

Urokinase-Rezeptor (uPAR) und Zellkontakte:
Mechanismen uPAR-abhängiger Zelladhäsion, Zellmigration und
Signaltransduktion.

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin des Fachbereichs
Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von Jutta Petzinger
aus Gießen

Gießen 2009

Aus dem Biochemischen Institut
Leiter: Prof. Dr. Klaus T. Preissner, Fachbereich Humanmedizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Kanse
Gutachter: Prof. Dr. Meinhardt
Prüfungsvorsitz: Frau Prof. Dr. Lorenz

Tag der Disputation: 03.09.2010

Inhaltsverzeichnis	1
Abkürzungsverzeichnis	4
1 Einleitung	6
1.1 Allgemeine Einteilung	6
1.2 Das Plasminogen- aktivierende System	7
1.2.1 Bildung von Plasminogen und Plasmin	7
1.2.2 Intra- und extravaskuläre Funktionen von Plasmin	9
1.2.3 Regulation der Plasminaktivität	11
1.3 Das Urokinase- /Urokinaserezeptor (uPA-/uPAR)-System	14
1.3.1 Aufbau des Urokinasemoleküls	14
1.3.2 Aktivierung der Urokinase	14
1.3.3 Substrate der Urokinase	17
1.3.4 Der Urokinaserezeptor (uPAR)	18
1.4 Zelluläre Funktionen des uPA-/uPAR-Systems	22
1.4.1 uPA-/uPAR-Expression	22
1.4.2 uPAR und Zelladhäsion	23
1.4.3 uPAR und Zellmigration	27
1.4.4 uPAR und Signalaktivierung	28
1.5 Fragestellungen der Arbeit	32
2 Material & Methoden	33
2.1 Reagenzien	33
2.2 Zellkultur	34
2.3 Adhäsionsassay	35
2.4 Präparation Detergenz-unlöslicher Adhäsionskomplexe	36
2.5 Western-Blot und Signalaktivierung	38
2.6 Zellmigrationsassay	39
2.7 Anmerkung zur statistischen Auswertung	41

3 Ergebnisse	42
3.1 Funktion von uPAR in Zelladhäsionsprozessen	42
3.1.1 uPAR-vermittelte Zelladhäsion auf Vitronektin (VN)	42
3.1.2 Bedeutung von Lipiddomänen für die uPAR-VN-Interaktion	46
3.1.3 Komponenten des uPAR-abhängigen Adhäsionskomplexes	48
3.2 Funktion von uPAR in Migration und Signalaktivierung in humanen, glatten Gefäßmuskelzellen	55
3.2.1 Proteolyse-unabhängige, uPAR-vermittelte Zellmigration	55
3.2.2 uPA-induzierte Signalaktivierung in Gefäßmuskelzellen	58
3.2.3 Beteiligte Signalwege der uPAR-vermittelten Zellmigration	62
3.2.4 Rolle von Lipiddomänen in uPAR-vermittelter Zellmigration	69
4 Diskussion	72
4.1 uPAR als Regulator von Zelladhäsionsprozessen	72
4.1.1 Interpretation der Ergebnisse	72
4.1.2 Frage nach uPAR-assoziierten Adapterproteinen	75
4.1.3 Bedeutung der uPAR-regulierten Adhäsion <i>in vivo</i>	76
4.2 uPAR als Regulator von Zellmigrationsprozessen	77
4.2.1 Interpretation der Ergebnisse	77
4.2.2 uPAR-regulierte Zellmigration in Gefäßwand- und Inflammationsprozessen <i>in vivo</i>	78
4.2.3 uPA-/uPAR und Cancerogenese	81
4.3 uPAR als Initiator von Signaltransduktionsprozessen	82
4.3.1 Interpretation der Ergebnisse	82
4.3.2 Mögliche Signalkaskaden uPAR-abhängiger HVSMC-Migration	83
4.3.3 Rolle des GPI-Ankers in uPAR-vermittelter Migration und Signalaktivierung	86
4.3.4 uPAR und mögliche Adapterproteine der Signalaktivierung	87

4.4 Diagnostische und therapeutische Optionen	90
5 Zusammenfassung/ Summary	94
6 Literaturverzeichnis	96

Abkürzungsverzeichnis

AdCyc	Adenylatcyclase
AS	Aminosäure
ATF	Amino-terminales Fragment
Ca ²⁺ / CalmK	Calcium-Calmodulinkinase
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CD	Cluster of differentiation
CholOx	Cholesteroxidase
DAG	Diacylglycerin
DIAP	Detergent-insoluble-adhesion-patch
DMS	<i>D</i> -erythro- <i>N,N</i> -dimethylsphingosin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERK1/2	Extracellular regulated kinase
Fbg	Fibrinogen
FGF	fibroblast growth factor
FN	Fibronectin
HMW	High molecular weight; entspricht der aktiven Urokinaseform
HVSMC	Human vascular smooth muscle cell
ICAM	Intercellular adhesion molecule
Ins(n)-P	Inositol- (n)- Phosphat; n= Anzahl der Phosphatgruppen
IL	Interleukin
LFA-1	lymphocyte function-associated antigen 1
Mac-1	macrophage antigen 1
MAPK	Mitogen-activated proteinkinase
MBCD	β-Methylcyclodextrin
MLCK	Myosin light-chain kinase
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MVSMC	Mouse vascular smooth muscle cell
PAI	Plasminogen-activator-inhibitor
PBS	Phosphat buffered saline
PDGF	Platelet derived growth factor
PI-3K	Phosphatidylinositol-3 Kinase
PKC	Proteinkinase C

PLC	Phospholipase C
PTX	Pertussistoxin
S1P	Sphingosin-1-phosphat
sc-uPA	Single-chain uPA
SphK	Sphingosinkinase
suPAR	Soluble uPAR/ löslicher uPAR
TGF- β	Transforming growth factor- β
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
uPA	Urokinase-type plasminogen activator/ Urokinase
uPAR	uPA Rezeptor
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
VEGF	vascular endothelial growth factor
VSMC	Vascular smooth muscle cell
VN	Vitronektin

1 Einleitung

1.1 Allgemeine Einteilung

Bei physiologischen wie pathologischen Prozessen unseres Organismus sind regulierte Auf-, Um- und Abbauprozesse extrazellulärer Proteine und die dafür notwendigen Enzyme, die Proteasen, von essentieller Bedeutung. Funktionsbereiche dieser Enzyme können umschriebene Wundheilungs- oder Inflammationsprozesse sein. Zahlreiche Vorgänge, die eine gesteigerte Mobilisierung von Zellen erfordern, werden von Proteasesystemen beeinflusst und reguliert. Hierzu zählen die Anheftung zirkulierender Entzündungszellen am Gefäßwandendothel und die so erst mögliche Migration aus dem intra-/ in den extravaskulären Raum im Rahmen entzündlicher Prozesse. Die Auswanderung maligner Zellen aus dem Gefäßsystem und Einwanderung in Sekundärgewebe im Rahmen der Tumorzellmetastasierung sowie das Einsprossen neuer Gefäßendothelzellen und Fibroblasten während der Angiogenese sind weitere Beispiele. Auch in Gefäßwandprozessen wie Arteriosklerose und Neointimabildung finden kontinuierliche Umbauvorgänge statt, welche zur Einlagerung fibrotischen Materials, sowie zur Migration glatter Muskelzellen innerhalb der Gefäßwand führen.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit einem spezifischen perizellulären Matrix-Proteolysesystem, dem Urokinase-System (uPA= urokinase type plasminogen activator), welches Einfluss auf zahlreiche der oben genannten Prozesse nimmt. Erst durch das zunehmende Wissen um Funktion und Regulation dieses Proteolysesystems können Möglichkeiten der diagnostischen und therapeutischen Nutzung etabliert werden. Da uPA mit anderen Proteolysesystemen in Wechselwirkung tritt, soll kurz auf die prinzipiellen Unterschiede von Proteasen eingegangen werden.

Man unterscheidet Proteasen nach ihrem Vorkommen:

- a) Extrazelluläre Proteasen, welche im Plasma oder der extrazellulären Matrix zu finden sind, z.B. Proteasen des Gerinnungs-, Fibrinolyse- und Komplementsystems sowie Matrix-Metalloproteinasen (MMP);
- b) Intrazelluläre Proteasen, welche z.B. in Lysosomen (Kathepsin B,D) oder als Signalpeptidasen/-proteasen vorkommen.

Nach dem Ort des proteolytischen Angriffspunktes wird weiterhin unterschieden zwischen Exopeptidasen, welche Aminosäurereste am Ende einer Peptidkette abspalten, und Endopeptidasen, welche an für das entsprechende Enzym spezifischen Stellen innerhalb einer Peptidkette angreifen.

Für die perizelluläre Proteolyse sind Serinproteasesysteme wie das Plasminogen- und das Urokinase-System von Bedeutung. Die beiden Systeme sind funktionell eng miteinander verknüpft, wie in Abschnitt 1.2 erörtert werden wird. Eine weitere große Gruppe extrazellulärer Proteasen sind die Matrix-Metalloproteinasen (MMP), welche ihren Namen dem Zink-abhängigen aktiven Zentrum verdanken. Die MMPs haben im Gegensatz zum Plasminogensystem die Besonderheit, dass ihr Wirkungsspektrum eingeschränkt ist auf das jeweils spezifische Matrix-/Faserprotein (siehe Tab.1).

Proteasesystem	Katalytische Triade	Bsp. (extra-/intrazellulär)
Serinproteasen	Serin, Histidin, Asparaginsäure	Plasmin, uPA, tPA (extraz.)
Cysteinproteasen	Cystein	Kathepsin B (intraz.)
Aspartatproteasen	Asparaginsäure	Kathepsin D (intraz.)
Matrix-Metalloproteinasen (MMPs)	Zink	Kollagenasen, Elastasen, Gelatinasen, Stromelysine (extrazellulär)

Tabelle 1: Übersicht beteiligter Proteolysesysteme im Rahmen extrazellulärer Matrix-Umbauprozesse.

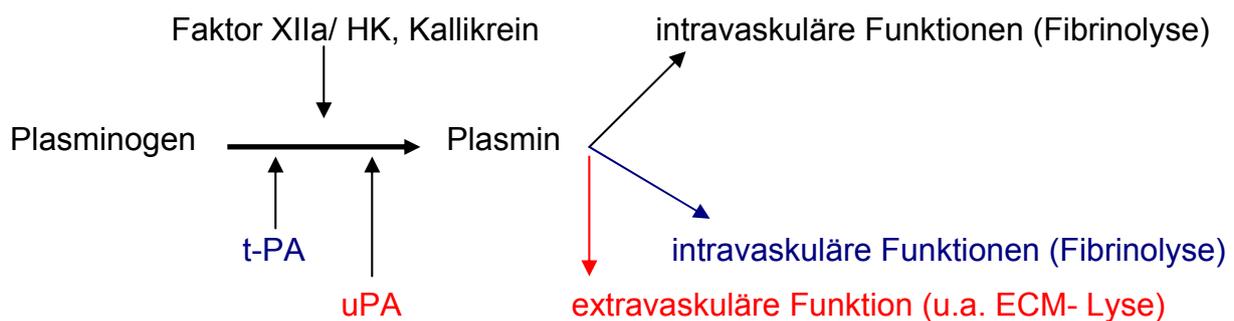
1.2 Das Plasminogen-aktivierende System

1.2.1 Bildung von Plasminogen und Plasmin

Plasminogen ist ein 80 kD großes Plasmaprotein, welches vorwiegend in der Leber synthetisiert wird und zur Gruppe der α_2 -Plasmaglobuline gehört. Es stellt die inaktive Vorstufe der Serinprotease Plasmin dar und wird u.a. bei Infektionen ähnlich dem Fibrinogen als Akut-Phase-Protein vermehrt produziert.

Die Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin erfolgt durch Plasminogenaktivatoren, welche vom Organismus selbst hergestellt werden. Dabei ist der tissue-type plasminogen activator (t-PA) für die intravasale, und der urokinase-type plasminogen activator (uPA=Urokinase) für die extravasale Plasminfreisetzung verantwortlich. Alternativ, wenngleich von untergeordneter Bedeutung, kann aktivierter Gerinnungsfaktor XIIa in Anwesenheit von Proaktivatoren wie Präkallikrein, Kallikrein und hochmolekularem Kininogen (HK) Plasmin freisetzen. Faktor XIIa sowie seine Profaktoren gehören zum intrinsischen System der Plasminbildung, die Gewebeaktivatoren wie t-PA und uPA zum extrinsischen System (siehe Schema 1) (Chavakis et al., 2003). Die weiteren Ausführungen werden sich primär mit dem extrinsischen System befassen.

Intrinsisches System



Extrinsisches System

Schema 1: Schematische Darstellung der Plasminogenaktivierungs-Systeme.

Das von vaskulären Endothelzellen synthetisierte und sezernierte t-PA ist ein ca. 70 kD großes Glykoprotein, dessen Freisetzung u.a. von Thrombin reguliert wird. Für die Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin durch t-PA ist die intravasale Bindung von Plasminogen an Fibrin notwendig. t-PA bildet mit Plasminogen und Fibrin einen ternären Komplex, und fokussiert so die Plasminwirkung im intravasalen Raum spezifisch auf fibrinolytische Prozesse.

uPA hingegen kann seine proteolytische Aktivität im Unterschied zu t-PA auch unabhängig von einer Plasminogenbindung an Fibrin entfalten. Somit ist das Urokinase-System vor allem für die extravasale Bildung von Plasmin von Bedeutung

(siehe Schema 1). Der Angriffspunkt von uPA befindet sich zwischen Arg⁵⁶⁰ und Val⁵⁶¹ des Plasminogens. Das so freigesetzte Plasmin kann, Annexin₂-Rezeptor gebunden, wiederum das Proenzym der Urokinase aktivieren, womit sich die Proteolysekaskade der oberflächengebundenen Plasminbildung selbst verstärkt.

1.2.2 Intra- und extravaskuläre Funktionen des Plasmins

Plasmin zählt wie seine Aktivatoren zu den Serinproteasen. Seine intravaskuläre Bedeutung besteht vor allem in der geregelte Aktivierung fibrinolytischer Prozesse. Hier sorgt Plasmin für die Spaltung von Fibrin und Fibrinogen und verhindert somit eine unkontrollierte Fibrinvernetzung und Thrombusbildung. Zusätzlich entstehen Fibrinogenspaltprodukte, welche u.a. diagnostischen Wert in der Frühphase der disseminierten intravasalen Gerinnung z.B. im Rahmen septischer Krankheitsbilder haben.

Plasmin hat jedoch im Gegensatz zu seinen spezifischen Aktivatoren t-PA und u-PA ein noch weitaus größeres Substratspektrum extrazellulärer Matrixproteine wie Laminine, Fibronektine und Proteoglykane (Ellis et al., 1991, van Leeuwen et al., 1996). Die Degradierung stabilerer Matrixproteine, wie z.B. Kollagen, ist über einen enzymatischen Zwischenschritt ebenfalls durch Plasmin beeinflussbar, da Plasmin die Matrix-Metalloproteinasen MMP-1, MMP-3 und MMP-9 sowie Elastasen aus der inaktiven Vorstufe in die aktive Protease spalten kann (van Leeuwen et al., 1996).

Auch das Proenzym des Plasminogenaktivators uPA gehört, wie in 1.2.1 beschrieben, zu den Substraten von Plasmin. Die einkettige Pro-Urokinase, auch single-chain uPA (sc-uPA) genannt, wird durch Plasmin in die aktive, hochmolekulare Form (high-molecular weight-uPA/ HMW-uPA) gespalten und dadurch aktiviert. Dies trifft auch zu, wenn sc-uPA an seinen Rezeptor gebunden an der Zelloberfläche vorliegt. HMW-uPA fördert wiederum die zellgebundene Plasminaktivierung. Dieser Mechanismus hat vor allem für Zellmigrationsprozesse besondere Bedeutung, da hier eine Fokussierung proteolytischer Aktivität auf gezielte Bereiche der Zelloberfläche notwendig ist.

Durch Plasmin-abhängige Degradierung extrazellulärer Matrixbestandteile kommt es außerdem zur Freisetzung und somit Aktivierung matrixgebundener Wachstumsfaktoren wie fibroblast growth factor (FGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) oder transforming growth factor- β (TGF- β) (Pedrozo et al., 1999;

Whitelock et al., 1996; Park et al., 1993). Die folgende Abb.1 fasst die vielseitigen Funktionen des Plasminogen-Urokinasesystems zusammen.

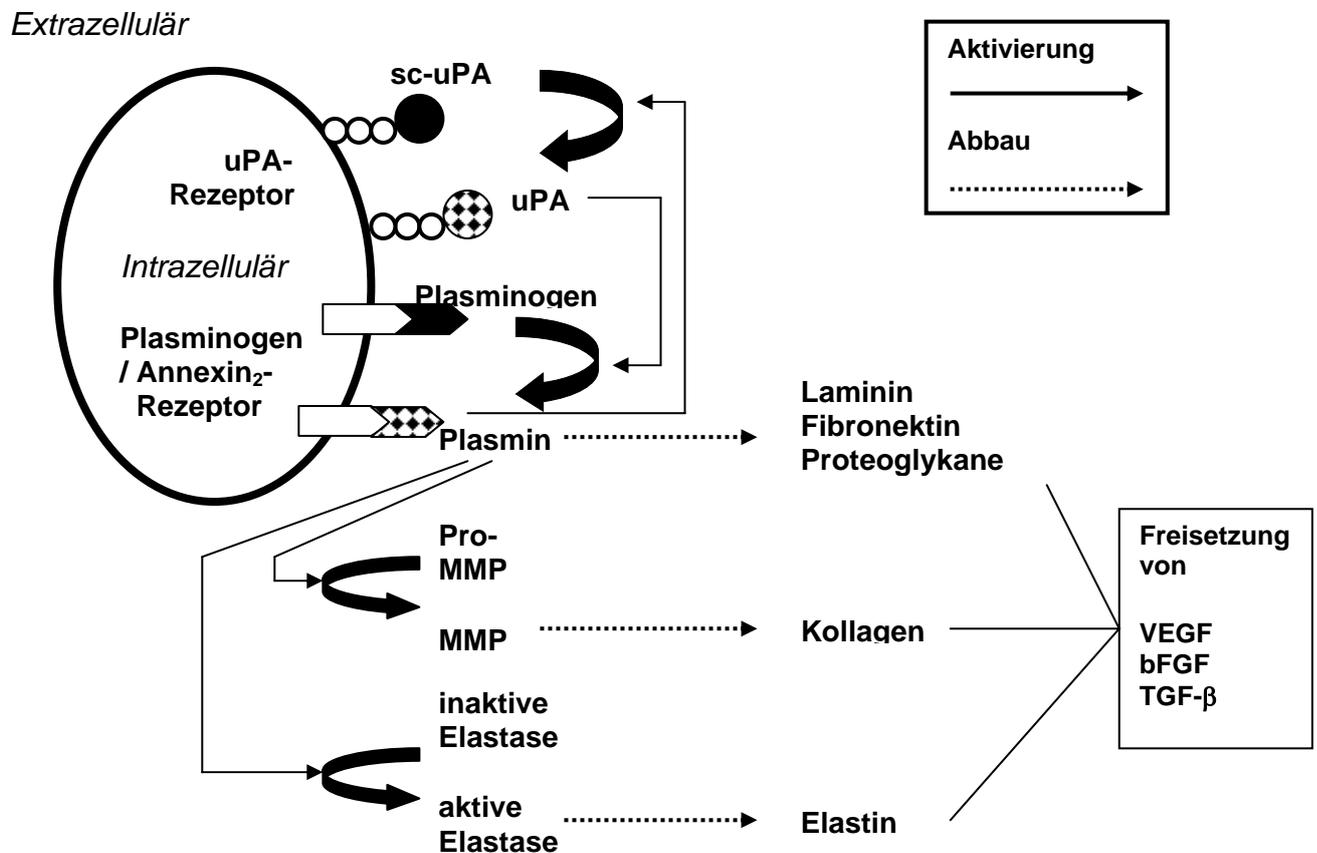


Abb. 1: Darstellung uPA-vermittelter Plasmin-Aktivierung und daraus resultierender Proteolysekaskaden.

Die Bildung von Plasmin kann somit sowohl durch direkte proteolytische Matrixdegradation wie auch indirekt durch die Aktivierung weiterer Proteolysesysteme wie MMPs und Elastasen eine weitreichende Wirkung haben. Dementsprechend erhalten Plasminogen-aktivierende Systeme einen entscheidenden Stellenwert in der Regulation des extrazellulären Matrixumbaus und der damit verbundenen physiologischen und pathologischen Vorgänge.

1.2.3 Regulation der Plasminaktivität

Sowohl intravaskulär wie auch extravaskulär hätte eine ungehemmte Proteolyse ungewünschte Folgen, sodass der Organismus Mechanismen zur Kontrolle der Plasminaktivität entwickelt hat. Dies kann a) über Regulation der Plasminogenaktivatoren und b) durch eine direkte Interaktion von Plasmin mit einem Inhibitor geschehen. Eine weitere Möglichkeit ist c) die Klärung von Plasminogenaktivatoren aus der Zirkulation.

a) Die Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren (PAIs) binden und inaktivieren t-PA und uPA, was folglich zu einer verminderten Plasminbildung führt. Bekannt sind PAI-1, PAI-2 und PAI-3, wobei PAI-1 das wohl am besten untersuchte Enzym darstellt. Es wird von zahlreichen Zelltypen synthetisiert und ist in hohen Konzentrationen auch in der extrazellulären Matrix, gebunden an Vitronektin oder Heparansulfate zu finden (Okumura et al., 2002). Die Protease Nexin-1 (auch PAI-4 genannt) bildet sowohl direkt mit Plasmin, aber auch mit Thrombin, t-PA und uPA einen Komplex und führt dadurch ebenfalls zur Inaktivierung der Enzyme (Anan et al., 2003; Rossignol et al., 2004). Daher kann die Protease Nexin-1 gleichzeitig zwei Mechanismen der Plasmindeaktivierung nutzen.

b) α_2 -Antiplasmin und α_2 -Makroglobulin sind hochmolekulare Plasmaproteine, welche durch eine Komplexbildung mit intravasalem Plasmin dessen proteolytische Aktivität hemmen. Differenziert werden muss hier zwischen frei im Plasma vorliegendem und Fibrin-gebundenem Plasmin.

Innerhalb eines Thrombus ist Plasminogen und folglich auch Plasmin im Komplex mit Fibrinogen und t-PA konzentriert, sodass die Plasminbildung lokal aufrechterhalten wird. Die Konzentration der inaktivierenden Globuline ist zudem im Thrombus im Vergleich zum umgebenden Plasma gering, sodass deren Wirkung kaum zum Tragen kommt. Intravasal fokussiert sich die Plasminaktivität demnach auf den Ort des fibrinolytischen Geschehens, wo sie benötigt wird. Ist der Thrombus dann gelöst und liegt Plasmin frei im Plasma vor, kann es zügig von oben genannten Globulinen gebunden und inaktiviert werden.

Betont werden muss, dass an seinen Rezeptor zellgebundenes Plasmin nicht mehr mit α_2 -Antiplasmin oder α_2 -Makroglobulin interagieren kann (Ellis et al., 1991). Somit

ist dieser Weg der Plasmininaktivierung nur intravasal suffizient, wo Plasmin ungebunden vorliegt. Im extravaskulären Gewebe ist er nur eingeschränkt wirksam. Wenngleich von untergeordneter Bedeutung soll der Einfluss von Antithrombin kurz aufgeführt werden. Das Plasmaprotein hat durch die Inaktivierung von Thrombin einerseits gerinnungshemmende Wirkung, da die Thrombin-abhängige Fibrinbildung gestoppt wird. Andererseits kommt es über die parallele Deaktivierung von Faktor XIIa sekundär auch zu einer verminderten Plasminbildung, wodurch die intravasale Fibrinolyse ebenfalls gehemmt wird. Somit ist eine Regulation zwischen Fibrinbildung und parallel dazu ablaufender Fibrinolyse gewährleistet.

c) Durch Bindung von uPA und t-PA über Oligosaccharidseitenketten an Mannose-Rezeptoren werden die Proteasen der Zirkulation entzogen (Smedsrod et al., 1988). Zusätzlich kann der Komplex aus rezeptorgebundenen Plasminogenaktivatoren wie uPA mit einem Plasminogenaktivatorinhibitor (PAI), über ein Internalisationssystem in die Zelle aufgenommen werden (siehe Abb.2). Für die PAI-uPA/ uPA-Rezeptor (uPAR)-Interaktion ist der Internalisationskomplex mit dem LDL-Rezeptor assoziierten Protein (LRP), auch α_2 -Makroglobulinrezeptor genannt, bekannt (Conese et al., 1995; Webb et al., 1999). Der gesamte Komplex wird in die Zelle internalisiert, wodurch die Expression des aktiven Plasminogenaktivators uPA dezimiert wird. Dies führt zu einer verminderten, zellgebundenen Plasminbildung. Außerdem hat dieser Klärungsmechanismus für die Funktion des Plasminogenaktivators und seines Rezeptors selbst Bedeutung, wie im weiteren Verlauf noch erörtert werden wird.

Eine Zusammenfassung der genannten Regulationsmöglichkeiten geben Tabelle 2 und Abbildung 2 wieder.

Plasminogenaktivator-Inhibitoren (PAIs)	Plasmininaktivatoren	Internalisierungsprotein
PAI-1	α_2 -Antiplasmin	LDL-Rezeptor assoz. Protein
PAI-2	α_2 -Makroglobulin	= α_2 -Makroglobulinrezeptor
PAI-3		
PAI-4/Protease Nexin-1		

Tabelle 2: Übersicht möglicher Plasmininaktivierungsprozesse.

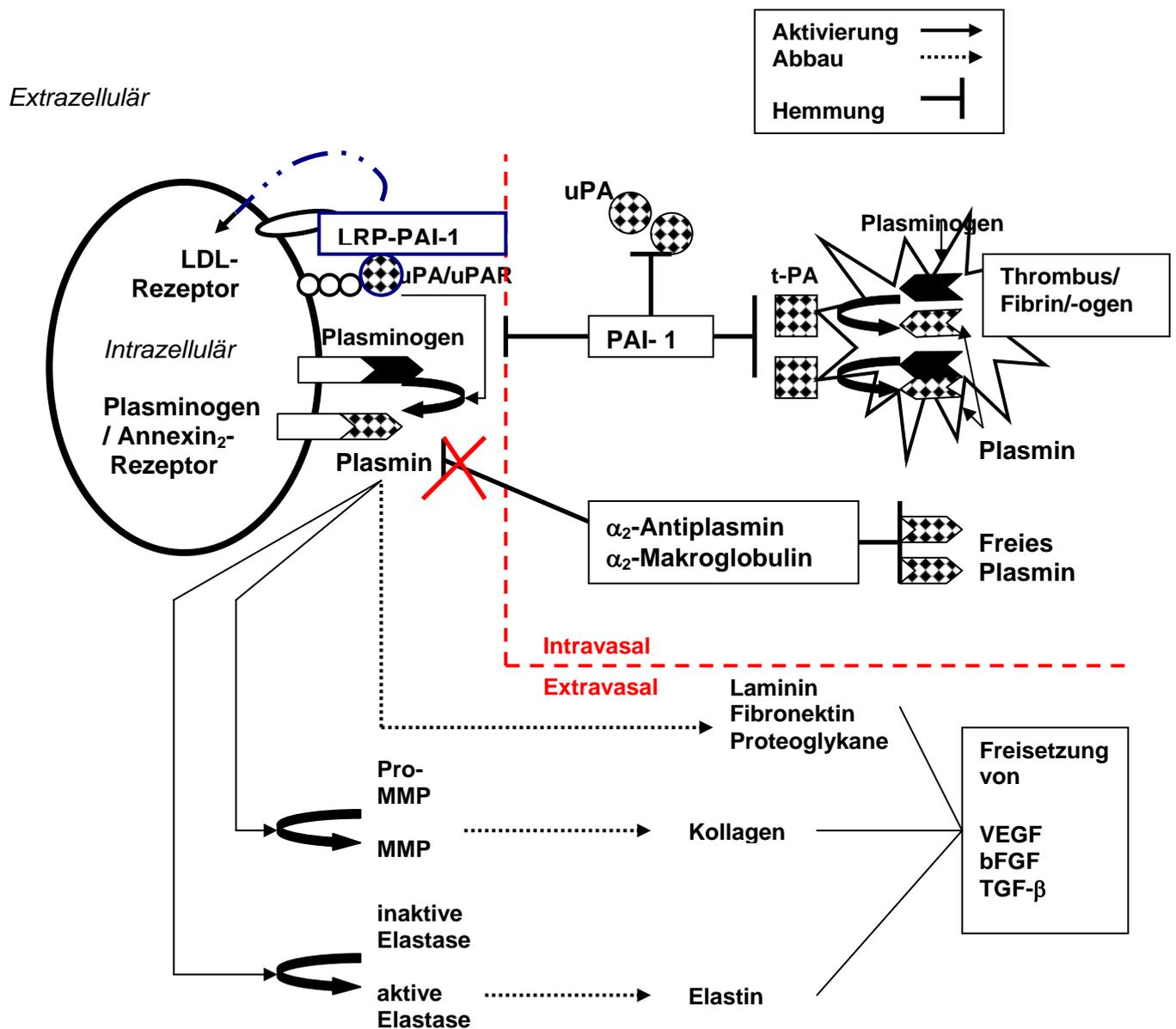


Abb. 2: Übersicht von Regulationsmechanismen der Plasminaktivität. Die Übergänge zwischen den primär intravasalen und primär extravasalen ablaufenden Regulationswegen sind *in vivo* fließend.

Bereits durch die weitreichenden Funktionen des Plasmin-Proteasesystems erhalten auch seine Aktivatoren erhebliche Bedeutung. Vertieft eingegangen wird im Folgenden auf das uPA-System, welches neben der Plasmin-aktivierenden Wirkung eigenständigen Funktionen besitzt. Diese besser zu beleuchten und zu verstehen ist Ziel dieser Arbeit.

1.3 Das Urokinase-/ Urokinaserezeptor (uPA-/uPAR)-System

1.3.1 Aufbau des Urokinasemoleküls

Die Serinprotease Urokinase wurde bereits als wichtiger Gewebeaktivator des Plasmins genannt. Sie hat ein Molekulargewicht von 50kD und besteht aus einer Peptidkette von 411 Aminosäuren (AS), welche sich in drei Abschnitte faltet (siehe Abb.3). Die N-terminale, sog. Wachstumsfaktor-ähnliche/ growth-factor-like Domäne (GFD) zeigt starke Ähnlichkeit zu der des epidermalen Wachstumsfaktors und ist für die Bindungsfähigkeit von Urokinase an ihren Rezeptor uPAR notwendig (Appella et al., 1987). Die sich anschließende Sequenz beinhaltet eine Peptidkette mit charakteristischer Kringel-Form und wird daher auch „kringle-Domäne“ genannt. Sie enthält insbesondere die Bindungsstelle für PAI-1 (Stephens et al., 1992). GFD und die kringle-Domäne bilden zusammen das aminoternale Fragment (ATF), welches aus AS 1-135 besteht.

Am C-terminalen Ende des Peptids schließt sich die katalytische Einheit von uPA an, welche die für Serinproteasen typische Aminosäuretriade His₂₀₄, Asp₂₄₅, Ser₃₅₆ beinhaltet (Stepanova et al., 2002). Die einzelnen Abschnitte erhalten ihre räumliche Struktur durch Disulfidbrückenbindungen, wovon in der GFD und kringle-Domäne jeweils drei, in der Proteaseeinheit insgesamt sechs zu finden sind.

Wie in Abb. 3 zu erkennen, kann das uPA-Molekül demnach in zwei Hauptbereiche eingeteilt werden; das aminoternale Fragment, welches zwar die Rezeptorbindungsdomäne besitzt, jedoch proteolytisch inaktiv ist, und die C-terminale Proteaseeinheit, welche keine Rezeptorinteraktion mehr eingehen könnte.

1.3.2 Aktivierung der Urokinase

Urokinase wird als inaktives Zymogen in der einkettigen, sogenannten single-chain Version bestehend aus GFD, Kringelsequenz, einem Verbindungsstück, dem sog. connecting peptide (CP) aus 22 Aminosäuren, und der Proteaseeinheit von zahlreichen Zellen wie Endo-/ Epithelzellen, glatten Muskelzellen, Fibroblasten, Monozyten/ Makrophagen und vor allem Tumorzellen synthetisiert (Tkachuk et al., 1996; Clowes et al., 1990; Eaton et al., 1984).

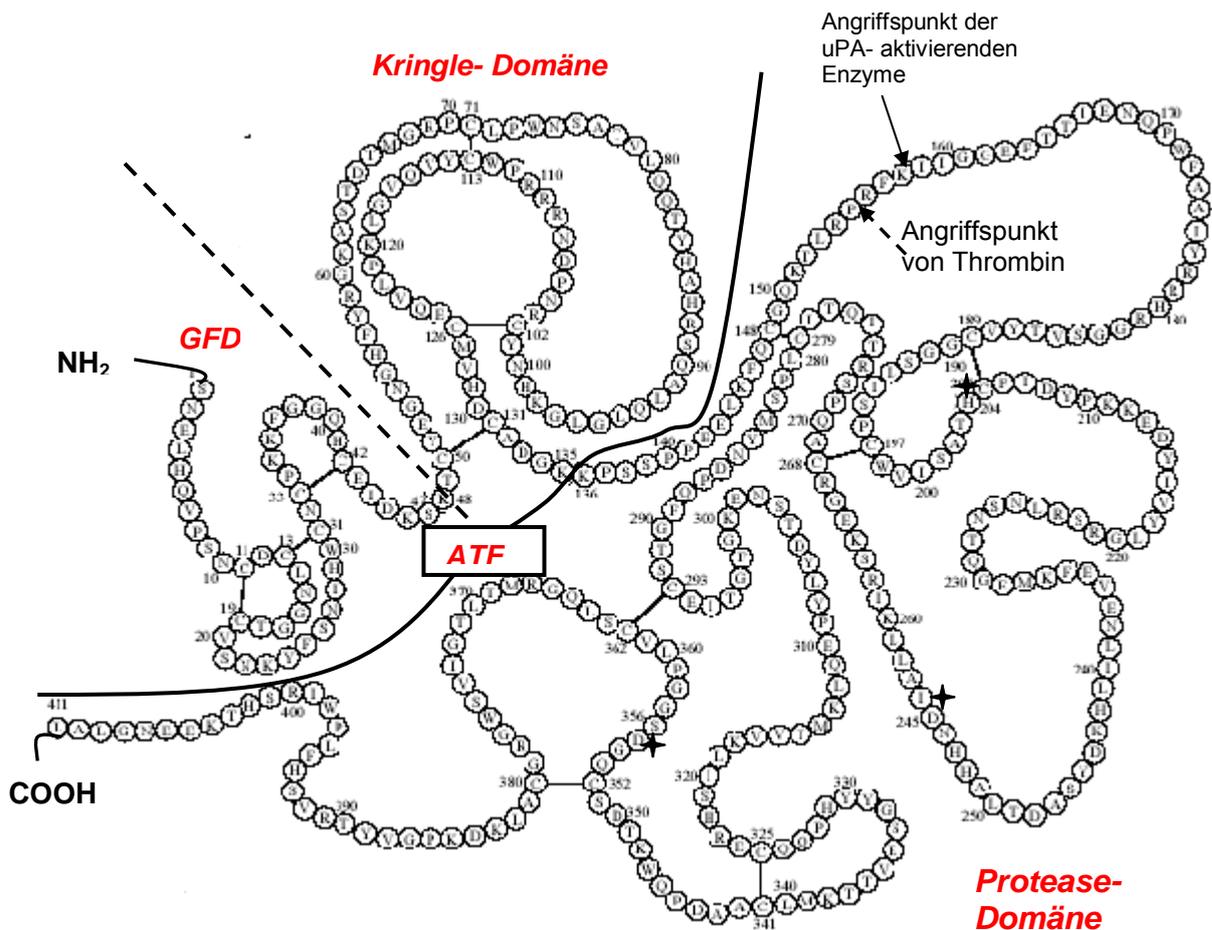
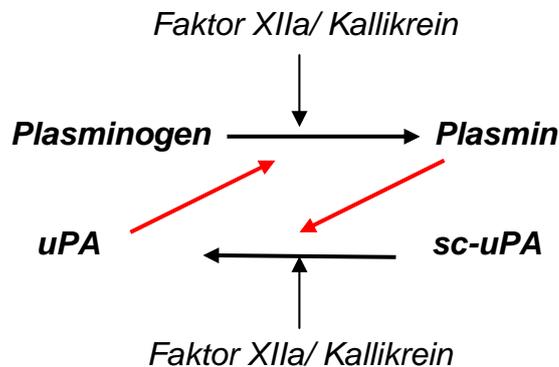


Abb. 3: Aminosäuresequenz des Urokinasemoleküls mit Darstellung der einzelnen Funktionsbereiche. Die mit einem Stern (✦) versehenen AS sind Bestandteil der katalytischen Triade der Proteaseeinheit. Der Pfeil an Stelle AS₁₅₈ markiert den Angriffspunkt der uPA-aktivierenden Enzyme, an Stelle AS 156 den Angriffspunkt von Thrombin.

Durch die Spaltung der Peptidkette an Stelle Lys₁₅₈ wird uPA in die Zweikettenform, oder auch sogenannten two-chain-/ bzw. high-molecular-weight (HMW)-Form konvertiert, erst dann ist uPA proteolytisch aktiv. Genau genommen weist auch die einkettige Form von uPA eine minimale katalytische Aktivität auf, welche jedoch um ein Vielfaches geringer ist, als die der aktivierten Urokinase (Lijnen et al., 1990). Die Spaltung von uPA durch gerichtete Proteolyse an Lys₁₅₈ kann durch das Substrat Plasmin aber auch durch Kallikrein und Faktor XIIa erfolgen (Ichinose et al., 1986). Hierbei fällt auf, dass F XIIa und Kallikrein als intravasale Profaktoren sowohl in die Plasminbildung direkt einwirken, aber auch indirekt über die Aktivierung von uPA die Plasminaktivität beeinflussen. Umgekehrt stehen Plasmin und uPA in enger Wechselwirkung, da das jeweils aktive Enzym die Protease aktiviert, für die es selbst

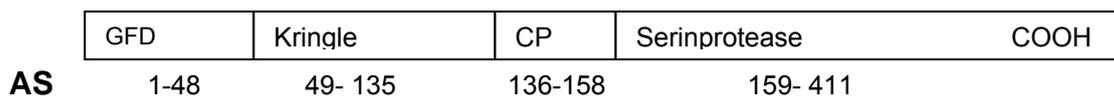
Substrat ist (Schema 2). Diese Aktivierungskaskade spielt vor allem für extravasal ablaufende proteolytische Prozesse eine entscheidende Rolle.



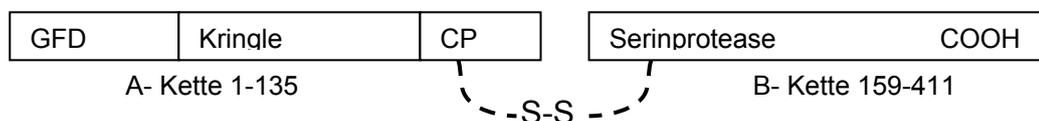
Schema 2: Potenzierungsweg der Plasmin- und Urokinaseaktivierung.

