.

Allo scopo di dimostrare che anche questo miRNA regola l'espressione di uPAR bersagliando la sua 3'UTR, il precursore sintetico di *miR-let7d* è stato transientemente co-trasfettato con il costrutto PGL-3'UTR/uPAR e il vettore PRLSV40 (necessario per normalizzare le differenze di trasfezione) in cellule HeLa. Se *miR-let7d* bersaglia direttamente la 3'UTR dell'mRNA di uPAR, si otterrà una riduzione dell'attività luciferasica rispetto alle cellule trasfettate con il miRNA controllo. L'analisi

al luminometro, effettuata 48 ore dopo la trasfezione, ha evidenziato una significativa riduzione dell'attività della *firefly*-luciferasi, normalizzata sull'attività della *renilla*-luciferasi, nelle cellule trasfettate con il miRNA selezionato, rispetto alle cellule trasfettate con il miRNA controllo (Fig. 4.8).

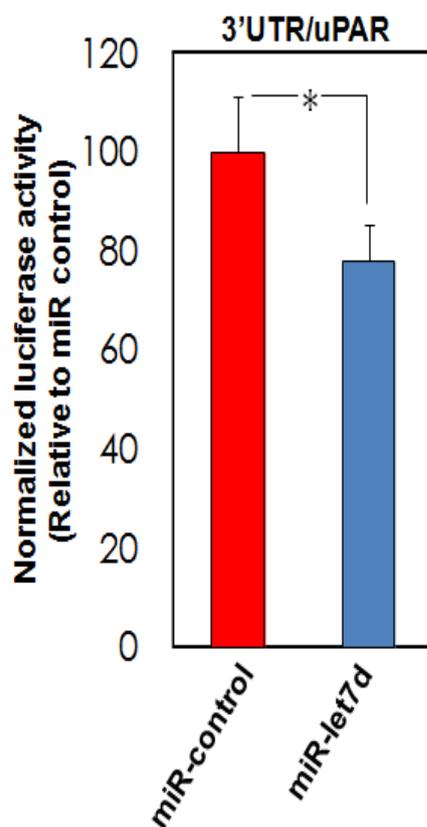


Figura 4.8 La 3'UTR di uPAR è bersaglio diretto di *miR-let7d*. Cellule HeLa sono state co-trasfettate con il costrutto PGL-3'UTR/uPAR e il PRLSV40 (vettore contenente il gene codificante per la *renilla* luciferasi, necessario per normalizzare le differenze di trasfezione) e con il precursore di *miR-let7d*. Dopo 48 ore, è stata misurata l'attività luciferasica *firefly* normalizzata sull'attività luciferasica *renilla*. I valori mostrati rappresentano il rapporto tra i valori ottenuti nelle cellule trasfettate con i miRNA selezionati e i valori ottenuti nelle cellule trasfettate con il miRNA controllo. (*): $p \leq 0,05$, determinata attraverso il t-test di Student.

4.2.4 LA 3'UTR DI uPAR REGOLA L'ESPRESSIONE DI BERSAGLI DEI miRNA SELEZIONATI DIVERSI DA uPAR

I miRNA vengono definiti genomicamente ridondanti e, la ridondanza, è anche una loro caratteristica funzionale. Infatti, uno stesso mRNA può essere bersaglio di più miRNA e ogni miRNA è una molecola multi-target. Un singolo miRNA può ridurre l'espressione di migliaia di trascritti bersagliando la regione 3'UTR (Di Leva *et al.*, 2014). Se la 3'UTR di uPAR recluta dei miRNA endogeni e, tra questi, quelli da noi identificati, oltre a determinare l'incremento dell'uPAR, dovrebbe determinare l'incremento di espressione anche di altri bersagli dei miRNA identificati. Abbiamo quindi cercato in letteratura quali altri bersagli dei miRNA in esame fossero stati identificati, scegliendo di esaminare, tra questi, quelli coinvolti in un fenotipo tumorale.

Il primo bersaglio identificato è stato il recettore della chemioquina SDF1, CXCR4, la cui espressione è già stata dimostrata essere co-regolata, tramite i miRNA descritti, nelle AML (Alfano *et al.*, 2015). Il CXCR4 è bersaglio diretto del *miR-146a*.

Un altro bersaglio interessante ci è sembrato ROCK-1 che è un bersaglio diretto del *miR-335* che, inibendo la sua espressione, inibisce migrazione e invasione cellulare.

Altro bersaglio scelto è stato RAS, appartengono a questa famiglia proteine con funzioni cruciali nella tumorigenesi e nel mantenimento del fenotipo tumorale (Campbell *et al.*, 2007). RAS è bersaglio diretto dei *miR-622* e *miR-let7d*.

L'ultimo bersaglio preso in considerazione è stato MYC, fattore trascrizionale importante nella proliferazione e nella progressione tumorale, bersaglio diretto del *miR-let7d*.

Le cellule KG1, sono state quindi trasfettate con la 3'UTR/uPAR o con il vettore vuoto e i lisati cellulari sono stati analizzati mediante Western Blot con gli anticorpi specifici per i bersagli selezionati. I risultati hanno evidenziato aumento dell'espressione di tali bersagli nelle cellule in cui è stata iperespressa la 3'UTR di uPAR (Fig. 4.9).

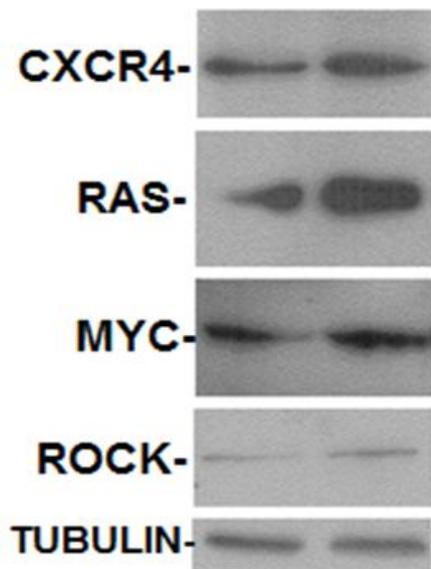


Figura 4.9 La 3'UTR di uPAR regola l'espressione di bersagli dei miRNA selezionati diversi da uPAR. Cellule KG1, esprimenti elevati livelli endogeni dei miRNA selezionati, sono state transientemente trasfettate con la 3'UTR di uPAR. Dopo 24 ore le cellule sono state lisate e i lisati analizzati per Western Blot con anticorpi specifici. Il filtro è stato poi reibridato con tubulina per il controllo di caricamento.

Tali risultati supportano la possibile attività di ceRNA della 3'UTR di uPAR che, come ipotizzato, potrebbe fungere da spugna per i miRNA oncosoppressori selezionati, consentendo l'espressione anche di altri importanti bersagli pro-tumorali.

4.3 DISCUSSIONE

Diversi studi hanno dimostrato l'esistenza di RNA, codificanti o meno, che possono sequestrare miRNA endogeni, agendo da competing endogenous RNA (ceRNA). Trascritti di pseudogeni sono stati tra i primi ceRNA descritti; essi, infatti, presentano siti di legame ai miRNA uguali ai trascritti dei loro geni ancestrali, quindi possono competere con essi per i miRNA endogeni, permettendo la loro traduzione (Tay *et al.*, 2014). Abbiamo quindi ipotizzato che anche la 3'UTR di uPAR, essendo bersaglio diretto di miRNA, come dimostrato nel capitolo precedente, potesse avere tale funzione. In un lavoro di Sayers *et al.*, mediante "rapid amplification of cDNA ends" (RACE), in cellule di cancro polmonare e leucociti circolanti, sono state identificate numerose varianti di splicing del trascritto di uPAR, alcune tradotte altre invece non tradotte. Alcuni di questi trascritti alternativi presentano la regione 3'UTR e potrebbero, quindi, funzionare da ceRNA (Stewart e Sayers, 2009).

Al fine di dimostrare un'eventuale funzione di ceRNA della 3'UTR di uPAR in linee cellulari di AML, abbiamo iperespresso la 3'UTR di uPAR nella linea cellulare che presenta maggiori livelli endogeni dei miRNA selezionati, evidenziando un aumento dell'espressione di uPAR e la parallela riduzione del gene reporter regolato dalla 3'UTR stessa. Tale risultato dimostra che la 3'UTR di uPAR recluta fattori, presumibilmente miRNA endogeni, che inibiscono l'espressione dell'uPAR stesso, permettendo la traduzione del trascritto intero. L'aumento dell'espressione di uPAR ha come conseguenza funzionale l'aumento significativo della migrazione cellulare verso il suo ligando. L'effetto della 3'UTR di uPAR risulta specifico in quanto viene inibito dall'espressione di una 3'UTR antisense di uPAR.

Abbiamo poi identificato in cellule KG1 un altro miRNA in grado di bersagliare l'mRNA di uPAR, il *miR-let7d*, che presenta livelli di espressione paragonabili a quelli di *miR-146a*, che potrebbe essere quindi sequestrato dalla 3'UTR del recettore come gli altri miRNA precedentemente identificati.

In base ai dati presenti in letteratura, infine, abbiamo selezionato alcuni bersagli di particolare interesse dei miRNA selezionati, nell'intento di dimostrare che l'iperespressione della 3'UTR di uPAR aumenta anche i loro livelli. Il primo bersaglio considerato è stato il recettore della chemiochina SDF-1, CXCR4, coinvolto in crescita tumorale, angiogenesi e metastasi (Sand *et al.*, 2015), la cui espressione è aumentata in molti tumori. CXCR4 è bersaglio diretto del miRNA oncosoppressore *miR-146a* (Labbaye *et al.*, 2008).

Altro bersaglio interessante è stato ROCK-1, serina-treonina chinasi, attiva quando legata dalla piccola GTPasi RhoA. ROCK-1 è coinvolto nella formazione di metastasi e nell'angiogenesi in quanto ha un ruolo nella regolazione della contrattilità cellulare, cruciale nei cambiamenti di forma delle cellule durante la migrazione e l'invasione (Rath e Olson, 2012). ROCK-1 è bersaglio diretto del *miR-335* che, inibendo la sua espressione, inibisce migrazione e invasione di cellule di osteosarcoma (Wang *et al.*, 2013). *miR-335* bersaglia ROCK-1 anche in cellule di carcinoma epatocellulare, inibendo proliferazione, migrazione ed invasione cellulare (Liu *et al.*, 2015).

Altro bersaglio scelto è stato RAS; appartengono a questa famiglia varie proteine con funzioni rilevanti nella formazione del tumore e nel mantenimento del fenotipo tumorale (Campbell *et al.*, 2007). *miR-622* inibisce K-RAS e tutta la via di segnalazione ad esso associata in cellule di tumore polmonare (Han *et al.*, 2012).

Inoltre, *miR-622*, bersagliando K-RAS, inibisce proliferazione e migrazione di cellule di cancro del colon-retto (Fang *et al.*, 2015). È stato dimostrato, inoltre, che K-RAS è anche bersaglio di *miR-let7d*; è stata infatti dimostrata l'influenza di *miR-let7d* sulla proliferazione di cellule muscolari lisce vascolari, mediante regolazione dell'espressione di K-RAS (Yu *et al.*, 2011).

L'ultimo bersaglio considerato è MYC, fattore trascrizionale con un ruolo cruciale nella progressione del ciclo cellulare, quindi nella proliferazione e nella progressione tumorale; nelle cellule tumorali sono state osservate con elevata frequenza forme mutate di MYC che determinano proliferazione incontrollata. MYC è bersaglio di *miR-let7d* (Kolenda *et al.*, 2014).

I risultati dimostrano che l'iperespressione della 3'UTR di uPAR incrementa i livelli di tutti i bersagli considerati, supportando fortemente l'ipotesi che la 3'UTR di uPAR agisca da spugna molecolare, sequestrando i miRNA che regolano l'espressione di tali bersagli.

Nel loro insieme i risultati mostrati dimostrano che la 3'UTR di uPAR, il cui incremento *in vivo* potrebbe essere legato all'espressione di varianti, anche non tradotte, del trascritto di uPAR, è in grado di sequestrare i fattori che inibiscono l'espressione di vari bersagli, permettendo la loro traduzione. Nel caso descritto, se tali bersagli sono oncògeni, l'attività di ceRNA dell'uPAR risulterebbe fortemente coinvolta nell'espressione del fenotipo tumorale, suggerendo quindi importanti implicazioni terapeutiche.