Nach Plasmin-induzierter Proteolyse des inaktiven einkettigen Urokinasemoleküls (Abb. 4a) kommen *in vivo* die in Abb. 4 b-d schematisch dargestellten Spaltprodukte von uPA vor. Zunächst das aktive high-molecular-weight-uPA, gespalten in eine A- und B-Kette, in der AS-Sequenz jedoch unverändert. Das ebenfalls aktive low-molecular-weight-(LMW)uPA entsteht nach Abspaltung der Rezeptorbindungsdomäne (Abb. 4c), besitzt demnach noch eine aktive katalytische Einheit, jedoch keine Bindungsfähigkeit zum Rezeptor mehr. Das amino-terminale Fragment (ATF, Abb. 4d) hingegen kann zwar an seinen Rezeptor binden, jedoch keinerlei proteolytische Aktivität mehr aufweisen (Poliakov et al., 2001), da die katalytische Einheit fehlt (siehe auch Abb.3).

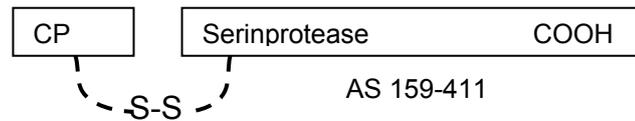
a) inaktive einkettige Form (sc-uPA)



b) aktive hochmolekulare Form (HMW-uPA)



c) aktive niedermolekulare (LMW)-Form



d) inaktives aminoterminales Fragment (ATF)

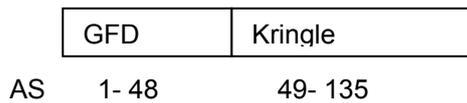


Abb. 4a-d: Schematische Darstellung der biologisch bedeutsamen Sequenzen des uPA-Peptides. Die Bezeichnung aktiv/ inaktiv bezieht sich ausschließlich auf die proteolytische Aktivität. GFD= growth-factor domain, Kringel= Kringeldomäne, CP= connecting peptide.

Thrombin ist ebenfalls fähig, Urokinase zu spalten. Allerdings geschieht dies an Stelle Arg₁₅₆ (Abb.3), wodurch eine Zweikettenform entsteht, die proteolytisch inaktiv ist (Braat et al., 1999). Somit stellt die Thrombin-abhängige Proteolyse von uPA einen Inaktivierungsprozess dar.

1.3.3 Substrate der Urokinase

Wie bereits ausgeführt ist eines der hauptsächlichen Substrate der aktiven Urokinase die Protease Plasminogen. Die Bindung von uPA an seinen spezifischen Rezeptor uPAR erhöht die Affinität der Urokinase zu Plasminogen (Quax et al., 1991), sodass hierüber die Plasminbildung und damit die proteolytische Aktivität auf ausgewählte Bereiche der Zelloberfläche konzentriert werden kann, wo uPA gebunden an seinen Rezeptor in räumlicher Nähe zu Plasminogen vorliegt.

Der Urokinase-Rezeptor wird durch seinen Liganden uPA aber nicht nur gebunden, sondern dient selbst als Substrat des aktiven Enzyms (Hoyer- Hansen et al., 1992). Die sensible Region befindet sich zwischen zwei Proteindomänen des Rezeptors, der sog. Domäne 1 und 2 (siehe Abb. 5). Nach uPA-abhängiger Proteolyse des eigenen Rezeptors, wird eine Verbindungssequenz zwischen Domäne 1 und 2 des Rezeptors freigesetzt, welches auch Peptid 88-94 genannt wird und die AS-Sequenz SRSRYLE besitzt. Dieses Peptid soll für verschiedene zelluläre Funktionen verantwortlich sein, worauf im Verlauf noch näher eingegangen werden wird.

1.3.4 Der Urokinase-Rezeptor (uPAR)

1985 wurde erstmals über einen spezifischen Zellmembranrezeptor für uPA berichtet (Vasalli et al., 1985; Stoppelli et al., 1985), welcher als uPAR/ CD 87 identifiziert wurde und mit dem sogenannten macrophage differentiation antigen Mo3 identisch war (Min et al., 1992; Todd et al., 1995).

Das uPAR-Gen liegt auf Chromosom 19q13 (Børghlum et al., 1992) und kodiert ein Protein aus 335 AS, welches nach posttranslationeller Prozessierung und Verknüpfung mit einem COOH-terminal gebundenen Lipidanker noch 283 AS mit einem Molekulargewicht von 40-60kD umfasst (Ploug et al., 1991; Roldan et al., 1990). Die Variationen des Molekulargewichtes beruhen auf unterschiedlichen Glykosylierungszuständen des Proteins und zeigen dementsprechend in elektrophoretischen Auftrennungen ein uneinheitlich breites Muster (Behrendt et al., 1990), welches in den Ergebnissen dieser Arbeit noch gezeigt werden wird. Der Rezeptor gehört aufgrund seiner strukturellen Verwandtschaft zur Gruppe der Ly-6/ snake venom Proteine und besitzt drei extrazelluläre homologe Domänen (Abb. 5). Bedingt durch die Anordnung der Cysteine in der Peptidkette zeigen diese ein ganz bestimmtes Muster von fünf Disulfidbrücken, welches in den Domänen 2 und 3 identisch ist. Domäne 1 enthält dagegen nur die ersten vier S-S-Brücken (Abb. 5). Diese Domäne ist von besonderer Wichtigkeit, da hier die Bindungsstellen für Liganden des Urokinaserezeptors liegen.

Das beschriebene Disulfidbrückenmuster wurde in Neurotoxinen von Schlangen gefunden, wodurch die oben genannte Bezeichnung „snake venom“ Proteine zustande kam (Ploug et al., 1993, 1994).

Mittlerweile ist bekannt, dass uPAR auf unterschiedlichsten Zelltypen wie Leukozyten, Endothel-/ Epithelzellen, glatten vaskulären Muskelzellen und zahlreichen Tumorzellarten zu finden ist (Blasi et al., 1988; Nakata et al., 1998; Hildenbrand et al., 1998; Dubuisson et al., 2000). Hierbei fällt auf, dass Gefäßzellen ebenso wie auch Organ-/ Stromazellen den Urokinaserezeptoren exprimieren, was bereits eine gewisse Multifunktionalität des Rezeptors vermuten lässt.

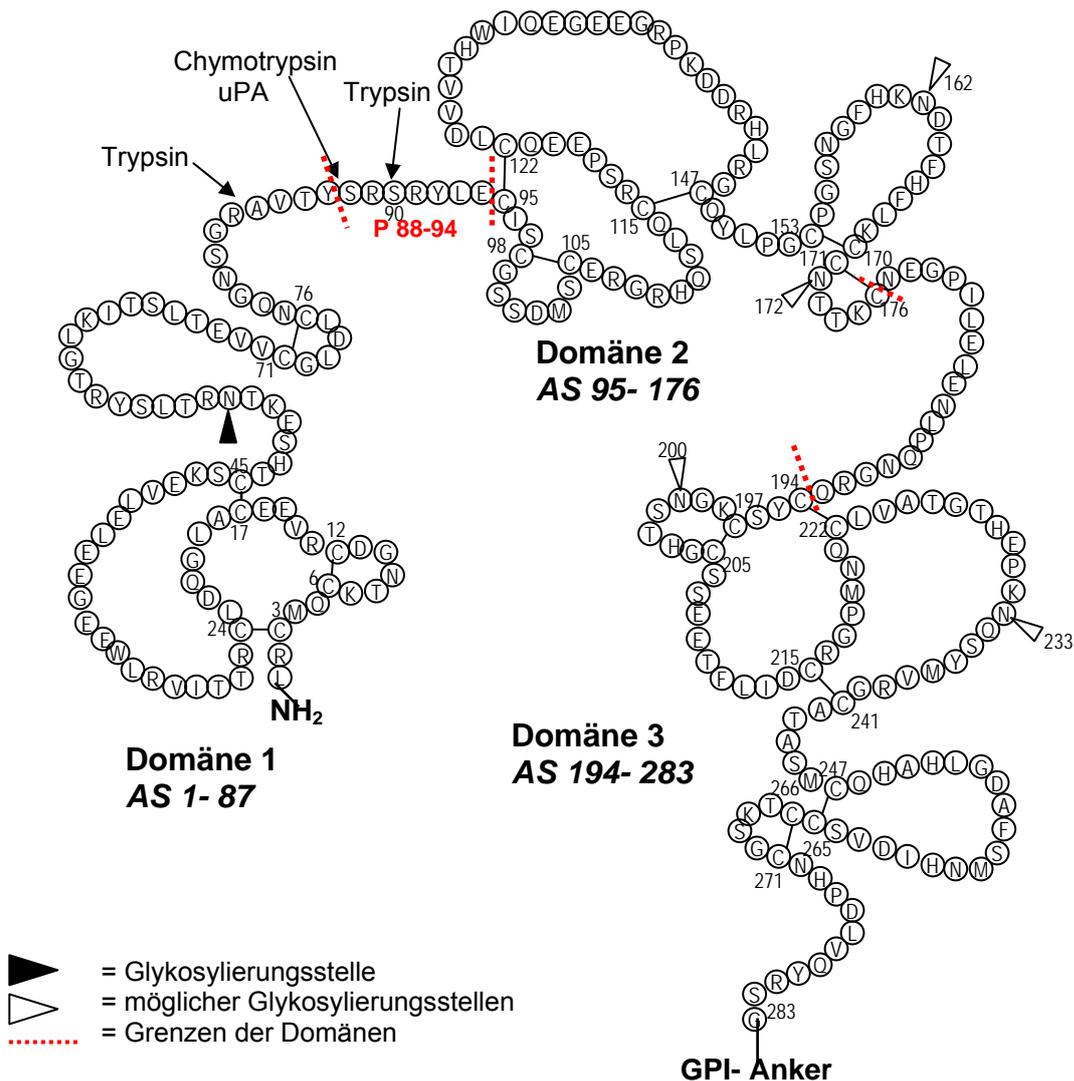


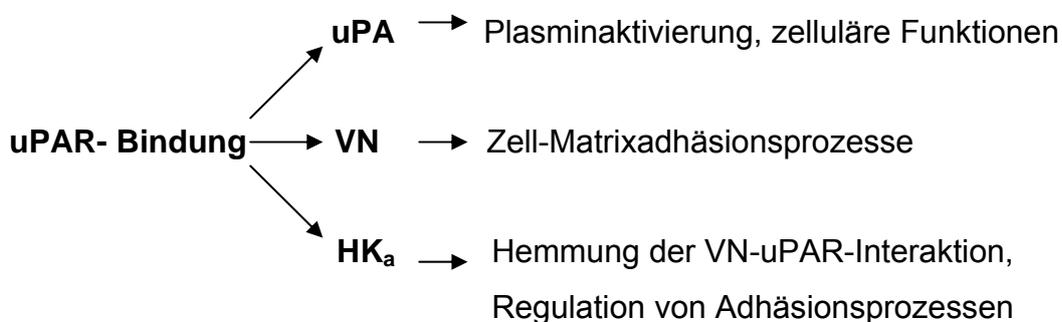
Abb. 5: Aufbau des uPAR-Moleküls. Dargestellt ist die AS-Sequenz mit Markierung der drei homologen extrazellulären Domänen, jeweils mit Angabe der Aminosäureanzahl sowie der Disulfidbindungen. Am COOH-terminalen Ende der Peptidkette schließt sich der Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker an. Typische Glykosylierungsstellen und die Angriffspunkte der Proteasen Trypsin und Chymotrypsin sowie die Peptidsequenz 88-94 zwischen Domäne 1 und 2 sind hervorgehoben.

Wie in Abb. 5 ersichtlich befinden sich zwischen den Domänen 1 und 2, sowie zwischen Domäne 2 und 3 kurze AS-Ketten, welche den eigentlichen Proteindomänen nicht zugeordnet sind. Der AS-Sequenz 88-94 steht eine besondere Bedeutung zu, da sich in diesem Abschnitt mehrere Angriffspunkte für verschiedene Proteasen wie Trypsin, Chymotrypsin und auch uPA befinden. Durch spezifische Proteolyse kann demnach das bereits in 1.3.3 beschriebene Peptid 88-94 aus dem

Rezeptorprotein ausgeschnitten werden, wobei die Liganden-bindende Domäne 1 von dem Gesamtprotein abgespalten wird und der sog. D2/D3-uPAR-Komplex übrig bleibt.

Liganden des uPAR sind sowohl die inaktive einkettige Variante wie auch die aktive hochmolekulare Form der Urokinase, welche an Domäne 1 des Urokinaserezeptors binden. Interessanterweise stellt auch das Matrixprotein Vitronektin einen Bindungspartner für den Urokinaserezeptor dar, wofür ebenfalls Domäne 1 des Rezeptors die Bindungsstelle beinhaltet (Behrendt et al., 1991). Diese Eigenschaft lässt eine Bedeutung von uPAR als Adhäsionspartner für Zell-Matrix-Interaktionen bereits vermuten.

Ein weiterer Ligand für uPAR ist die Kinin-freie, hochmolekulare Form von Kininogen (HMW-Kininogen, Hk_a) (Chavakis et al., 2002). Dieses entsteht nach Kallikrein-abhängiger Abspaltung des Vasodilatators Bradykinin aus Kininogen. Hk_a und Vitronektin kompetieren als Bindungspartner für uPAR, sodass in Anwesenheit von hochmolekularem Kininogen keine uPAR-Vitronektin-Interaktion möglich ist und Hk_a als antiadhäsiver Faktor interpretiert werden muss.



Schema 3: uPAR-Ligand-Interaktion und entsprechende Funktionen.

In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Affinität des kompletten Rezeptors für seine Liganden um ein Vielfaches höher ist, als die Bindungskapazität der Domäne 1 alleine, sodass für eine effektive Ligand-Rezeptorinteraktion der intakte uPAR mit allen drei Domänen notwendig zu sein scheint (Ploug et al., 1994; Behrendt et al., 1996; Bdeir et al., 2000; Liang et al., 2001). Inwiefern die Domänen 2 und 3 allerdings die Affinität des Rezeptors zu seinen Liganden verändern, ist noch nicht vollends geklärt. Ausnahme ist die

Bindungsfähigkeit von uPAR zu Hk_a , da auch nach Abspaltung der Domäne 1 des Rezeptor der D2/D3-uPAR-Komplex interessanterweise eine unbeeinträchtigte Hk_a -Bindungsfähigkeit aufweist (Chavakis et al., 2000).

Ein wichtiges Charakteristikum des Urokinaserezeptors ist seine Verankerung in der Zellmembran, welche aus einem Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Lipidanker am COOH-Terminus des Proteins besteht (Abb. 6). Damit ist die Position des Rezeptors im äußeren Blatt der Doppellipidmembran einer Zelle lokalisiert; eine transmembranäre Rezeptordomäne bis in den Zytosolraum fehlt (Ploug et al., 1991). Durch eine Glycosylphosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C (PLC) kann die Proteineinheit des uPAR am COOH-Terminus von dem GPI-Anker getrennt werden. So entsteht eine lösliche Form des uPA-Rezeptors (soluble uPAR= suPAR), welcher der GPI-Anker fehlt, bei jedoch erhaltener Ligandenbindungsfähigkeit.

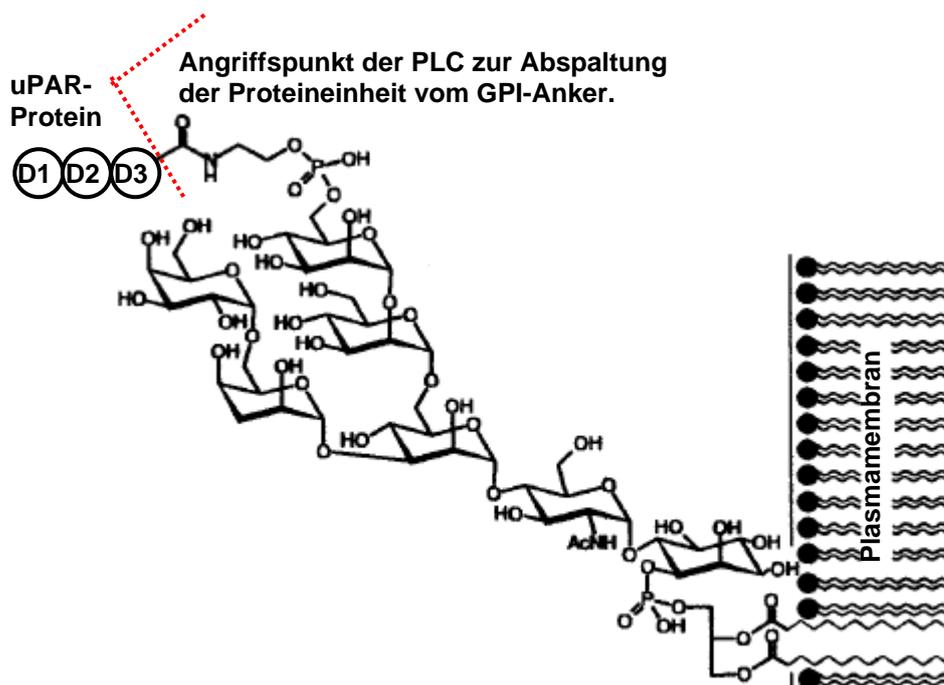


Abb. 6: Struktur des GPI-Ankers mit charakteristischer Verankerung im äußeren Blatt einer Doppellipidmembran. Markiert ist ebenso die Angriffsstelle der Phospholipase C, welche den GPI-Anker von der Proteineinheit lösen kann.

Über mögliche spezifische Funktionen des Lipidankers wird derzeit noch intensiv diskutiert. Durch die GPI-Verankerung wird eine relativ hohe laterale Mobilität des

Rezeptors in der Zellmembran erreicht. Andererseits weiß man von der Bildung besonders Lipid- und Cholesterin-reicher Inseln und Signalosomen innerhalb einer Zellmembran, wo es zu Kontakten intra-und transmembranärer Proteine/ Rezeptoren mit intrazellulären Signalproteinen kommen kann. Sphingolipide, Ganglioside aber auch GPI-verankerte Proteine sind häufig Bestandteil dieser sog. lipid rafts (Harder et al., 1997; Simons et al., 2000) sodass die Akkumulation des uPAR in solchen Lipidinseln für die Funktionsfähigkeit von Bedeutung sein mag.

1.4 Zelluläre Funktionen des uPA-/uPAR-Systems

1.4.1 uPA-/uPAR-Expression

Bislang fokussierte sich die Beschreibung des uPA-/uPAR-Systems primär auf die Proteolyseaktivität und Plasmin-Regulation. Die ausgeprägte Zellvielfalt, auf welcher der Urokinaserezeptor zu finden ist, lässt jedoch vielseitige Funktionen des Systems vermuten.

Passend dazu zeigte sich eine Überexpression von uPA und uPAR in Regionen verstärkter Umbauprozesse wie entzündlichen Geweben, atherosklerotischen Plaques, in Wundheilungsprozessen, aber auch in Tumorgeweben (Andreasen et al., 2000). Ursächlich beteiligt daran sind inflammatorische Mediatoren wie TNF- α , IL-1 und IL-8 (Feliciani et al., 2003; Han et al., 2002). Aber auch hypoxisches Milieu sowie der Einfluss von Wachstumsfaktoren wie z.B. VEGF verstärken die Expression von uPA und seinem Rezeptor (Kroon et al., 1999, 2000).

Untersuchungen an Tumorzelllinien, u.a. Mamma-, Prostata-, Colonicarcinomzellen, aber auch vaskulären glatten Muskelzellen und Monozyten zeigten, dass der Urokinaserezeptor besonders an Zellausläufern verstärkt exprimiert wird, welche in Kontakt mit benachbarten Zellen oder der extrazellulärer Matrix stehen (Blasi et al., 1988; Stephens et al., 1989; Pollänen et al., 1988; Andreasen et al., 1997). Diese Kontakte spielen für Prozesse wie Zelladhäsion und Migration eine wichtige Rolle, sodass für das uPA-/uPAR-System eine Beteiligung an diesen Funktionen postuliert wurde. Zunächst sah man in dieser Fokussierung nur die Konzentrierung proteolytischer Aktivität an den Füßchenausläufern (Plasmopodien) der Zellen. Immunopräzipitationen und immunhistochemische Färbungen ergaben jedoch mehrfach eine Colokalisation von uPAR und Zelladhäsionsproteinen, wie den

Integrinen. So wuchs der Gedanke, das uPA-/uPAR-System könnte eigene, spezifische Funktionen haben, welche unabhängig vom Plasminsystem und der proteolytischen Aktivität des Urokinasesystems sind.

1.4.2 uPAR und Zelladhäsion

Durch den Nachweis der Kollokationen zwischen uPAR und Zelladhäsionsproteinen wurde eine regulatorische Wirkung des uPAR auf Adhäsionsprozesse, insbesondere auf Integrinfunktionen postuliert, welche hier näher erörtert werden soll.

Integrine sind transmembranär verankerte Membranproteine, welche aus zwei Untereinheiten, einer α - und einer β -Kette bestehen, und in obligater Gegenwart divalenter Kationen wie Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} mit hoher Spezifität an extrazelluläre Matrixproteine (Fibronektin, Fibrinogen, Vitronektin, Laminin, Kollagen, vWF u.a.) aber auch Zellmembranrezeptoren, spezifischen Proteinen der Immunglobulinfamilie (intercellular adhesion molecules; ICAMs) binden. Somit sind Integrine essentiell für Zell-Matrix- wie auch Zell-Zell-Interaktionen. Die Bindung von Integrinen an die entsprechenden Matrixproteinen ist typischerweise abhängig von einer RGD- (Arginin-Glycin-Glutamat) Sequenz auf den entsprechenden Bindungsproteinen.

Durch die intrazelluläre Domäne stehen Integrine in direkter Verbindung zu zytoskelettären Proteinen wie Talin, Vinculin oder Aktin (Abb. 7). Sie können außerdem in der Zellmembran untereinander wie auch mit zahlreichen anderen Membranproteinen wie Caveolin, IAP (integrin associated protein), TM_4 (four-transmembrane receptor) akkumulieren (Giancotti et al., 2000) und somit an der Bildung von Adhäsionskomplexen beteiligt sein.

Abbildung 7 stellt schematisch einen Integrinfunktionskomplex dar.

Über die β -Untereinheit, welche eine größere intrazelluläre Domäne besitzt kommunizieren Integrine u.a. mit Talin, welches wiederum Kontakt zu Vinculin und Aktin herstellt. Insbesondere Vinculin kann zusätzlich Signalproteine an sich binden, sodass über veränderte Integrin-Zytoskelettverknüpfungen Wirkungen auf die intrazelluläre Signalweiterleitung entstehen. Dabei sind sowohl outside-in Signalwege nach Integrin-Ligand-Interaktion möglich, wie auch inside-out vermittelte Veränderungen der Integrin-Affinität zu ihren Liganden nach intrazellulären Veränderungen des Zytoskeletts.

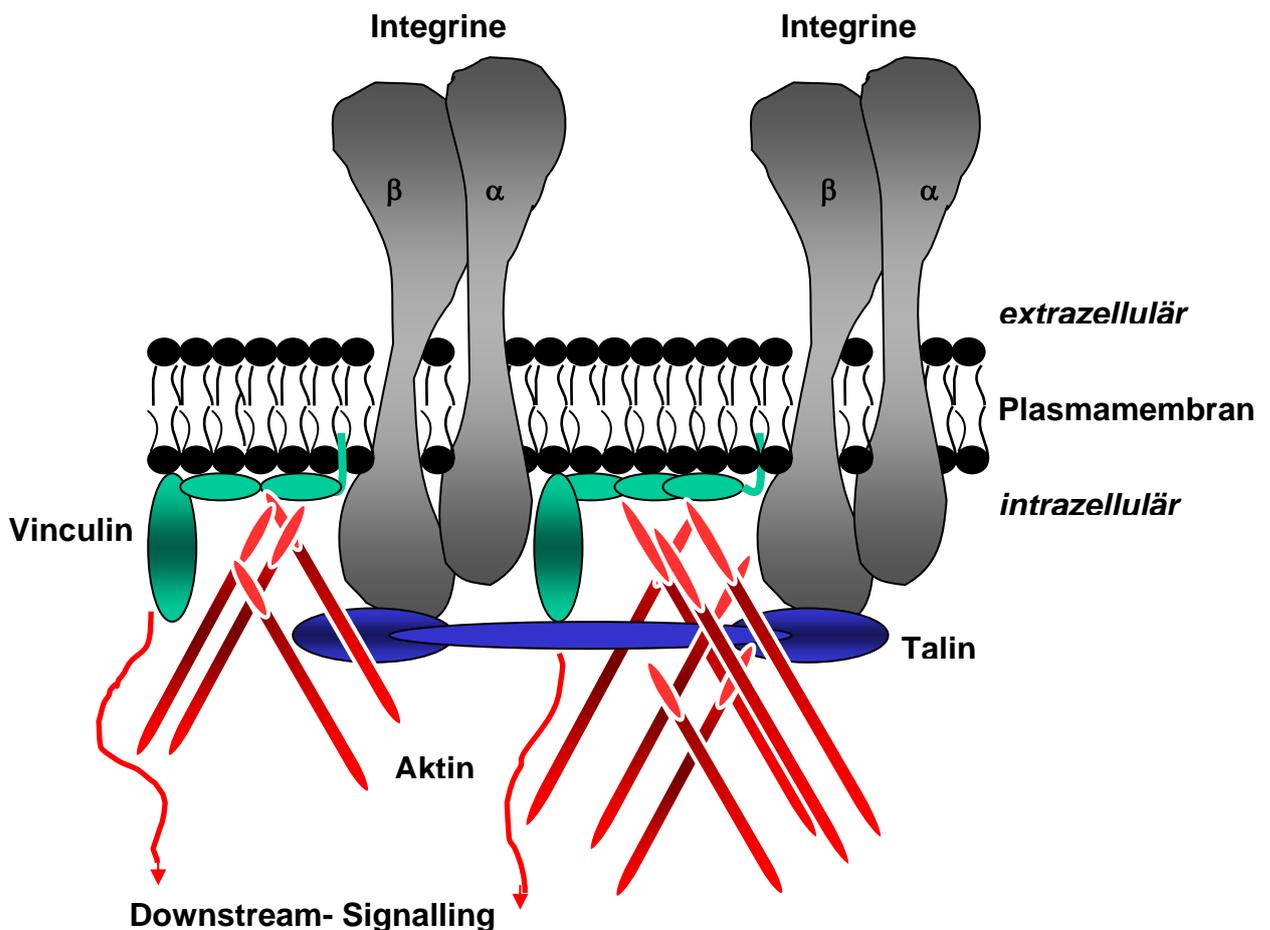


Abb. 7: Beispielhafte Darstellung einer Integrinverankerung in der Zellmembran mit entsprechender Verbindung zu intrazellulären Zytoskelettproteinen.

Durch Integrine wird unter anderem das Haften von Leukozyten an den Endothelzellen vermittelt, bevor sie in entzündliche Gewebe einwandern. Die Bindung von Fibrinogen an Thrombozyten im Rahmen von Koagulationsprozessen ist ebenfalls ein Integrin-vermittelter Prozess und führt zu Veränderungen des Zytoskeletts wie auch zur Aktivierung von Signaltransduktionsprozessen. Insbesondere Signalpeptide aus der Gruppe der src-Kinasen, aber auch G-Protein-vermittelte Signalkaskaden können Integrin-vermittelt aktiviert werden (Newham et al., 1996; Giancotti, 2000; Schlaepfer et al., 1998).

Insgesamt ist die Regulation von Integrinfunktionen bislang nur teilweise verstanden. uPAR wurde in Assoziation mit β_1 -, β_2 -, β_3 - und β_5 -Integrinen (Yebra et al., 1999; Carriero et al., 1999) auf Zellmembranen identifiziert und kann auf noch nicht ganz

geklärte Weise die Bindungsfähigkeit der Integrine zu ihren Liganden verändern und deren Funktionsfähigkeit beeinflussen (Nguyen et al., 1999). So beschrieben May et al. 2000 und Zhang et al. 2003 die notwendige Interaktion zwischen dem β_2 -Integrin Mac-1 (CD11b/CD18; macrophage antigen-1) und uPAR für den Aufbau einer stabilen Bindung von Monozyten auf Endothelzellen (Zell-Zell-Interaktion), bzw. von Epithelzellen auf Fibrinogen (Zell-Matrix-Interaktion). Da β_2 -Integrine auf Leukozyten überwiegen, ist die Regulation ihres Aktivitätszustandes ein essentieller Schritt für die Rekrutierung von Leukozyten in entzündliche Gewebe.

Simon et al. beschrieben 2000 die Identifikation einer direkten Bindungsstelle von uPAR mit β_1 - und β_2 -Integrinen, welche als sog. peptide 25 der Aminosäuresequenz 424-440 der CD11b-Domäne von Mac-1 entsprach. Eine lösliche Form des peptide 25 vermochte kompetitiv die Assoziation von β_1 -Integrinen und uPAR zu verhindern. Postuliert man uPAR als direkten Integrinliganden, so ist vorstellbar, dass er sowohl in cis-Konfiguration in die Integrinfunktion der Rezeptor-exprimierenden Zelle eingreift, aber auch in trans-Konfiguration mit Integrinen benachbarter Zellen eine Bindung eingehen kann und somit an Zell-Matrix-, wie auch an Zell-Zellinteraktionen beteiligt ist.

uPAR exprimierende Zellen zeigen außerdem eine vermehrte Bindung an Vitronektin (VN). Dieses Matrixprotein, welches als monomere Form im Plasma aber vor allem als multimerer oder auch denaturierter, geöffneter Form vermehrt extravaskulär in Inflammationsgeweben wie auch bei Wundheilungsprozessen zu finden ist, stellte sich als direkter Bindungspartner des Urokinaserezeptors heraus (Wei et al., 1994; Kanse et al., 1996). Die Bindungsdomäne für Vitronektin befindet sich ebenso wie für uPA in Domäne 1 des uPA-Rezeptors, kompetiert jedoch nicht mit selbiger. Vielmehr zeigen uPA-stimulierte Zellen mitunter eine erhöhte Affinität zu VN. Umgekehrt befindet sich die Bindungsstelle für uPAR in der N-terminal gelegenen sog. Somatomedin B (SMB)-Domäne von Vitronektin und ist abhängig von spezifisch sulfatierten Tyrosinresten (Okumura et al., 2002).

Die Integrinbindungsstelle auf Vitronektin enthält als Pendant eine RGD-Sequenz und entspricht somit einer typischen Integrin-Matrixbindung, welche auf die Anwesenheit divalenter Kationen angewiesen ist. Beide Vitronektinbindungsareale stehen jedoch nicht in Wechselwirkung miteinander, sondern scheinen interessanterweise völlig unabhängig voneinander vorzuliegen.

Ebenfalls in der SMB-Domäne von Vitronektin befindet sich allerdings eine Bindungsstelle für PAI-1, sodass es zur kompetitiven Hemmung der uPAR-Vitronektin-Interaktion in Gegenwart von PAI-1 kommt, was einen antiadhäsiven Regulationsmechanismus darstellt. In 1.3.4 wurde hochmolekulares Kininogen (HK_a) bereits als Ligand von uPAR beschrieben, welcher die VN-uPAR-Interaktion stört und somit ebenfalls anti-adhäsiv wirkt. Vitronektin selbst kann über seine N-terminale SMB-Domäne HK_a binden und dadurch PAI-1 aus der VN-Interaktion lösen. Somit bedingt das Vorliegen von HK_a die Präsenz zweier antiadhäsiver Faktoren, HK_a selbst sowie PAI-1, und führt gleichzeitig durch die Freisetzung von PAI-1 zur Hemmung von uPA.

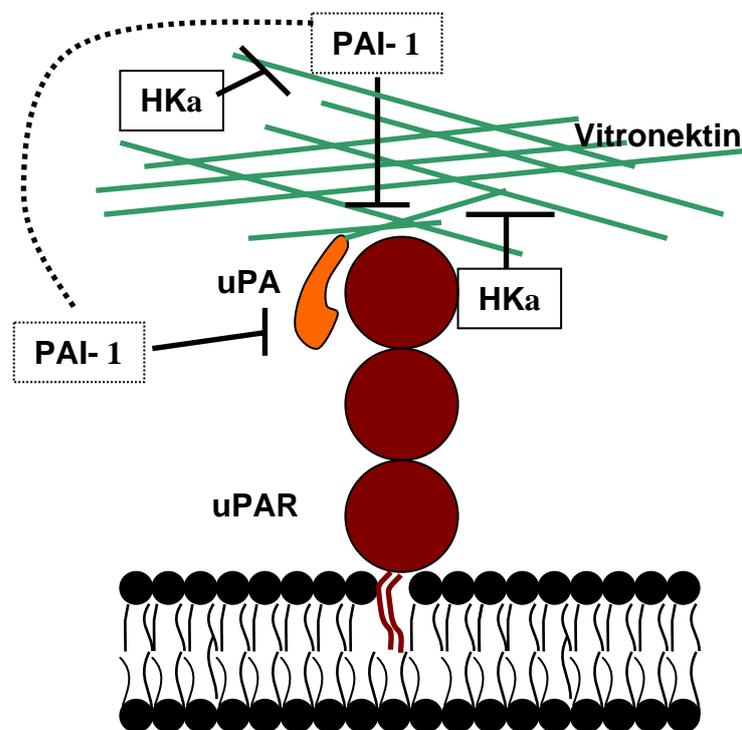


Abb. 8: Antiadhäsive Funktion von PAI-1 und HK_a bei der uPAR-VN-Interaktion.

Es wird deutlich, dass das uPA-/uPAR-System auf komplexe Weise in Zelladhäsionsprozesse einzugreifen vermag und an deren Regulation wesentlich beteiligt ist.

1.4.3 uPAR und Zellmigration

Die Regulation von Zelladhäsionsprozessen ist eng verknüpft mit dem Ausmaß an möglicher Zellmobilität, sodass in weiteren Studien der Einfluss des uPA-/uPAR-Systems auf Zellmigrations- und Proliferationsgeschehen untersucht wurde.

Das Ausmaß der Motilität und/oder Proliferation zahlreicher Tumorzelllinien zeigte sich *in vitro* durch eine Aktivierung des uPA-/uPAR-Systems beeinflusst (Mc Donald et al., 1998; Nakata et al., 1998). Interessanterweise wird eine verstärkte Expression von uPAR spezifisch auf entarteten Zellen im Vergleich zum Ursprungsgewebe eines Tumors gefunden, was eine Eigenschaft eines besonders invasiven Phänotyps einer Tumorzelle zu sein scheint (Fisher et al., 2000).

Initial wurde die motilitätssteigernde Wirkung der uPA-/uPAR-Interaktion primär durch den Plasmin-aktivierenden Effekt und die fokussierte Proteolyse durch gegenseitige Wechselwirkung des Plasmin- und uPA-Systems erklärt. Mukhina et al. postulierten 2000 jedoch eine rein chemotaktische Wirkung der Kringeldomäne von uPA auf humane epitheliale Nierenzellen (HEK293). In einer weiteren Arbeit der gleichen Autoren wurde diese Wirkung wiederum der GFD zugeschrieben, sodass die Ergebnisse bezüglich des genauen Regulationsmechanismus fraglich bleiben.

Kanse et al. konnten bereits 1997 eine proliferationssteigernde Wirkung von uPA auf glatte Gefäßmuskelzellen (VSMC) zeigen. Dieser Zelltyp spielt v.a. bei entzündlichen Gefäßwandprozessen wie der Entwicklung atherosklerotischer Plaques, Neointimabildung und postinterventioneller Restenose eine Rolle. Es kommt zur vermehrten Einwanderung und Proliferation der VSMC in die Intima, sowie zur Akkumulation von Entzündungszellen, welche wiederum chemotaktisch wirkende Entzündungsmediatoren wie IL-1 und TNF- α freisetzen können (Ross et al., 1993).

Die Beteiligung des uPA-/uPAR-Systems an Zellmobilitäts- und -zyklusprozessen weist Funktionen auf, die unabhängig von der proteolytischen Aktivität sind.

Eine zentrale Frage dabei ist jedoch, wie der Mechanismus der Informationsvermittlung in die Zelle nach uPA-Bindung an seinen Rezeptor funktionieren soll, da uPAR keine transmembranäre Domäne besitzt.

Eine interessante These wurde von der Arbeitsgruppe des Francesco Blasi postuliert. Eine durch uPA-Bindung an seinen Rezeptor initiierte Konformationsänderung des uPA-/uPAR-Komplexes sollte die Freilegung eines Adapter-bindenden Neopepitops hervorrufen. Unterstützung fand diese These, als

Resnati et al. 1996 einen chemotaktischen Effekt einer proteolytisch veränderten löslichen uPAR-Form auf humane Monozyten beschrieben. Nach proteolytischer Abspaltung von Domäne 1 des uPA-Rezeptors durch Urokinase selbst, Trypsin oder Chymotrypsin wird die Verbindungssequenz zwischen Domäne 1 und 2, das bereits beschriebene peptide 88-94 exprimiert. Dieses Peptid wurde neben seiner möglichen chemotaktischen Wirkung auch als Induktor von Signalaktivierungskaskaden sowie als möglicher Ligand des G-Protein gekoppelten FMLP-Rezeptors beschrieben (Resnati et al., 1996; Fazioli et al., 1997; Sidenius et al., 2002).

Insgesamt ist die Suche nach einem möglichen und notwendigen Adapterprotein äußerst interessant und erscheint eine logische Konsequenz der fehlenden Zytosol-Verbindung des Urokinaserezeptors zu sein. Da die Untersuchungen über das Urokinasesystem bereits mehrfach gezeigt haben, dass eine relative Zellspezifität der Ergebnisse vorzuliegen scheint, bleibt jedoch die Frage, inwiefern sich die Ergebnisse von Resnati und Blasi et al. auf andere Zellmodelle übertragen lassen.

1.4.4 uPAR und Signalaktivierung

Unbeachtet der noch ungelösten Frage, wie eine Signalaktivierung über die Ligand-uPAR-Interaktion vonstatten gehen kann, steht mittlerweile außer Frage, dass sie dennoch funktioniert. Zum einen, weil die Regulation von Zelladhäsion, -migration und -proliferation einen komplexen Mechanismus darstellt, an welchem intrazelluläre Signalaktivierungskaskaden beteiligt sein müssen (Gyetko et al., 1999; Ribatti et al., 1999). Zum anderen, weil mittlerweile zahlreiche Publikationen vorhanden sind, die dies belegen (siehe auch Tab.3, S.29). Chiardonna et al. konnten 1999 eine p56/59 (hck)-abhängige Regulation von myelomonozytärer Adhäsion versus Motilität in uPAR stimulierten Zellen zeigen. Eine Reihe uPA inkubierter Zellen (VSMC, Tumorzellen, Monozyten) weisen außerdem zytoskelettale Veränderungen im Sinne von Filopodienbildung auf, was eine Wirkung jenseits der proteolytischen Aktivität voraussetzt. *Vice versa* können Reorganisationsprozesse des Zytoskeletts zur vermehrten Expression des uPA-Gens führen (Irigoyen et al., 1999), was eine Vernetzung des uPA-/uPAR-Systems mit Zellmotilität und Signalaktivierung zeigt.

In Immunopräzipitationsversuchen wurde die Assoziation von uPAR und Signalproteinen wie Src-Kinasen und Proteinen der JAK/STAT-Familie deutlich (Dumler et al., 1998). Ebenso konnte die direkte Aktivierung von Erk (extracellular

regulated kinase)/MAPK (mitogen activated protein kinase) oder kleinen GTPasen wie Rac/Rho in verschiedenen Zelltypen, u.a. Mammacarcinomzellen, Fibroblasen, Endothelzellen und VSMC, initiiert werden (Kjøller et al., 2001; Nguyen et al., 2000; Dumler et al., 1998; Kanse et al 1997).