CAPITOLO V

CONCLUSIONI

5.1 CONCLUSIONI

In questo progetto di dottorato ci siamo focalizzati sullo studio della regolazione post-trascrizionale dell'uPAR, un componente importante del sistema di attivazione del plasminogeno. L'uPAR è coinvolto nella regolazione di processi legati alla proteolisi extracellulare mediati dal suo ligando urochinasi (uPA), ma anche nella regolazione di processi indipendenti dalla proteolisi extracellulare (Ragno, 2006) quali adesione, migrazione e proliferazione cellulare, mediante interazione con specifici partners di segnale sulla superficie cellulare. L'uPAR è iperespresso e rappresenta un fattore prognostico negativo in vari tipi di tumori; la sua iperespressione può avvenire sia a livello trascrizionale che a livello post-trascrizionale. Sono state individuate da tempo famiglie di proteine in grado di legare mRNA e regolarne l'emivita, le mRNA binding protein (RBP) (Keene, 2010). Le RBP legano, nella regione non tradotta al 3' (3'UTR) di molti trascritti, gli AU-rich elements (ARE). I vari componenti del sistema di attivazione del plasminogeno, compreso l'uPAR, sono regolati da RBP. La 3'UTR, inoltre, è sito di legame anche per i miRNA. I miRNA si appaiano all'mRNA bersaglio inibendone la traduzione. Essi possono agire da oncogeni, determinando il silenziamento genico di oncosoppressori, oppure da oncosoppressori, determinando silenziamento genico di prodotti di oncogeni (Di Leva *et al.*, 2014). Studi recenti hanno indicato la possibilità di una regolazione inversa RNA-miRNA. È stato ipotizzato, infatti, che alcuni trascritti, detti competing endogenous RNA (ceRNA) possano competere per il legame a specifici miRNA; se il trascritto competitore prevale, lascia libero l'altro trascritto bersaglio dei miRNA di essere tradotto in proteina. In particolare questo meccanismo è stato descritto per alcuni pseudogeni (Tay *et al.*, 2014).

La regolazione di uPAR da parte di miRNA è stata molto poco studiata, per cui un primo obiettivo della mia ricerca è stato l'identificazione, convalida e la caratterizzazione di miRNA che avessero come bersaglio l'mRNA di uPAR. Il sistema cellulare prescelto sono state cellule di leucemia mieloide acuta (AML) che esprimono uPAR a diversi livelli a seconda del grado di differenziamento cellulare (Béné *et al.*, 2004). Sono stati selezionati miRNA predetti per uPAR, espressi in AML o HSC, con attività di oncosoppressori, in particolare i *miR-146a*, *miR-335* e *miR-622*. Per dimostrare che i miRNA selezionati fossero realmente in grado di regolare l'espressione di uPAR, sono stati trasfettati in cellule che esprimono costitutivamente elevati livelli di uPAR e, mediante saggi di luciferasi, è stata dimostrata la loro capacità di regolare direttamente l'espressione di uPAR attraverso il legame alla sua 3'UTR. In linee cellulari di AML abbiamo osservato una correlazione inversa fra l'espressione di uPAR e dei miRNA selezionati. Inoltre, in tali cellule, i miRNA selezionati riducono l'espressione di uPAR e specifici inibitori di tali miRNA, invece, l'aumentano, dimostrando che i tre miRNA regolano l'espressione di uPAR in linee cellulari di AML.

Il passo successivo è stato indagare un eventuale ruolo di questi miRNA nella regolazione di processi funzionali importanti per la cellula come migrazione, invasione e proliferazione cellulare. I risultati dei nostri esperimenti hanno evidenziato che i tre miRNA riducono la capacità di cellule di AML di migrare, invadere e proliferare, regolando l'espressione di uPAR ma, probabilmente, anche di altri bersagli coinvolti in tali processi biologici.

Abbiamo successivamente analizzato i livelli di uPAR e dei miRNA selezionati in blasti ottenuti da dieci pazienti affetti da AML e nelle HSC CD34⁺ di tre donatori sani, evidenziando una relazione inversa tra l'espressione di uPAR e dei *miR-146a* e *miR-335*. Quindi, tali miRNA potrebbero effettivamente contribuire alla regolazione di uPAR anche *in vivo*.

Il secondo obiettivo è stato valutare un'eventuale attività di competing endogenous RNA (ceRNA) dell'mRNA di uPAR. Abbiamo, infatti, ipotizzato che la 3'UTR di uPAR potesse competere con l'intero trascritto di uPAR per il legame di miRNA specifici per uPAR, lasciandolo libero di essere tradotto in proteina.

La 3'UTR di uPAR è stata quindi trasfettata in cellule che esprimono elevati livelli endogeni dei miRNA selezionati, dimostrando la sua capacità di aumentare l'espressione di uPAR e incrementare la migrazione direzionale uPAR-dipendente di cellule KG1. L'analisi al luminometro, inoltre, ha evidenziato che, in parallelo, la 3'UTR di uPAR aveva presumibilmente sequestrato i miRNA endogeni specifici per uPAR, regolando negativamente l'espressione del gene reporter codificante per la *firefly* luciferasi. La specificità della 3'UTR di uPAR è stata dimostrata usando una 3'UTR antisenso di uPAR, che, appaiandosi alla 3'UTR senso, inibisce il legame dei miRNA endogeni, annullando il suo effetto sull'espressione di uPAR.

Poiché i miRNA sono molecole multi-target, possono regolare l'espressione di vari bersagli, per cui abbiamo ipotizzato che la 3'UTR di uPAR, agendo da spugna per miRNA endogeni in cellule KG1 (inclusi quelli da noi selezionati), potesse regolare l'espressione di altri bersagli dei miRNA studiati, in particolare di bersagli importanti nella progressione e nel mantenimento del fenotipo tumorale. I risultati ottenuti hanno dimostrato che effettivamente la 3'UTR di uPAR aumenta l'espressione di molecole pro-tumorali come CXCR4, ROCK-1, MYC e RAS.

In conclusione abbiamo identificato miRNA che regolano in modo diretto l'espressione di uPAR in cellule di AML. Tali miRNA e probabilmente altri miRNA espressi in AML e non ancora identificati, possono essere sequestrati dalla 3'UTR di uPAR, che agirebbe così da spugna molecolare, lasciando che i loro bersagli, che includono l'uPAR e che favoriscono il fenotipo tumorale, siano liberi per la traduzione in proteina. Tali risultati potrebbero avere grande rilievo e importanti implicazioni anche in ambito clinico.