Signalkomponenten in uPA-/uPAR- oder uPA-/uPAR-Integrin Komplexen

Signalproteine	Zelltyp	Funktion	Referenzen
FAK-Cas-Paxillin	LNCaP, EC	Migration	1,2
FAK, Src, ERK	MCF-7, HEK293	Adhäsion, Migration	3,4
PKC δ -ERK	PC12	Differenzierung	5
Ras-ERK	MCF-7(uPAR)	Migration	6
Src-Shc-SOS-,Ras-Mek-ERK	MCF-7	Migration	3
Mek-ERK	MCF-7, HEK 293	Adhäsion, Migration, Tumorwachstum	4,6,7,8
Mek-ERK-MLCK	MCF-7(uPAR)	Migration	6
Mek-ERK	VSMC	Proliferation	15
Hck-fgr	U937	Chemotaxis, Adhäsion, Differenzierung	9,10
Hck-G $\alpha\beta\gamma$	THP-1, VSMC	Chemotaxis, Differenzierung	10,11
Hck-ERK/p38	HT-1080	PAI-2 Expression, c-fos	12
P38	HT 1080, Hep3	PAI-2 Expression, c-fos, Tumorwachstum	12,7
Jak/Stat family	VSMC, EC	Transkription, DNA- Synthese	13,14
Caveolin	THP	Adhäsion	4
PI-3K, Tyk2, RhoA	VSMC	Migration	16
PI-3K, G $_i$, PLC, Ca/CalmK	VSMC	Migration	17

Tabelle 3: Übersicht uPAR-aktivierter Signalkomponenten. Teilweise entnommen aus Ossowski L et al., *Curr Opin Cell Biol* 2000 mit eigenen Ergänzungen.

Ergänzungen zu Tabelle 3:

Zellen: EC=Endothelzellen; HEK 293=human epithelial kidney; Hep3=human squamöses Carcinom; HT1080=humanes Fibrosarkom; LNCaP=humanes Prostatacarcinom; MCF-7=humanes Mammacarcinom; MCF-7(uPAR) mit uPAR-Überexpression; PC12=Phäochromozytom; THP-1=humane Monozyten; U937=humane Myelomonozyten; VSMC=vaskuläre glatte Gefäßmuskelzellen.

Referenzen: **1** Tang et al., 1998; **2** Yebra et al., 1999; **3** Nguyen et al., 2000; **4** Wei et al., 1999; **5** Farias- Eisner et al., 2000; **6** Nguyen et al., 1999; **7** Aguirre Ghiso et al., 1999; **8** Chapman et al., 1999; **9** Chiardonna et al., 1999; **10** Fazioli et al., 1997; **11** Degryse et al., 1999; **12** Blasi et al., 1999; **13** Koshelnik et al., 1997; **14** Dumler et al., 1998, **15** Kanse et al., 1997; **16** Kiian et al., 2003; **17** Petzinger et al., 2001.

Die in 1.4.3 beschriebene These eines notwendigen Adapterproteins zur Vermittlung uPAR-abhängiger zellulärer Funktionen kann auch auf die entsprechend notwendigen Signalaktivierungsvorgänge wie 2nd-messenger-Aktivierung oder Phosphorylierungsprozesse übertragen werden. Neben der noch fraglichen Funktion des beschriebenen Peptids 88-94 werden als mögliche Adapter Transmembranproteine wie Integrine, LRP und Caveolin diskutiert, da hier eine direkte Assoziation mit uPA-/uPAR beschrieben ist.

Die Bedeutung von Caveolin für die β_1 -Integrin vermittelte, uPAR-abhängige Signalaktivierung wurde 1999 von Chapman et al. und Wei et al. nachgewiesen, sodass dieses Protein kurz beschrieben werden soll. Caveolin ist ein ca. 21kD schweres Membranprotein, welches die Fähigkeit besitzt, Cholesterin sowie unterschiedliche Signalproteine, darunter c-Src und G-Proteine, zu binden (Okamoto et al., 1998; Parton et al., 1996). Es besitzt eine sog. „scaffolding domain“, welche die Einbettung in die Plasmamembran vermittelt und für die Bildung von Homo-Oligomeren verantwortlich ist. Dadurch formieren sich Caveolin- und Cholesterinreiche Mikrodomänen in der Membran, welche Caveolae (= Grübchen) genannt werden. GPI-verankerte Proteine, wie der Urokinaserezeptor eines ist, neigen zur Akkumulation in lipidreichen Membraninseln. Dies könnte die räumliche Assoziation von uPAR mit Caveolin vereinfachen und auf eine funktionelle Bedeutung des GPI-Ankers hinweisen.

Allerdings können auch Zellen, die kein Caveolin exprimieren, lipidreiche Membrandomänen, sog. lipid rafts bilden, sodass diese von typischen Caveolae unterschieden werden müssen (Simons et al., 2000).

Diese Lipiddomänen spielen ebenfalls für zahlreiche Signalaktivierungsprozesse eine Rolle (Horejsi et al., 1999; Harder et al., 1997). Im Hinblick auf die Konzentration von Cholesterin und Sphingolipiden sowie beteiligten Membranproteinen und Rezeptoren sind Caveolae und lipid rafts zwar ähnlich, allerdings gab es immer wieder Diskrepanzen bezüglich der Organisation GPI-verankerter Proteine in diesen lipidreichen Membraninseln (Schnitzer et al., 1995). Caveolin darf dennoch als attraktive Möglichkeit eines Adapterproteins für die β_1 -Integrin-vermittelte, uPAR-abhängige Zelladhäsion und die notwendige Signalaktivierung betrachtet werden.

Letztendlich hat sich immer wieder bestätigt, dass uPA-/uPAR-vermittelte zelluläre Funktionen einschließlich der notwendigen Signalprozesse eine hohe Zellspezifität aufweisen, sodass die Aktivierungskaskaden einer Zelllinie und die daraufhin

folgenden Effekte nicht ohne weiteres auf eine andere Zellart übertragen werden können. Dies kann auch bedeuten, dass unterschiedliche Zellarten unterschiedliche Adapterproteine verwenden, sodass die Antwort wahrscheinlich nicht in einem universellen Protein zu suchen ist, sondern immer auf die besonderen Funktionen der jeweiligen Zelle bezogen werden muss.

In Abb. 9 werden die beschriebenen zellulären Funktionen des uPA-uPAR-Systems abschließend schematisch zusammengefasst.

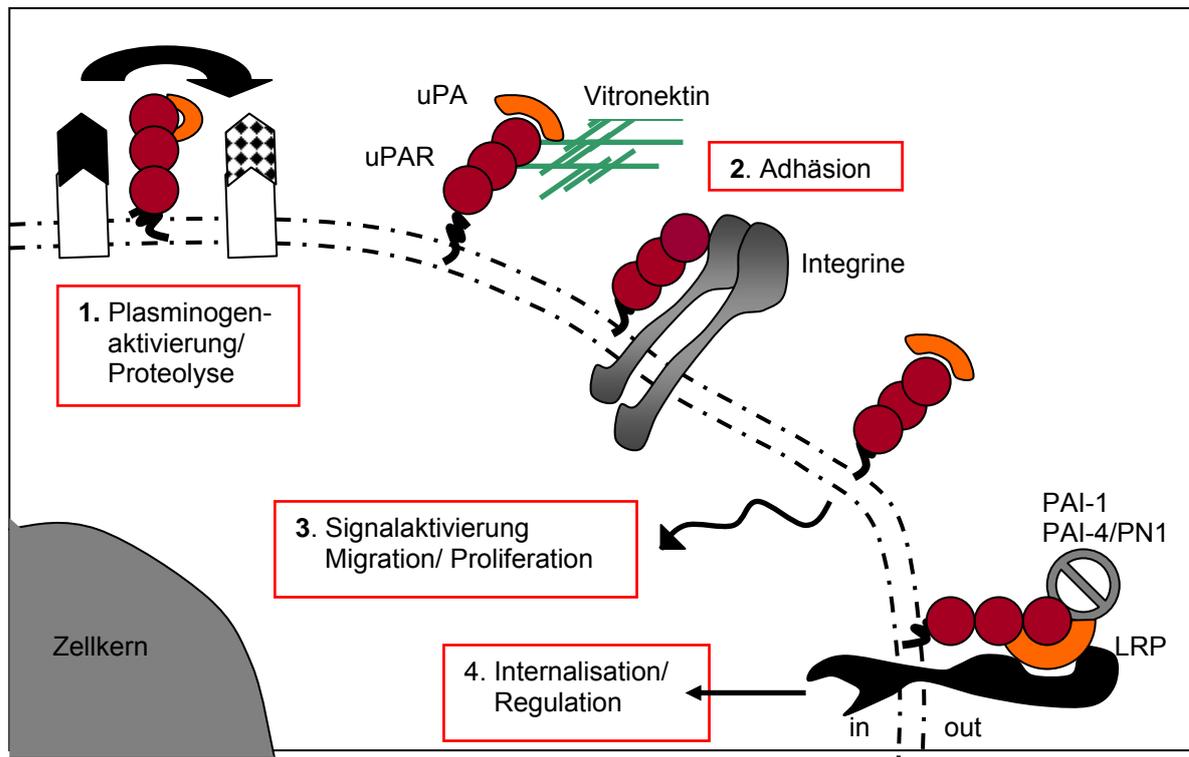


Abb. 9: Schematische Darstellung zellulärer Funktionen des uPA-uPAR-Systems.

1.5 Fragestellungen dieser Arbeit

Wie Kapitel 1 gezeigt hat, sind die Funktionen des uPA-/uPAR-Systems vielfältig und dennoch nur begrenzt untersucht und verstanden. Von besonderem Interesse erscheinen die zellulären Funktionen der Zelladhäsion und -migration und die damit verbundenen Signalkaskaden. Dabei ist die Fähigkeit des uPAR, neben uPA und Kininogen auch Vitronektin als extrazelluläres Matrixprotein direkt binden zu können, eine Besonderheit dieses Rezeptors. Da es sogar zusätzliche Regulationsmöglichkeiten und spezifische anti-adhäsive Faktoren gibt, erscheint diese Bindungsfähigkeit Teil eines komplexen Adhäsions-Regulator-Systems zu sein. Das Verständnis dieses Systems ist Ziel der ersten Fragestellung der vorliegenden Arbeit:

1.) Wie funktioniert uPAR-vermittelte Zelladhäsion insbesondere auf Vitronektin? Liegt hierbei nur eine semistabile Bindung vor, oder kann uPAR als eigenständiges Adhäsionsmolekül dienen, Komplexe mit zytoskelettalen Proteinen bilden und somit eine stabile Zell-Matrixinteraktion vermitteln? Ist für die Ausbildung solch eines Adhäsionskomplexes die Anwesenheit von Integrinen erforderlich oder spielt vielmehr die typische Membranintegration des uPA-Rezeptors mit seinem GPI-Anker eine Rolle in uPAR-abhängiger Formation von Adhäsionskomplexen?

Regulierte Zelladhäsionsprozesse sind meist die Grundvoraussetzung für zelluläre Migration, da nur so die notwendige Balance zwischen ausreichender Fixierung und Mobilisierung einer Zelle erreicht werden kann.

Durch Stimulation glatter Muskelzellen mit uPA konnte eine vermehrte Proliferation und Migrationsfähigkeit der Zellen erreicht werden; wohlgemerkt sind beide Funktionen essentielle Reaktionen im Rahmen gefäßpathologischer Prozesse. Die Aufklärung der Frage, wie das uPA-/uPAR-System Zellmigration beeinflusst, ist der zweiten Fragestellung dieser Arbeit gewidmet.

2.) Wie funktioniert uPAR-vermittelte Migration glatter Gefäßmuskelzellen, wenn man postuliert, dass die Wirkung nicht ausschließlich auf eine vermehrte Plasminaktivität zurückzuführen ist? Welche spezifischen, signalaktivierenden Prozesse sind an uPAR-vermittelter Zell-Migration beteiligt?

2 Material & Methoden

2.1 Reagenzien

Antikörper (monoklonal (mAB), polyklonal (pAB)):

Anti- human-uPAR (pAB)	Dr. D. Cines (Pennsylvania, Philadelphia, USA)
Anti- β_1 -Integrin/ CD 29 (M106, mAB)	Santa Cruz (Heidelberg, D)
Anti- β_1 -Integrin /CD 29 (K20, mAB)	Dako (Hamburg, D)
Anti- β_2 -Integrin/ CD 18 (CTB104, mAB)	Santa Cruz (Heidelberg, D)
Anti- β_2 -Integrin (Game 46, mAB)	Pharmingen (Hamburg, D)
Anti- c-Src (SRC-2, pAB Kaninchen)	Santa Cruz (Heidelberg, D)
Anti- G(α) (pAB Kaninchen)	Santa Cruz (Heidelberg, D)
Anti- Talin (C-20, pAB Ziege)	Santa Cruz (Heidelberg, D)
Anti- Aktin (mAB)	Sigma (Taufkirchen, D)
Anti- Vinculin (mAB)	Sigma (Taufkirchen, D)
Anti- Zytokeratin (PCK-26, mAB)	Sigma (Taufkirchen, D)
Anti- MAPK (pAB, Kaninchen)	Biotech (USA)
Anti- LRP (pAB)	Dr. T. Wilnow (Max- Delbrueck- Centre, Berlin, D)
Anti- Phosphotyrosin (Py20, mAB)	Transduction Laboratories (Heidelberg, D)
Anti- Phospho-MAPK p42/p44 (mAB)	Cell Signalling Technology (Frankfurt/M, D)
Anti- Phospho-Akt/PKB (pAB, Kaninchen)	Cell Signalling Technology (Frankfurt/M, D)

Peptide:

Amino-terminales Fragment (ATF, AS 1-135))	American Diagnostica (Heidelberg, D)
High-molecular-weight uPA (HMW)	American Diagnostica (Heidelberg, D)
Fibronektin und Kollagen 1	Sigma (Taufkirchen, D)
Peptide 88-94 (SRSRYLE)	MWG Biotech (Ebersburg, D)
P 25 (AESTYHHLSLGYMYTLN)*	MWG Biotech (Ebersburg, D)
*(Reinigung mittels High performance liquid Chromatographie, Charakterisierung durch MALDI-TOF (matrix-assistend laser desorption/ ionisation time of flight analysis) Arbeitsgruppe M. Linder, Biochemisches Institut, JLU- Giessen, D)	
PDGFbb (Platelet derived growth factor)	R&D Systems (Wiesbaden, D)
RAP (receptor associated protein)	Dr. T. Wilnow (Max- Delbrueck- Centre, Berlin, D)
Soluble uPAR (suPAR, löslicher uPAR)	Dr. N. Behrendt, G. Hoyer- Hansen (Finsen Laboratory, Copenhagen, Dänemark)
Vitronektin	Isolation und Säulenaufreinigung Biochemisches Institut, JLU- Giessen, D

<u>Inhibitoren/ Pharmaka</u>	<u>Wirkung</u>	<u>Herkunft:</u>
A23	Calcium Ionophore	Calbiochem (Heidelberg, D)
BAPTA/AM	intrazellulärer Ca ²⁺ -Chelator	Calbiochem (Heidelberg, D)
6-Benz-cAMP	membranpermeables cAMP-Analogon	Calbiochem (Heidelberg, D)
Cholesteroxidase	Zerstörung von Lipiddomänen	Calbiochem (Heidelberg, D)
DMS	Hemmung der Sphingosinkinase	Calbiochem (Heidelberg, D)
Forskolin	Stimulator der Adenylatcyclase	Calbiochem (Heidelberg, D)
KN62	Hemmung der Ca/ CalmK II	Calbiochem (Heidelberg, D)
Ly 294002, Wortmannin	Hemmung der PI-3K	Calbiochem (Heidelberg, D)
MBCD	Zerstörung von Lipiddomänen	Calbiochem (Heidelberg, D)
PD 098059	Hemmung der MAPK	Calbiochem (Heidelberg, D)
U73122	Hemmung der PLC β,γ	Calbiochem (Heidelberg, D)
Pertussistoxin	Hemmung von G _i - Proteinen	Sigma (Taufkirchen, D)

Zellkulturmedien/ Bedarfmaterial:

ECL	Amersham Pharmacia (Freiburg, D)
PVDF-Membranen (Elektrophorese)	Amersham Pharmacia (Freiburg, D)
Antibiotika (Penicillin, Streptomycin)	Calbiochem (Heidelberg, D)
G418 (Geneticin)	Calbiochem (Heidelberg, D)
PVPF-Membranen (Migrationsassays)	Corning-Costar/ Whatman (Bodenheim, D)
DMEM	GIBCO (Eggenstein, D)
Fetales Kälberserum (FKS)	GIBCO (Eggenstein, D)
Glutamat	GIBCO (Eggenstein, D)
Iscove`s DMEM	GIBCO (Eggenstein, D)
RPMI 1640	GIBCO (Eggenstein, D)
Zellkulturplatten	Nunc (Roskilde, Dänemark)
Maus-Interleukin-3	Stratham Biotech (Hannover, D)

2.2 Zellkultur

Maus-Prä-B Lymphozytenlinie (BAF3) sowie humane epitheliale Nierenzellen (HEK 293: human epithelial kidney cells) stammen von ATCC (Rockville, MD); humane vaskuläre glatte Muskelzellen (human vascular smooth muscle cells: HVSMC) wurden zuvor von PD S. Kanse mittels Explant-Methode isoliert und durch SMC- α -Actin-Färbung charakterisiert. Murine vaskuläre glatte Muskelzellen (MVSMC) von Wildtyp- und uPAR-knockout Mäusen (MVSMC $-/-$) wurden freundlicherweise von Dr. Roger Lijnen (Universtiy of Leuven, Belgien) zur Verfügung gestellt.

Die Kultivierung der BAF3 Zellen erfolgte in RPMI-1640 Suspension, supplementiert mit Maus-Interleukin-3 2ng/ml, fetalem Kälberserum (FKS) 10% (vol/vol), Penicillin 100 U/ml und Streptomycin 100 µg/ml. Die Zellkulturteilung erfolgte 1-2x/ Woche im Verhältnis 1:10. HEK293 und HVSMC wurden in DMEM Suspension, supplementiert mit FKS 10% (vol/vol), Penicillin 100 U/ml, Streptomycin 100 µg/ml und Natriumpyruvat 1% (wt/vol) kultiviert. Die Teilung der HVSMC-Kulturen erfolgte 1x/ Woche im Verhältnis 1:3, für HEK293 1x/ Woche 1:10. Die MVSMC Kultur enthielt Iscoves DMEM Suspension mit Zusätzen wie oben beschrieben, die Kulturteilung erfolgte hier im Verhältnis 1:10 1x/ Woche. Die uPAR-transfizierten BAF3 und HEK293 Zellen erhielten zur Selektionierung zusätzlich G418 (Geneticin), um weiterhin die Reinheit der transformierten Kulturen zu gewährleisten. Die Transfektionen der entsprechenden Zellen erfolgte mittels Elektroporation (Biorad, München, Deutschland), Charakterisierung der Rezeptorexpression mittels fluorescens associated cell sorting (FACS)-Analyse (unter freundlicher Mitwirkung von T. Schmidt-Wöll).

2.3 Zelladhäsionsassay

Kulturplatten mit 96 Vertiefungen (wells) wurden mit Vitronektin (VN) 2 µg/ml, Fibronektin (FN) 10 µg/ml, Fibrinogen (Fbg) 10 µg/ml oder BSA (bovine serum albumin) als Kontrolle der unspezifischen Bindung über Nacht bei 4°C beschichtet und mit BSA 3% (wt/vol) für 1h bei Raumtemperatur (RT) geblockt.

BAF3 und HEK293 Zellen wurden in Serum-freiem Medium gewaschen und in einer Konzentration von 1×10^5 (BAF3), respektive 5×10^4 (HEK293) Zellen/ Well für 1h bei 37°C inkubiert. Bei den jeweiligen Versuchen wurden entsprechende Testsubstanzen hinzugefügt. Nach einer Stunde Inkubation wurden die nicht adhärenen Zellen mit Serum-freiem Medium abgewaschen, die adhärenen Zellen mit Methanol-Aceton 1:1 fixiert und mit Crystal-Violet für 1h gefärbt. Danach wurde die überschüssige Farbsubstanz im Wasserbad ausgewaschen, sodass nur die angefärbten Zellen auf den Platten zurückblieben. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels densitometrischer Messung im Elisa-Reader bei 590nm; äquivalent behandelte Wells ohne Zellen wurden als Nullabgleich verwendet.

Alle Versuche wurden in mehrfachen Ansätzen (N= Anzahl der einzelnen Versuchsansätze) mit Well-Triplikaten durchgeführt. Aus den jeweils 3 identischen Wells wurde ein Mittelwert/Versuchsansatz berechnet.

2.4 Präparation der Detergenz- unlöslichen Adhäsionskomplexe (detergent-insoluble-adhesion-patch=DIAP)

Zellkulturplatten (10cm Ø) wurden mit VN 2 µg/ml, FN 10 µg/ml oder Fbg 10 µg/ml in PBS über Nacht bei 4°C beschichtet, danach mit 3% (wt/vol) BSA in PBS für 1h bei Raumtemperatur geblockt. BAF3 oder HEK293 Zellen wurden behandelt wie für übliche Adhäsionsassays (s.o.) und in einer Konzentration von 2×10^6 Zellen/ Platte für 1h bei 37°C inkubiert. Die nicht adhärenen Zellen wurden danach mit Serum-freiem Medium abgewaschen. Jeweils eine separate Platte wurde mit Trypsin behandelt, um die Anzahl der adhärenen Zellen auf den verschiedenen Substraten durch maschinelle Zellzählung ermitteln zu können. Bei den übrigen Platten wurden die adhärenen Zellen mit 1% (wt/vol) Triton X 100 in PBS für 1h bei 4°C unter Schwenken behandelt. Der erhaltene Überstand wurde abpipettiert und mit 13.000 g bei 4°C 15 min. zentrifugiert, woraufhin ein Detergenz-löslicher Überstand (S= Supernatant), sowie ein unlösliches Pellet (P= Pellet) erhalten wurde. Die behandelten Platten wurden jeweils 2x mit 1% Triton X 100 in PBS sowie 1x mit reinem PBS gewaschen, um nicht adhärenes Material zu entfernen, sodass auf den Platten nur noch eine Detergenz-unlösliche, an das entsprechende Matrixprotein gebundene Fraktion zurückblieb, welche detergent-insoluble-adhesion-patch (DIAP) genannt wurde (siehe Abb. 10). Um die Bedeutung der Lipiddomänen zu verifizieren, wurde in manchen Experimenten anstelle der Triton X 100-Lyse der Platten das Lösungsmittel N-Octylglucosid (Na_2CO_3 0,1M, pH 11,5) verwendet, welches bis auf zytoskelettäre Anteile alle Bestandteile löst.

Überstand, Pellet sowie die Platten mit den noch gebundenen DIAPs wurden mit 4% (wt/vol) Natrium Dodecyl Sulfat (SDS) behandelt und die Fraktionen anschließend im kochenden Wasserbad für einige Minuten erhitzt. Die nachfolgende Identifikation der isolierten Proteine erfolgte mittels Western-Blot-Analyse.

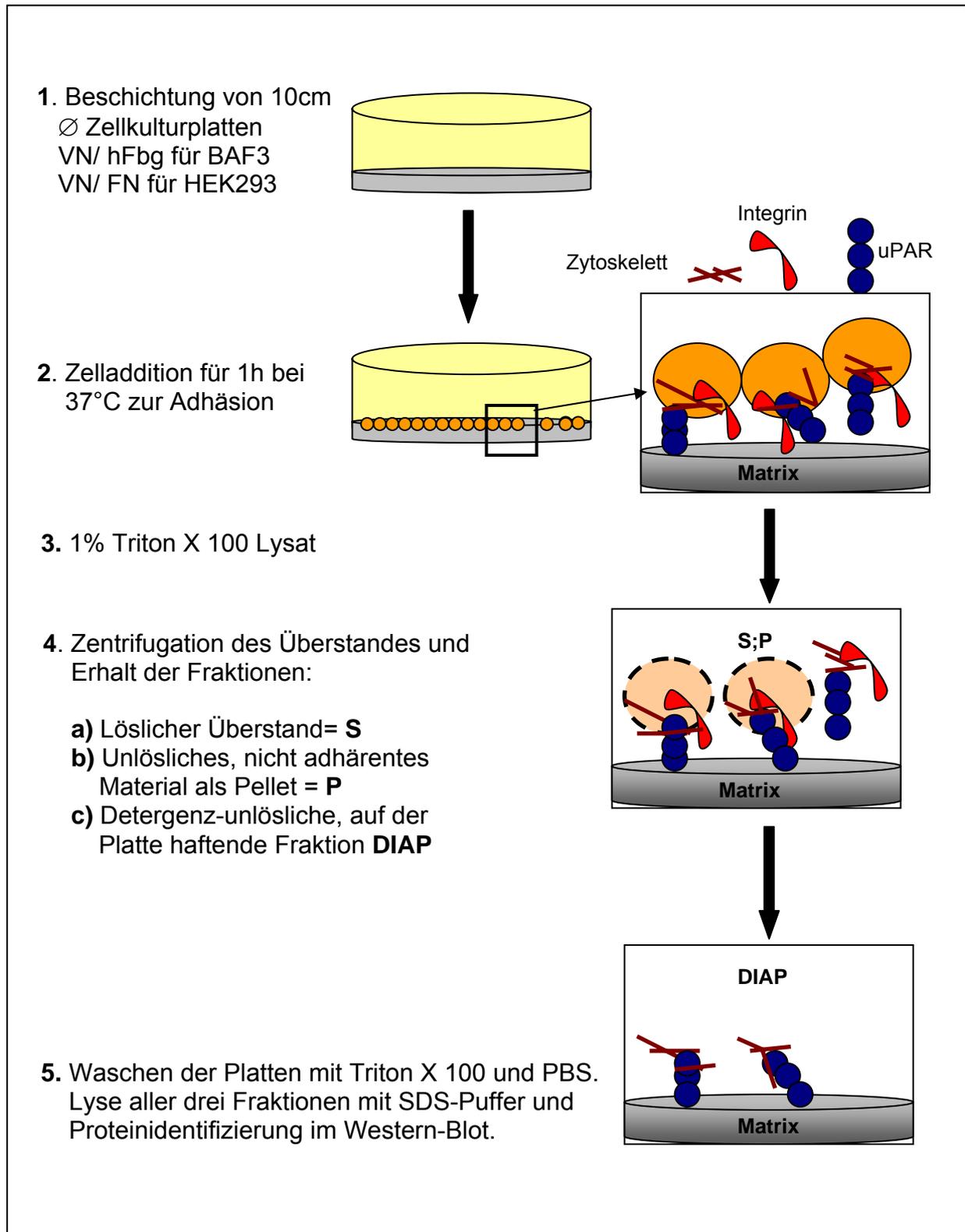


Abb. 10: Isolierung der Detergenz-unlöslichen uPAR-Adhäsionskomplexe (detaillierte Beschreibung siehe Text 2.4).

2.5 Western-Blot-Analyse/ Signalaktivierung

Die Volumina der oben beschriebenen Fraktionen Überstand (S), Pellet (P) und Detergenz-unlöslicher Adhäsionskomplex (DIAP) wurden entsprechend der ermittelten Zellzahl adhärenter Zellen auf den verschiedenen Substraten angepasst, um fehlerhafte Aussagen aufgrund unterschiedlich guter Adhäsivität auf den zu vergleichenden Substraten zu vermeiden. Die Proteinauftrennung erfolgte im 10% (wt/vol) Polyacrylamidgel. Anschließend wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran geblottet, die Membranen mit 5% (wt/vol) Milchpulver (skim-milk-powder= SMP) und 0,1% (wt/vol) Tween 20 in PBS geblockt und mit den entsprechenden primären IgG-Antikörpern über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach gründlichem Waschen mit PBS und nachfolgender Behandlung mit sekundären horseradish-Peroxidasegekoppelten Antikörpern (Dianova, Hamburg, D) über 1h bei RT konnten die Proteinbanden mittels ECL detektiert werden.

Für die Signalaktivierungsanalysen der HVSMC wurden die Zellen zunächst 24h in Serum-freiem Medium bei 37°C inkubiert, um Einflüsse von Serumbestandteilen auf die Signalaktivierung auszuschließen. Der notwendige Mediumwechsel mit dem Ziel der Volumenreduktion erfolgte 3 Stunden vor der weiteren Behandlung der Zellen. Danach wurden die Zellen mit entsprechenden Reagenzien über 15 min. bei 37°C stimuliert. Für die Spezifizierung der in der Signalkette beteiligten Prozesse wurden entsprechende Inhibitoren/ Reagenzien eingesetzt, mit welchen die Zellen 30 min. vor der Stimulation inkubiert wurden.

Die Zellyse wurde anschließend mit 1x SDS-Sample Puffer mit 1 mM Orthovanadate für 1h bei Raumtemperatur durchgeführt, das gewonnene Material im kochenden Wasserbad erhitzt und wie oben beschrieben mittels Western-Blot-Analyse untersucht.

2.6 Zellmigrationsassay

Die Chemotaxis der HVSMC sowie MVSMS wurde mittels des modifizierten Boyden-Chamber-Assays getestet (siehe Abb. 11). Hierbei werden die stimulierenden Substanzen in die unteren Kammern gefüllt, die Zellsuspensionen in die oberen. Obere und untere Kammern werden durch eine Dichtungsschicht sowie eine spezielle PVPF-Filtermembran (Nucleopore) getrennt (siehe Abb. 12), welche 8 μm große Poren besitzt und in diesem Fall mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Kollagen 1 in PBS über Nacht bei 4°C beschichtet wurde.

Die in Kultur befindlichen Zellen wurden trypsinisiert, in Serum-freiem Medium gewaschen, danach in Promocell Medium mit 0,2% (vol/vol) FKS resuspendiert und in einer Konzentration von $1,5 \times 10^4$ Zellen/Well in die oberen Kammern gefüllt. Wie im Ergebniskapitel zu sehen, wurden die Zellen teilweise mit Antikörpern, Inhibitoren oder anderen Reagenzien vorbehandelt, bevor sie in dem Migrationsassay getestet wurden.

Die befüllten Migrationskammern wurden 3h bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Oberseite der Membran von den nicht-migrierten Zellen gereinigt, die Membranen mit den auf der Unterseite haftenden, migrierten Zellen in eiskaltem Methanol-Aceton 1:1 für 15 min. fixiert, mit Crystal Violet für weitere 30 min. gefärbt und danach im Wasserbad ausgewaschen. Die Auswertung erfolgte initial mittels Zellzählung unter dem Mikroskop und im Verlauf mittels densitometrischer Auswertung der gefärbten Membranareale durch Scion image software (NIH, Bethesda Maryland).

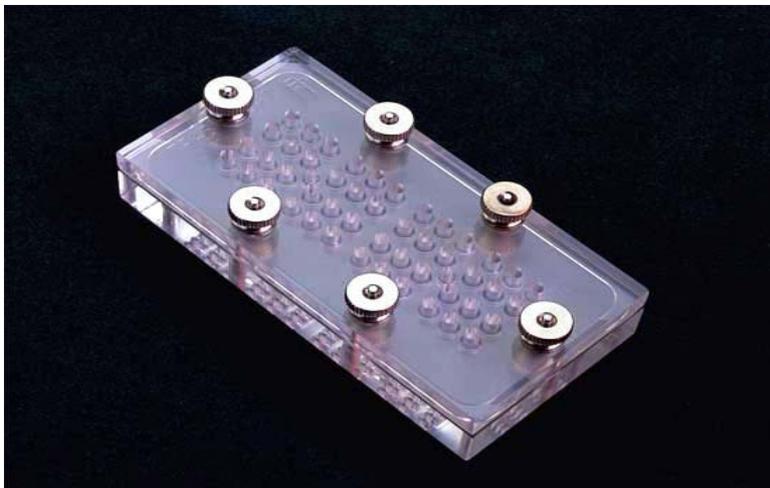
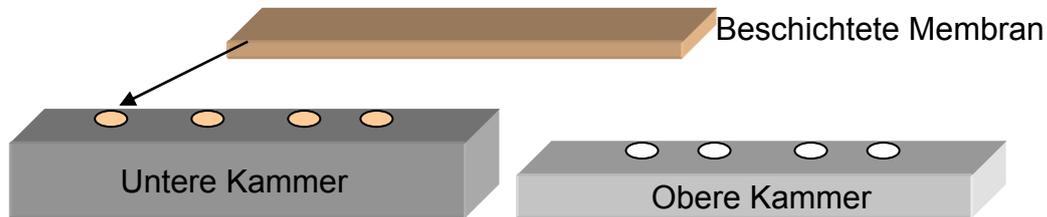
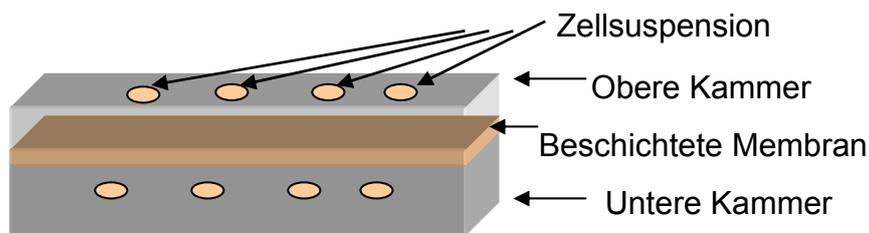


Abb. 11: 48-well Boyden-Chamber-Chemotaxiskammer.

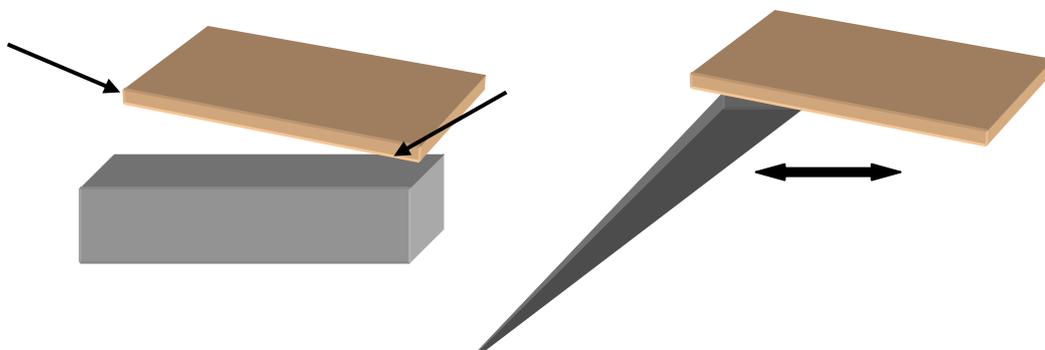
1. Füllen der unteren Kammern mit chemotaktischen Testsubstanzen und Auflegen von Membran und Dichtung. Dabei ist peinlich darauf zu achten, dass sich keine Lufteinschlüsse bilden.



2. Auflegen und fixieren der oberen Kammer mit Schrauben, Füllen der oberen Kammer mit Zellsuspension, danach Inkubation.



3. Entfernen der oberen Kammer, vorsichtiges Abheben der Membran, Wenden und Säubern der Membranoberseite von nicht-adhäsiven Zellen über sog. Cell-Scraper. Dabei ist darauf zu achten, dass die zu reinigende Membranoberseite immer feucht bleibt, da die Zellen sonst haften bleiben.



4. Fixieren und Färben der Membran.
5. Einbetten der gefärbten Membran zwischen zwei Objektträgern.

Abb. 12: Migrationsassay in der modifizierten Boyden-Chamber-Migrationskammer.

2.7 Anmerkung zur statistischen Auswertung

Versuchsaufbau und Durchführung wurden in den jeweiligen Kapiteln bereits dargestellt, verdeutlicht werden soll hier noch einmal, dass in allen Versuchsansätzen der Adhäsions- und Migrationsassays die Zellbehandlung in Dreiergruppen erfolgt (Triplets), sodass für jeden Ansatz bereits ein Mittelwert aus drei Einzelwerten erhoben werden konnte. Die Angabe $N=x$ beschreibt die Anzahl der jeweils identisch durchgeführten Ansätze. Die dargestellten Mittelwerte sind als Balken- oder Kurvengraphen dargestellt mit Angaben des SEM (standard error of means). Die statistische Auswertung der Daten der Migrationsassays erfolgte freundlicherweise gemeinsam mit dem Institut für medizinische Informatik unter Leitung von Dr. Bödeker und federführend durch Hr. Helge Hudel. Analysiert wurden die Daten zusätzlich mittels des Wilcoxon-Score und Kruskal-Wallis-Test für multiple Variablen.

3 Ergebnisse

3.1 Funktion von uPAR in Zelladhäsionsprozessen

3.1.1 uPAR-vermittelte Zelladhäsion auf Vitronektin (VN)

In der Einleitung wurde ausführlich darauf eingegangen, dass uPAR einerseits mit Integrinen interagieren und deren Funktion regulieren kann, andererseits aber auch das Matrixprotein Vitronektin direkt bindet. Um den Mechanismus uPAR-vermittelter Adhäsionsfähigkeit von Zellen auf Vitronektin näher zu untersuchen, wurden BAF3 Zellen, eine prä-B-Lymphozytenlinie aus der Maus, sowie HEK293, humane epitheliale Nierenzellen verwendet. Beide Zelllinien besitzen in ihrer Wildtyp (wt)-Form keinen Urokinaserezeptor und wurden für die Untersuchungen mit humanem Urokinaserezeptor transfiziert, sodass eine Suspensionszelllinie (BAF3) sowie eine adhärent wachsende Zelllinie (HEK293) für die Untersuchungen zur Verfügung stand. In bereits zuvor durchgeführten Studien war das Integrinexpressionsmuster der Zellen untersucht worden, worüber Tabelle 4 Auskunft gibt.

BAF3	HEK293	Integrine	Bindungsmatrix
+	+	β_1 -Integrine: - $\alpha_3\beta_1$ - VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$) - VLA-5 ($\alpha_5\beta_1$) - $\alpha_V\beta_1$	Fibrinogen, Fibronektin, Kollagen, VCAM-1 Vitronektin, Fibronektin
+	+		
-	+		
+		β_2 -Integrine: - LFA-1 (CD18/CD11; $\alpha_L\beta_2$) - MAC-1 (CD18/CD11b; ($\alpha_M\beta_2$))	Fibrinogen, ICAM's
(+)			
-	+	β_3 -Integrine: - $\alpha_V\beta_3$	Vitronektin, Fibronektin

Tabelle 4: Zusammenfassung der Integrinexpressionsmuster von BAF3- und HEK293-Zellen.

Hervorzuheben ist, dass BAF3 Zellen die für Leukozyten typischen β_2 -Integrine exprimieren, welche an Fibrinogen oder interzelluläre Adhäsionsmoleküle (ICAMs) binden können. MAC-1 (CD18/CD11b), auch $\alpha_M\beta_2$ genannt, für welches eine Interaktion mit dem uPA-Rezeptor angenommen wird, konnte auf BAF3 Zellen nur in sehr geringem Ausmaß gefunden werden. Auffällig hierbei war, dass wt-BAF3 Zellen keine Integrine exprimieren, welche als direkte Rezeptoren für Vitronektin fungieren können, wie z.B. $\alpha_v\beta_1$ oder $\alpha_v\beta_3$. HEK293 zeigten vor allem β_1 -Integrine sowie die Vitronektin bindenden Integrine $\alpha_v\beta_1$ und $\alpha_v\beta_3$.

Zunächst wurden mit den wt- wie den uPAR-transfizierten Zellen *in vitro* Adhäsionstests durchgeführt, um deren Bindungsfähigkeit auf Vitronektin (VN) *versus* Fibronektin (FN) und Fibrinogen (Fbg) zu untersuchen. Bezüglich der FN- und Fbg-Bindung bestand kein Unterschied zwischen wt- und uPAR-Zellen. Demnach hatte die Transfektionsprozedur selbst keinen nachteiligen Einfluss auf die Bindungsfähigkeit der Zellen gehabt. Die Adhäsion beider Zellarten wurde auf FN bzw. Fbg durch den Einfluss von EDTA gehemmt (Abb. 13A/B, schwarze Balken), was als Nachweis der Integrinabhängigkeit gewertet wird, da die notwendigen divalenten Kationen durch EDTA gebunden werden.

Auf VN konnte aufgrund des beschriebenen Integrinspektrums wie erwartet für die wt-BAF3 Zellen keine spezifische Bindung beobachtet werden. uPAR-transfizierte Zellen hingegen zeigten eine starke Adhäsion auf VN-beschichteter Matrix, welche zudem nach Hinzugabe von EDTA unbeeinträchtigt blieb (Abb. 13C). Diese Bindung musste demnach auf einer direkten Interaktion zwischen VN und dem uPA-Rezeptor beruhen. Bezüglich der HEK293 Zelladhäsion war zunächst kein Unterschied zwischen wt- und uPAR-Zellen auf FN- oder VN-beschichteten Platten zu erkennen, was aufgrund der Integrinexpression zu erwarten war. Die Zugabe von 10mM EDTA reduzierte sowohl bei wt- wie auch transfizierten Zellen die Adhäsion auf FN deutlich (Abb. 13B). Auf VN beschichteten Platten hingegen traf diese Beobachtung ausschließlich für die wt-Zellen zu, während die HEK293 (uPAR+) Zellen ihre Adhäsionsfähigkeit behielten (Abb.13D).

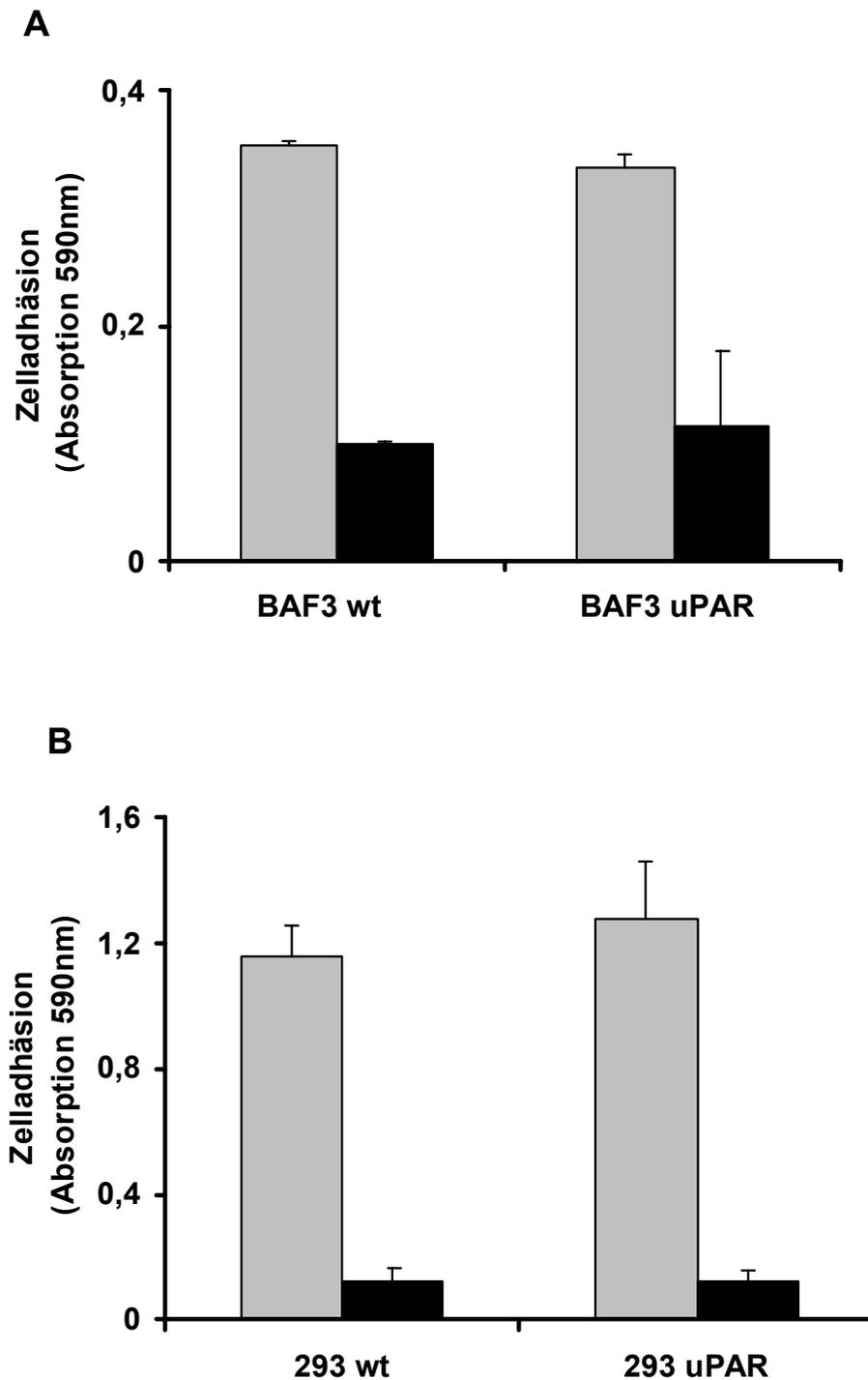


Abb. 13 A/B: Zelladhäsion der BAF3 Zellen auf *Fbg* (A) und der HEK293 Zellen auf *FN* (B). wt- und uPAR-transfizierte Zellen wurden im Adhäsionsassay in Abwesenheit (graue Balken) oder Anwesenheit von 10mM EDTA (schwarze Balken) getestet. BAF3 Zellen zeigten vergleichbare Ergebnisse auf FN und Fbg. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert +/- SEM, N=3.

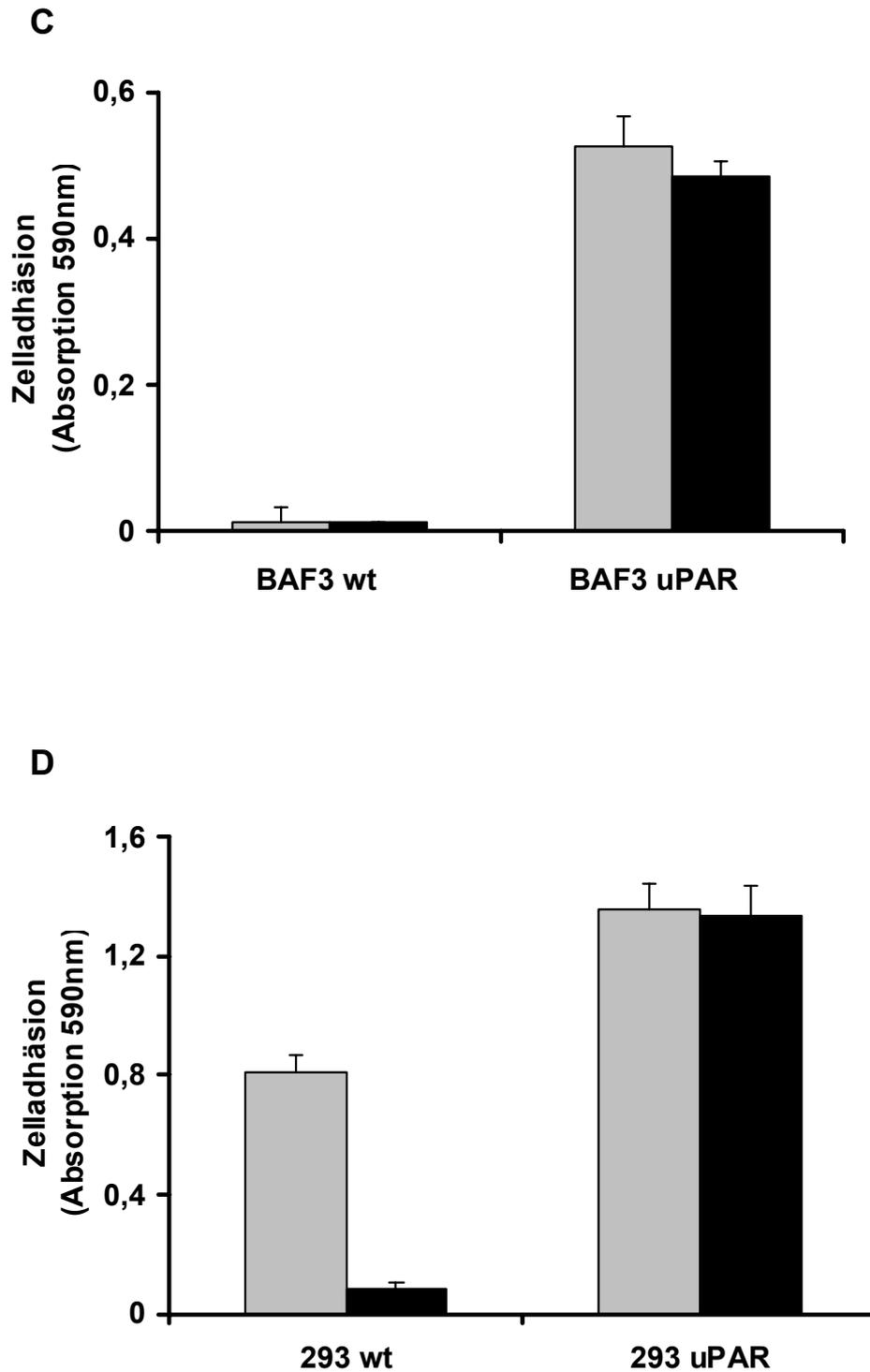


Abb. 13 C/D: *uPAR*-abhängige Zelladhäsion auf VN: wt- und *uPAR*-transfizierte Zellen wurden im Adhäsionsassay in Abwesenheit (graue Balken) oder Anwesenheit von 10mM EDTA (schwarze Balken) getestet. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert +/- SEM, N=3.

3.1.2 Die Bedeutung von Membranlipiddomänen für die uPAR-VN-Interaktion

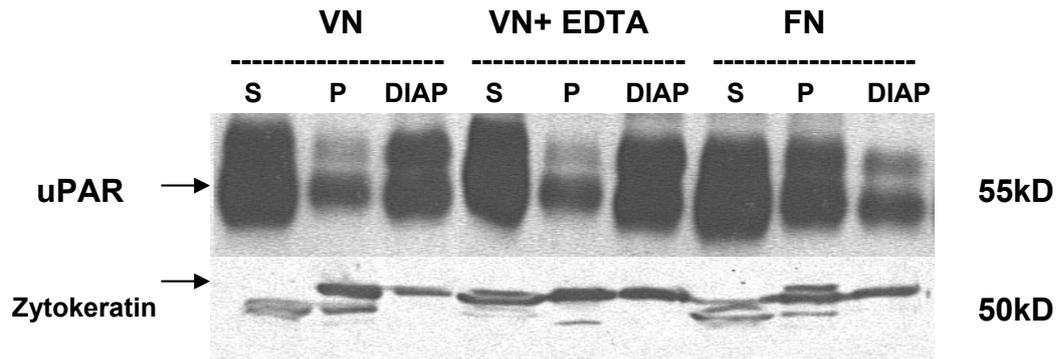
Die oben gezeigten Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass für die Interaktion von uPAR mit VN keine aktiven Integrine notwendig sind. Fraglich ist jedoch, ob uPAR aufgrund seiner fehlenden Verbindung zum intrazellulären Raum tatsächlich eine feste, zytoskelettär verankerte Bindung vermitteln kann, oder ob Integrine zumindest als Adapterproteine notwendig sind.

In jedem Falle erscheint eine Akkumulation von uPAR mit weiteren Membranproteinen und zytoskelettären Bestandteilen notwendig. Ein solcher Kontaktort könnten Caveolae oder lipid rafts sein, wie in 1.4.4 beschrieben, sodass im Folgenden untersucht wurde, ob uPAR unter funktionellen Bedingungen tatsächlich in solchen Membrandomänen akkumuliert und ob dies eine Voraussetzung für uPAR-abhängige Zelladhäsion auf VN sein kann.

Zur Isolierung der lipid rafts bedarf es einer Lyse mit Triton X 100 (Brown et al., 1992), welches selbige nicht zerstören kann, aber Detergenz-lösliche Bestandteile aus der Membran und dem intrazellulären Raum entfernt. Wir entwickelten eine kombinierte Methode, bestehend aus einem Adhäsionsassay und anschließender Triton X 100-Lyse wie in 2.4 beschrieben. Bei der durchgeführten Isolationsmethode erhält man drei Fraktionen: einen Überstand, welcher nach Zentrifugation eine lösliche Fraktion (Supernatant=S) und ein unlösliches Pellet (P) ergibt, und die unlösliche, adhärenente Fraktion auf der beschichteten Matrix, genannt „detergent insoluble adhesion patch“ (DIAP) (Abb. 10, S. 37). Trifft die These zu, dass uPAR sich in lipid rafts formiert und dies für die Vermittlung der Adhäsion bedeutend ist, so sollte der Rezeptor spezifisch nach Zelladhäsion auf VN in der DIAP-Fraktion zu finden sein, nicht jedoch nach Zelladhäsion auf einem anderen Matrixprotein.

Um die Integrin-vermittelte Adhäsion auf VN, welche in uPAR-transfizierten HEK293 Zellen parallel zur uPAR-vermittelten VN-Bindung stattfindet, auszuschalten, wurde auch in diesen Zelladhäsionsassays EDTA addiert. In beiden Zellarten zeigte sich nach Adhäsion auf VN eine deutliche Akkumulation von uPAR in den Detergenz-unlöslichen Adhäsionskomplexen, wohingegen dies nach Kontakt mit anderen Matrixproteinen zu einem deutlich geringeren Ausmaß bzw. gar nicht zu beobachten war. Die Anwesenheit von EDTA hatte bei beiden Zellarten keinen Einfluss auf die Akkumulation des Urokinaserezeptors in den DIAPs (Abb.14).

A: HEK293 uPAR



B: BAF3 uPAR

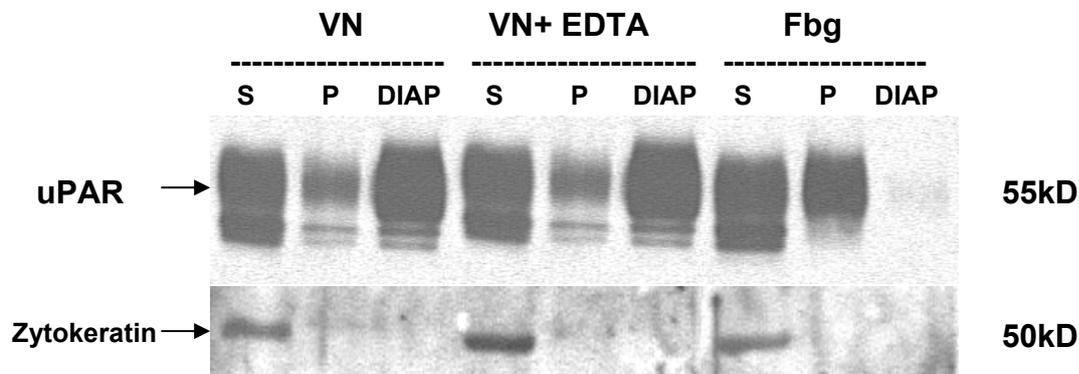
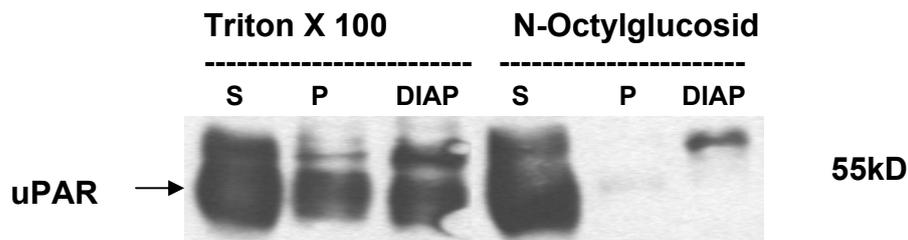


Abb. 14: Western-Blot Analyse der verschiedenen Fraktionen nach Zelladhäsion von uPAR-transfizierten HEK293 (A) und BAF3 (B) Zellen auf VN, FN und Fbg. Zytokeratin ist ein Zytoskelettprotein, welches als Kontrollmarker verwendet wurde, da es häufig in Detergenz-unlöslichen Fraktionen identifiziert wird. Bezüglich BAF3 uPAR-Zellen ergaben die Untersuchungen auf FN und Fbg erneut vergleichbare Ergebnisse.

Um zu kontrollieren, ob nach Triton X 100-Lyse tatsächlich funktionell wirksame Lipiddomänen untersucht werden konnten, wurde im gleichen Versuchsaufbau anstelle der Triton X 100-Behandlung eine N-Octylglucoside-Lyse durchgeführt. Diese führt zur Zerstörung der Membranlipiddomänen, sodass in den Pellet- und DIAP-Fractionen keine Proteindetektion mehr zu finden sein dürfte. Bereits makroskopisch war nach der Behandlung mit N-Octylglucoside in diesen Fraktionen keine Proteinmenge mehr sichtbar, und auch die Western-Blot-Analyse bestätigte diese Beobachtung (Abb. 15).

A: HEK293 uPAR



B: BAF3 uPAR

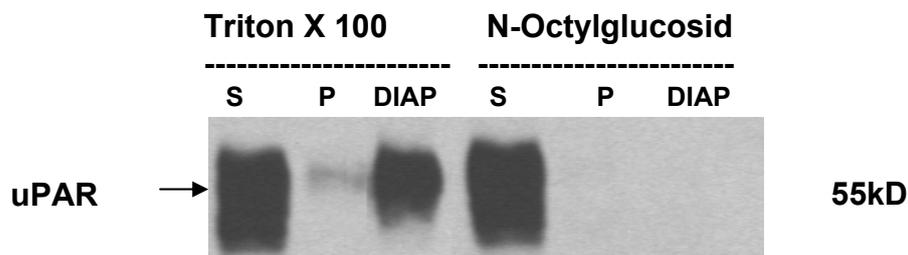


Abb. 15: Zelladhäsion uPAR-transfizierter HEK293 (A) und BAF3 (B) Zellen jeweils auf VN mit anschließender Triton X 100-Lyse der adhären Zellen wie beschrieben oder N-Octylglucosid-Lyse. Anschließend wurde jeweils eine SDS-Lyse und uPAR-Detektion im Western-Blot durchgeführt.

3.1.3 Komponenten des uPAR-abhängigen Adhäsionskomplexes

Um mehr über den Aufbau der Adhäsionskomplexe zu erfahren, wurden die Proben auch auf weitere Proteine untersucht, welche in Zelladhäsionsprozessen häufig eine Rolle spielen.

Talin ist ein 270 kD großes Zytoplasmprotein, welches mit seiner Kopfdomäne in direkten Kontakt mit β -Ketten von Integrinen treten kann, mit seiner Schwanzdomäne Vinculin und Aktin bindet und so eine Brücke von Integrinen zu Zytoskelettelementen herstellt (Calderwood et al., 1999). Vinculin (135 kD) wiederum bindet das Protein Paxillin und vermittelt darüber die Verbindung zu Src-Kinasen, kann aber selbst auch die focal adhesion kinase (FAK) aktivieren, welche für Zytoskelettveränderungen wie die Formation von Zellausläufern verantwortlich ist (Giancotti et al., 2000).

FAK und c-Src-Kinase stellen zwei in Integrin-aktivierter Signaltransduktion bekannte Proteine dar und können weitere downstream-Mechanismen wie die Aktivierung der mitogen activated protein kinase (MAPK) hervorrufen. Auch eine Assoziation von G-

Protein gekoppelten Rezeptoren mit 7-Transmembranrezeptoren oder Proteinkinase C kann einen Adhäsions-vermittelten Signalweg darstellen, sodass diese Proteine auch eine Rolle in uPAR-vermittelter Adhäsion auf VN spielen könnten.

Wie in 1.4.4 beschrieben, wurde auch das Membranprotein Caveolin in uPAR-abhängiger Integrinregulation und Signalaktivierung identifiziert. Nach den bislang vorliegenden Erkenntnissen dieser Arbeit käme demnach auch Caveolin als Bestandteil uPAR-abhängiger Adhäsionskomplexe in Betracht, was im Folgenden untersucht wurde.

A: HEK293 uPAR

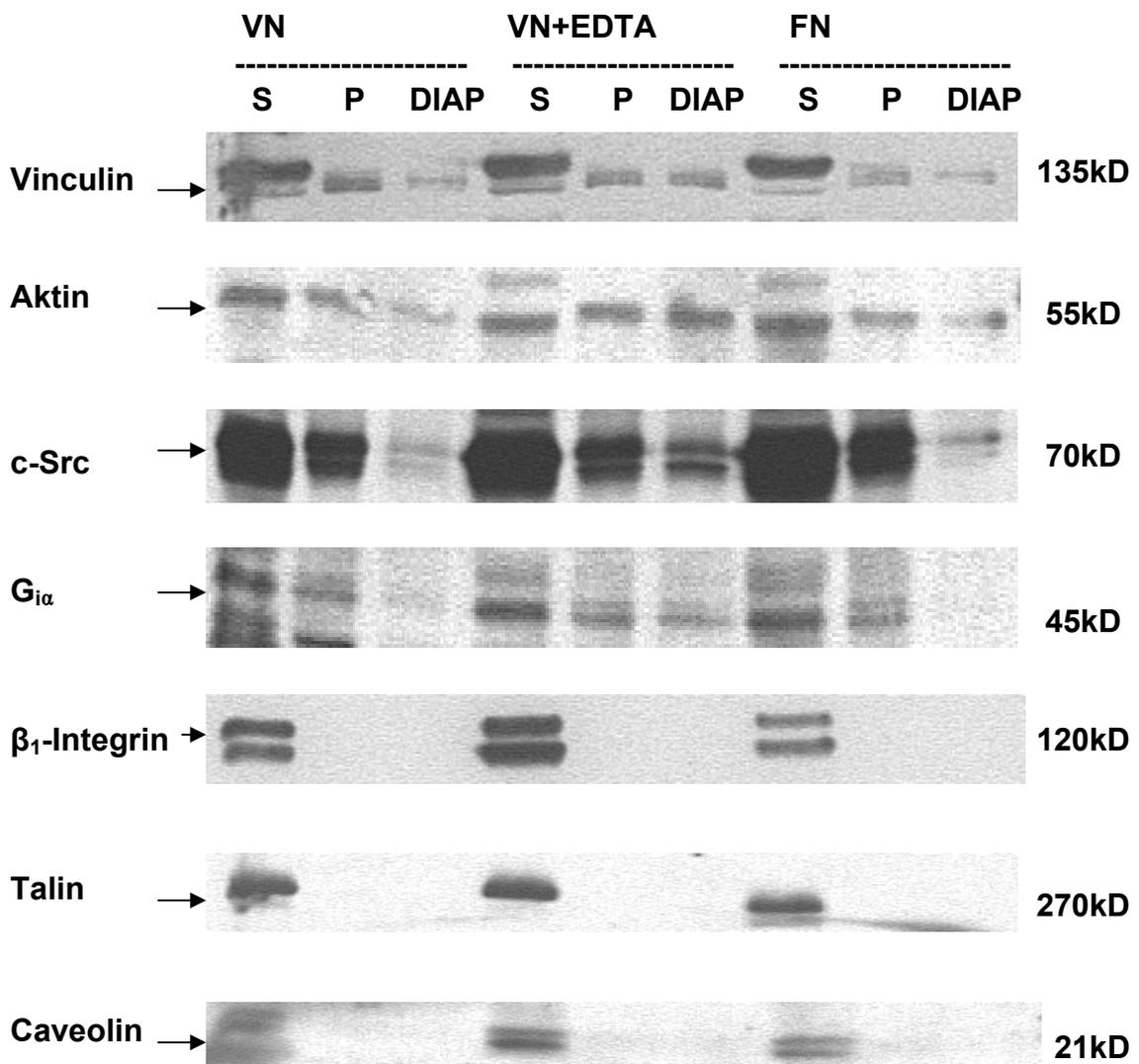


Abb. 16A: Western-Blot-Analyse der verschiedenen Fraktionen nach Adhäsion von uPAR-transfizierten HEK293 Zellen auf VN (+/- 10mM EDTA) und FN.

Die Ergebnisse bezüglich der HEK293 (uPAR+) Zellen zeigen ein deutlich stärkeres Signal für die Zytoskelettproteine Vinculin und Aktin in der DIAP- Fraktion nach uPAR-vermittelter Adhäsion auf VN (+EDTA) im Vergleich zu Integrin-vermittelter Adhäsion. Auch Signalproteine wie c-Src und G_{iα} konnten nachgewiesen werden, was auf eine Assoziation von uPAR, zytoskelettären Bestandteilen und Signalproteinen in den für die uPAR-vermittelte Adhäsion auf VN wichtigen Lipiddomänen schließen lässt (Abb. 16a). Hingegen konnten weder β₁-Integrine noch deren Bindungsprotein Talin detektiert werden. Caveolin ist in HEK293-Zellen zwar vorhanden, scheint aber für die uPAR-vermittelten Adhäsionskomplexe dieser Zellen keine Rolle zu spielen.

B: BAF3 uPAR

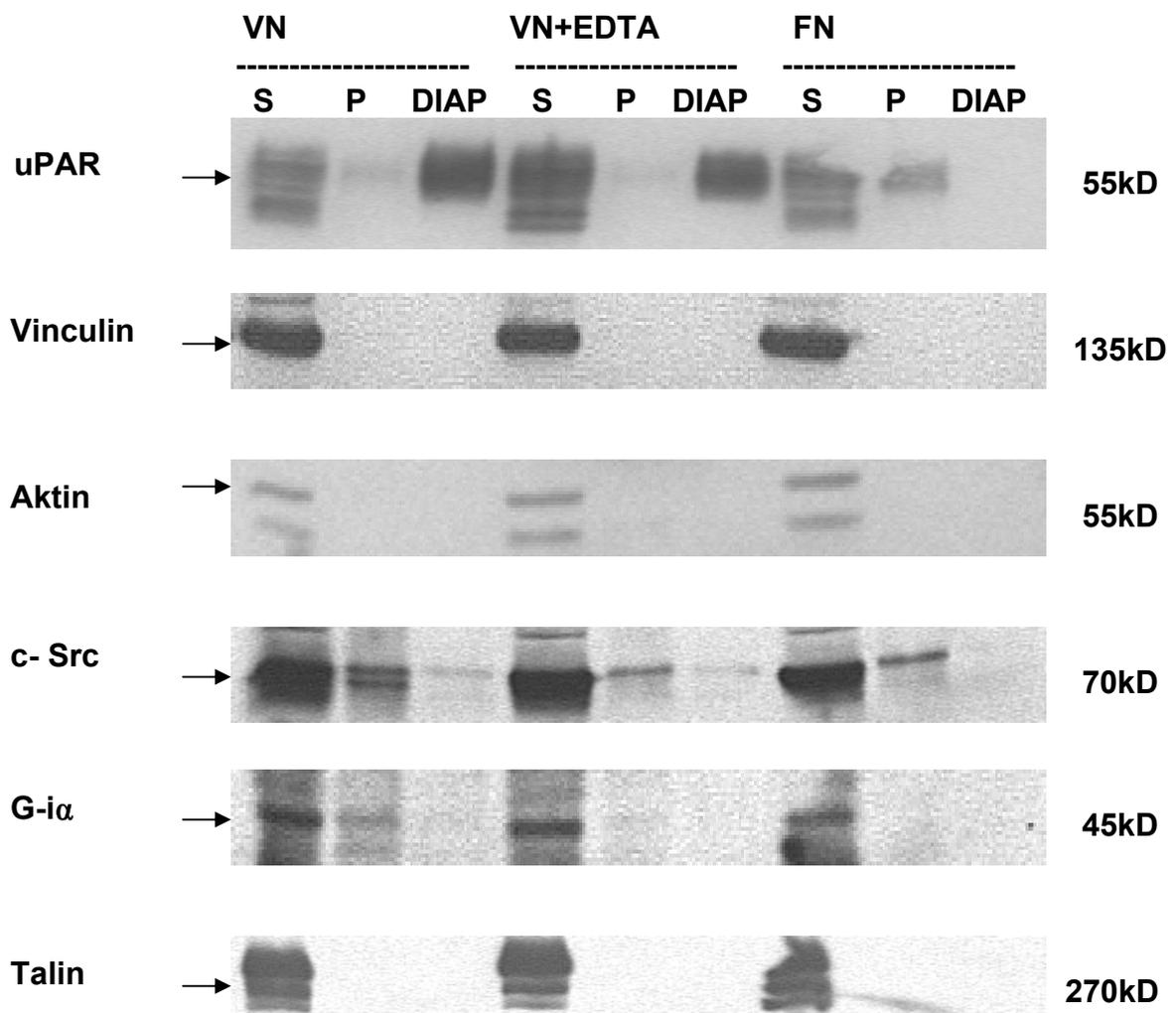


Abb. 16B: Western-Blot-Analyse der verschiedenen Fraktionen nach Adhäsion von uPAR-transfizierten BAF3 Zellen auf VN (+/- EDTA) und FN.

Überraschenderweise ergab sich in den identischen Versuchen mit der transfizierten Suspensionszelllinie BAF3 (uPAR+) ein differentes Bild. Hier konnten in den formierten Adhäsionskomplexen keine zytoskelettären Proteine nachgewiesen werden, allerdings war eine leichte Bande des Signalproteins c-Src zu erkennen. Mit den zur Verfügung stehenden β_1 -Integrinantikörpern konnte auch kein Nachweis der entsprechenden Integrine in keiner Fraktion erzielt werden. Caveolin wurde in der Versuchsanordnung der Abb. 16B nicht getestet, da BAF3 Zellen kein Caveolin besitzen.

Insbesondere um die Ergebnisse bez. der BAF3 Zellen weiter verifizieren zu können, wurde zusätzlich die Methode der immunhistochemischen Färbung und konfokalen Lasermikroskopie zu Hilfe genommen. Die Behandlung der Zellen erfolgte gemäß der Isolierungsmethode zur Untersuchung uPAR-abhängiger DIAPs. Nach Triton X 100-Lyse erfolgte jedoch keine SDS-Lyse der Platten, sondern die entsprechenden Immunfärbungen.

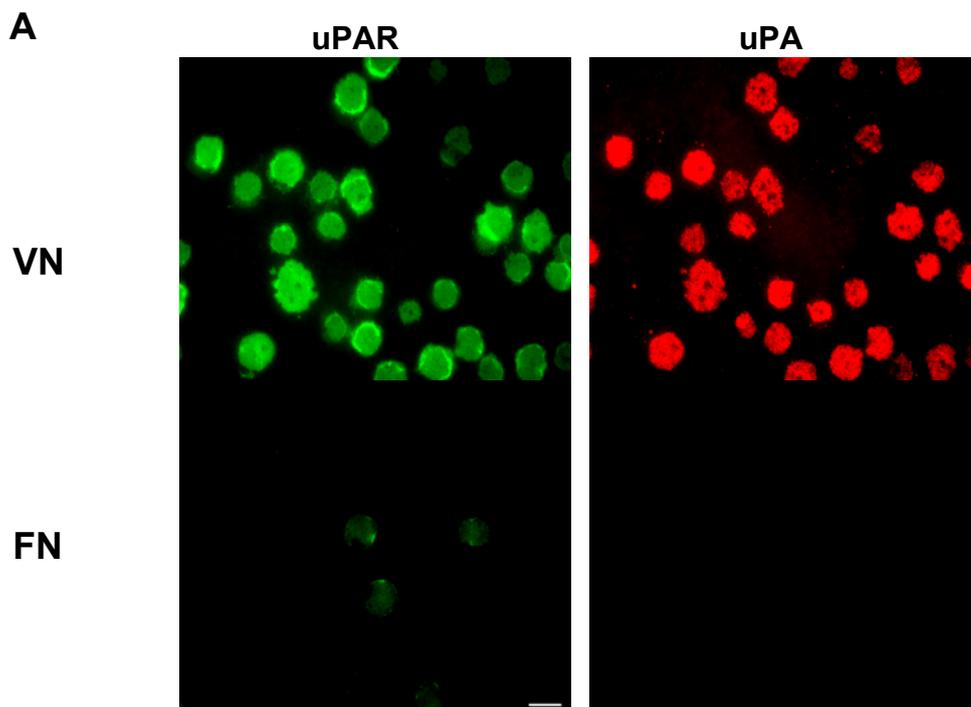


Abb. 17A: Immunhistochemische Färbung der Adhäsionskomplexe nach Adhäsion von BAF3 uPAR(+) Zellen auf VN und FN sowie anschließender Triton X 100-Lyse und Präparation der DIAPs. Die Zellen wurden zusätzlich mit uPA (50nM) für 30 min. vorinkubiert. Die Durchführung der Immunfärbungen sowie die Aufnahmen des Lasermikroskops wurden freundlicherweise von Fr. Dr. Karin Hersemeyer durchgeführt und zur Verfügung gestellt.

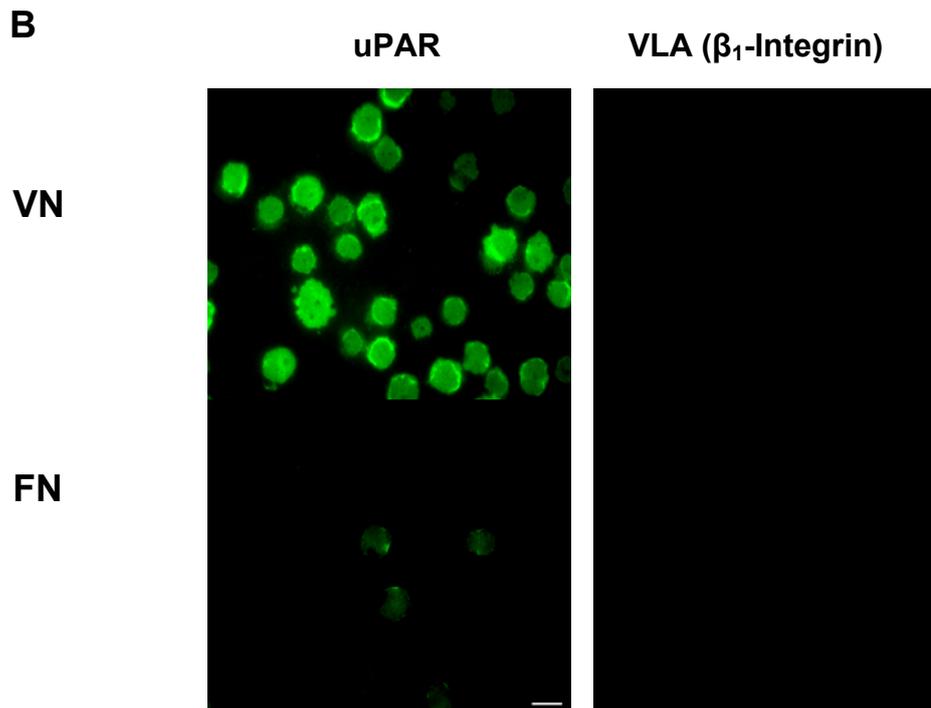


Abb. 17B: *uPAR- und β_1 -Integrinverteilung in den Adhäsionskomplexen nach Zelladhäsion der BAF3 uPAR(+) Zellen auf VN und FN, anschließender Triton X 100-Lyse und DIAP-Präparation.*

Die Immunfärbungen reproduzierten zunächst die Ergebnisse der Western-Blot-Untersuchungen und zeigten die Akkumulation von uPAR in DIAPs nach Zelladhäsion auf VN im Unterschied zu FN. Auch der Ligand uPA, welcher normalerweise gelöst vorkommt, wird nach Bindung an seinen Rezeptor stabil in den Adhäsionskomplex inkorporiert (Abb. 17A).

β_1 -Integrine konnten nach der Präparation der DIAPs dort nicht angefärbt werden, weder nach Adhäsion der Zellen auf VN noch auf FN (Abb. 17B).

Dies sagt aus, dass Integrin-vermittelte Zelladhäsion der BAF3 Zellen hier auf Fibronectin (FN) im Gegensatz zur uPAR-vermittelten Adhäsion auf Vitronectin (VN) nicht auf die Formation von lipidreichen Microdomänen angewiesen ist, sondern unabhängig davon funktioniert.

Die konfokale Lasermikroskopie gab zusätzliche die Möglichkeit, die Akkumulation von uPAR und Zytoskelettbestandteilen sowie Signalproteinen im aktiven Zustand der Adhäsion darzustellen. Die Zellen wurden gemäß eines Adhäsionsassays behandelt, danach jedoch keiner Triton X 100-Lyse unterzogen, sondern fixiert und gefärbt (Abb. 17C-E).

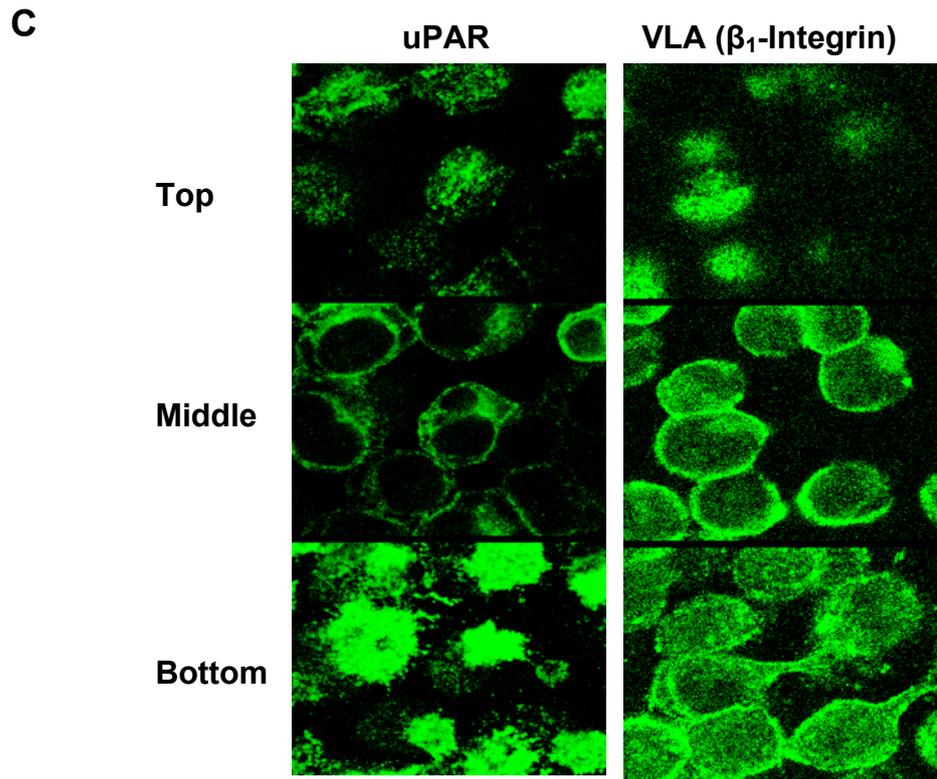


Abb. 17C: Konfokale Lasermikroskopie der BAF3 uPAR(+) Zellen nach Adhäsion auf VN. Top/ Middle/ Bottom beschreiben die dargestellten Zellebenen. Bottom entspricht der Berührungsebene von Zelle und adhäsiver Matrix.