CAPITOLO VI

MATERIALI E METODI

6.1 MATERIALI

6.1.1 REAGENTI

L'anticorpo monoclonale anti-uPAR R2 è stato gentilmente fornito dalla Dott.ssa G. Hoyer-Hansen (Finsen Institute, Copenhagen, Denmark). L'anticorpo policlonale anti-CXCR4 è stato acquistato dall'Upstate (Temecula, CA, USA). L'anticorpo anti-actina di coniglio e l'anticorpo anti-tubulina di topo, il cocktail di inibitori di proteasi e il collagene IV sono prodotti dalla Sigma-Aldrich (St.louis, MO, USA). I reagenti di trasfezione Oligofectamina e Lipofectamina 2000 sono stati acquistati dall'Invitrogen (Paisley, UK). Il Nucleofector kit è stato fornito dalla Lonza (Basel, Switzerland). I vettori PGL3 e PRLSV40 e il Dual-luciferase reporter assay system sono prodotti dalla Promega (Madison, WI, USA). I Pre-miRs sono Ambion (Austin, Texas). Gli LNA-ONs sono prodotti da Exiqon (Vedbaek, Denmark). Gli anticorpi secondari e l'IQTMSYBR Green Supermix sono stati forniti dalla Bio-Rad (Hercules, CA, California). L'ECL (Enhanced ChemiLuminescence) detection Kit e i filtri PVDF per Western Blot sono stati acquistati dalla Millipore (Windsor, MA, USA). I filtri per chemiotassi polyvinylpyrrolidone-free (PVPF) sono prodotti dalla Whatman Int. (Kent, UK). QuantiTect Reverse Transcription kit, mini e midi-Prep kit sono stati acquistati dalla Quiagen (Hilden, Germany). *MIRNA* assay kit e il Quiazol sono stati forniti dalla Life Technologies (Carlsbad, CA, USA). L'anticorpo monoclonale anti-MYC è prodotto dalla Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, Texas, USA); L'anti-Pan-RAS è della ditta CALBIOCHEM (Billerica, MA, USA); l'anti-ROCK1 della Cell Signalling Technology, Inc. (Danvers, MA, USA).

6.2 METODI

6.2.1 COLTURE CELLULARI

Cellule KG1 (mielomonocitiche), THP-1 e U937 (promonocitiche) sono state coltivate in RPMI 1640 con il 10% di FBS inattivato 30 minuti a 56°C. Le cellule HeLa (carcinoma della cervice uterina) sono state cresciute in DMEM con il 10% di FBS.

6.2.1 RACCOLTA CAMPIONI DA PAZIENTI

I campioni sono stati forniti, nell'ambito di una collaborazione scientifica, dal Prof. Selleri, del reparto di ematologia dell'AOU San Giovanni di Dio e Ruggi D'Aragona, Università di Salerno. I campioni di midollo osseo sono stati ottenuti, in seguito a consenso informato, durante le procedure diagnostiche, da 10 pazienti affetti da AML (classificazione FAB: 1M1, 3M2, 1M3, 4M4, 1M5). Nessuno di questi pazienti era stato precedentemente trattato con farmaci anti-cancro o aveva una precedente diagnosi di sindrome mielodisplastica.

Le cellule mononucleate sono state isolate in gradiente di densità usando Lymphoprep. I blasti sono stati isolati usando anticorpi specifici e biglie magnetiche, in modo da evitare contaminazione da cellule T, ottenendo come risultato finale una purezza dei blasti ≥ 95 . Le cellule sono state poi lisate in Quiazol per l'estrazione dell'RNA totale.

6.2.3 WESTERN BLOT

Le cellule sono state lisate in 1% Triton X-100, in presenza di inibitori di proteasi. Il contenuto proteico dei lisati è stato quantizzato attraverso uno specifico saggio colorimetrico (Bio-Rad). Le proteine sono state separate su gel al 10% di poliacrilammide in SDS e trasferite su filtro di PVDF. I siti di legame aspecifici del filtro sono stati bloccati mediante una soluzione contenente il 5% di latte magro in PBS. Il filtro è stato ibridato con l'anticorpo primario specifico e incubato successivamente con l'anticorpo secondario coniugato alla perossidasi di rafano. Le bande proteiche sono state poi visualizzate mediante ECL.

6.2.4 REAL-TIME RT-PCR

Le cellule sono state lisate in Quiazol per l'estrazione dell'RNA totale, seguendo le indicazioni dell'azienda produttrice. Per quantizzare i miRNA è stato usato il TaqMan miRNA Assay (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA), seguendo le istruzioni del Kit. Come controllo interno per normalizzare l'espressione dei miRNA è stato usato RNU6, i miRNA con $C_T > 35$ sono stati considerati come non espressi. Per quantificare l'mRNA di uPAR, 1 μ g di RNA totale è stato retrotrascritto usando il QuantiTec Reverse Transcription Kit; 1 μ l di una diluizione 1:10 del prodotto di retrotrascrizione è stato analizzato per Real Time PCR con il termociclatore Biorad IQ5, usando l'IQTMSYBR Green Supermix. I livelli specifici di espressione dell'mRNA di uPAR sono stati normalizzati sull'mRNA del gene housekeeping GAPDH. I primers utilizzati per amplificare l'uPAR sono stati progettati usando il software Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) e usati in concentrazione di 0,25 μ M; per l'amplificazione di uPAR il forward primer era 5'-CTGGAGCTGGTGGAGAAAAG-3' e il reverse primer 5'-CATGTCTGATGAGCCACAGG-3'; per l'amplificazione di GAPDH il forward primer era 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3' e il reverse primer 5'-GAAGATGGTGGATGGATTTC-3'. I livelli di espressione sono stati calcolati con la formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

6.3.5 COSTRUZIONE PLASMIDI REPORTER

Il frammento di 319 bp che rappresenta la 3'UTR di uPAR (<http://genome.ucsc.edu/>) è stato amplificato da DNA genomico utilizzando il primer senso 5'-GCTCTAGAACCYGAAATCCCCCTCTCTGCC-3' e antisenso 5'-GCTCTAGACCACTGGTACAAAATCTTTATGTAAG-3', adattati al sito di restrizione XbaI, usando le metodiche standard e la proofreading polimerasi (Platinum *Pfu*, Invitrogen). La 3'UTR di uPAR così ottenuta e amplificata è stata inserita nel vettore PGL, a livello del sito di restrizione XbaI, posto immediatamente a valle del codone di stop del gene reporter *firefly*-luciferasi, ottenendo così il costrutto PGL-3'UTR/uPAR; il costrutto è stato controllato per sequenziamento.