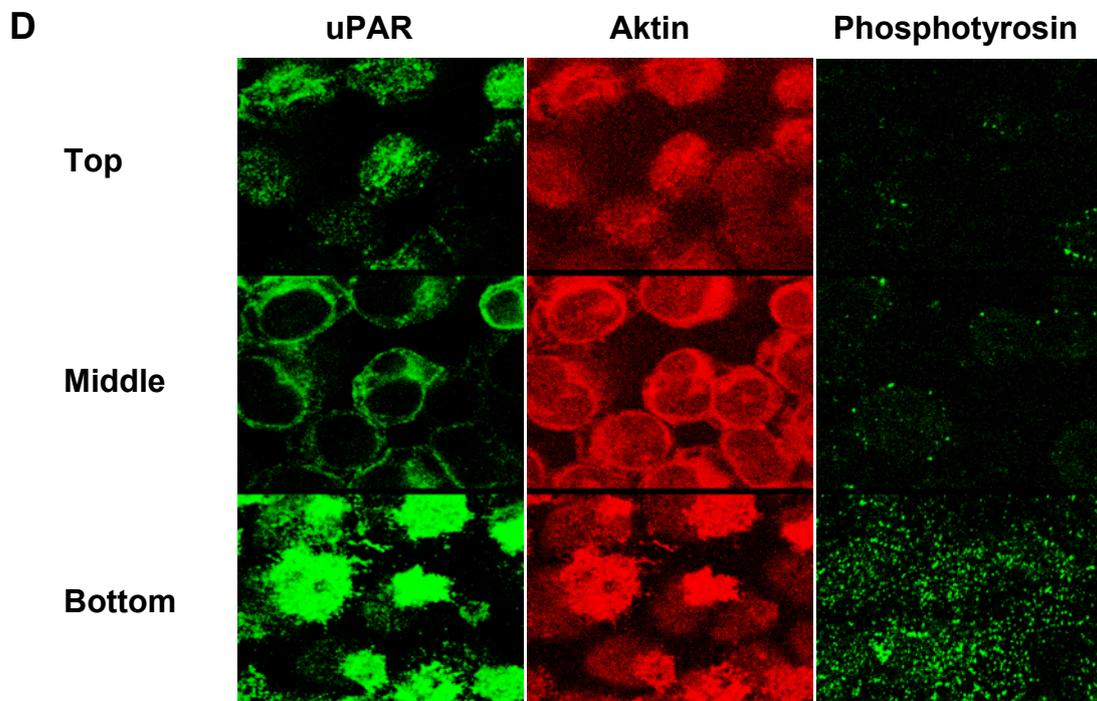


Abb. 17D: Konfokale Lasermikroskopie der BAF3 uPAR(+) Zellen nach Adhäsion auf VN, Darstellung der Colokalisation von uPAR, Aktin und Phosphotyrosin in den Kontaktbereichen zwischen Zelle und Matrix.

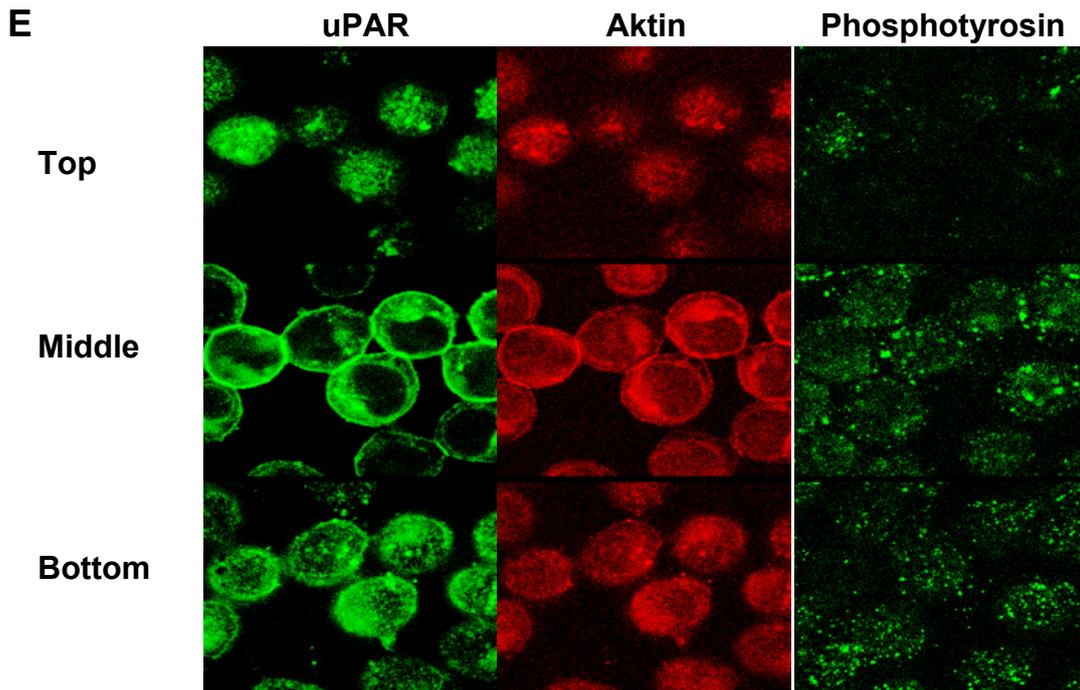


Abb. 17E: Konfokale Lasermikroskopie nach Adhäsion der BAF3 uPAR(+) Zellen auf FN. Die eindeutigen Adhäsionszonen sind hier im Vergleich zu VN-Bindung nicht mehr zu sehen.

Abb. 17C+D zeigen die Konzentration des uPAR in den Kontaktzonen von Zelle und Matrix (Bottom) nach Adhäsion auf Vitronektin. Ein nahezu identisches Verteilungsmuster konnte in der Aktinfärbung gesehen werden, was auf eine Colokalisation von uPAR und Aktin hinweist. Ebenso in der Kontaktzone konzentriert färbte sich Phosphotyrosin, als Hinweis auf vorhandene Phosphorylierungs-/ Signalaktivierungsprozesse innerhalb der Adhäsionsareale. Nach Bindung der Zellen auf Fibronektin (Abb. 17E) war keine entsprechende Konzentration von uPAR mit Aktin oder Phosphotyrosin sichtbar. β_1 -Integrine sind zwar auf den Zellen vorhanden, zeigten jedoch keine Colokalisation mit uPAR (Abb. 17C).

Zusammengefasst lässt sich für die Fragestellung 1 aus den vorgestellten Ergebnissen schlussfolgern: uPAR-abhängige Adhäsion auf VN ist nicht Integrin-abhängig. Es findet keine Assoziation von uPAR und Integrinen, jedoch eine Komplexbildung mit zytoskelettären Bestandteilen wie Aktin und Vinculin statt. Essentiell dafür ist die Ausbildung der DIAPs, in denen uPAR mit seinem GPI-Anker akkumuliert. Auch lässt sich aus den Ergebnissen ableiten, dass Signalaktivierungs- und Phosphorylierungsprozesse unter Beteiligung von G-Proteinen und Src-Kinasen an der uPAR-vermittelten Zelladhäsion auf VN beteiligt sind.

3.2 Funktion von uPAR in Migration & Signalaktivierung in humanen glatten Gefäßmuskelzellen (HVSMC)

3.2.1 Proteolyse-unabhängige, uPAR-vermittelte Migration der HVSMC

Eine weitere zelluläre Funktion, welche einerseits von regulierten Anhaftungs- und Lösungsvorgängen einer Zelle abhängt, und andererseits mit Chemotaxis und Proteolysevorgängen in Verbindung steht, ist die Zellmigration. Da insbesondere glatte Gefäßmuskelzellen eine entscheidende Rolle in physiologischen wie pathologischen Gefäßwandprozessen haben, fokussierte sich unser Interesse im Folgenden auf die Bedeutung des uPA-/uPAR-Systems für die Migrationsfähigkeit dieser Zellen. Gut bekannt ist der Effekt von PDGF (platelet derived growth factor), welcher sowohl chemotaktisch wie auch mitogen auf glatte Gefäßmuskelzellen wirkt (Heldin et al., 1999). Daher wurde PDGF in dieser Arbeit als positive Kontrolle im Vergleich zur Wirkung der Urokinase verwendet.

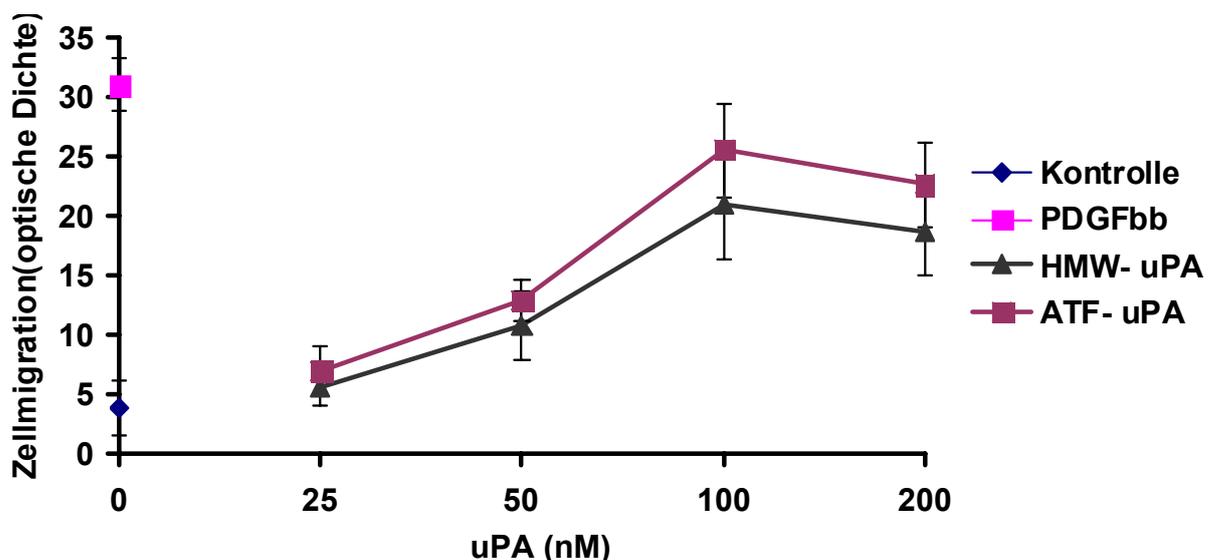


Abb. 18: Dosiswirkungskurve von uPA auf die Migration der HVSMC.

Als Positivkontrolle diente PDGFbb (10ng/ml), als Negativkontrolle (Kontrolle) das verwendete Versuchsmedium (Promocell+ 0,2% FKS). Die Ergebnisse zeigen Mittelwerte +/- SEM, N= 8.

Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen des proteolytisch aktiven HMW-uPA sowie des proteolytisch inaktiven amino-terminalen Fragments (ATF) stimuliert (Abb. 18), um den Einfluss der Proteolysefähigkeit sowie die Dosis der höchstmöglichen Wirkung ermitteln zu können. Beide uPA-Formen zeigten eine nahezu identische chemotaktische Wirkung auf die glatten Muskelzellen.

Im nächsten Schritt erfolgte der Nachweis der Rezeptorabhängigkeit uPA-stimulierter HVSMC-Migration, indem die Zellen vor der Stimulation mit einem uPAR-blockierenden Antikörper behandelt wurden (Abb. 19).

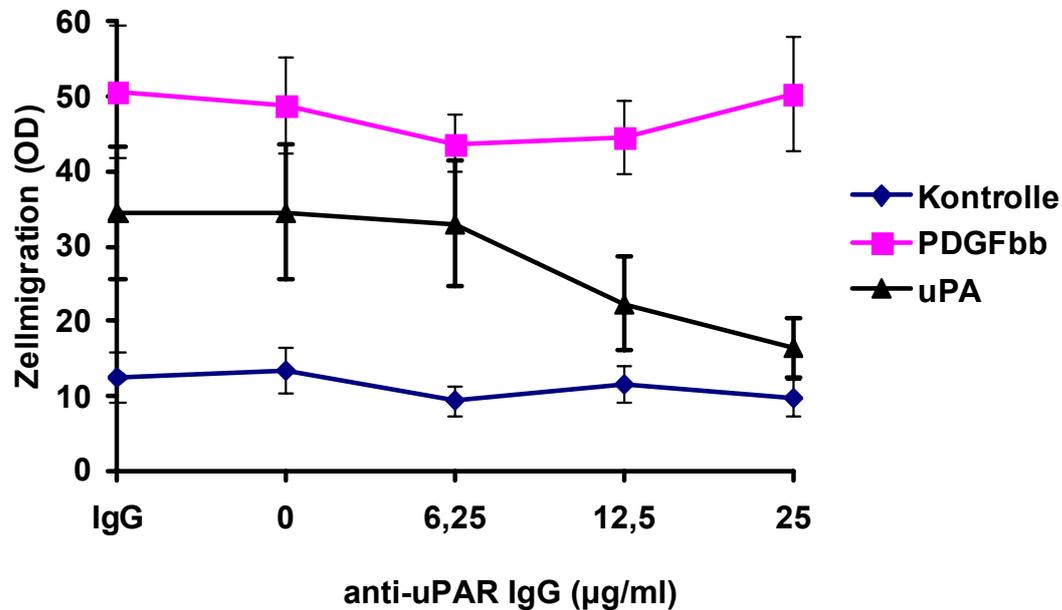


Abb. 19: Migration der HVSMC nach uPAR-Blockade. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen eines polyklonalen anti-uPAR Antikörpers oder mit einem polyklonalen Kontrollantikörper= IgG (25µg/ml) für 30 min. vorinkubiert. Die Stimulation erfolgte mit PDGFbb (10ng/ml) und uPA (100nM), die Negativkontrolle mit Versuchsmedium wie beschrieben. Die Ergebnisse zeigen Mittelwerte +/- SEM, N=3.

Die uPA-stimulierte Zellmigration konnte nach Behandlung mit dem uPAR-spezifischen Antikörper dosisabhängig reduziert werden, wohingegen die Migrationsraten der unstimulierten Zellen sowie der PDGF-inkubierten Zellen nicht von dem uPAR-Antikörper beeinflusst wurden.

Der polyklonale Kontrollantikörper (IgG) hatte in der verwendeten Konzentration von 25 µg/ml ebenfalls keinen Einfluss auf die Migrationsfähigkeit der Zellen, sodass ein unspezifischer Effekt durch die Behandlung mit einem Immunglobulin ausgeschlossen ist.

Als zusätzliche Kontrolle der uPAR-Abhängigkeit uPA-vermittelter Zellmigration wurde ein Migrationsassay mit glatten vaskulären Muskelzellen aus uPAR-knockout-Mäusen (MVSMC^{-/-}) durchgeführt (Abb. 20). In diesem Versuch wurde die proteolytisch aktive uPA-Form verwendet, sodass gleichzeitig eine Aussage über

den Proteolyseeinfluss auf die Zellmigration dieser Zellen unter den zugrunde liegenden Versuchsbedingungen gemacht werden kann.

Die Stimulation mit Urokinase zeigte keinen Effekt. Dieser Beobachtung liegt keine prinzipielle Unfähigkeit der Zellen zur Migration zu Grunde, da die Positivkontrolle PDGFbb eine deutliche Zellwanderung verursachte. Vielmehr zeigt es, dass uPA tatsächlich der Anwesenheit seines spezifischen Rezeptors bedarf, welcher den knockout-Mauszellen fehlt. Auch die Verwendung des proteolytisch aktiven uPA (HMW) steigerte die Migrationsfähigkeit der Zellen nicht, was eine Verfälschung der Ergebnisse durch unspezifische Proteolyse ausschließt.

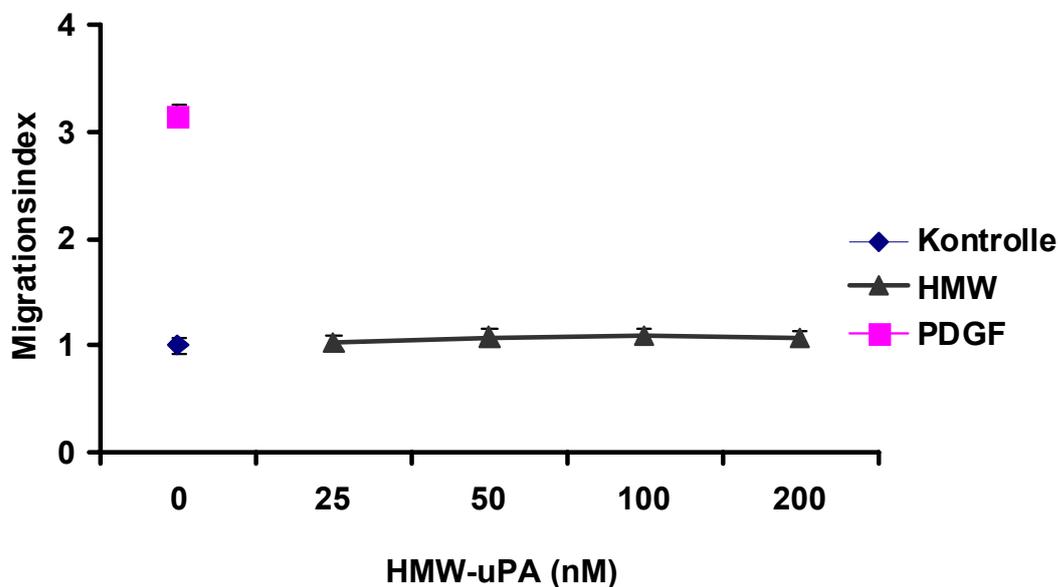


Abb. 20: *MVSMC*^{-/-} Migration nach Stimulation mit verschiedenen HMW-uPA- Konzentrationen, PDGFbb oder Kontrollmedium. Ergebnisse zeigen Mittelwerte \pm SEM, N=3.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Stimulation der HVSMC mit uPA zu einem 3-4-fachen, im Vergleich nach Stimulation mit PDGFbb zu einem 5-6-fachen Anstieg der Zellmigration führt. Die proteolytische Aktivität der Urokinase wird für den chemotaktischen Effekt jedoch nicht benötigt, da äquivalente Konzentrationen des HMW-uPA wie des ATF einen identischen Effekt zeigen (Abb. 18). In weiteren, hier nicht graphisch dargestellten Versuchen wurde ebenfalls deutlich, dass auch in Anwesenheit der Proteinaseinhibitoren PAI-1 und PN-1 keine Inhibition der uPA-vermittelten Migration auftritt.

Die Behandlung der Zellen mit uPAR-blockierenden Antikörpern zeigte eine dosisabhängige Hemmung der Zellmigration spezifisch nach Stimulation mit uPA, während ein Kontrollantikörper keine Wirkung hatte (Abb. 19). Dies unterstreicht die Notwendigkeit einer Ligand-Rezeptorinteraktion für die Vermittlung der chemotaktischen Wirkung der Urokinase. Außerdem konnten Gefäßmuskelzellen aus uPAR-knockout-Mäusen (MVSMC^{-/-}) zwar durch PDGFbb nicht aber durch uPA zur Migration stimuliert werden (Abb. 20).

In hier nicht graphisch dargestellten Versuchen führte die parallele Stimulation der Zellen mit uPA und einer löslichen Form des uPA-Rezeptors (suPAR) zu einer Hemmung der chemotaktischen Wirkung von uPA, was auf die vorzeitige Blockade der Rezeptor-bindenden growth-factor-like domain in uPA durch den löslichen Rezeptor zurückzuführen ist. Folglich konnte uPA keine Verbindung mehr mit dem Zelloberflächen-exprimierten Rezeptor eingehen. Dies zeigte erneut die Notwendigkeit der Bindung von uPA an seinen spezifischen Rezeptor, und verdeutlicht, dass der Komplex aus suPAR und uPA zu einer Hemmung der Migration führt und selbst keine chemotaktische Wirkung auf HVSMC aufweist.

3.2.2 uPA-induzierte Signalaktivierung in HVSMC

Wenn allein die Ligand-Rezeptor-Interaktion von uPA mit uPAR ohne Mithilfe der Proteolysefähigkeit zur Zellmigration führen kann, müssen Signalprozesse innerhalb der Zelle beteiligt sein. Welche dabei für die Wirkung auf die HVSMC verantwortlich sind, galt es im Folgenden zu beleuchten.

In gesunden Zellen wie aber auch in zahlreichen Tumorzelllinien stellt die Aktivierung des MAPK-Signalwegs einen Beitrag zur mitotischen und migratorischen Aktivität dar. Über die Aktivierung des MAPK/ERK1/2-Signalweges werden Prozesse wie Genexpression und Aktivierung von Calcium/ Calmodulinkinasen wie der Myosin-Light-Chain-Kinase (MLCK) initiiert, welche für Veränderungen des Zytoskeletts im Sinne der Polymerisierung von Aktinfilamenten verantwortlich sind. Die Aktivierung der ERK1/2 erfolgt häufig über sog. kleine GTPasen wie Ras und Raf. Ngyuen et al. publizierten 1999 einen uPAR- und Integrin-vermittelten Einfluss der ERK1/2 auf die Migration der Mammakarzinomzellreihe MCF-7 wie auch der Fibrosarkomzelllinie HT1080, sodass auch in HVSMC eine Beteiligung dieses Signalweges vermutet wurde.

Um eine mögliche Aktivierung der ERK1/2 sowie der PI-3K in uPA stimulierten HVSMC zu untersuchen, wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von uPA über einen Zeitraum von 3-120 min. stimuliert. Anschließend erfolgte der Expressionsnachweis der Aktivierungsprodukte; für ERK1/2 die MAPK p42/p44, für PI-3K entsprechend phosphorylierte Akt/PKB (P-Akt), im Western-Blot. Für beide Signalwege ist eine Aktivierung durch PDGF beschrieben (Heldin et al., 1999), sodass auch in diesen Versuchen PDGFbb als Positivkontrolle, unstimulierte Zellen als Negativkontrolle dienten.

A

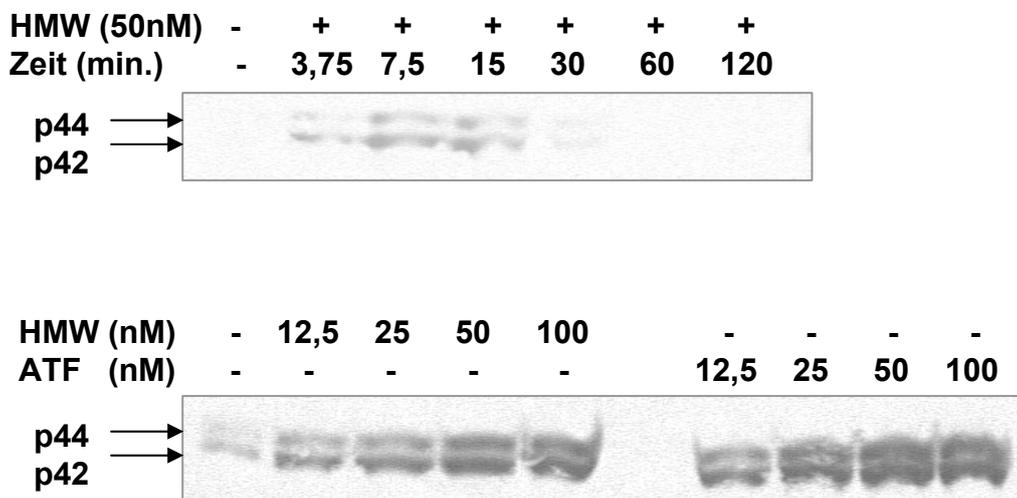


Abb. 22A: Zeit- und Dosisabhängigkeit der ERK1/2 Aktivierung in HVSMC. Stimulation der Zellen mit HMW-uPA (50nM) über unterschiedliche Zeiträume (3-120 min.), sowie mit HMW-/ ATF-uPA (12,5-100nM) über jeweils 15 min..

Die Ergebnisse zeigen eine deutliche Aktivierung der ERK 1/2 in einer dosis- und zeitabhängigen Weise. Die maximale Aktivierung der Zellen wurde nach Stimulation mit 50-100nM uPA über eine Dauer von 15 min. erzielt. Hierbei hatte die proteolytische Aktivität der Urokinase keinen Einfluss auf die Signalaktivierung, da die HMW-Variante ebenso wie die ATF-Form von uPA identische Resultate ergaben (Abb. 22A).

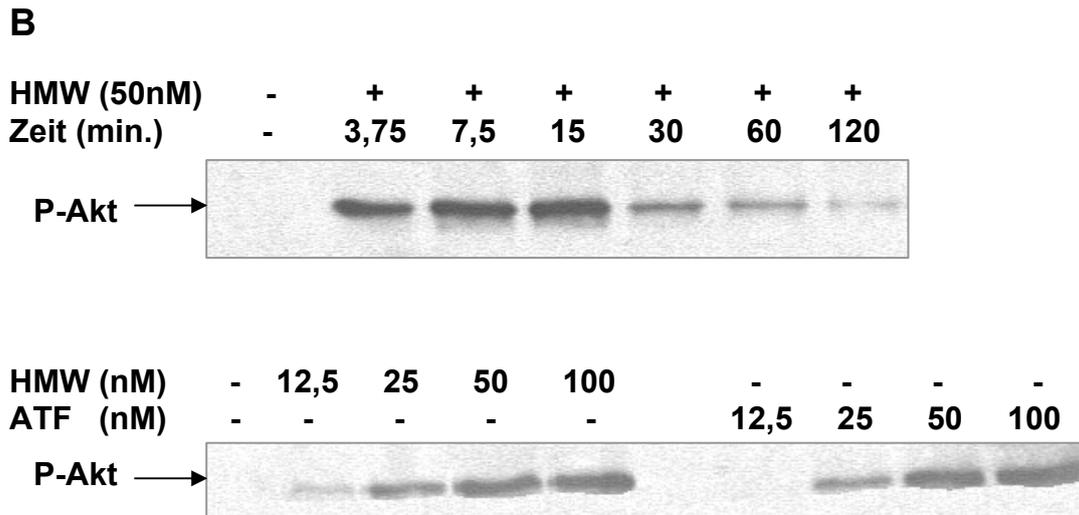


Abb. 22B: Zeit- und Dosisabhängigkeit der PI-3K Aktivierung in HVSMC. Stimulation der Zellen mit HMW-uPA (50nM) über unterschiedliche Zeiträume (3-120 min.), sowie mit HMW-/ ATF-uPA (12,5-100nM) über jeweils 15 min.

Ebenso konnte eine Zeit- und Dosisabhängigkeit der uPA-stimulierten Aktivierung der PI-3K gezeigt werden, wobei sich die katalytisch aktive und inaktive uPA-Form in ihrer Wirksamkeit erneut identisch zeigten (Abb. 22B). Nachdem für beide Signalwege das Stimulationsmaximum mit einer Konzentration von 50-100nM uPA über 15 min. erreicht werden konnte, wurden diese Konditionen für die weiteren Untersuchungen verwendet.

Die Aktivierungsversuche wurden auch in kombinierter Anwesenheit von uPA und suPAR durchgeführt, wodurch eine Hemmung der uPA-vermittelten Akt-Phosphorylierung auftrat, jedoch keine Wirkung auf die Aktivierung der ERK1/2 verzeichnet werden konnte (Daten nicht graphisch dargestellt). Kanse et al. hatten 2001 die Existenz eines neuen, zusätzlichen Urokinase-bindenden Rezeptors auf glatten Gefäßmuskelzellen postuliert, da VSMC-Proliferation aus uPAR-knockout-Mäusen durch uPA induziert werden konnte. Passend dazu zeigten Stimulationsversuche der gleichen Zellen eine deutliche dosisabhängige Aktivierung der ERK1/2 nach Stimulation mit uPA, jedoch keine Phosphorylierung der Akt/PKB. Die Aktivierung der MAPK in VSMC *via* Urokinase scheint somit einem anderen Mechanismus als der uPA-uPAR-Interaktion zu folgen, da MVSMC^{-/-} Zellen keinen uPAR exprimieren und dennoch über uPA stimulierbar waren. Diese Ergebnisse stellen allerdings die Bedeutung der MAPK-Aktivierung für die uPAR-vermittelte

Migration der HVSMC in Frage, sodass im Folgenden der Einfluss pharmakologischer Inhibitoren auf die uPA-induzierte Migration getestet wurde.

3.2.3 Beteiligte Signalwege der uPAR-vermittelten Zellmigration

Der MAPK-Inhibitor PD098059 ist ein spezifischer ERK1/2 Inhibitor, dessen wirksame Konzentration mit 10-50 μM angegeben wird; eine Apoptose induzierende Wirkung wurde nicht beschrieben. Gleiches gilt auch für den PI-3K-Inhibitor Ly294002, welcher an der ATP-Bindungsstelle der PI-3K angreift. Wortmannin, ein weiterer PI-3K-, aber auch PI-4K-Inhibitor wurde in einigen Experimenten parallel verwendet und zeigte prinzipiell gleiche Effekte wie Ly294002. Aufgrund seiner geringeren Stabilität beschränkten wir uns im Verlauf jedoch primär auf Ly294002.

Zunächst wurde die Wirksamkeit der Inhibitoren auf die Hemmung der Substratphosphorylierung untersucht. Wie in Abb. 23 dargestellt, reduzierte der ERK1/2 Inhibitor PD098059 die Phosphorylierung der MAPK p42/p44 in einer Konzentration von 10 μM bis auf Kontrollniveau, bei 50 μM war keinerlei Phosphorylierung mehr nachweisbar. Hingegen konnte der PI-3K-Inhibitor Ly294002 die Aktivierung der ERK1/2 nicht beeinflussen, sehr wohl aber die Phosphorylierung der Akt/PKB in konzentrationsabhängiger Weise mit einem Wirkungsmaximum von 10 μM . PD 098059 hatte keinerlei Einfluss auf die Aktivität der PI-3K. Die Ergebnisse zeigen einerseits die Spezifität der Inhibitoren, andererseits verdeutlichen sie aber auch die Unabhängigkeit der beiden Signalwege voneinander.

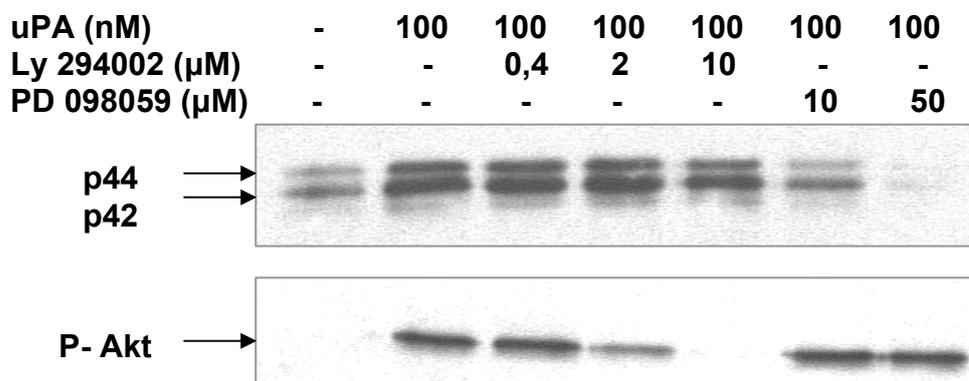


Abb. 23: Wirksamkeitsnachweis und Dosiskontrolle der Inhibitoren Ly294002 und PD098059. Die Zellen wurden 30 min. vor Stimulation mit uPA (100nM) mit den angegebenen Konzentrationen der Inhibitoren präinkubiert und der Effekt der Inhibitoren auf beide Signalwege untersucht.

Beide Inhibitoren wurden nach Nachweis ihrer Wirksamkeit in uPA-stimulierter Migration getestet. Dafür wurden die Zellen jeweils 30 min. vor Beginn des Migrationsassays mit 10 μ M bzw. 50 μ M PD098059 oder mit 10 μ M Ly294002 präinkubiert.

A

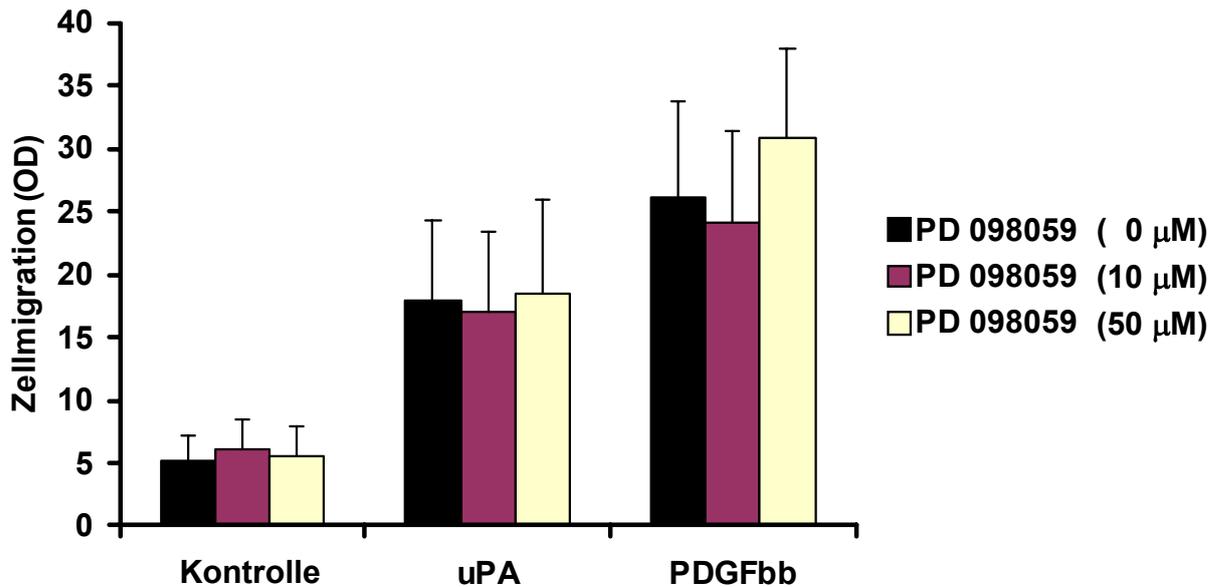


Abb. 24A: Einfluss des MAPK-Inhibitors PD098059 auf die Migration der HVSMC.

Die Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen des Inhibitors PD098059 für 30 min. präinkubiert. Die Stimulation erfolgte danach mit HMW-uPA (100nM) oder PDGFbb (10ng/ml), als Negativkontrolle (Kontrolle) diente Versuchsmedium. Die Ergebnisse zeigen Mittelwerte \pm SEM, N=8.

Wie in Abb. 24A dargestellt hatte die Behandlung der HVSMC mit dem MAPK-Inhibitor PD098059 keinen Einfluss auf uPA- oder PDGF-vermittelte Migration, obwohl mit äquivalenten Dosen des Inhibitors in den Western-Blot-Analysen eine deutliche Inhibition des Signalweges zu erreichen war.

Die Ergebnisse in Abb. 24B hingegen zeigen eine deutliche Hemmung der Zellmigration nach Inkubation der Zellen mit dem PI-3K-Inhibitor. Der stärkste Effekt wurde hierbei für die uPA-induzierte Zellmigration verzeichnet. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die uPAR-vermittelte Migration von HVSMC die uPA-induzierte Aktivierung der PI-3K benötigt, jedoch unabhängig von der Aktivierung der ERK1/2 abläuft.

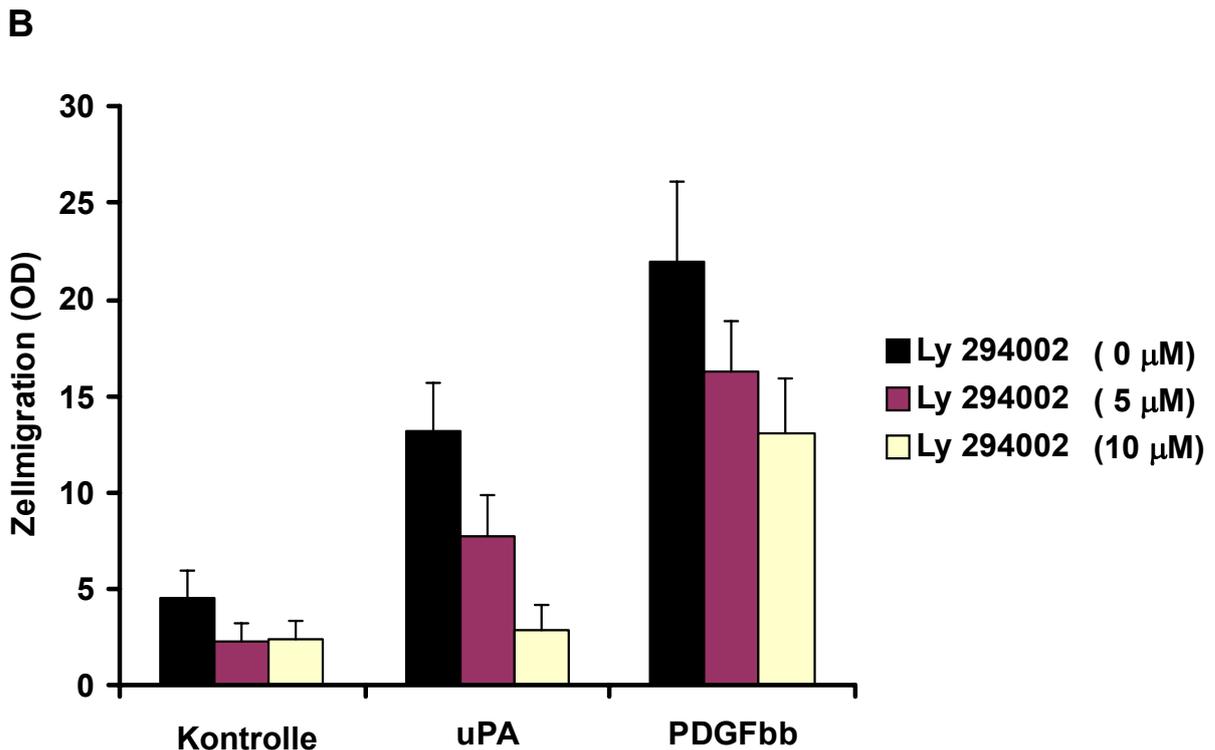


Abb. 24B: Einfluss des PI-3K Inhibitor Ly294002 auf die Migration der HVSMC.

Die Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen des Inhibitors Ly294002 für 30 min. präinkubiert. Die Stimulation erfolgte danach mit HMW-uPA (100nM) oder PDGFbb (10ng/ml), als Negativkontrolle (Kontrolle) diente Versuchsmedium. Die Ergebnisse zeigen Mittelwerte +/- SEM, N=9.

Ein weiterer, für Zellmigration typischer Signalweg ist die G-Proteine vermittelte Aktivierung der Phospholipase C (PLC) (siehe auch Abb. 21, S. 59), wodurch es über den Anstieg des Inositol-1,4,5-triphosphat (InsP₃) zur intrazelluläre Ca²⁺-Erhöhung kommt, die wiederum für die Aktivierung verschiedener Ca²⁺/Calmodulinkinasen notwendig ist. Ca²⁺/Calmodulinkinasen, z.B. Myosin-Light-Chain-Kinase (MLCK) oder Ca²⁺/Calmodulinkinase II (Ca/CalmKII), verändern durch Phosphorylierung der Myosinseitenketten deren Kontraktionszustand und haben essentielle Bedeutung für die Zellmotilität. Da bereits eine Beteiligung G-Protein-abhängiger Migration in anderen Zellen, sowie der Nachweis von G_{iα} in uPAR-vermittelter Zelladhäsion auf Vitronektin beschrieben wurde, lag die Vermutung einer Beteiligung an uPAR-vermittelter Migration der HVSMC nahe, sodass der Einfluss von Pertussistoxin auf selbige untersucht wurde.