6.2.6 SAGGIO DI LUCIFERASI

Le cellule HeLa sono state poste in piastre da 24 pozzetti (7×10^4 /pozzetto). Dopo 24 ore le cellule sono state trasfettate, usando la Lipofectamina 2000, con 150 ng di PGL-3'UTR/uPAR, 5 ng di PRLSV40, plasmide contenente il gene codificante per *renilla* luciferasi (per la normalizzazione) e con 5 pmol dei precursori dei miRNA o di un miRNA controllo. Le cellule KG1 sono state poste in piastre da 24 pozzetti (8×10^5 /pozzetto) e, usando la Lipofectamina 2000, sono state trasfettate con 1 μ g di PGL-3'UTRuPAR, 35 ng di PRLSV40 per la normalizzazione e con 5 pmol di precursori dei miRNA.

Dopo 24 ore, le cellule sono state lisate e l'attività luciferasica è stata analizzata al luminometro usando il dual-luciferase reporter assay system. In breve, le cellule sono state lisate nella soluzione di lisi fornita e 20 μ l di lisato sono stati mescolati con 100 μ l di soluzione contenente il substrato. L'attività della *firefly* luciferasi è stata misurata al luminometro e successivamente bloccata per la misura dell'attività della *renilla* luciferasi.

6.2.7 TRASFEZIONI

Trasfezione con miRNA: 2×10^5 cellule HeLa o 8×10^5 cellule THP-1 sono state poste in piastre da 35 mm e sono state trasfettate con i precursori dei miRNA o del miRNA controllo (40 μ M) in presenza di siero e senza antibiotici, usando 4 μ l oligofectamina come reagente di trasfezione. Ai tempi indicati le cellule sono state lisate ed analizzate per Western Blot.

Trasfezione con LNA-ONs: 2×10^6 cellule KG1 sono state trasfettate con 200 nm LNA-ONs, usando l'Amaxa cell line nucleofector kit, seguendo le istruzioni fornite dalla ditta. Dopo 24 ore dalla trasfezione le cellule sono state lisate ed analizzate per Western Blot.

Trasfezione con DNA: 8×10^5 cellule KG1 sono state poste in piastre da 24 pozzetti in presenza di siero e trasfettate con i vettori PGL oppure PGL3'UTR/uPAR usando 2 μ l di Lipofectamina 2000. Ai tempi indicati, le cellule sono state lisate ed analizzate per Western Blot.

6.2.8 SAGGI DI MIGRAZIONE CELLULARE E INVASIONE

I saggi di migrazione cellulare sono stati effettuati in camere di Boyden, usando filtri di policarbonato PVPF con pori del diametro di 5 μ m. 2×10^5 cellule sono state caricate nella camera superiore, in mezzo di coltura senza siero. Nella camera inferiore, invece, sono stati aggiunti 5nM ATF o 10% siero, come chemioattrattanti. Le cellule sono state poste a migrare a 37°C, 5% CO₂ per 2 ore. Le cellule migrate sono state poi fissate in etanolo al 70%, 90% e 100%, colorate 15 minuti in ematossilina e contate (ingrandimento 20X, 10 campi per filtro).

Nel caso dei saggi di invasione, sono stati utilizzati filtri con pori da 8 μ m ricoperti con 25 μ g di Matrigel (BD, Bedford, MA, USA). Le cellule sono state poste ad invadere per 18 ore a 37°C e 5% CO₂.

6.2.9 SAGGIO DI PROLIFERAZIONE CELLULARE

Le cellule sono state trasfettate con i precursori dei miRNA selezionati o di un miRNA controllo; a 0, 24 e 48 ore dalla trasfezione, le cellule, diluite in 300 μ l e distribuite in tre pozzetti di una piastra da 96, sono state incubate per 1 ora a 37°C e 5% CO₂ e poi sono stati aggiunti, a ciascun pozzetto, 20 μ l di CellTiter 96 AQueous

One Solution Reagent. Le cellule sono state quindi incubate per 4 ore a 37°C e 5%CO₂ e successivamente è stata determinata l'assorbanza attraverso un lettore ELISA (Bio-Rad) ad una lunghezza d'onda di 490nm.

6.2.10 ANALISI STATISTICA

Le differenze fra gruppi sono state analizzate con il t-test di Student usando il software PRISM (GraphPad, San Diego, CA). Un valore di $p \leq 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo.

BIBLIOGRAFIA

Alfano, D., Gorrasi, A., Li Santi, A., Ricci, P., Montuori, N., Selleri, C., Ragno, P. (2015). Urokinase receptor and CXCR4 are regulated by common miRNA in leukaemia cells. *J Cell Mol Med.*, **19**(9):2262-72.

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

Alfano, D., Ragno, P., Stoppelli, M., Ridley, A. (2012). RhoB regulates uPAR signalling . *J Cell Sci.*, **125**(Pt 10):2369-80 .

Ambros, V., Lee, R., Lavanway, A., Williams, P., Jewell, D. (2003). miRNA and other tiny endogenous RNAs in *C. elegans*. *Curr Biol.*, **13**(10):807-18.

Baranwal, S., Alahari, S. (2009). miRNA control of tumor cell invasion and metastasis. *Int J Cancer.*, **126**(6):1283-90.

Bartel, D. (2004). MiRNA: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.*, **116**(2):281-97.

Behrendt, N., Rønne, E., Danø, K. (1995). The structure and function of the urokinase receptor, a membrane protein governing plasminogen activation on the cell surface. *Biol Chem Hoppe Seyler*, **376**(5):269-79.

Béné, M., Castoldi, G., Knapp, W., Rigolin, G., Escribano, L., Lemez, P., Ludwig, W., Matutes, E., Orfao, A., Lanza, F., Van't Veer, M. (2004). CD87 (urokinase-type plasminogen activator receptor), function and pathology in hematological disorders: a review. *Leukemia*, **18**(3):394-400.

Besta, F., Müller, I., M. Lorenz, M., Massberg, S., Bültmann, A., Cabeza, N., (2004). Reduced beta3-endonexin levels are associated with enhanced urokinase-type plasminogen activator receptor expression in ApoE-/- mice. *Thromb Res.*, **114**(4):283-92.

Blasi, F., Carmeliet, P. (2001). uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, **3**(12):932-43.

Blasi, F., Sidenius, N. (2009). The urokinase receptor: focused cell surface proteolysis, cell adhesion and signaling. *FEBS Lett.*, **584**(9):1923-30.

Børglum, A., Byskov, A., Ragno, P., Roldan, A., Tripputi, P., Cassani, G., Danø, K. Blasi, F., Bolund, L., Kruse, T. (1992). Assignment of the urokinase-type plasminogen activator receptor gene (PLAUR) to chromosome 19q13.1-q13.2. *Am J Hum Genet.*, **50**(3):492-7.

Calin, G., Dumitru, C., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., Rassenti, L., Kipps, T., Negrini, M., Bullrich, F., Croce, C. (2002). Frequent deletions and down-regulation of microRNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**(24):15524-9.

Campbell, P., Groehler, A., Lee, K., Ouellette, M., Khazak, V., Der, C. (2007). K-Ras promotes growth transformation and invasion of immortalized human pancreatic cells by Raf and phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *Cancer Res.*, **67**(5):2098-106.

Carriero, M., Stoppelli, M. (2011). The urokinase-type plasminogen activator and the generation of inhibitors of urokinase activity and signaling. *Curr Pharm Des.*, **17**(19):1944-61.

Casey, J., Petranka, J., Kottra, J., Fleenor, D., Rosse, W. (1994). The structure of the urokinase-type plasminogen activator receptor gene. *Blood*, **84**(4):1151-6.

Cimmino, A., Calin, G., Fabbri, M., Iorio, M., Ferracin, M., Shimizu, M., Wojcik, S., Aqeilan, R., Zupo, S., Dono, M., Rassenti, L., Alder, H., Volinia, S., Liu, C., Kipps, T., Negrini, M., Croce, C. (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **102**(39):13944-9.

Di Leva, G., Garofalo, M., Croce, C. (2014). MiRNA in cancer. *Annu Rev Pathol.*, **9**:287-314.

Esquela-Kerscher, A., Slack, F. (2006). Oncomirs - miRNA with a role in cancer. *Nat Rev Cancer.*, **6**(4):259-69.

Fang, Y., Sun, B., Li, Z., Chen, Z., Xiang, J. (2015). MiR-622 inhibited colorectal cancer occurrence and metastasis by suppressing K-Ras. *Mol Carcinog.*, [Epub ahead of print].

Fibbi, G., Ziche, M., Morbidelli, L., Magnelli, L., Del Rosso, M. (1988). Interaction of urokinase with specific receptors stimulates mobilization of bovine adrenal capillary endothelial cells. *Exp Cell Res.*, **179**(2):385-95.

Furusato, B., Mohamed, A., Uhlén, M., Rhim, J. (2010). CXCR4 and cancer. *Pathol Int.*, **60**(7):497-505.

Gorrasi, A., Li Santi, A., Amodio, G., Alfano, D., Remondelli, P., Montuori, N., Ragno, P. (2014). The urokinase receptor takes control of cell migration by recruiting integrins and FPR1 on the cell surface . PLoS One, **9**(1):e86352.

Han, Z., Yang, Q., Liu, B., Wu, J., Li, Y., Yang, C., Jiang, Y. (2012). MicroRNA-622 functions as a tumor suppressor by targeting K-Ras and enhancing the anticarcinogenic effect of resveratrol. Carcinogenesis, **33**(1):131-9.

Hapke, S., Kessler, H., Arroyo de Prada, N., Benge, A., Schmitt, M., Lengyel, E., Reuning, U. (2001). Integrin alpha(v)beta(3)/vitronectin interaction affects expression of the urokinase system in human ovarian cancer cells. J Biol Chem., **276**(28):26340-8.

Hildenbrand, R., Gandhari, M., Stroebel, P., Marx, A., Allgayer, H., Arens, N. (2008). The urokinase-system-role of cell proliferation and apoptosis. Histol Histopathol., **23**(2):227-36.

Høyer-Hansen, G., Pessara, U., Holm, A., Pass, JU., Weidle, U., Danø, K., Behrendt, N. (1992) Urokinase plasminogen activator cleaves its cell surface receptor releasing the ligand-binding domain. J Biol Chem., **267**(25):18224-9.

Høyer-Hansen, G., Pessara, U., Holm, A., Pass, JU., Danø, K., Behrendt, N. (2001). Urokinase-catalysed cleavage of the urokinase receptor requires an intact glycolipid anchor. Biochem J., **358**(Pt 3):673-9.

Hwang, S., Seol, H., Park, Y., Kim, K., Gorospe, M., Nam, D., Kim, H. (2012). MicroRNA-146a suppresses metastatic activity in brain metastasis. Mol Cells, **34**(3):329-34.

Irigoyen, J., Muñoz-Cánoves, P., Montero, L., Koziczak, M., Nagamine, Y. (1998). The plasminogen activator system: biology and regulation. Cell Mol Life Sci., **56**(1-2):104-32.

Kalyana-Sundaram, S., Kumar-Sinha, C., Shankar, S., Robinson, D., Wu, Y., Cao, X., Asangani, I., Kothari, V., Prensner, J., Lonigro, R., Iyer, M., Barrette, T., Shanmugam, A., Dhanasekaran, S., Palanisamy, N., Chinnaiyan, A. (2012). Expressed pseudogenes in the transcriptional landscape of human cancers. Cell, **149**(7):1622-34.

Karreth, F. R., Ruocco, A., C, N., Chapuy, B., Léopold, V., Sjöberg, M., Verma, KTA., Ala, U., Tay, Y., Wu, D., Seitzer, N., Velasco-Herrera Mdel, C., Bothmer, A., Fung, J., Langellotto, F., Rodig, SJ., Elemento, O., Shipp, MA., Adams, DJ., Charlie, R., Pandolfi, PP. (2015). The BRAF pseudogene

functions as a competitive endogenous RNA and induces lymphoma in vivo. *Cell*, **161**(2):319-32.