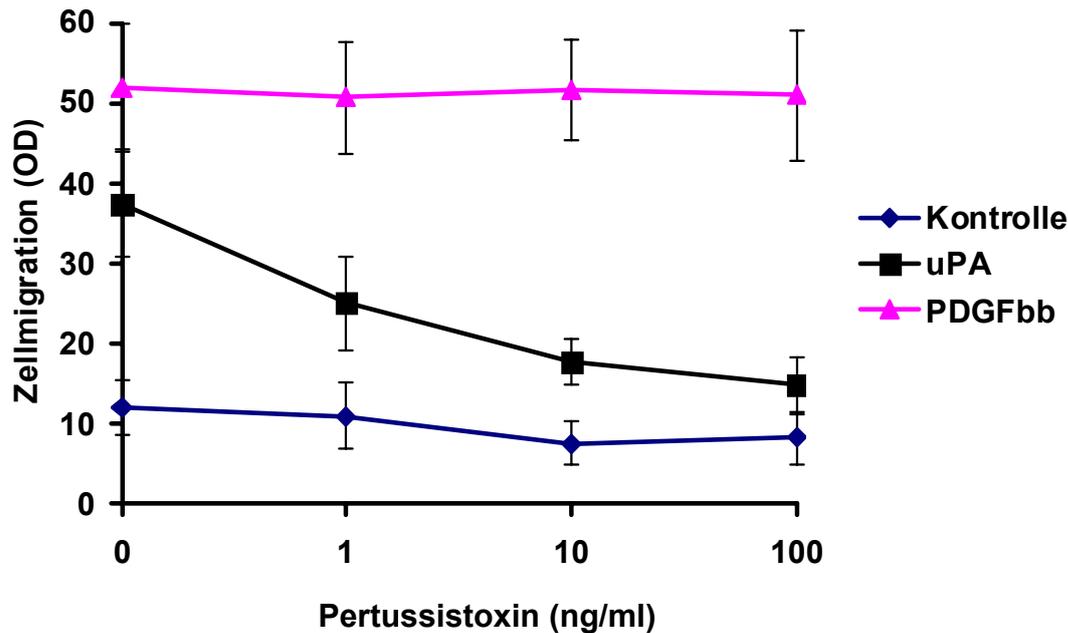


Abb. 25: Einfluss von Pertussis toxin auf die Migration der HVSMC.

Die Zellen wurden 16h mit unterschiedlichen Konzentrationen Pertussis toxin (1-100ng/ml) vorinkubiert. Die Stimulation der Zellen erfolgte mit HMW-uPA (100nM) oder PDGFbb (10ng/ml), die Negativkontrolle mit Versuchsmedium. Die Ergebnisse zeigen Mittelwerte +/- SEM, N=9.

Pertussis toxin führte zu einer dosisabhängigen Hemmung uPAR-vermittelter Zellmigration, hingegen blieben die basale wie auch die PDGFbb-stimulierte Migration unbeeinträchtigt (Abb. 25). Eine Beteiligung inhibitorischer G-Proteine spezifisch in uPA-/ uPAR-abhängiger HVSMC-Migration konnte somit nachgewiesen werden. Um dieses Ergebnis zu untermauern, wurde der Einfluss möglicher downstream-Wege inhibitorischer G-Protein, wie die Aktivierung der PLC mit Folge einer intrazellulären Ca^{2+} -Erhöhung, auf die Motilität der Gefäßmuskelzellen untersucht. Die Behandlung der HVSMC mit dem PLC β/γ -Inhibitor U73122 sowie dem membranpermeierenden Calcium-Chelator BAPTA/AM führte jeweils zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung sowohl der uPA-, wie auch der PDGFbb-stimulierten Zellmigration (Abb. 26A/B). Identischen Effekt hatte der Einsatz des Calcium-Ionophor A23 in einer Konzentration von 1-10 μM (Daten nicht graphisch dargestellt).

Beide Stimulationswege, sowohl uPA wie auch PDGF sind demnach angewiesen auf eine intrazelluläre Calciumerhöhung als Voraussetzung der Zellmotilität. Die Initiierung über den uPA-Rezeptor erfolgt jedoch in G-Protein-abhängiger Weise. Für den PDGF-Rezeptor ist ein Tyrosinkinaseweg bekannt.

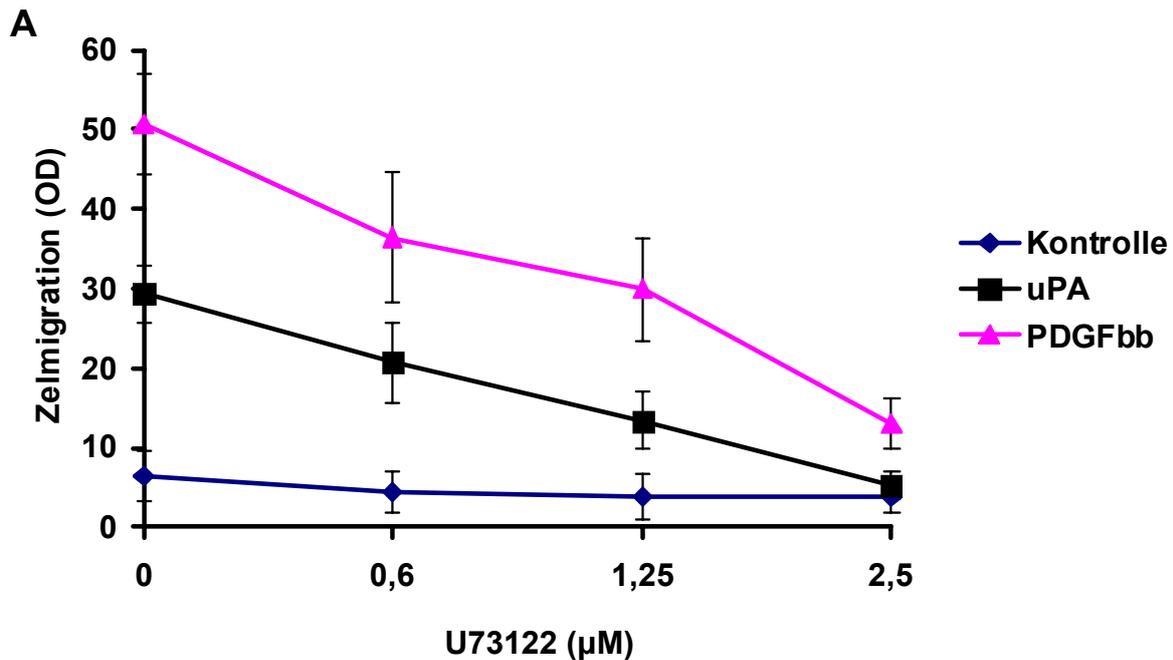


Abb. 26A: Einfluss des PLC-Inhibitors U73122 auf die Migration der HVSMC.

Die Präinkubation der Zellen erfolgte mit den angegebenen Konzentrationen des PLC-Inhibitors U73122 für 30 min., die Stimulation mit HMW-uPA (100nM) oder PDGFbb (10ng/ml). Als Negativkontrolle diente Versuchsmedium. Die Ergebnisse zeigen Mittelwerte +/- SEM, N=4.

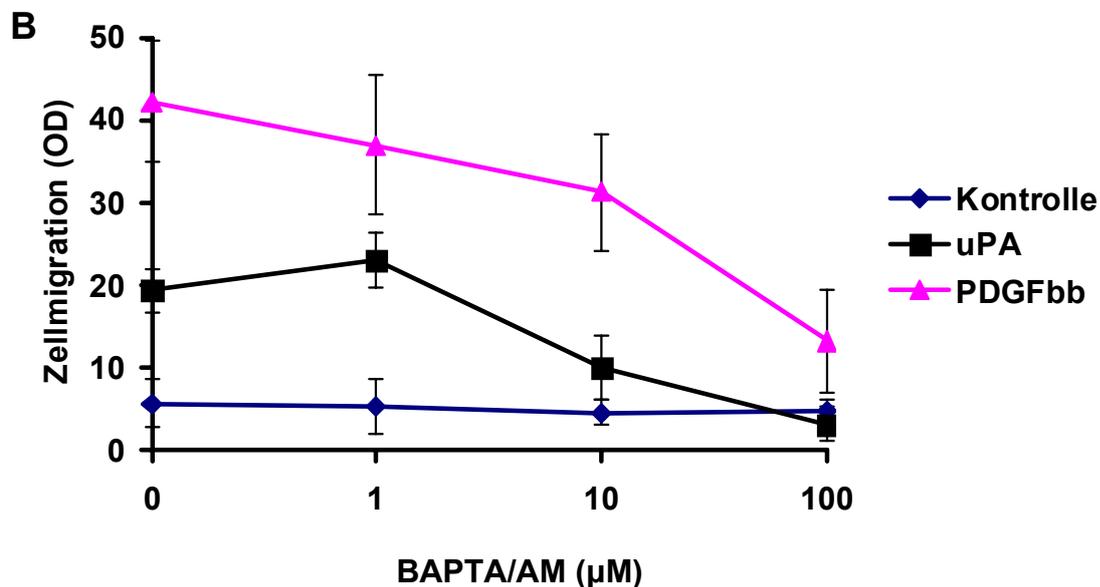


Abb. 26B: Einfluss des Calcium-Chelator BAPTA/AM auf die Migration der HVSMC.

Die Präinkubation der Zellen erfolgte mit BAPTA/AM für 30 min., die Stimulation mit ATF-uPA (100nM) oder PDGFbb (10ng/ml). Als Negativkontrolle diente Versuchsmedium. Da BAPTA/AM das Lösungsmittel DMSO enthält, wurde allen Zellen während der Präinkubtion eine, der höchsten verwendeten BAPTA/AM Konzentration identische DMSO-Menge beigefügt, um einen unspezifischen Effekt des Lösungsmittels auszuschließen. Die Ergebnisse zeigen Mittelwerte +/- SEM, N=4.

Neben der Aktivierung der PLC- β ist ein weiteres Target G-Protein-gekoppelter Rezeptoren die Synthese des 2nd messengers cAMP über die Regulation der Adenylatcyclaseaktivität. Pertussis toxin führt über die ADP-Ribosylierung der α -Einheit inhibitorischer G-Proteine zur unwiderruflichen Hemmung derselben, wodurch die inhibitorische Wirkung des $G_{i\alpha}$ auf die Adenylatcyclase (AdCyc) entfällt und es zum intrazellulären cAMP-Anstieg kommt. Ob auch dieser Mechanismus bei der uPAR-vermittelten, für die Migration der HVSMC notwendigen Signalaktivierung eine Rolle spielt, wurde mittels weiterer pharmakologischer Komponenten getestet. Forskolin, ursprünglich eine Substanz aus der indischen Pflanze *Coleus forskoli*, kann direkt am katalytischen Zentrum der Adenylatcyclase angreifen und diese aktivieren, woraufhin es zum intrazellulären cAMP-Anstieg kommt.

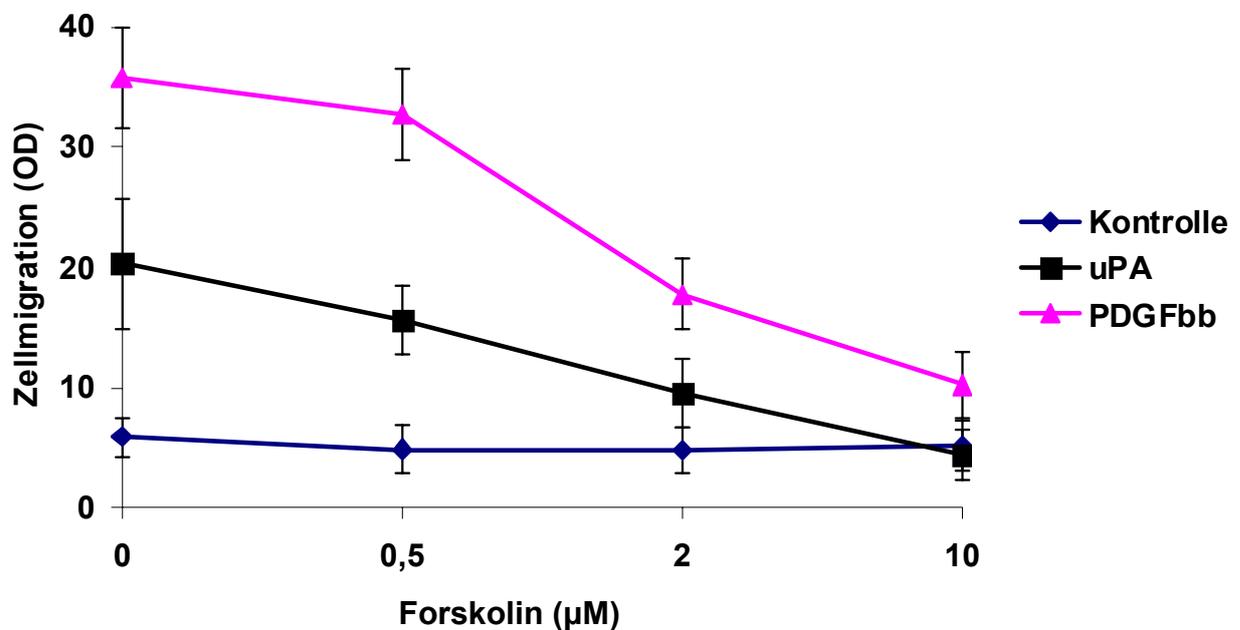


Abb. 27: Einfluss des AdCyc-Stimulators Forskolin auf die Migration der HVSMC.

Die Präinkubation der Zellen erfolgte mit den angegebenen Konzentrationen Forskolin für 30 min., die Stimulation mit HMW-uPA (100nM) oder PDGFbb (10ng/ml). Als Negativkontrolle diente Versuchmedium. Die Ergebnisse zeigen Mittelwerte \pm SEM, N=3.

Die Behandlung der Zellen mit Forskolin bewirkte eine dosisabhängige Hemmung der uPA- wie auch der PDGF-induzierten Migration, ohne die unstimulierten Kontrollzellen zu beeinflussen (Abb. 27). Versuche mit einer membranpermeablen cAMP-Form (6Benz-cAMP) ergaben vergleichbare Ergebnisse (Daten nicht graphisch dargestellt), sodass der Aktivitätszustand der Adenylatcyclase für beide Stimulationswege von Bedeutung zu sein scheint.

Wie könnten die bislang identifizierten Signalwege nun ineinander greifen? Ein Einfluss der aktivierten Signalkaskade über G-Proteine, cAMP und PLC auf die Aktivierung der PI-3 Kinase wäre sowohl outside in, wie auch sekundär inside out über die erfolgten zytoskelettären Veränderungen denkbar, sodass im nächsten Schritt der Einfluss von Pertussistoxin und dem PLC-Inhibitor U73122 auf die Phosphorylierung der Akt/PKB und demnach die Aktivierung der PI-3K untersucht wurde.

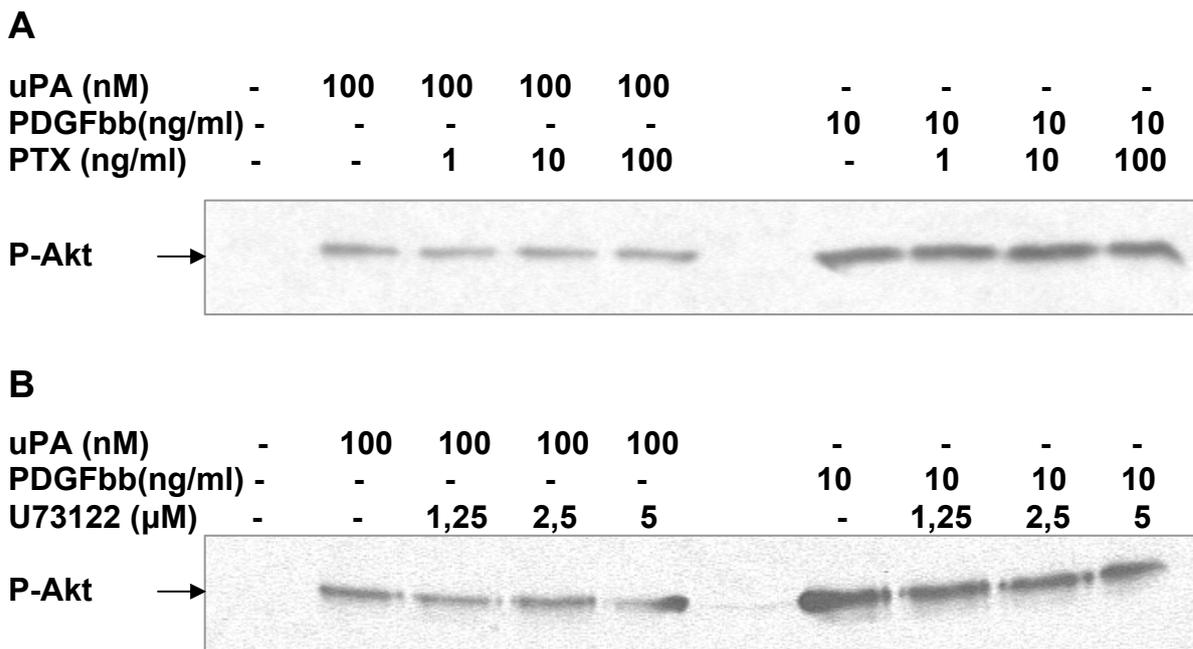


Abb. 28A/B: Einfluss von Pertussistoxin (A) und U73122 (B) auf die PI-3K-Aktivierung in HVSMC. Die Präinkubation der HVSMC erfolgte entweder mit PTX (1-100ng/ml) über 16h oder mit U73122 (1,25-5µM) über 30 min.. Stimuliert wurden die Zellen mit HMW-uPA (100nM) oder PDGFbb (10ng/ml) über 15 min., als Negativkontrolle diente Versuchsmedium. Nachgewiesen wurde dann phosphorylierte Akt/PKB als Substrat aktivierter PI-3K im Western-Blot.

Beide Substanzen hatten keinen erkennbaren Einfluss auf die Aktivierung der PI-3K (Abb. 28), obwohl die hier eingesetzten Konzentrationen von PTX und U73122 im Migrationsassay bereits eine starke Hemmung der Zellmotilität bewirken konnten. Die Interpretation der oben dargestellten Ergebnisse ergibt demnach die Schlussfolgerung, dass G_i-Protein- sowie PI-3K-abhängige Signalwege parallel und voneinander unabhängig aktiviert werden, aber beide zur uPAR-vermittelten Migration der HVSMC beitragen.

3.2.4 Rolle von Lipiddomänen in uPAR-vermittelter Zellmigration

Die Untersuchungen bezüglich uPAR-vermittelter Adhäsion beruhen auf der Voraussetzung einer Konzentration des GPI-verankerten Rezeptors in Lipiddomänen. Selbiges kann man auch für die, zur Zellmigration führende Signalaktivierung *via* uPAR, postulieren. Daher wurde der Einfluss von Substanzen, welche die Formierung von Membranlipiddomänen stören, Cholesteroxidase (CholOx) und β -Methylcyclodextrin (MBCD), auf die Migration der HVSMC untersucht.

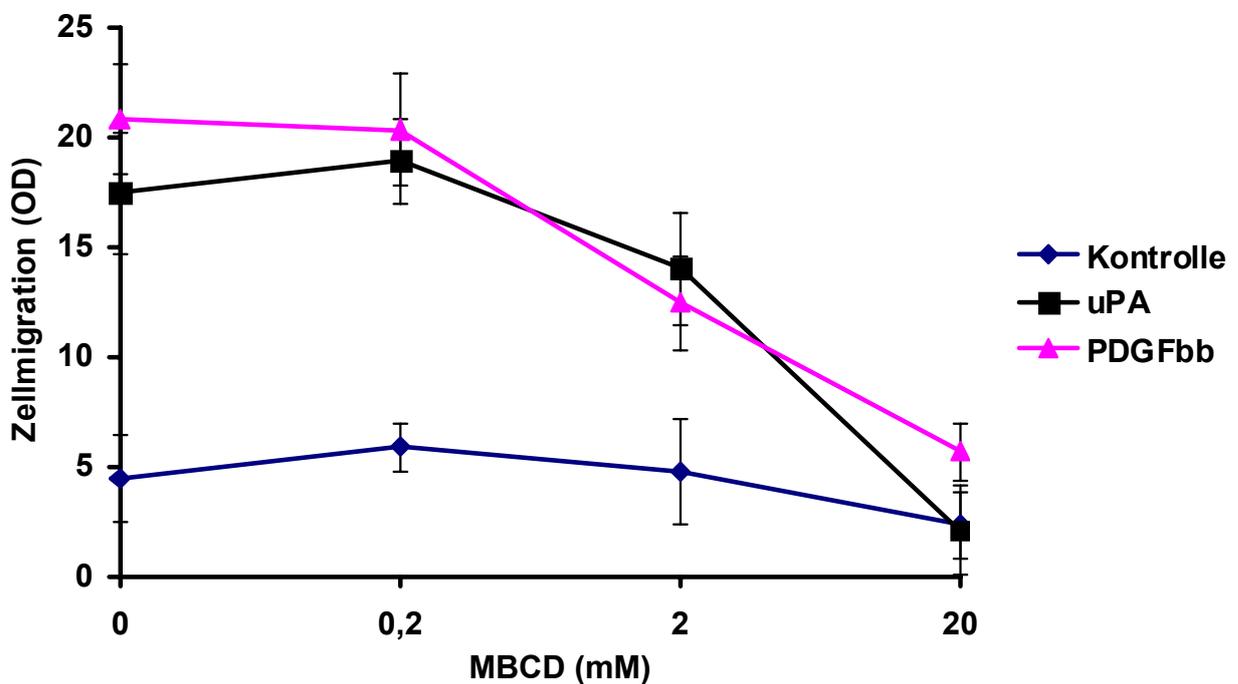


Abb. 29: Einfluss von MBCD auf die Migration der HVSMC.

Die Präinkubation der Zellen erfolgte mit den angegebenen Konzentrationen MBCD für 30 min., die Stimulation mit HMW-uPA (100nM) oder PDGFbb (10ng/ml). Als Negativkontrolle diente Versuchsmedium. Die Ergebnisse zeigen Mittelwerte \pm SEM, N=3.

Die Zerstörung der Lipiddomänen durch MBCD (Abb. 29) führte in PDGFbb- wie uPA-stimulierter Zellmigration zu einer deutlichen Hemmung, sodass interessanterweise die Colokalisation von beiden Rezeptoren in lipidreichen Membrandomänen für die migrationsvermittelnde Signalaktivierung notwendig zu sein scheint. Die Versuche mit Cholesteroxidase ergaben vergleichbare Ergebnisse und sind hier nicht mehr isoliert graphisch dargestellt.

Wenn für beide Stimulatoren, uPA und PDGFbb, die chemotaktische Wirkung auf HVSMC u.a. von einer Aktivierung der PI-3K abhängt, aber auch von einer Akkumulation der entsprechenden Rezeptoren in lipidreichen Membrandomänen, so postulierten wir einen negativen Effekt von MBCD oder/und Cholesteroxidase auf die Phosphorylierung von Akt.

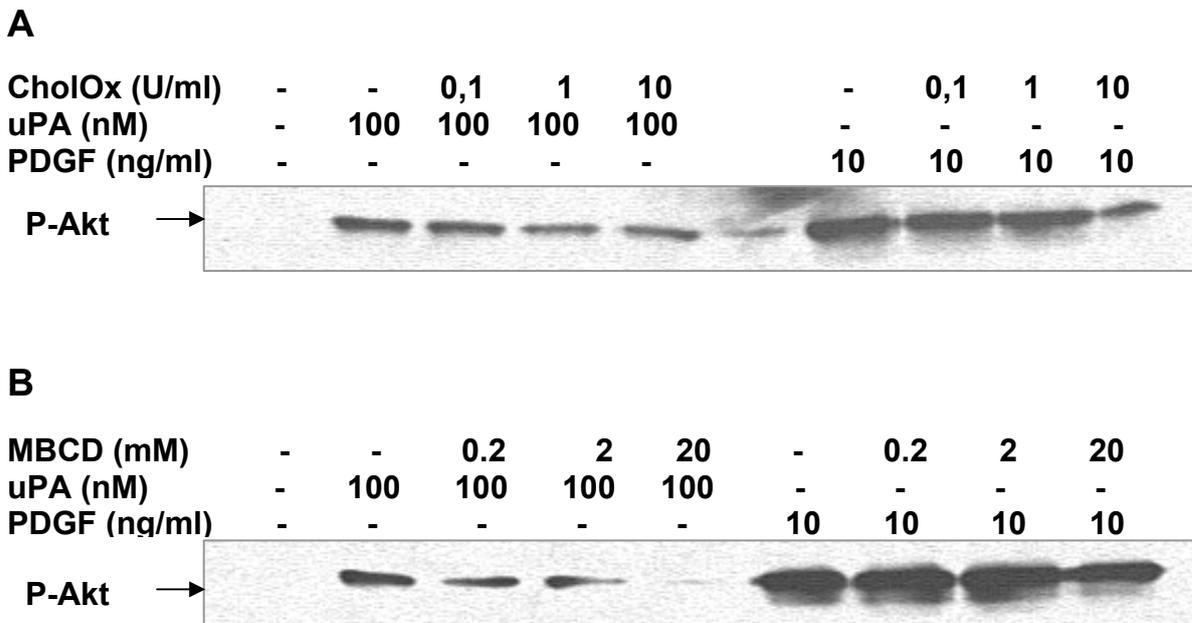


Abb. 30A/B: Einfluss von CholOx (A) und MBCD (B) auf die Phosphorylierung von Akt/PKB.

Die Präinkubation der Zellen erfolgte mit den angegebenen Konzentrationen von CholOx (0,1-10 U/ml) oder MBCD (0,2-20 mM) für 30 min., die Stimulation mit HMW-uPA (100nM) oder PDGFbb (10ng/ml) über 15 min. Als Negativkontrolle diente Versuchsmedium.

Die entsprechende Western-Blot-Analyse ergab eine dosisabhängige Reduktion der Akt-Phosphorylierung nach Präinkubation der Zellen mit beiden Substanzen. Allerdings zeigte insbesondere die Behandlung der Zellen mit MBCD einen deutlich ausgeprägteren Effekt auf uPA-stimulierte Phosphorylierung im Vergleich zu PDGF. Diesbezüglich passen die deutliche Hemmung uPAR-abhängiger Migration durch den PI-3K Inhibitor Ly294002 (Abb. 24B, S.63) mit dem Einfluss von MBCD auf uPA-stimulierte Migration und Akt-Phosphorylierung überein. Hingegen scheint die Zerstörung von lipidreichen Mikrodomänen zwar auch einen ausgeprägten Effekt auf PDGF-stimulierte Zellmigration zu haben, dieser ist nach oben dargestellten Ergebnissen jedoch nicht primär auf eine Hemmung der PI-3K-Aktivität

zurückzuführen. Insgesamt scheint diese für PDGF-vermittelte Zellmigration nicht in selbem Maße wichtig, wie für das uPA-/uPAR- System (Vergleiche Abb.24).

Zum Ende des Ergebnisteils lässt sich bezüglich der zweiten Fragestellung der Arbeit zusammenfassen, dass uPAR-vermittelte Migration humaner glatter Muskelzellen abhängig von der Bindung des Liganden uPA an seinen Rezeptor, jedoch unabhängig von der proteolytischen Aktivität der Protease ist.

Die Ligand-Rezeptorassoziation führt zur Aktivierung unterschiedlicher Signalkaskaden, welche mitunter parallel und unabhängig voneinander stimuliert werden. Involviert sind G_i -Proteine, mit ihren downstream-Komponenten der PLC und Adenylatcyclase. Eine intrazelluläre Calciumerhöhung ist dabei anscheinend essentiell, *vice versa* wirkt sich eine intracelluläre cAMP-Erhöhung negativ auf die Migrationsfähigkeit der Zellen aus.

Die Aktivierung der PI-3K ist ebenfalls essentiell für uPAR-vermittelte HVSMC-Migration. Die entscheidende Voraussetzung für uPAR-abhängige Signalaktivierung und daraus resultierende Zellmotilität ist hierbei die Konzentration des Rezeptors in lipidreichen Membranmicrodomänen.

4 Diskussion

4.1 uPAR als Regulator von Zelladhäsionsprozessen

4.1.1 Interpretation der Ergebnisse

Das Verständnis von Zell-Matrixadhäsionsprozessen basierte lange Zeit auf der Interaktion von Matrixbestandteilen mit ihren spezifischen Adhäsionsproteinen, den Integrinen. In den letzten zehn Jahren hat die Bedeutung des Urokinaserezeptors als zusätzlicher Regulator von Integrinfunktionen dieses Bild jedoch modifiziert (May et al. 1998, Wei et al. 1999, Simon et al. 2000, Degryse et al. 2005 u.w.). Die Identifikation von uPAR als direkten Vitronektin-Bindungspartner warf zusätzliche Möglichkeiten aber auch zahlreiche Fragen auf.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Zelladhäsion auf Vitronektin mit uPAR als direktem Bindungspartner für das Matrixprotein einen stabilen Kontakt zwischen Zelle und Matrix herstellen kann. Diese Bindung war unabhängig von jedweder Integrinaktivität, aber abhängig von der Akkumulation des uPAR in Detergenz-unlöslichen Adhäsionskomplexen (DIAPs).

Nach bisherigem Kenntnisstand und den Ergebnissen dieser Arbeit kommen demnach prinzipiell drei Möglichkeiten der Zelladhäsion auf Vitronektin in Betracht.

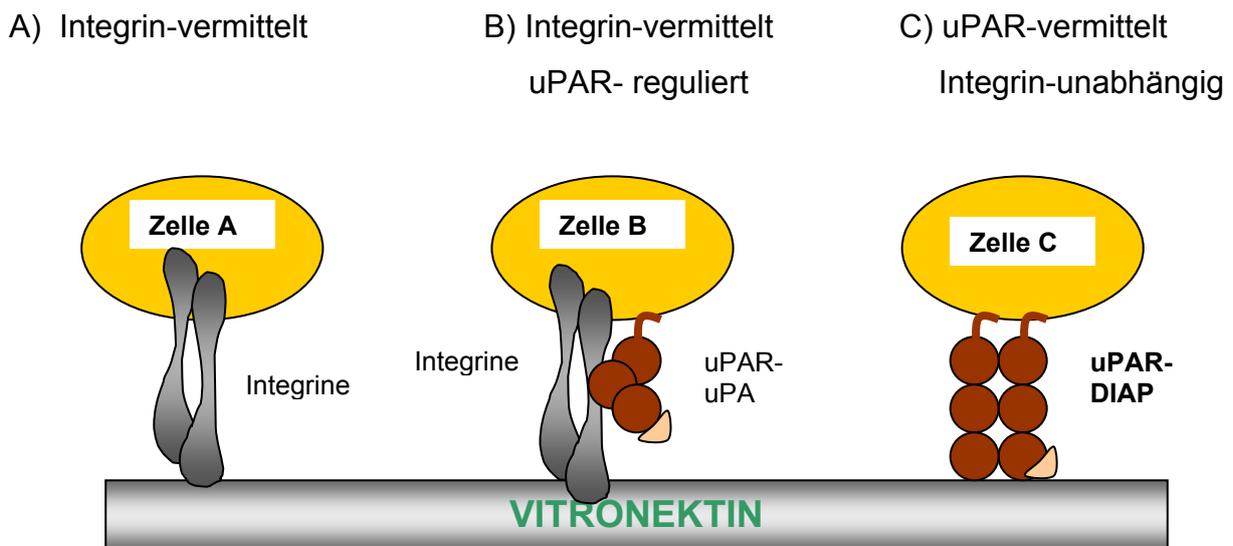


Abb. 31: Möglichkeiten zellulärer Adhäsion auf Vitronektin.

Die weitere Untersuchung der uPAR-spezifischen Adhäsionskomplexe ergab das Fehlen jeglicher Integrine, sodass die Frage, ob Integrine unabhängig von ihrem Aktivitätszustand nicht trotzdem als Adapterproteine zwischen uPAR und intrazellulären Zytoskelettverankerungen fungieren, in diesem Fall verneint werden musste.

Essentiell für die Formation Detergenz-unlöslicher uPAR-abhängiger Adhäsionskomplexe (DIAPs) auf VN war die Konzentration des GPI-verankerten uPAR in lipidreichen Microdomänen. Zerstörte man diese Domänen, wie mit N-Octylglucosid geschehen, so verblieb lediglich ein minimaler uPAR-Rest an VN gebunden, welcher als unspezifisches Artefakt interpretiert wurde (HEK293 uPAR(+), Kapitel 3.1.2). Kurz eingegangen werden soll an dieser Stelle auf die uPAR-Verteilung innerhalb der unterschiedlichen Fraktionen im Rahmen der DIAP-Präparation.

Nach Adhäsion beider Zellarten auf VN war der überwiegende uPAR-Anteil in den DIAPs sowie im löslichen Überstand (S) zu finden und deutlich geringer in der unlöslichen Pellet-Fraktion (P). Die uPAR-VN-Interaktion ist demnach ein aktiver Prozess, für welchen uPAR in die Adhäsionskomplexe rekrutiert werden muss. Der nicht in den Lipiddomänen befindliche uPAR, welcher sich z.B. in Umbauprozessen im Zytosol befindet, wurde dementsprechend in der lysierten Fraktion detektiert. Nach Integrin-abhängiger Zelladhäsion auf einem anderen Matrixprotein (FN, Fbg) konzentrierte sich uPAR einerseits wie gehabt in der löslichen Fraktion (S), andererseits aber stärker im unlöslichen aber nicht adhätierenden Pellet. Dies spricht dafür, dass uPAR in gewissem Maße immer in lipidreichen Microdomänen zu finden ist. Erst durch den Kontakt zum Substrat VN wird dieser uPAR-Anteil aber aktiviert, sodass es zur Bildung von Adhäsionskomplexen kommt und so die Umverteilung des uPAR-Anteils aus der Pellet- in die DIAP-Fraktion sichtbar wurde.

Wenngleich noch nicht geklärt ist, wie die Kontaktmechanismen genau funktionieren, konnten in Kapitel 3.1.3 weitere Bestandteile des uPAR-abhängigen Adhäsionskomplexes charakterisiert werden. Hierzu gehörten intrazelluläre Fokalkontaktproteinen wie Vinculin und Aktin, wohingegen z.B. Talin als typisches Integrin-bindendes Protein fehlte. Signalproteine wie $G_{i\alpha}$, c-Src oder das Substrat Phosphotyrosin konnten ebenfalls detektiert werden. Dies unterstreicht die individuelle Funktionalität des uPAR-Adhäsionskomplexes, über den es durch intrazelluläre Signalprozesse und zytoskelettalen Umbau zur stabilen Zelladhäsion

kommt. Allerdings bestand ein Unterschied zwischen HEK293 und BAF3 Zellen. In den Untersuchungen der DIAPs nach BAF3 uPAR(+)-Adhäsion auf VN konnte neben uPAR lediglich ein geringer Nachweis von c-Src erbracht werden, hingegen bei HEK293 (uPAR+) Zellen Vinculin, Aktin, $G_{i\alpha}$ und c-Src. Eine Erklärung könnte in den Unterschieden zwischen Adhärenz- und Suspensionszelllinie zu finden sein, mit Nachweisproblemen zu geringer Proteinmengen zytoskelettärer Bestandteile in den BAF3 Zellen. Die durchgeführten immunhistochemischen Färbungen sowie die Lasermikroskopie schienen diesbezüglich sensitiver zu sein. Dort war eine deutliche Colokalisation von uPAR mit Aktin und Phosphotyrosin nach BAF3 (uPAR+) Adhäsion auf VN sichtbar.

Abb. 32 zeigt schematisch einen möglichen uPAR-Adhäsionskomplex.

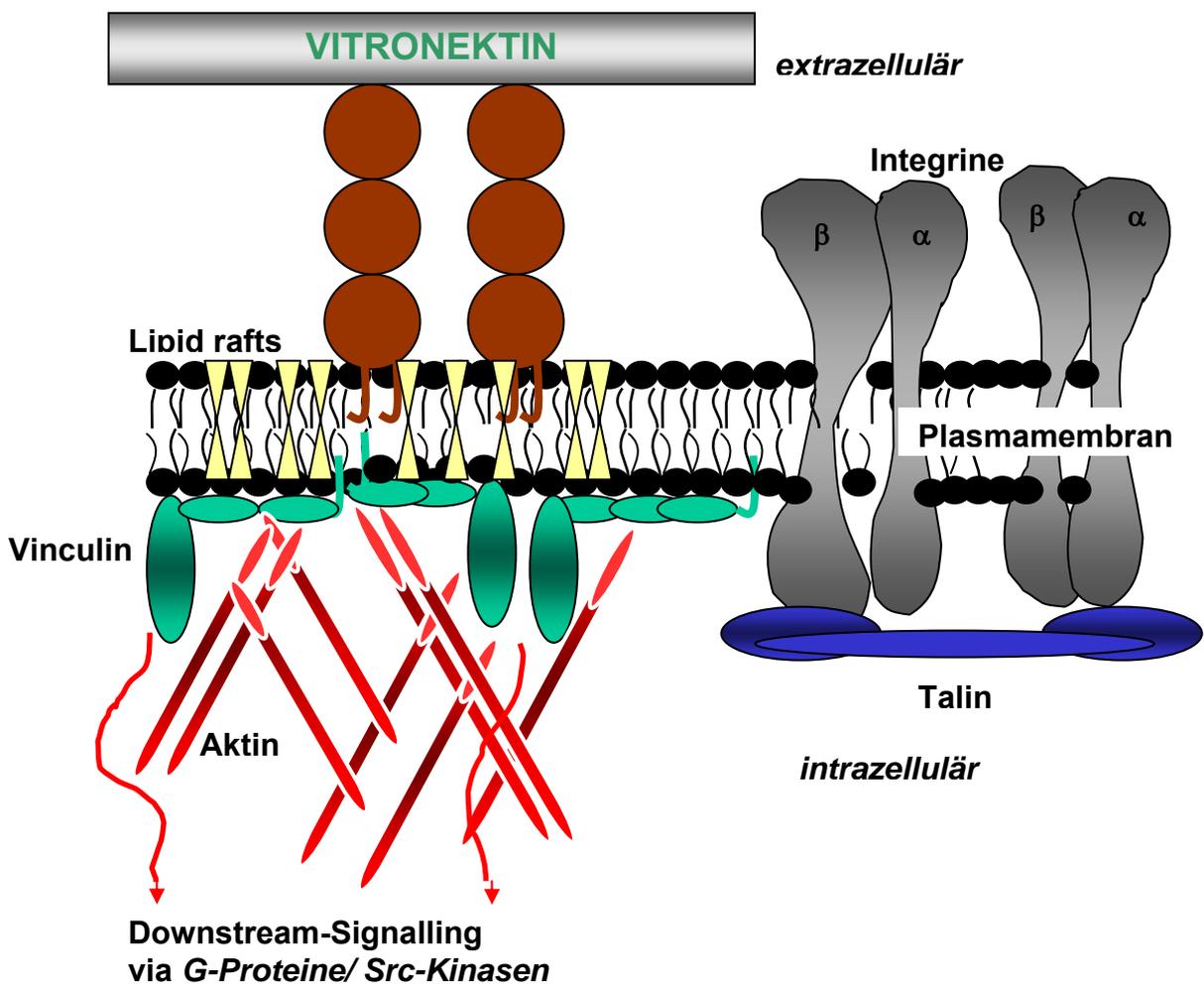


Abb. 32: Schematische Darstellung einer möglichen Formation im uPAR-Adhäsionskomplex nach VN-Bindung, wobei Integrine NICHT Bestandteil innerhalb der Lipiddomänen sind.

4.1.2 Frage nach uPAR- assoziierten Adapterproteinen

Eine Beteiligung von Adapterproteinen an der Verbindung des uPA-Rezeptors mit zytoskelettären Bestandteilen ist wahrscheinlich, konnte aber im Rahmen dieser Arbeit weder ausgeschlossen noch bewiesen werden. Für andere GPI-verankerte Proteine gilt eine ähnliche Problematik.

Beispielsweise wurde für die T-Zellrezeptoraktivierung das sog. linker for activation of T cells (LAT)-Protein (Simons et al., 2000) und für den IL-6 Rezeptor gp130 identifiziert (Chow et al., 2001). Über gp130 wird unter anderem c-Src und der Signalweg der JAK/STAT-Proteine aktiviert. Da auch in den DIAP-Präparationen beider Zelllinien ein Nachweis von c-Src erbracht werden konnte und Koshelnik et al. bereits 1997 eine Assoziation von uPAR mit gp130 beschrieb, wäre gp130 prinzipiell ein mögliches Adapterprotein. Allerdings exprimieren BAF3 Zellen kein gp130 und zeigten nach Transfektion mit dem Urokinaserezeptor dennoch eine deutliche uPAR-vermittelte Adhäsion auf VN, sodass diese Möglichkeit in den hier getesteten Zellen keine Rolle spielen konnte. Auch Caveolin wurde in Assoziation mit β_1 -Integrinen, Src-Kinasen und uPAR identifiziert (Wei et al., 1999; Chapman et al., 1999) und stellt insofern eine attraktive Adaptermöglichkeit für die uPAR-vermittelten Adhäsion dar. BAF3 Zellen exprimieren jedoch auch Caveolin nicht und HEK293 Zellen nur in geringem Maße. Dennoch zeigten beide Zellarten eine stabile uPAR-vermittelte Adhäsion auf Vitronektin. Schließlich konnte Caveolin zwar in der Detergenz-löslichen Fraktion, nicht jedoch in den DIAPs der HEK293 Zellen detektiert werden, was gegen eine Adapterfunktion von Caveolin in diesen Zellen spricht. Erste Versuche der biochemischen Darstellung uPAR-assoziierter Proteine in den Adhäsionskomplexen mittels 2D-Gel-Elektrophorese (unter freundlicher Mitwirkung der Arbeitsgruppe Linder, Biochemisches Institut Gießen) zeigten eine große Anzahl von Proteinen. Nach einer 2005 erschienenen Publikation von de Hoog et al. konnten in Fokalkontakten 280 verschiedene Proteine detektiert werden, sodass die Vorstellung besteht, dass uPAR in seinen Lipiddomänen ähnlich komplexe Strukturen formiert. Die Identifizierung der beteiligten Proteine verspricht, interessant zu werden, steht jedoch noch aus.

4.1.3 Bedeutung uPAR-regulierter Adhäsion *in vivo*

In der Literatur bestehen zahlreiche Daten über die Bedeutung des uPA-Rezeptors bezüglich seiner Integrinfunktion-regulierenden Fähigkeit, und lange Zeit galt dies als einzige Möglichkeit uPAR-regulierter Zelladhäsion. Die postulierte direkte Bindung von uPAR an β_1 - und β_2 -Integrine stellt einen Mechanismus dar, wie uPAR zusätzlich Zell-Matrix-, und Zell-Zellkontakte modulieren kann (Tarui et al., 2001).

Insbesondere die direkt mögliche uPAR-VN-Interaktion scheint jedoch von Bedeutung. Hierfür weist das Urokinase-System einen eigenständigen Regulationsmechanismus auf, indem PAI-1 mit seiner VN-bindenden Fähigkeit die uPAR-vermittelte VN-Adhäsion hemmen kann. Auch löslicher uPAR (suPAR) könnte diese Funktion übernehmen, d.h. ob eine Bindung der uPAR-exprimierenden Zelle an VN stattfinden kann hängt nicht nur vom Ausmaß der Expression ab, sondern auch von der Gegenwart und Sekretion löslichen uPARs und PAI-1. Vitronektin wird u.a. in inflammatorischen Geweben und bei Wundheilungsprozessen vermehrt synthetisiert, sodass über uPAR Zellen auch unter Bedingungen, die keine Adhäsion über Integrine zulassen an einer Vitronektin-Matrix adhären könnten.

Für die Adhäsion von Tumorzellen kann ein ähnlicher Mechanismus postuliert werden. In vielen Tumorgeweben kommt VN vermehrt vor, sodass bei entsprechender Expression des uPA-Rezeptors eine Stabilisierung von Tumorzellen in VN-reichem Gewebe die Folge sein könnte. Zum anderen gilt die Adhäsion von in der Blutbahn befindlichen Tumorzellen als initialer Schritt zu deren Einwanderung in weitere Organe, sodass die Hemmung dieses Schrittes ein mögliches Target einer Therapie darstellen könnte. Für diesen Fall ist die Erkenntnis, dass Zelladhäsion nicht nur über Integrininteraktionen, sondern auch über uPAR an Vitronektin stattfindet, von Bedeutung. Mit der Interaktionshemmung von uPAR mit VN aber auch von uPAR mit weiteren Integrinen könnte gleich auf zweierlei Weise die Adhäsionsfähigkeit der Zellen vermindert werden, da sowohl die direkte Bindung, als auch der regulatorische Einfluss von uPAR auf Integrine beeinträchtigt wäre.

Die stimulierende Wirkung inflammatorischer Zytokine auf die uPAR-Expression ist ebenfalls interessant. In atherosklerösen Plaques befindliche Schaumzellen sezernieren Zytokine wie IL-1, TNF- α und auch uPA, welche u.a. zur vermehrten Expression des uPA-Rezeptors führen (Feliciani et al., 2003; Han et al., 2002) und chemotaktische Wirkung auf die Lymphozyten ausüben, sodass die Einwanderung

von Lymphozyten und Makrophagen in die Gefäßwand stimuliert wird. Dort können diese ggf. durch direkte uPAR-VN Bindung in den adhäsiven Status gebracht werden und zum Wachstum des atherosklerotischen Plaque beitragen, ihrerseits wiederum Zytokine oder Chemokine sezernieren und einen pathologischen Kreislauf aufrecht erhalten. Zum anderen wirkt uPA direkt chemotaktisch auf glatte Gefäßmuskelzellen, was ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde und im Folgenden diskutiert wird.

4.2 uPAR als Regulator von Zellmigrationsprozessen

4.2.1 Interpretation der Ergebnisse

In Kapitel 3.2.1 konnte gezeigt werden, dass über die uPA-uPAR Interaktion *in vitro* eine 3-4-fache Steigerung der Migration humaner Gefäßmuskelzellen (HVSMC) in dosisabhängiger aber proteolyseunabhängiger Weise initiiert werden kann. Diese Wirkung war eindeutig abhängig von einer Bindung an den spezifischen uPA-Rezeptor, da sowohl uPAR-spezifische Antikörper wie auch suPAR diesen Effekt hemmen konnten, andererseits VSMC von uPAR-knockout-Mäusen keine Migration nach uPA-Stimulation aufwiesen. Dieser Nachweis erschien deshalb sehr wichtig, da in vorherigen Arbeiten eine uPA-stimulierte aber anscheinend uPAR-unabhängige Proliferation sowie Aktivierung der ERK1/2 von VSMC aus uPAR-knockout-Mäusen beschrieben worden war (Kanase et al. 1997; 2001).

Die Hemmung der Migration durch suPAR muss kontrovers diskutiert werden. Einerseits erscheint der Mechanismus klar, da suPAR Urokinase bindet und selbige somit nicht mehr für den membranständigen Rezeptor zur Verfügung steht. Andererseits wird postuliert, dass durch uPA-abhängige Proteolyse des Rezeptors die chemotaktisch aktive Aminosäuresequenz 88-94 zwischen Domäne 1 und 2 des uPAR exprimiert wird. Auch die bereits beschriebenen Daten in der Literatur klingen diesbezüglich vielversprechend in Bezug auf die Suche nach einem Adapterbindenden Neopeptid, als welches das Peptid 88-94 dienen soll. Zu Beginn meiner Arbeit zu diesem Thema wurde das Peptid in zahlreichen Migrationsassays getestet, ohne jedoch eine chemotaktische Wirkung auf die HVSMC ausüben zu können. In Zusammenschau mit dem inhibitorischen Effekt von suPAR scheint der beschriebene

Mechanismus demnach in diesen Zellen nicht zuzutreffen, was ein weiteres Beispiel der ausgeprägten Zellspezifität uPAR-abhängiger Mechanismen darstellt.

4.2.2 uPAR-regulierte Zellmigration in Gefäßwand- und Entzündungsprozessen *in vivo*

Insbesondere Gefäßwandprozesse wie Atherosklerose und Restenosierung nach Angiodilatation wurden bereits mehrfach in Bezug auf die Untersuchungen an HVSMC betont. Im Rahmen dieser komplexen Vorgänge kommt es u.a. über inflammatorische Zytokine einerseits zur vermehrten Expression des uPAR (siehe 4.1.3), andererseits zur Aktivierung von Gefäßmuskelzellen und Fibroblasten, welche aus dem ruhenden in den sekretorischen, proliferierenden Typ übergehen. Dies führt zur vermehrten Ansprechbarkeit für Mediatoren wie PDGF aber auch uPA, welche beide zur Proliferation der Gefäßmuskelzellen wie auch zur Migration beitragen, wie diese Arbeit gezeigt hat. Auch wenn die vorgestellten Daten eine chemotaktische Wirkung der Urokinase ohne katalytische Aktivität beweisen, wird die gerichtete proteolytische Wirkung des uPA-Systems über die Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin *in vivo* seine gerechtfertigte Bedeutung haben. Darauf weisen Daten hin, welche eine Reduktion der Atheroskleroseplaquebildung in uPA-knockout Mäusen zeigen (Carmeliet et al., 1998). Interessanterweise trifft dies nicht für uPA-Rezeptor knockout Mäuse zu (Carmeliet et al., 1998).

Diese Beobachtung scheint die Notwendigkeit des uPAR für die Invasion der HVSMC in die Neointima in Frage zu stellen. Man kann aber auch argumentieren, dass andere migrationsfördernde Mechanismen den Ausfall des uPA-Rezeptors kompensieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde PDGFbb im Vergleich zu uPA eingesetzt und zeigte ein noch stärkeres chemotaktisches Potential, als über den uPA-uPAR-Weg erreicht werden konnte. Es gibt jedoch keine Information in der Literatur, ob z.B. nach Ausschalten des PDGF-Einflusses in uPAR-knockout Mäusen verglichen mit uPAR positiven Mäusen nicht doch eine Reduktion atheroskleröser Veränderungen zu beobachten wäre.

Allerdings ist bekannt, dass Wachstumsfaktoren wie PDGF oder bFGF mit dem uPA-uPAR-System in Wechselwirkung treten können (Padro et al., 2002). PDGF wie auch bFGF stimulierten die Sekretion von uPA in HVSMC; *vice versa* zeigte sich eine verminderte Proliferation der Zellen nach Stimulation mit PDGF oder bFGF, wenn

zuvor die Wirkung von uPA gehemmt wurde, was auf eine uPA-abhängige Expression der Wachstumsfaktoren schließen lässt. Wie bereits schon von Kanse et al. 2001 beschrieben, war eine uPA-Rezeptor Interaktion für die mitogene Wirkung von uPA nicht notwendig. Die Autoren führten es in dem Falle auf eine primär vermittelnde Funktion der Urokinase für die Wachstumsfaktor-induzierte Proliferationssteigerung zurück. *In vivo* kann dieser Mechanismus zur Potenzierung sowohl der uPA- wie auch der Wachstumsfaktorwirkung auf die Einwanderung und Proliferation der HVSMC in die Neointima führen.

Abb. 33 stellt schematisch Einflussmöglichkeiten und Wechselwirkungen des uPA-uPAR-Systems in Gefäßwandveränderung dar.

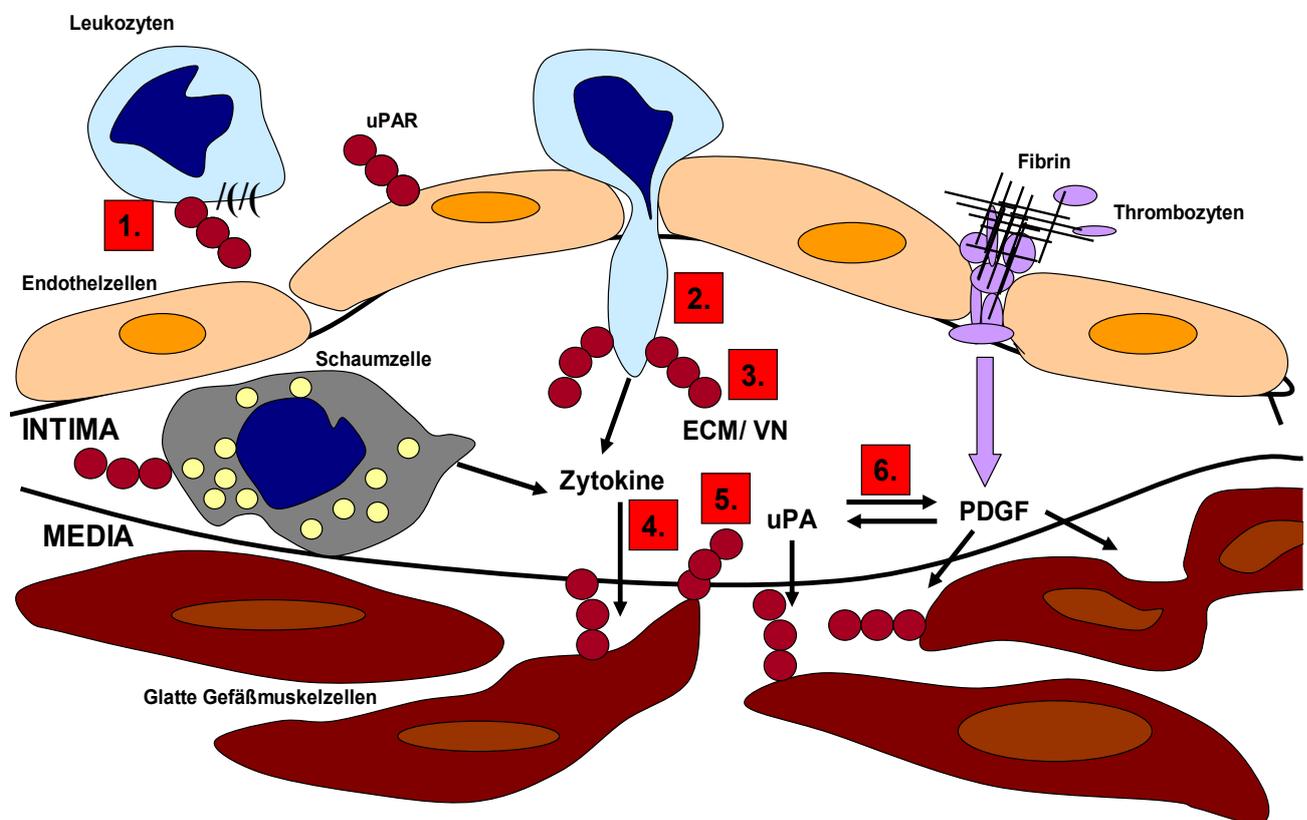


Abb. 33: Einflussmöglichkeiten des uPA-uPAR-Systems: 1. Leukozytenadhäsion am Endothel, 2. Invasion der Leukozyten/ Monozyten in die Gefäßwand und 3. Stabilisierung/ Anhaftung am VN innerhalb der inflammatorischen Gefäßwand. 4. Durch sezernierte Zytokine einerseits Chemotaxis der SMC, andererseits Hochregulation der uPAR-Expression und uPA-Sekretion. Damit 5. gesteigerte chemotaktische Wirkung des uPA auf die SMC. 6. Wechselwirkung zwischen uPA und weiteren Chemotaxinen und Mediatoren wie PDGF, bFGF.

Bezüglich chronischer Gefäßwandveränderungen muss auch an eine mögliche Beteiligung des uPA-uPAR-Systems in der Pathogenese von vaskulitischen Krankheitsbildern gedacht werden. Diesbezüglich ist eine der häufigsten chronischen Erkrankungen unserer Gesellschaft der Diabetes mellitus. Bekannt ist bereits, dass dabei akkumulierende reaktive Sauerstoffspezies ROS (reactive oxygen species) die Expression von uPAR im retinalen Gewebe erhöhen (El-Remessy et al., 2003). Im Hinblick auf die beschriebene Wirkung von uPA auf HVSMC wäre daher eine interessante Fragestellung, ob eine über ROS oder AGE's (advanced glycosylated endproducts) induzierte Expression von uPA und uPAR zur Pathogenese der diabetischen Mikro- und Makrovaskulopathie beiträgt. Eine Beeinflussung der Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen würde somit therapeutische Optionen zur Behandlung der chronische Gefäßinflammation, welche beim Diabetes mellitus die Hauptursache zahlreicher Folgeerkrankungen darstellt, beinhalten.

Abgesehen vom uPA-Einfluss auf HVSMC, wird auch die Motilität anderer Zellen durch das uPA-uPAR-System reguliert.

In vivo Versuche an uPA- wie auch uPAR-knockout-Mäusen ergaben eine eingeschränkte Invasionsfähigkeit von Entzündungszellen in die Bauchhöhle nach intraperitonealer Injektion eines entzündlichen Agens (May et al., 1998). Die Anwesenheit von uPAR auf Monozyten ist dabei verantwortlich für einen entweder adhäsiven oder migratorischen Phänotyp der Zellen und somit maßgebend für die Einwanderungsfähigkeit in das Inflammationsgewebe (Chiaradonna et al., 1999). Die uPAR-Expression auf Monozyten kann *in vitro* zudem durch die Anwesenheit bakterieller Endotoxine wie auch monozytärer Chemokine gesteigert werden (Dekkers et al., 2000; Nakayama et al., 2002), wodurch sich der Aktivierungszustand der Monozyten im Entzündungsgeschehen eigenständig zu regulieren scheint.

Im humanen System lässt sich diese Beobachtung anhand von Untersuchungen an Patienten, welche an paroxysmaler, nocturaler Hämoglobinurie (PNH) leiden bestätigen. Bei dieser Erkrankung besteht eine Unfähigkeit der Synthese GPI-verankerter Proteine. Diese Patienten leiden u.a. an hartnäckigen bakteriellen Infektionen und zeigen auch in Komplement-unabhängiger Umgebung eine eingeschränkte Migrationsfähigkeit neutrophiler Granulozyten *in vitro* (Pedersen et al., 1996). Als Erklärung der Pathogenese muss hierbei noch berücksichtigt werden, dass auch T-Zellrezeptoren und einige Komplement-Faktoren GPI-verankerte

Proteine sind, und das Fehlen selbiger *in vivo* ebenfalls zur Genese entzündlicher Erkrankungen beiträgt.

Auch bei chronisch entzündlichen Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis/Osteoarthritis wird eine vermehrte Expression des uPA-uPAR-Systems wie auch eine Colokalisation desselbigen mit Matrix-Metalloproteinasen beschrieben (Busso et al., 1997; Schwab et al., 2004), sodass auch hier ein Fortschreiten des Entzündungsprozesses durch den Adhäsions- und Migrations-regulierenden Einfluss auf Leukozyten, wie auch durch die direkte Matrix-degenerierende Wirkung des uPA-uPAR-Systems zustande kommt. Zusätzlich beschrieben Apparailly et al. 2002 einen Angiogenese-fördernden Einfluss des uPA-uPAR-Systems in experimenteller Arthritis, welcher zur Unterhaltung der chronischen Entzündungsreaktion beiträgt.

4.2.3 uPA-/uPAR und Cancerogenese

Wenngleich dieses Thema nicht direkten Einfluss auf die Ergebnisse dieser Arbeit nimmt, ist es dennoch so wichtig, dass es erwähnt werden soll. Die Invasivität und Malignität mehrerer Tumorzellarten wurde schon mehrfach auf das Ausmaß der uPAR-Expression zurückgeführt (Mc Donald et al., 1998; Nakata et al., 1998) und interessanterweise fehlt diese bei vielen gesunden Organzellen vor der malignen Entartung. Somit scheint der Weg von der uPAR-armen zur uPAR-reichen Expression ein Schritt der malignen Entartung darzustellen. Berücksichtigt man, dass entzündliche Mediatoren und Stressfaktoren die Regulation der uPAR-Expression beeinflussen, könnte man schlussfolgern, dass dies ein möglicher Mechanismus ist, der den Schritt vom chronisch entzündlichen Gewebe zum entarteten Gewebe unterstützt.

Rother et al. konnten 2004 in diesem Zusammenhang zeigen, dass die Aktivierung des Tumorsuppressorgens p53, welchem eine Beteiligung in der Genese von Mamma-, Bronchus- und Colonkarzinomen zugeschrieben wird, zu einer Herabregulation der uPAR-Expression führt. Umgekehrt ist dementsprechend vorstellbar, dass aus der Mutation des p53-Gens und daraus folgender Funktionsunfähigkeit eine vermehrte uPAR-Expression resultiert. Die wiederum charakterisiert den invasiven Phänotyp der Zellen und könnte einen Aspekt der malignen Entartung bei Tumorsupressorgenmutationen darstellen.

Nicht nur bezüglich seiner direkten Wirkung auf Tumorzellen nimmt das uPA-uPAR-System Einfluss auf maligne Prozesse. Es gibt mehrfach Hinweise, dass die Tumor-induzierte Angiogenese über uPA unterstützt wird, sodass hier ein weiterer Mechanismus des Tumorwachstums und der Metastasierung vorliegt (Rabbani et al., 1998).

Es wird deutlich, dass das Urokinase-System zahlreiche Bezüge zu und starken Einfluss in Bereiche nimmt, in denen Zelladhäsions-, proliferations- und migrationsprozesse eine entscheidende Rolle spielen. Gerade im Hinblick auf die zunehmenden Beweise der Multifunktionalität des uPA-Rezeptors und seiner Liganden ist die Aufklärung und das Verständnis dieses Systems auf zellulärer Ebene von großer Bedeutung, wozu diese Arbeit beitragen möchte.

4.3 uPAR als Initiator von Signaltransduktionsprozessen

4.3.1 Interpretation der Ergebnisse

Für die Vermittlung komplexer zellulärer Vorgänge wie Adhäsion und Migration ist die Aktivierung intrazellulärer Signalprozesse erforderlich. Die Zelle muss Form und Zytoskelett verändern, Membrankomplexe und Lipiddomänen formieren und ihren Stoffwechsel auf die neuen Anforderungen ausrichten. In Kapitel 3.1.3 wurde beschrieben, dass eine uPAR-vermittelte Adhäsion auf Vitronektin G_i -Proteine und c-Src in einen funktionellen Komplex mit uPAR und zytoskelettären Proteinen bringt. Diese Daten gehen konform mit weiteren Veröffentlichungen, in denen uPAR-regulierte Zelladhäsion mit einer Aktivierung von Src-Kinasen (Bohuslav et al., 1995; Chiaradonna et al., 1999) und auch einer Assoziation mit Caveolin (Wei et al., 1999) einhergeht. Im Unterschied zu den hier dargestellten Ergebnissen wurde die Aktivierung der Src-Kinasen zwar durch uPAR reguliert aber primär durch Integrine vermittelt, sodass keine direkte Assoziation von uPAR und Src-kinasen postuliert wurde. Diese Arbeit zeigt aber, dass auch Integrin-unabhängig eine Komplexbildung von uPAR mit c-Src wie auch mit G_i -Proteinen stattfinden kann, welche die Akkumulation von uPAR in lipidreichen Membrandomänen als funktionelle Einheit voraussetzt.

In glatten Muskelzellen führte die Stimulation mit uPA zu einer dosisabhängigen Aktivierung der ERK1/2 sowie der PI-3 Kinase (Kapitel 3.2.2). Die uPAR-Abhängigkeit der MAPK-Aktivierung ist jedoch fraglich, da interessanterweise auch VSMC aus uPAR-knockout-Mäusen diese zeigen (Kanase et al., 1997), wohingegen dies für die PI-3 Kinase nicht zutrifft. Passend zu dieser Beobachtung spielte in Kapitel 3.2.3 die Aktivierung der ERK 1/2 für uPAR-abhängige HVSMC-Migration keine Rolle. Hingegen führte die Inhibition der PI-3 Kinase sowohl zu einer Phosphorylierungshemmung des Substrats Akt/PKB im Western-Blot wie auch zu einer dosisabhängig reduzierten Zellmigration.

Die Beteiligung inhibitorischer G-Proteinen konnte spezifisch für uPA-stimulierte HVSMC-Migration nachgewiesen werden. Mögliche downstream-Signale von G_i -Proteinen wie die Aktivierung der PLC oder die Hemmung der Adenylatcyclase (AdCyc) zeigten Einfluss auf uPA- wie auch PDGF-stimulierte Zell-Migration.

Wie in 3.2.3. beschrieben, wäre eine gegenseitige Beeinflussung des G_i -Proteingekoppelten Signalweges mit einer PI-3 Kinase-Aktivierung denkbar. Allerdings hatten sowohl Pertussistoxin, wie auch der PLC-Inhibitor keinen Einfluss auf die Akt-Phosphorylierung als Nachweis der PI-3 Kinase-Aktivität.

Über den Urokinase-Rezeptor werden demnach mehrere Signalkaskaden parallel aktiviert, welche zur Migration der HVSMC in Proteolyse-unabhängiger Weise führen können.

4.3.2 Mögliche Signalkaskaden uPAR-abhängiger HVSMC-Migration

Dieser Abschnitt möchte anhand der erhobenen Ergebnisse sowie bereits publizierter Daten einige mögliche Signalkaskaden skizzieren.

uPAR-spezifisch war die Aktivierung von G_i -Proteinen, welche zur Hemmung der cAMP-Synthese und Aktivierung der PLC mit Bildung der 2nd messenger Diacylglycerin (DAG) und Inositol (1,4,5)-triphosphat (InsP_3) führt. Die Aktivierung der PLC kann dabei entweder über die α -Untereinheit des G-Proteins, oder über eine PLC-aktivierende Funktion der $\beta\gamma$ -Einheit erfolgen (Tomura et al., 1997). Da sowohl ein Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration wie auch die Hemmung der PLC einen Effekt auf die uPA-stimulierten HVSMC ausübten, wäre denkbar, dass über die α -Untereinheit des G_i -Proteins die Inhibition der Adenylatcyclase reguliert wird, und es über die $\beta\gamma$ -Untereinheit zur Aktivierung der PLC mit nachfolgendem Anstieg von

InsP₃ kommt. Konsequenz daraus wäre eine intrazelluläre Ca²⁺-Erhöhung, welche die Voraussetzung für die Aktivierung Ca²⁺-abhängiger Kinasen darstellt. Nguyen et al. hatten 1999 eine Beteiligung der Myosin-Light-Chain-Kinase (MLCK) an uPAR-vermittelten Signaltransduktion publiziert. Es war damit vorstellbar, dass auch in HVSMC eine Aktivierung derselben erfolgt. Der im Rahmen dieser Arbeit in Migrationsassays getestete spezifische MLCK-Inhibitor ML-7 konnte jedoch keine reproduzierbare Hemmung der Migration hervorrufen, wohingegen der Ca/Calmodulin-Kinasell Inhibitor KN62 in einer Konzentration von 1-10µM eine dosisabhängige Wirkung auf PDGF wie uPA- induzierte HVSMC-Migration zeigte (Daten nicht graphisch dargestellt). Bei Ausbleiben des intrazellulären Ca²⁺-Anstiegs kommt es jedenfalls zu einer generellen Motilitätseinschränkung der Zellen, sodass von einer Beteiligung Ca²⁺-abhängiger Ca/Calmodulinkinasen für beide Induktionswege ausgegangen werden kann.

Über die Aktivierung der Phospholipase C und Bildung des 2nd messengers Diacylglycerin (DAG), wird die membranständigen Proteinkinase C reguliert. Busso et al. publizierten bereits 1994 die Beteiligung der PKC an uPAR-vermittelter Signaltransduktion in Epithelzellen. In HVSMC konnte jedoch kein spezifischer Effekt auf die uPAR-vermittelte Migration durch PKC-Inhibition verzeichnet werden (Daten nicht graphisch dargestellt), was erneut die Zellspezifität der beteiligten Signalkaskaden unterstreicht

Fraglich ist, welchen inhibitorischen Einfluss eine hohe cAMP-Konzentration auf die Motilität der glatten Gefäßmuskelzellen haben könnte? Eine Möglichkeit wurde von Mouaward et al. 2004 für die Wirkung des atrialen natriuretischen Peptides beschrieben, nach dessen Rezeptorinteraktion es in VSMC zur Pertussistoxin-sensitiven Inhibition der AdCyc und Aktivierung der PLC kam. cAMP führte in diesem Fall zur verminderten Synthese des PLC-Produktes InsP₃ und somit zum Ausbleiben des intrazellulären Ca²⁺-Anstiegs.

Die Aktivierung der PI-3K ist ebenfalls essentiell für die uPAR-vermittelte HVSMC-Migration, jedoch unabhängig vom Funktionszustand der G_i-Proteine oder der PLC, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte. Es scheint also keine inside out-Aktivierung der PI-3K über die zytoskelettären Veränderungen vorzuliegen, sondern vielmehr sind diese erst Folge der PI-3K-Aktivität. Wie könnte man selbige erklären? Ein Produkt der PI-3K ist das PtdIns (3,4,5)-P₃, welches durch Phosphorylierung von PtdIns(4,5)-P₂ entsteht. Letzteres kann direkt an Fokalkontaktproteine wie Vinculin,

Talin und α -Aktinin binden, wodurch es zur Stabilisierung von Adhäsionskomplexen kommt (Heraud et al., 1998; Fukami et al., 1992; Gilmore et al., 1996). Die Bindung von PtdIns (3,4,5)-P₃ an α -Aktinin führt jedoch zu einer Umstrukturierung der Fokalkontaktkomplexe. Es kommt zur Dissoziation von α -Aktinin und Vinculin, wohingegen Talin und Paxillin im Adhäsionskomplex verbleiben. Die aktivierten Signalkaskaden bedingen einen weniger adhäsiven und eher mobilen Phänotyp der Zelle, wie es für Fibroblasten beschrieben wurde (Greenwood et al., 2000).

Kiian et al. publizierten 2003 außerdem eine PI-3K abhängige RhoA-Aktivierung nach VSMC-Stimulation mittels uPA, welche zur Phosphorylierung von Ca/Calmodulinkinasen führte. Die Aktivierung der PI-3K wäre demnach einerseits für die Regulation der Matrix-Bindung, in diesem Fall Kollagen I, zuständig. Andererseits gemeinsam mit aber unabhängig von stimulierten G_i-Proteinen und den oben beschriebenen Signalwegen für die aktive Kontraktilität und Motilität der Zelle verantwortlich. Abb. 34 stellt schematisch einen möglichen uPAR-Signalkomplex dar.

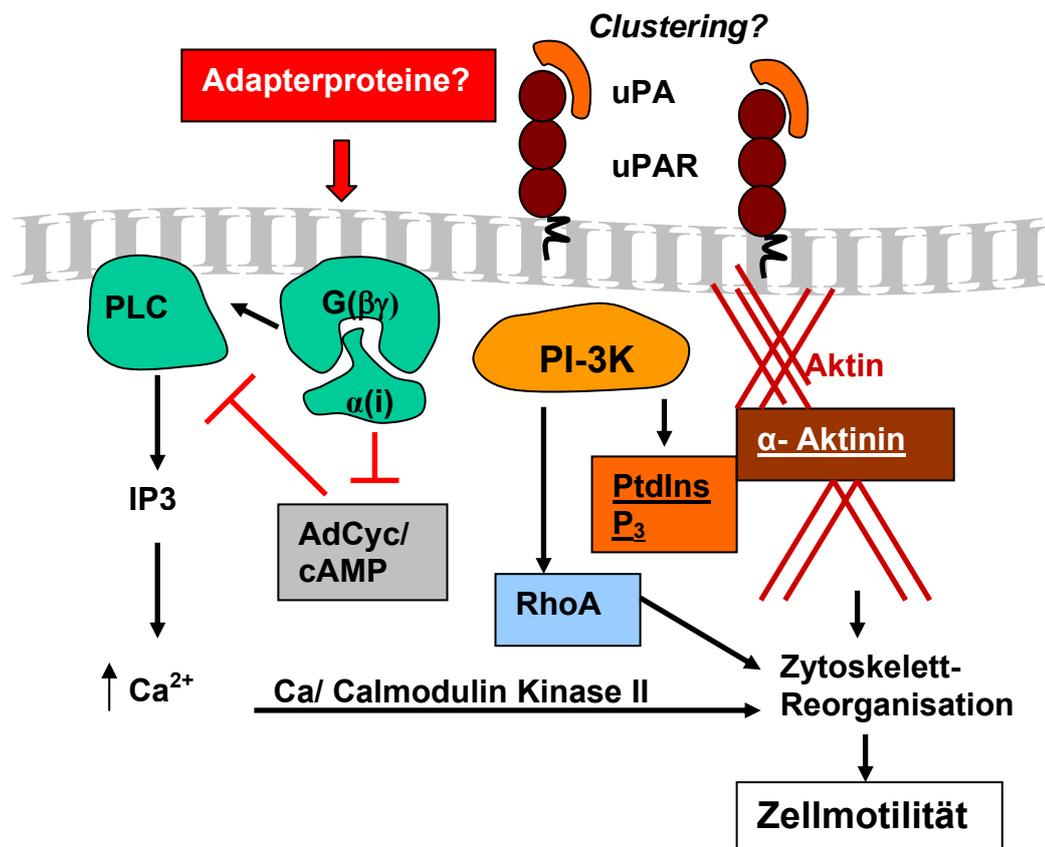


Abb. 34: Modell der an uPAR-vermittelten HVSMC-Migration beteiligten Signalkaskade.

Wenngleich die Aktivierung der ERK1/2 für die hier verwendeten humanen glatten Muskelzellen keine Bedeutung in uPAR-vermittelter Migration hatte, so darf nicht verschwiegen werden, dass dies in anderen Zelltypen sehr wohl der Fall ist. Interessanterweise trifft dies für mehrere Tumorzellarten zu, wie z.B. MCF-7 (Mammakarzinomzellen), HCT116 (Colonkarzinomzellen) und humane Melanomzellen (Ahmed et al., 2003; D'Alessio et al., 2004). Zusätzlich induziert die aktivierte ERK1/2 eine vermehrte Expression von uPAR in Mammakarzinom-, Melanom- sowie Prostatakarzinomzellen (Trisciuglio et al., 2004; Lee et al., 2004). Auf die ausgeprägte Zellspezifität von uPA-uPAR-Wirkungen wurde zwar bereits mehrfach hingewiesen, dennoch ist auffällig, dass es sich in diesem Fall um große Gruppen maligner Zellen handelt. Spannend wäre demnach die Frage nach einer möglichen uPA-uPAR-vermittelten, Tumorzell-typische Signalaktivierung.

4.3.3 Rolle des GPI-Ankers in uPAR-vermittelter Migration und Signalaktivierung

Für die Vermittlung zellulärer Funktionen wie uPAR-abhängiger Adhäsion, Migration und Signalaktivierung wurde im Rahmen dieser Arbeit die notwendige Akkumulation des Rezeptors in Lipidmembrandomänen gezeigt. Eine Zerstörung selbiger durch MBCD und Cholesteroxidase führte entsprechend zum zellulären Funktionsverlust und nachgewiesener Hemmung der HVSMC-Migration nach Stimulation mit uPA aber auch PDGFbb (Abb. 29). Außerdem wurde die uPA- wie auch die PDGFbb-stimulierte Akt-Phosphorylierung durch beide Substanzen negativ beeinflusst (Abb. 30A/B), was eine notwendige Akkumulation beider Rezeptoren in lipidreichen Membrandomänen für die Aktivierung der PI-3 Kinase bedeutet. Als Voraussetzung der Konzentration des uPA-Rezeptors in Lipidmembrandomänen wurde seine Membranbindung mittels GPI-Anker interpretiert. Bezüglich der PDGFbb-abhängigen Migration und Signalaktivierung bleibt diese Frage zum aktuellen Zeitpunkt spannend, aber unbeantwortet.

An einen unspezifischen, Zell-toxischen Einfluss der Substanzen muss natürlich auch gedacht werden. Allerdings zeigten die Kontrollzellen, welche gleichsinnig behandelt waren, keine Beeinträchtigung. Auch die Mikroskopie der Zellen nach Behandlung mit MBCD oder CholOx in den angegebenen Konzentrationen war nicht hinweisend auf eine Beeinträchtigung der Zellvitalität im Sinne von Vakuolenbildung

oder sichtbarem Zelldedritus. Allerdings wurden keine Kontrollen spezifischer Apoptosemarker durchgeführt.

4.3.4 uPAR und mögliche Adapterproteine der Signalaktivierung

Eine bereits mehrfach angesprochene Problematik ist die Frage, wie uPAR ohne eine direkte Verbindung zum intrazellulären Raum Signalaktivierungsprozesse vermitteln kann. Auch für die uPAR-abhängige Migration gibt es noch keinen einheitlichen Konsens.

Integrine oder das LDL-receptor related protein (LRP) kämen potentiell in Frage. Insbesondere für β_1 -Integrinen wird eine direkte Assoziation mit uPAR beschrieben, welche durch das sog. Peptid 25 unterbunden werden kann (Simon et al., 2000). Das entsprechende Peptid wurde demnach in unseren Migrationsassays eingesetzt (eigens erhobene Daten, nicht graphisch dargestellt), um mögliche Auswirkungen einer postulierten Integrin-uPAR-Dissoziation zu erkennen. Die Präinkubation der HVSMC mit P25 führte zu einer ausgeprägten generellen, unspezifischen Migrationshemmung jeglicher stimulierter wie auch unstimulierter Zellen. Demnach scheint dieses Peptid entweder einen unspezifischen Einfluss auf die Zellmotilität zu haben. Oder es kommt über die beeinträchtigte Integrinfunktion zur verminderten Zellhaftung auf der Kollagen-Matrix der Migrationsmembran und somit zu schlechteren Voraussetzungen für die Durchwanderung.

Bezüglich einer Adapterfunktion des LDL-receptor related protein ergab die Behandlung der HVSMC mit LRP-Antikörpern oder dem receptor associated protein (RAP), welches die Bindung von uPA-uPAR an LRP hemmen kann, keinen Einfluss auf uPAR-vermittelte Migration (eigens erhobene Daten, nicht graphisch dargestellt). Eine Adapterfunktion von β_1 -Integrinen oder LRP für uPAR-vermittelte HVSMC-Migration und die entsprechende Signalaktivierung ist demnach unwahrscheinlich.