Keene, J. (2010). The global dynamics of RNA stability orchestrates responses to cellular activation. *BMC Biol.*, **8**:95.

Khabar, K. (2010). Post-transcriptional control during chronic inflammation and cancer: a focus on AU-rich elements. *Cell Mol Life Sci.*, **67**(17):2937-55.

Kirchheimer, J., Wojta, J., Christ, G., Binder, B. (1989). Functional inhibition of endogenously produced urokinase decreases cell proliferation in a human melanoma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**(14):5424-8.

Kjaergaard, M., Hansen, L., Jacobsen, B., Gardsvol, H., Ploug, M. (2008). Structure and ligand interactions of the urokinase receptor (uPAR). *Front Biosci.*, **13**:5441-61.

Kjøller, L., Hall, A. (2001). Rac mediates cytoskeletal rearrangements and increased cell motility induced by urokinase-type plasminogen activator receptor binding to vitronectin. *J Cell Biol.*, **152**(6):1145-57.

Kolenda, T., Przybyła, W., Teresiak, A., Mackiewicz, A., Lamperska, K. (2014). The mystery of let-7d - a small RNA with great power. *Contemp Oncol (Pozn)*, **18**(5):293-301.

Kumar, MS, Armenteros-Monterroso, E., East, P., Chakravorty, P., Matthews, N., Winslow, M., Downward, J. (2014). HMGA2 functions as a competing endogenous RNA to promote lung cancer progression. *Nature*, **505**(7482):212-7.

Labbaye, C., Testa, U. (2012). The emerging role of MIR-146A in the control of hematopoiesis, immune function and cancer. *J Hematol Oncol.*, **5**:13.

Labbaye, C., Spinello, I., Quaranta, M., Pelosi, E., Pasquini, L., Petrucci, E., Biffoni, M., Nuzzolo, E., Billi, M., Foà, R., Brunetti, E., Grignani, F., Testa, U., Peschle, C. (2008). A three-step pathway comprising PLZF/miR-146a/CXCR4 controls megakaryopoiesis. *Nat Cell Biol.*, **10**(7):788-801.

Lanza, F., Castoldi, G., Castagnari, B., Todd, R., Moretti, S., Spisani, S., Latorraca, A., Focarile, E., Roberti, M., Traniello, S. (1998). Expression and functional role of urokinase-type plasminogen activator receptor in normal and acute leukaemic cells. *Br J Haematol.*, **103**(1):110-23.

Lee, B.M., Gusev, Y., Brackett, D., Nuovo, G., Schmittgen, T. (2008). Systematic evaluation of microRNA processing patterns in tissues, cell lines, and tumors. *RNA*, **14**(1):35-42.

Liu, H., Li, W., Chen, C., Pei, Y., Long, X. (2015). MiR-335 acts as a potential tumor suppressor miRNA via downregulating ROCK1 expression in hepatocellular carcinoma. *Tumour Biol.*, **36**(8):6313-9.

Lund, L., Ellis, V., Rønne, E., Pyke, C., Danø, K. (1995). Transcriptional and post-transcriptional regulation of the receptor for urokinase-type plasminogen activator by cytokines and tumour promoters in the human lung carcinoma cell line A549. *Biochem J.*, **310** (pt1): 345-52.

Markiewicz, A., Książkiewicz, M., Wełnicka-Jaśkiewicz, M., Seroczyńska, B., Skokowski, J., Szade, J., Żaczek, A.J., (2014). Mesenchymal phenotype of CTC-enriched blood fraction and lymphnode metastasis formation potentia. *PLoS One*, **9**(4):e93901.

Mongroo, P., Rustgi, A. (2010). The role of the miR-200 family in epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Biol Ther.*, **10**(3):219-22. .

Montuori, N., Ragno, P. (2009). «Multiple activities of a multifaceted receptor: roles of cleaved and soluble uPAR. *Front Biosci. (Landmark Ed)*, **14**:2494-503.

Montuori, N., Carriero, M., Salzano, S., Rossi, G., Ragno, P. (2002). The cleavage of the urokinase receptor regulates its multiple functions. *J Biol Chem.*, **277**(49):46932-9.

Montuori, N., Cosimato, V., Rinaldi, L., Rea, V., Alfano, D., Ragno, P. (2013). uPAR regulates pericellular proteolysis through a mechanism involving integrins and fMLF-receptors. *Thromb Haemost.*, **109**(2):309-18.

Montuori, N., Mattiello, A., Mancini, A., Taglialatela, P., Caputi, M., Rossi, G., Ragno, P. (2003). Urokinase-mediated posttranscriptional regulation of urokinase-receptor expression in non small cell lung carcinoma. *Int J Cancer*, **105**(3):353-60.

Nagamine, Y., Medcalf, R., Muñoz-Cánoves, P. (2005). Transcriptional and posttranscriptional regulation of the plasminogen activator system. *Thromb Haemost.*, **93**(4):661-75.

Noh, H., Hong, S., Huang, S. (2013). Role of urokinase receptor in tumor progression and development. *Theranostics.*, **3**(7):487-95.

O'Day, E., Lal, A. (2010). MiRNA and their target gene networks in breast cancer. *Breast Cancer Res.*, **12**(2):201.

Ploug, M., Eriksen, J., Plesner, T., Hansen, N., Dako, K. (1992). A soluble form of the glycolipid-anchored receptor for urokinase-type plasminogen activator is secreted from peripheral blood leukocytes from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Eur J. Biochem.*, **208**(2):397-404.

Poliseno, L., Salmena, L., Zhang, J., Carver, B., Haveman, W., Pandolfi, P.P. (2010). A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology. *Nature.*, **465**(7301):1033-8.

Ragno, P. (2006). The urokinase receptor: a ligand or a receptor? Story of a sociable molecule. *Cell Mol Life Sci.*, **63**(9):1028-37.

Rath, N., Olson, M. (2012). Rho-associated kinases in tumorigenesis: re-considering ROCK inhibition for cancer therapy. *EMBO Rep.*, **13**(10):900-8.

Resnati, M., Pallavicini, I., Wang, J., Oppenheim, J., Serhan, C., Romano, M., Blasi, F. (2002). The fibrinolytic receptor for urokinase activates the G protein-coupled chemotactic receptor FPRL1/LXA4R. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **5**;99(3):1359-64.

Rijken, D. Lijnen, H. (2009). New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system. *J Thromb Haemost.*, **7**(1):4-13.

Sand, L., Jochemsen, A., Beletkaia, E., Schmidt, T., Hogendoorn, P., Szuhai, K. (2015). Novel splice variants of CXCR4 identified by transcriptome sequencing. *Biochem Biophys Res Commun.*, **466**(1):89-94.

Shenouda, S., Alahari, S. (2009). MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? *Cancer Metastasis Rev.*, **28**(3-4):369-78.

Shetty, S., Muniyappa, H., Halady P.K., Idell S. (2004). Regulation of urokinase receptor expression by phosphoglycerate kinase. *Am J Respir Cell Mol Biol.*, **31**(1):100-6.

Shetty, S., Velusamy, T., Idell, S., Shetty, P., Mazar, A., Bhandary, Y., Shetty, R. (2007). Regulation of urokinase receptor expression by p53: novel role in stabilization of uPAR mRNA. *Mol Cell Biol.*, **27**(16):5607-18.

Shetty, P., Velusamy, T., Bhandary, Y., Shetty, R., Liu, M., Shetty, S. (2008). Urokinase expression by tumor suppressor protein p53: a novel role in mRNA turnover. *Am J Respir Cell Mol Biol.*, **39**(3):364-72.

Shetty, P., Velusamy, T., Bhandary, Y., Liu, M., Shetty, S. (2009). Urokinase receptor expression involves tyrosine phosphorylation of phosphoglycerate kinase. *Mol Cell Biochem.*, **335**(1-2):235-47.

Shetty, S., Marudamuthu, A., Abernathy, D., Shetty, R., Shetty, P., Fu, J., Idell, S., Bhandary, Y., Ji, H., Liu, M., Shetty, S. (2012). Regulation of urokinase expression at the posttranscription level by lung epithelial cells. *Biochemistry*, **51**(1):205-13.

Sidenius, N., Blasi, F. (2003). The urokinase plasminogen activator system in cancer: recent advances and implication for prognosis and therapy. *Cancer Metastasis Rev.*, **22**(2-3):205-22.

Silva, H., Alves, V., Nogueira, L., Rosa, M., Carvalho, L., Regateiro, F. (2012). Impairment of breast cancer cell invasion by COX-2-specific inhibitor NS398: roles of CXCR4 and of uPA system. *Med Oncol.*, **29**(3):1468-76.

Stewart, C., Sayers, I. (2009). Characterisation of urokinase plasminogen activator receptor variants in human airway and peripheral cells. *BMC Mol Biol.*, **10**:75.

Tang, C., Hill, M., Brumwell, A., Chapman, H., Wei, Y. (2008). Signaling through urokinase and urokinase receptor in lung cancer cells requires interactions with beta1 integrins. *J Cell Sci.*, **121**(Pt 22):3747-56.

Tarighi, P., Montazeri, H., Khorramizadeh, M., Sobhani, A., Ostad, S., Ghahremani, M. (2015). uPAR peptide antagonist alters regulation of MAP kinases and Bcl-2 family members in favor of apoptosis in MDA-MB-231 cell line. *Res Pharm Sci.*, **10**(3):200-5.

Tay, Y., Karreth, F., Pandolfi, PP. (2014). Aberrant ceRNA activity drives lung cancer. *Cell Res.*, **24**(3):259-60. .

Tay, Y., Kats, L., Salmena, L., Weiss, D., Tan, S., Ala, U., Karreth, F. , Poliseno, L., Provero, P., Di Cunto, F., Lieberman, J., Rigoutsos, I., Pandolfi, PP. (2011). Coding-independent regulation of the tumor suppressor PTEN by competing endogenous mRNAs. *Cell.*, **147**(2):344-57.

Teicher, B., Fricker, S. (2010). CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clin Cancer Res.*, **16**(11):2927-31.

Tran, H., Maurer, F., Nagamine, Y. (2003). Stabilization of urokinase and urokinase receptor mRNAs by HuR is linked to its cytoplasmic accumulation induced by activated mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2. *Mol Cell Biol.*, **23**(20):7177-88.

Trisciuglio, D., Iervolino, A., Candiloro, A., Fibbi, G., Fanciulli, M., Zangemeister-Wittke, U., (2004). bcl-2 induction of urokinase plasminogen activator receptor expression in human cancer cells through Sp1 activation: involvement of ERK1/ERK2 activity. *J Biol Chem.*, **279**(8):6737-45.

Volinia, S., Calin, G., Liu, C., Ambros, S., Cimmino, A., Petrocca, F., Visone, R., Iorio, M., Roldo, C., Ferracin, M., Prueitt, R., Yanaihara, N., Lanza, G., Scarpa, A., Vecchione, A., Negrini, M., Harris C., Croce, C., **(2006)**. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**(7):2257-61.

Wang, X., Tang, S., Le, S., Lu, R., Rader, J., Meyers, C., Zheng, Z. **(2008)**. Aberrant expression of oncogenic and tumor-suppressive miRNA in cervical cancer is required for cancer cell growth. *PLoS One.*, **3**(7):e2557.

Wang, Y., Dang, J., Johnson, L., Selhamer, J., Doe, W. **(1995)**. Structure of the human urokinase receptor gene and its similarity to CD59 and the Ly-6 family. *Eur J Biochem.*, **227**(1-2):116-22.

Wang, Y., Zhao, W., Fu, Q. **(2013)**. miR-335 suppresses migration and invasion by targeting ROCK1 in osteosarcoma cells. *Mol Cell Biochem.*, **384**(1-2):105-11.

Yu, M., Wang, J., Wang, G., You, X., Zhao, X., Jing, Q., Qin, Y. **(2011)**. Vascular smooth muscle cell proliferation is influenced by let-7d microRNA and its interaction with KRAS. *Circ J.*, **75**(3):703-9.

Zannetti, A., Del Vecchio, S., Carriero, M., Fonti, R., Franco, P., Botti, G., D'Aiuto, G., Stoppelli, M., Salvatore, M. **(2000)**. Coordinate up-regulation of Sp1 DNA-binding activity and urokinase receptor expression in breast carcinoma. *Cancer Res.*, **60**(6):1546-51.

Zhang, B., Pan, X., Cobb, G. P., Anderson, T.A. **(2007)**. miRNA as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol.*, **302**(1):1-12.