Eine physiologische Bedeutung des LRP auf die uPAR-vermittelte Zellmigration durch die Rezeptorexpression-regulierende Wirkung ist dennoch *in vivo* nicht auszuschließen. Gilardoni et al. beobachteten 2003 eine Korrelation zwischen der verminderten Expression von LRP in Prostatakarzinomzellen und einem höheren Malignitätsgrad der Zellen. Aktuelle Studien beschrieben die Existenz eines weiteren Mitglieds der LDL-Rezeptorfamilie, LR11, in VSMC, welches die Expression von uPAR förderte, mit uPAR auf der Zelloberfläche colokalisierte und die Internalisation

mittels LRP verhinderte. LR11-Hemmung führte *in vivo* zu einer deutlichen Reduktion der Intimaproliferation (Zhu et al., 2004) im Rahmen atherosklerotischer Prozesse, was auf die funktionelle Bedeutung uPAR-Expression regulierender Mechanismen *in vivo* hinweist.

Da über die Aktivierung inhibitorischer G-Proteine Verbindungen zu unterschiedlichen downstream-Systemen nachgewiesen sind, erschien auch das mit G_i-Proteinen in Verbindung stehende endotheliale „differentiation gene“ Protein (EDG-1) eine attraktive Möglichkeit für vermutete Interaktionen mit uPAR. Es weist als Ligand Sphingosin-1-Phosphat (S1P) auf (Spiegel et al., 2000). S1P ist ein bioaktives Lipid, welches aus Sphingomyelin über Ceramide und Sphingosin nach Phosphorylierung an C₁ durch die Sphingosinkinase (SphK) entsteht, sowohl extra- wie auch intrazellulär vorkommt und aus Thrombozyten freigesetzt werden kann (Yatomi et al., 1995; Stunff et al., 2004). Über S1P und die Aktivierung von EDG-1 werden zahlreiche Signalprozesse initiiert, welche in Funktionen wie Zellmigration und –proliferation eingreifen. Zudem wird eine regulierende Bedeutung für die Entstehung atherosklerotischer Läsionen diskutiert (Xu et al., 2004). Glatte Gefäßmuskelzellen exprimieren sowohl EDG-1 wie zu einem größeren Anteil auch EDG-5 (Ryu et al., 2002), welche beide G_i-Protein gekoppelt sind, jedoch unterschiedliche Wirkungen auf die Zellmigration ausüben. Erste EDG-1 sense-antisense Versuche der HVSMC ergaben jedoch keinen Einfluss auf uPA-induzierte Zellmigration (eigens erhobene Daten, nicht graphisch dargestellt), was entweder auf eine fehlende Adapterfunktion oder noch nicht näher spezifizierte Wechselwirkungen der beiden EDG-Proteine zurückgeführt werden könnte. Hingegen vermochte *D*-erythro-*N,N*-dimethylsphingosine (DMS), ein Inhibitor der Sphingosin-1-P-Kinase, sowohl uPA- wie auch PDGF-stimulierte Zellmigration zu hemmen (eigens erhobene Daten, nicht graphisch dargestellt).

Bezüglich einer Wechselwirkung zwischen PDGF und S1P werden die bereits vorhandenen Daten in der Literatur kontrovers diskutiert. Beschrieben ist einerseits eine Transaktivierung/Phosphorylierung des PDGF-Rezeptors nach S1P-EDG-1 Interaktion in VSMC (Tanimoto et al., 2004), sowie eine PDGF-induzierte Aktivierung der SphK mit nachfolgendem Anstieg des intrazellulären S1P (Hobson et al., 2001). Andererseits wird die notwendige Gegenwart des EDG-1/G_i-Protein-gekoppelten Rezeptors für die Vermittlung PDGF-induzierter VSMC-Migration dementiert (Kluk et al., 2003). Diese Daten gehen mit den Ergebnissen dieser Arbeit konform, die eine

Abhängigkeit der HVSMC-Migration von G_i -Proteinen nur in uPA- nicht aber in PDGF-abhängiger Weise beobachten konnte. Die Inhibition der intrazellulären S1P-Synthese nahm jedoch Einfluss auf uPA- wie PDGF-stimulierte Chemotaxis. Da S1P prinzipiell auch intrazellulär in Abwesenheit von EDG-1 regulatorische Funktion als 2nd messenger übernehmen kann (Saba et al., 2004), wäre dies nach den Beobachtungen dieser Arbeit auch für uPA-stimulierte HVSMC-Funktionen denkbar. Bezüglich der uPAR-EDG-1/S1P-Interaktion gibt es bislang nur sehr spärliche Daten in der Literatur, sodass dies ein interessantes Feld für weitere Untersuchungen darstellt.

Wie könnte uPAR überhaupt mit einem möglichen Adapter in Verbindung treten?

Postuliert wird als Grundprinzip eine durch uPA-Bindung an seinen Rezeptor hervorgerufene Konformationsänderung, wodurch Epitope des Proteinkomplexes freigelegt würden, die wiederum als Liganden für Adapterproteine dienen könnten. Die Verbindungsregion zwischen Domäne 1 und 2 des uPA-Rezeptors, das Peptid 88-94 (SRSRYLE) erwies sich als chemotaktisch für THP-1 Zellen (Resnati und Fazioli et al., 1996 und 1997), ebenso wie der lösliche, mit Chymotrypsin behandelte uPA-Rezeptor. Allerdings war die HVSMC-Migration in unseren Untersuchungen weder durch Peptid 88-94 noch durch den proteolytisch veränderten suPAR positiv beeinflussbar. Auch konnte kein kompetitiver Effekt des Peptide 88-94 auf uPA-stimulierte HVSMC-Migration beobachtet werden, sodass dieser Mechanismus ebenfalls einer Zellspezifität zu unterliegen scheint. Welche weiteren potentiellen Neoliganden ggf. nach der Ligand-Rezeptorinteraktion exprimiert werden, ist derzeit noch nicht geklärt.

Festzustehen scheint die notwendige Akkumulation des uPAR in Lipiddomänen der Zellmembran, wie in dieser Arbeit für die uPAR-vermittelte Adhäsion, Migration und Signalaktivierung gezeigt werden konnte. In den komplexen Domänen postuliert man die Kontaktbildung mit den möglichen Adapterproteinen und ggf. auch eine Clusterbildung des uPA-Rezeptors. Für einige Membranproteinrezeptoren, wie z.B. Integrine oder Immunglobulinrezeptoren, ist die Komplexbildung Voraussetzung für weitere Aktivierungsprozesse. Auch uPAR weist Interaktionsstellen für Dimerisierungsprozesse auf (Liang et al., 2001), sodass die Akkumulation mehrerer uPAR-Moleküle gemeinsam mit möglichen transmembranären Adapter- und Signalproteinen in den lipid rafts als Grundprinzip der uPAR-vermittelten Signalaktivierung gesehen werden kann.

4.4 Diagnostische und therapeutische Optionen

Das uPA-/uPAR-System hat sich einmal mehr als multifunktionelles Regulationssystem bewiesen. Die vielfältigen Interaktionen in inflammatorischen, vaskulären und malignen Prozessen geben Anlass zur Suche nach seinem diagnostischen und therapeutischen Nutzen. In der Tat konnte inzwischen eine Korrelation der suPAR-Konzentration verschiedener Körperflüssigkeiten von Tumorpatienten mit dem Schweregrad des Tumorwachstums und/oder der Metastasierung, sowie der Überlebensrate mit und ohne Therapie aufgestellt werden. Tabelle 4 gibt eine Übersicht über bisher veröffentlichte Daten.

Diagn. Marker	Tumor	Korrelation	Referenz
suPAR (Plasma)	AML	Ansprechen der Chemoth.	Mustojoki S, 2000
suPAR ¹ (Plasma)	AML, ALL	Ansprechen der Chemoth	Mustojoki S, 1999
uPA Antigen ¹ (Plasma)	#	#	#
suPAR ² (Serum)	Colorektales CA	Mortalität ³	Hogdall CK, 2002
PAI-1 ² (Serum)	#	Mortalität ³	#
suPAR ² (Plasma)	Colorektales CA	Mortalität ³	Stephens RW, 1999
suPAR ² (Serum)	Mammacarcinom	Mortalität ³ unabhängig von LK-Status und Tumorgröße	Riisbro R, 2002 #
suPAR	Multipl. Myelom	Primärtumormasse	Rigolin GM, 2003
suPAR ¹ , uPA ¹ (Plasma)	Multipl. Myelom	Tumorprogress, Ansprechen der Chemotherapie	Luo LH, 2003 #
suPAR ¹ (Serum)	Nicht-/Kleinzelliges Bronchial CA	Primärtumor	Cobos E, 2003 #
suPAR ² (Plasma)	Ovarialcarcinom Endometrium-/Cervix CA	Mortalität ³ , FIGO- Stadium FIGO- Stadium	Riisbro R, 2001 #
suPAR (Serum)	Ovarial CA	Primärtumormasse	Sier CF, 2004
D1-/ D2D3uPAR(Urin)	#	Primärtumormasse	#
suPAR ¹ (Serum/CSF)	Paraneoplastisches S. Canceröse Meningitis	Ausmaß der Erkrankung/ cerebrale Schrankenstörung	Garcia-Monco J, 2002 #
suPAR ¹ (Serum)	Prostata CA	Malignität/ Mortalität	Mc Cabe NP, 2000
suPAR ¹ (Plasma)	Rektales Carcinom	Mortalität ³	Fernebro E, 2001
suPAR ² (Plasma)	Schleimzell CA	Primärtumormasse	Schmitt M, 1999

Tabelle 4: Übersicht diagnostischer Verwendung von Komponenten des Urokinase- Systems.

Erklärung der Hochzahlen: 1= prätherapeutisch (nicht näher spezifiziert), 2= präoperativ, 3= postoperativ

Die Akzeptanz und der Einsatz von suPAR als Tumormarker und prognostischer Faktor ist bislang noch auf klinische Studien beschränkt, die überzeugenden Daten sprechen jedoch für eine zunehmende Anerkennung und Nutzung auch im klinischen Alltag. In den oben aufgeführten Studien konnte bereits mehrfach das Tumorgewebe als Ursprung der vermehrten suPAR-Synthese identifiziert werden. Welche Bedeutung dieser Mechanismus hat, wird derzeit noch diskutiert. Eine Überexpression von suPAR im Mammacarcinomgewebe konnte das Wachstum des Primärtumors wie auch das Ausmaß der Lungenmetastasierung hemmen (Kruger et al., 2000), was durch eine Kompetition des oberflächenexprimierten uPAR durch suPAR und Bindung des freien uPA an suPAR erklärt wurde. Die Beobachtung der hier vorliegenden Arbeit gehen mit dieser Interpretation konform, da auch uPA-stimulierte HVSMC-Migration durch suPAR gehemmt werden konnte. Neuere Studien postulieren sogar eine direkte, uPA-unabhängige Hemmung Tumorwachstum-fördernder Signalprozesse durch suPAR (Jo et al., 2003). Wird suPAR aber proteolytisch zwischen Domäne 1 und 2 gespalten, sodass die vermeintlich chemotaktisch wirksame Verbindungssequenz exprimiert wird, könnten hohe suPAR-Konzentrationen andererseits Tumorwachstum- und Angiogenese-fördernd wirken. Es ergibt sich daher die Frage, ob die vermehrte intravasale suPAR-Konzentration einen Abstoßungsmechanismus der Tumorzellen darstellt, um die uPA-Wirkung innerhalb des Tumorgewebes zu aktivieren, oder stellt sie einen zusätzlichen Versuch der Zellen dar, weitere Tumorzellen z.B. aus dem Primärtumor zu rekrutieren?

Chavakis et al. beobachteten 2001, dass vaskuläre Endothel- und glatte Muskelzellen suPAR primär in den basolateralen Raum abgeben, wo es in der Gefäßwand akkumuliert, während membrangebundener GPI-uPAR vorwiegend an der apikalen Zellseite exprimiert wird. Bezogen auf maligne entartete Zellen müsste dieser Mechanismus umgekehrt worden sein. Gemeinsam mit der Beobachtung, dass suPAR in Tumorgeweben das Zellwachstum sowie die Tumor-induzierte Angiogenese hemmt, würde man die Ausschleusung von suPAR in den intravasalen Raum als tumorfördernd interpretieren. Hierzu passt auch die Beobachtung, dass die proteolytische Wirkung von uPA auf die Verbindungsregion D1-D2 des uPA-Rezeptors der Anwesenheit des GPI-Ankers bedarf, welcher suPAR fehlt (Hoyer-Hansen et al., 2001). Dies bedeutet, dass eine Aktivierung von freiem suPAR zu dem möglicherweise chemotaktisch wirksamen D2-D3-Fragment durch uPA

unwahrscheinlich ist, sodass die uPA-neutralisierende Wirkung durch die Anwesenheit von suPAR vorherrscht, was innerhalb des Tumorgewebes antiproliferativ und antiinvasiv wirksam wäre. Die Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass die Umkehrung der polarisierten suPAR-Expression einen Vorgang im Rahmen von Tumorwachstum und Metastasierung darstellen und so die Hemmung dieses Vorgangs therapeutisch genutzt werden könnte.

Insgesamt bietet das uPA-/uPAR-System zahlreiche Möglichkeiten der therapeutischen und diagnostischen Intervention. Die Tatsache, dass dieses Proteolysesystem keine lebensnotwendigen Vorgänge ausführt, wie man an der prinzipiell normalen Entwicklung von uPA- oder uPAR-knockout-Mäusen sehen kann, ist dabei nur positiv zu bewerten. So verspricht das Ausschalten des uPA-/uPAR-Systems eine wesentlich mindere toxische Wirkung auf den Gesamtorganismus als z.B. der Einsatz zytotoxischer Substanzen im Rahmen einer Chemotherapie. Inzwischen gibt es verschiedene Ansatzpunkte, welche den therapeutischen Nutzen in einer Hemmung des Proteolysesystems untersuchen (Mazar et al., 2001).

Die uPA-/ uPAR- Interaktionshemmung durch suPAR oder zyklische Peptide, welche die Bindungsstellen von uPA oder uPAR blockieren wurde bereits klinisch getestet (Guthaus et al., 2002). Die Hemmung der Interaktion von uPAR und Integrinen mit entsprechenden Peptiden oder Antikörpern spielt vor allem für die uPAR-regulierte Zelladhäsion eine Rolle. Hierbei ist die Erkenntnis, dass die uPAR-Zelladhäsion auf Vitronectin Integrin-unabhängig erfolgen kann, von Bedeutung, da über eine Ausschaltung von uPAR gleich zwei, für die Zelladhäsion notwendige Mechanismen, beeinflusst werden könnten, während dies mit Integrininhibitoren nicht möglich wäre. Ein weiterer therapeutischer Ansatzpunkt ist die Regulation der uPAR-Expression, welche z.B. durch bestimmte Antibiotikaklassen wie Geldanamycine beeinflusst werden kann (Webb et al., 2000).

Bezüglich pathologischer Gefäßwandprozesse sind die bisher verfügbaren Daten der Literatur nicht ganz eindeutig. Wie bereits geschildert, schien einerseits die Genese atherosklerotischer Veränderungen in uPAR-knockout-Mäusen nicht signifikant beeinträchtigt. Andererseits ergab sich jedoch eine Korrelation zwischen dem Ausmaß der uPAR-Expression in atherosklerotischen Plaques und dem Schweregrad der Gefäßerkrankung (Steins et al., 2004). Interaktionen zwischen dem

uPA-/uPAR-System und kardiovaskulären Risikofaktoren wie Diabetes mellitus, arterieller Hypertonie, Nikotinabusus oder Hypercholesterinämie wurden bislang ebenfalls nur spärlich beschrieben. Allerdings gibt es Hinweise, dass die Expression von uPAR sowie die Migration der HVSMC in verletzten Gefäßen, wie z.B. nach Ballondilatationen oder auch nach arteriovenösen Bypassoperationen, durch den pulsatilen Einfluss des Blutdrucks gesteigert wird (Redmond et al., 1999).

Das Fazit all dieser Überlegungen ist, dass eine Hemmung des uPA-/uPAR-Proteolysesystems, ggf. auch durch suPAR einen therapeutischen Nutzen in chronisch inflammatorischen Systemerkrankungen oder Vaskulitiden haben könnte. Alle bisher bekannten Daten sprechen für einen gefäßprotektiven Effekt. Auch in dieser Arbeit konnte der Einfluss des uPA-/uPAR-Systems auf mehrere pathophysiologische Prozesse gezeigt werden, sodass weitere klinische Studien notwendig sein werden, um die Bedeutsamkeit der *in vitro* Daten auch für den Patienten beurteilen zu können. Auch wenn derzeit die Vielzahl von Untersuchungen im Bereich der Erforschung maligner Erkrankungen zu liegen scheint, sollte die Tragweite des Verständnisses und der Regulation von Gefäßwandprozessen nicht unterschätzt werden, wozu diese Arbeit einen Beitrag leisten möchte.

5 Zusammenfassung

Das uPA-/uPAR-System stellt ein multifunktionelles Proteasesystem dar, welches zelluläre Funktionen wie Zelladhäsion, -migration und Signalaktivierungsprozesse reguliert. Somit nimmt es Einfluss auf Inflammationsprozesse, Gefäßerkrankungen und Karzinomleiden. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Bedeutung des Urokinaserezeptors (uPAR) für die Zelladhäsion nicht nur in der Regulation von Integrinen liegt, sondern in seiner direkten Wechselwirkung mit dem Matrixprotein Vitronektin. Über die Bindung von uPAR an Vitronektin werden stabile Adhäsionskomplexe gebildet, die die Akkumulation beteiligter intra- und extrazellulärer Proteine wie Vinculin und Aktin, sowie Signalproteine wie Src-Kinasen und inhibitorischen G-Proteinen in Lipiddomänen bedingen. Eine Beteiligung von Integrinen an der uPAR-vermittelten Zelladhäsion auf Vitronektin konnte in den isolierten Adhäsionskomplexen (DIAPs) nicht gefunden werden. Die uPAR-abhängige Formation dieser neu beschriebenen DIAPs stellt einen eigenständigen, uPAR-spezifischen Mechanismus der Zell-Matrix-Interaktion dar.

Bezüglich uPA-/uPAR-vermittelter Zellmigration, in dieser Arbeit an glatten Gefäßmuskelzellen untersucht, konnte die Notwendigkeit der Ligand-Rezeptorinteraktion nachgewiesen werden, wobei die proteolytische Aktivität der Urokinase für eine Steigerung der Zellmotilität nicht erforderlich war. Die chemotaktische Wirkung von uPA beruhte vielmehr auf der parallelen Aktivierung mehrerer, zellspezifischer Signalkaskaden. Hieran beteiligt sind inhibitorische G-Proteine, welche eine Hemmung der Adenylatcyclase und Aktivierung der Phospholipase C bedingen. Die dadurch erzeugte Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führte zur Aktivierung von Ca^{2+} /Calmodulinkinasen. Parallel und unabhängig von diesem Signalweg resultierte die Hemmung der PI-3K in einer deutlichen Reduktion uPA-/uPAR-vermittelter Zellmigration, wohingegen der ERK 1/2- Signalweg keinerlei Einfluss hatte. Eine Behandlung der Zellen mit Lipid raft-dissoziierenden Substanzen wie Methyl- β -cyclodextrin resultierte in Zellarrest. Demnach setzt die uPA-stimulierte Migration mit Aktivierung der entsprechenden Signalkaskaden ebenso wie uPAR-abhängige DIAP-Formation die Akkumulation des Rezeptors in Lipiddomänen voraus. Die über den GPI-Anker vermittelte Konzentration des Rezeptors in Lipid raft-Membranmicrodomänen ist folglich essentieller Bestandteil des multifunktionellen uPA-/uPAR-Systems.

5 Summary

The urokinase plasminogen activator system serves as a multifunctional protease system and plays a role in different cellular functions such as cell adhesion, migration and signal transduction. Thereby it may influence a number of pathological and physiological functions related to the vascular system. This study provided evidence for the integrin-independent but uPAR-dependent cell adhesion on the matrix protein vitronectin, which serves as a direct binding partner for uPAR. uPAR accumulates in lipid rafts together with putative adaptor molecules as well as with cytoskeletal components such as vinculin and actin, and signaling proteins like Src-kinases and G_i-proteins. Integrins could not be found in these “detergent insoluble adhesion patches” (DIAPs), indicating that the presence of uPAR in lipid rafts does not require integrin-clustering. Thus, uPAR-dependent cell-adhesion on vitronectin represents a mechanism distinct from usual integrin-dependent cell-matrix interaction.

Referring to uPA-stimulated migration of human vascular smooth muscle cells (HVSMC) the chemotactic response was not due to proteolytic activity, since the active as well as the catalytically inactive uPA showed a similar effect on cell migration, but it required ligand-receptor binding to uPAR. Furthermore, the chemotactic response after stimulation with uPA was dependent on the activation of different signalling pathways. These included the activation of inhibitory G-proteins, implicating the inhibition of adenylylcyclase as well as the activation of phospholipase C and thus an intracellular increase of Ca²⁺, which is necessary for activation of Ca/calmodulin kinases. The activation of PI-3K was equally important for uPA-/ uPAR-mediated HVSMC migration, but was independent of the G-protein pathway, whereas activation of the ERK 1/2 had no influence on uPA-induced migration. As described before uPAR-mediated cell adhesion on vitronectin, HVSMC migration and signaltransduction depended on uPAR accumulation in lipid rafts, since cholesterol depleting agents such as methyl-β-cyclodextrin completely abolished the stimulating effect. The presented results contribute to a better mechanistic understanding of how the uPA-/ uPAR-system regulates cellular functions such as cell adhesion, -migration and signalling.

6 Literaturverzeichnis

Ahmed N, Oliva K, Wang Y, Quinn M, Rice G. Proteomic profiling of proteins associated with urokinase plasminogen activator receptor in a colon cancer cell line using an antisense approach. *Proteomics* 2003; 3: 288-298

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

Anan T, Sonoda T, Asada Y, Kurata S, Takayasu S. Protease-activated receptor-1 (thrombin receptor) is expressed in mesenchymal portions of human hair follicle. *J Invest Dermatol* 2003; 121: 669-673

Andreasen PA, Egelund R, Petersen HH. The plasminogen activation system in tumor growth, invasion and metastasis. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57: 25-40

Andreasen PA, Kjøller L, Christensen L, Duffy MJ; The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int J Cancer* 1997; 72: 1-22

Apparailly F, Bouquet C, Millet V, Noel D, Jacquet C, Opolon P, Perricaudet M, Sany J, Yeh P, Jorgensen C. Adenovirus-mediated gene transfer of urokinase plasminogen inhibitor inhibits angiogenesis in experimental arthritis. *Gene Ther* 2002; 9: 192-200

Appella E, Robinson EA, Ullrich SJ, Stoppelli MP, Corti A, Cassani G, Blasi F. The receptor binding sequence of urokinase. A biological function for the growth-factor module of proteases. *J Biol Chem* 1987; 262: 4437-4440

Bdeir K, Kuo A, Mazar A et al. A region in domain II of the urokinase receptor required for urokinase binding. *J Biol Chem* 2000; 275: 28532

Begum FD, Hogdall CK, Kjaer SK, Christensen L, Blaakaer J, Bock JE, Glud E, Hoyer-Hansen G, Ring-Larsen H, Hogdall EV. The prognostic value of plasma soluble urokinase plasminogen activator receptor (suPAR) levels in stage III ovarian cancer patients. *Anticancer Res* 2004; 24: 1981-1985

Behrendt N, Ploug M, Patthy L, Houen G, Blasi F, Danø K. The ligand-binding domain of the cell surface receptor for urokinase-type plasminogen activator. *J Biol Chem* 1991; 266: 7842-7847

Behrendt N, Rønne E, Ploug M, et al. The human receptor for urokinase plasminogen activator. NH₂-terminal amino acid sequence and glycosylation variants. *J Biol Chem* 1990; 265: 6453- 6460

Behrendt N, Rønne E, Danø K. Domain interplay in the urokinase receptor. Requirement for the third domain in high affinity ligand binding and demonstration of ligand contact sites in distinct receptor domains. *J Biol Chem* 1996; 271: 22885-22894.

Blasi F. Surface receptors for urokinase plasminogen activator. *Fibrinolysis* 1988; 2: 73-84

Blasi F. The urokinase receptor. A cell surface regulated chemokine. *APMIS* 1999; 107: 99-101

Bohuslav J, Horejsi V, Hansmann C, Stockl J, Weidle UH, Majdic O, Bartke I, Knapp W, Stockinger H. Urokinase plasminogen activator receptor , beta 2-integrins and Src-kinases within a single receptor complex of human monocytes. *J Exp Med* 1995; 181: 1381-1390

Børghlum AD, Byskow A, Ragno P et al. Assignment of the urokinase-type plasminogen activator receptor gene (PLAUR) to chromosome 19q13.1- q13.2. *Am J Hum Genet* 1992; 50: 492-497

Braat EA, Levi M, Bos R, Haverkate F, Lassen MR, de Maat MP, Rijken DC. Inactivation of single-chain Urokinase-type plasminogen activator by thrombin in human subjects. *J Lab Clin Med* 1999; 134: 161-167

Brown DA, Rose JK. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 1992; 63:533-544

Busso N, Masur SK, Lazega D, Waxman S, Ossowski L. Induction of cell migration by pro- urokinase binding to its receptor: possible mechanism for signal transduction in human epithelial cells. *J Cell Biol* 1994; 126: 259-270

Busso N, Péclat V, So A, Sappino AP. Plasminogen activation in synovial tissues: differences between normal, osteoarthritis, and rheumatoid arthritis joints. *Annals of the Rheumatic Diseases* 1997; 56: 550-557

Calderwood DA, Zent R, Grant R, Rees DJG, Hynes RO, Ginsberg MH. The Talin Head Domain Binds to Integrin β - Subunit Cytoplasmic Tails and Regulates Integrin Activation. *J Biol Chem* 1999; 274: 28071-28078

Carmeliet P, Moons L, Dewerchin M, Rosenberg S, Herbert JM, Lupu F, Collen D. Receptor-independent role of urokinase-type plasminogen activator in pericellular plasmin and matrix-metalloproteinase proteolysis during vascular wound healing in mice. *J Cell Biol* 1999; 140: 233-245

Carriero MV, Del Vecchio S, Capozzoli M, Franco P, Fontana L, Zannetti A, Botti G, Dàuto G, Salvatore M, Stoppelli MP. Urokinase receptor interacts with alpha(v) beta5 vitronektin receptor, promoting urokinase-dependent cell migration in breast cancer. *Cancer Res* 1999; 59: 5307-5314

Chapman HA, Wei Y, Simon DI, Waltz DA. Role of Urokinase Receptor and Caveolin in Regulation of Integrin Signaling. *Thrombosis and Haemostasis* 1999; 82: 291-297

Chavakis T, Kanse SM, Lupu F, Hammes HP, Müller-Esterl W, Pixley RA, Colman RW, Preissner KT. Different mechanisms define the antiadhesive function of high molecular weight kininogen in integrin-and urokinase receptor- dependant interactions. *Blood* 2000 Jul 15; 96: 514-522

Chavakis T, Preissner KT. Potential pharmacological applications of the antithrombotic molecule high molecular weight kininogen. *Curr Vascular Pharmacology* 2003 Mar; 1: 59-64

Chavakis T, Willuweit AK, Lupu F, Preissner KT, Kanse SM. Release of soluble urokinase receptor from vascular cells. *Thromb Haemost* 2001; 86: 686-693

Chiaradonna F, Fontana L, Iavarone C, Carriero MV, Scholz G, Barone MV, Stoppelli MP. Urokinase receptor- dependent and -independent p56/59 (hck) activation state is a molecular switch between myelomonocytic cell motility and adherence. *Embo J* 1999; 11: 424-431

Chow D, He X, Snow AL, Rose- John S, Garcia KC. Structure of an extracellular gp130 cytokine receptor signaling complex. *Science* 2001; 291: 2150-2155

Clowes AW, Clowes MM, Au YPT, Reidy MA, Belin D. Smooth muscle cells express urokinase during mitogenesis and tissue- type plasminogen activator during migration in injured rat carotid artery. *Circ Res* 1990; 67: 61-67

Cobos E, Jumper C, Lox C. Pretreatment determination of the serum urokinase plasminogen activator and its soluble receptor in advanced small-cell lung cancer or non-small cell lung cancer. *Clin Appl Thromb Hemost* 2003; 9: 241-246

Conese M, Nykjaer A, Petersen CM, Cremona O, Pardi R, Andreasen PA, Gliemann J, Christensen EI, Blasi F. α_2 -Macroglobulin receptor/ LDL receptor related protein (LRP)- dependent internalization of the urokinase receptor.

J Cell Biology 1995; 131: 1609-1622

D'Alessio S, Margheri F, Pucci M, Del Rosso A, Monia BP, Bologna M, Leonetti C, Scarsella M, Zupi G, Fibbi G, Del Rosso M. Antisense oligodeoxynucleotides for urokinase plasminogen activator receptor have anti-invasive and anti-proliferative effects in vitro and inhibit spontaneous metastases of human melanoma in mice.

Int J Cancer 2004; 110: 125-133

Degryse B, Resnati M, Rabbani SA, Villa A, Fazioli F, Blasi F. Src-dependence and pertussistoxin sensitivity of urokinase receptor-dependent chemotaxis and cytoskeleton reorganization in rat smooth muscle cells. *Blood* 1999; 94: 649- 662

Degryse B, Resnati M, Czekay RP, Loskutoff DJ, Blasi F. Domain 2 of the urokinase receptor contains an integrin-interacting epitope with intrinsic signaling activity: generation of a new integrin inhibitor. *J Biol Chem.* 2005; 280: 24792-24803

Dekkers PEP, Ten Hove T, Te Velde AA, Van Deventer SJH, Van der Poll T. Upregulation of Monocyte Urokinase Plasminogen Activator Receptor during Human Endotoxemia. *Infection and Immunity* 2000; 68: 2156-2160

Dubuisson L, Monvoisin A, Nielsen BS, Le Bail B, Bioulac- Sage P, Rosenbaum J. Expression and cellular localization of the urokinase-type plasminogen activator and its receptor in human hepatocellular carcinoma. *J Pathol* 2000; 190:190

Dumler I, Kopmann A, Wagner K, Mayboroda OA, Jerke U, Dietz R, Haller H, Gulba DC. Urokinase induces activation and formation of Stat4 and Stat1-Stat2 complexes in human vascular smooth muscle cells.

J Biol Chem 1999; 274: 24059-24065

Dumler I, Wies A, Mayboroda OA, Maasch C, Jerke U, Haller H, Gulba DC. The Jak/Stat pathway and urokinase receptor signaling in human aortic vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1998; 273: 315-321

Eaton DL, Scott RW, Baker JB. Purification of human fibroblast urokinase proenzyme and analysis of its regulation by proteases and protease nexin.

J Biol Chem 1984; 259: 6241-6247

Ellis V, Behrendt N, Danø K. Plasminogen activation by receptor-bound urokinase. A kinetic study with both cell associated and isolated receptor.

J Biol Chem 1991; 266: 12752-12758

Ellis V, Danø K. Plasminogen activation by receptor-bound urokinase.

Semin Thromb Hemost 1991; 17:194

EI-Remessy AB, Behzadian MA, Abou-Mohamed G, Franklin T, Caldwell RW, Caldwell RB. Experimental diabetes causes breakdown of the blood-retina barrier by a mechanism involving tyrosine nitration and increases in expression of vascular endothelial growth factor and urokinase plasminogen activator receptor.

Am J Pathol 2003; 162: 1995-2004

Farias-Eisner R, Vician L, et al. The urokinase plasminogen activator receptor (UPAR) is preferentially induced by nerve growth factor in PC12 pheochromocytoma cells and is required for NGF-driven differentiation.

J Neuroscience 2000; 20: 230-239

Fazioli F, Resnati M, Sidenius N, Higashimoto Y, Appella E, Blasi F. A urokinase-sensitive region of the human urokinase receptor is responsible for its chemotactic activity. *EMBO J* 1997; 16: 7279-7286

Feliciani C, Toto P, Wang B, Sauder DN, Amerio P, Tulli A. Urokinase plasminogen activator mRNA is induced by IL-1alpha and TNF-alpha in in vitro acantholysis. *Exp Dermatol.*2003; 12: 466-471

Fernebro E, Madsen RR, Ferno M, Brunner N, Bendahl P, Christensen IJ, Johnson A, Nilbert M. Prognostic importance of the soluble plasminogen activator receptor, suPAR, in plasma from rectal cancer patients.

Eur J Cancer 2001; 37: 486-491

Fisher JL, Field CL, Zhou H, Harris TL, Henderson MA, Choong PF. Urokinase plasminogen activator system gene expression is increased in human breast carcinoma and its bone metastases – a comparison of normal breast tissue, non-invasive and invasive carcinoma and osseous metastases.

Breast cancer Rs Treat 2000; 61: 1

Fukami K, Furuhashi K, Inagaki M, Endo T, Hatano S, Takenawa T. Requirement of phosphatidylinositol 4,5- bisphosphate for α -actinin function.

Nature 1992; 359: 150-152

Garcia-Monco JC, Coleman JL, Benach JL. Soluble urokinase receptor (uPAR, CD87) is present in serum and cerebrospinal fluid in patients with neurologic diseases. *J Neuroimmunol* 2002; 129: 216-223

Giancotti FG. Complexity and specificity of integrin signaling.

Nature cell biol 2000; 2: issue E13-E14

Gilardoni MB, Ceschin DG, Sahores MM, Oviedo M, Gehrau RC, Chiabrande GA. Decreased expression of the low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1) in rats with prostate cancer.

J Histochem Cytochem 2003; 51: 1575-1580

Gilmore AP, Burridge K. Regulation of vinculin binding to talin and actin by phosphatidylinositol-4,5- bisphosphate. *Science* 1996; 381: 531-535

Greenwood JA, Theibert AB, Prestwich AD, Murphy-Ullrich JE. Restructuring of Focal Adhesion Plaques by PI-3 Kinases: Regulation by PtdIns (3,4,5)-P₃ Binding to Actin. *J Cell Biol* 2000; 150: 627-642

Guthaus E, Burgle M, Schmiedeberg N, Hocke S, Eickler A, Kramer MD, Sweep CG, Magdolen V, Kessler H, Schmitt M. uPA-silica-Particles (SP-uPA): a novel analytic system to investigate uPA-uPAR interaction and to test synthetic uPAR antagonists as potential cancer therapeutics. *Biol Chem* 2002; 383: 207-216

Gyetko MR, Libre EA, Fuller JA, Chen GH, Toews GB. Urokinase is required for T-lymphocyte proliferation and activation in vitro.

J of Lab & Clin Med 1999; 133: 274-288

Hahn Dantona E, Ramos- DeSimone N, Siple J, Nagase H, French DL, Quigley JP. Activation of pro MMP-9 by a plasmin/MMP-3 cascade in a tumor cell model. Regulation by tissue inhibitors of metalloproteinases.

Ann NY Acad Sci 1999; 878: 372

Han YP, Hughes MW, Nien YD, Garner WL. IL-8 stimulated expression of urokinase-type plasminogen activator in human skin and human epidermal cells.

J Sug Res 2002; 106: 328-334

Harder T, Simons K. Caveolae, DIG's and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Current Opin Cell Biol* 1997; 9: 534-542

Heldin CH, Westermark B. Mechanism of Action and in vivo role of Platelet-Derived- Growth Factor. *Physiological Reviews* 1999; 79: 1283-1316

Heraud JM, Racaud-Slutan C, Gironcel D, Albiges-Rizo C, Giacomini T, Roques S, Martel V, Breton-Douillon M, Perret B, Chap H. Lipid products of phosphoinositide 3-kinase and phosphatidylinositol 4',5'-bisphosphate are both required for ADP-dependent platelet spreading.

J Biol Chem 1998; 273: 17817-17823

Hildenbrandt R, Glienke W, Magdolen V, Graeff H, Stutte HJ, Schmitt M. Urokinase receptor localization in breast cancer and benign lesions assessed by in situ hybridization and immunohistochemistry. *Histochem Cell Biol* 1998; 110: 27

Hobsen JP, Tosenfeldt HM, Barak LS, Olivera A, Poulton S, Caron MG, Milstien S, Spiegel S. Role of the sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1 in PDGF-induced cell motility. *Science* 2001; 291: 1800-1803

Hogdall CK, Christensen IJ, Stephens RW, Sorensen S, Norgaard-Pedersen B, Nielsen HJ. Serum tetranectin is an independent prognostic marker in colorectal cancer and weakly correlated with plasma suPAR, plasma PAI-1 and serum CEA. *APMIS* 2002; 110: 630-638

De Hoog CL, Foster LJ, Mann M. RNA and RNA binding proteins participate in early stages of cell spreading through spreading initiation centers.

Cell 2004; 117: 649-662

Horejsi V, Drbal K, Cebecauer M, Cerny J, Brdicka T, Angelisova P, Stockinger H. GPI-microdomains: a role in signaling via immunoreceptors.

Immunology Today 1999; 20: 356-361

Hoyer- Hansen G, Pessara U, Holm A, Pass J, Weidle U, Danø K, Behrendt N. Urokinase-catalysed cleavage of the urokinase receptor requires an intact glycolipid anchor. *Biochem J* 2001; 358: 673-679

Hoyer- Hansen G, Ronne E, Solberg H, Behrendt N, Ploug , Lund LR, Ellie V, Danø K. Urokinase plasminogen activator cleaves its cell surface receptor releasing the ligand-binding domain. *J Biol Chem* 1992; 267: 18224-18229

Ichinose A, Fujikawa K, Suyama T. The activation of pro-urokinase by plasma kallikrein and its inactivation by thrombin. *J Biol Chem* 1986; 261: 3486-3489

Ilangumaran S, Hoessli DC. Effects of depletion by cyclodextrin on the sphingolipid microdomains of the plasma membrane. *Biochem J* 1998; 335: 433-440

Irigoyen JP, Nagamine Y. Cytoskeletal reorganization leads to induction of the urokinase-type plasminogen activator gene by activating FAK and Src and subsequently the Ras/ Erk signaling pathway.

Biochem & Biophys Res Com 1999; 262: 666-670

Jo M, Thomas KS, Wu L, Gonias SL. Soluble urokinase-type plasminogen activator receptor inhibits cancer cell growth and invasion by direct urokinase-independent effects on cell signaling. *J Biol Chem* 2003; 278: 46692-46698

Kanse SM, Benzakour O, Kanthou C, Kost C, Lijnen HR, Preissner KT. Induction of vascular SMC proliferation by urokinase indicates a novel mechanism of action in vasoproliferative disorders. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2848-2854

Kanse SM, Kost C, Wilhelm OG, Andreasen PA, Preissner KT. The urokinase receptor is a major vitronectin-binding protein on endothelial cells.

Exp Cell Res 1996; 224: 344-353

Kanse SM, Petzinger J, Linder M, Preissner KT: Evidence for the existence of novel urokinase receptor(s) on vascular smooth muscle cells. *1st Chianti meeting on Proteases: Non- proteolytic role for proteinases, Siena 2001; Abstract*

Kiian I, Tkachuk N, Haller H, Dumler I. Urokinase-induced migration of human vascular smooth muscle cells requires coupling of the small GTPases RhoA and Rac1 to Tyk2/PI-3K signalling pathway. *Thromb Haemost* 2003; 89: 904-914

Kjøller L, Hall A. Rac mediates cytoskeletal rearrangements and increased cell motility induced by urokinase type plasminogen activator receptor binding to vitronectin. *J Cell Biol* 2001; 6: 1-14

Kluk MJ, Colmont C, Wu MT, Hla T. Platelet-derived growth factor (PDGF)-induced chemotaxis does not require the G protein-coupled receptor S1P1 in murine embryonic fibroblasts and vascular smooth muscle cells.

FEBS Lett 2003; 533: 25-28

Koshelnik Y, Ehart M, Hufnagel P, Heinrich PC, Binder BR. Urokinase receptor is associated with the components of the JAK1/ STAT1 signaling pathway and leads to activation of this pathway upon receptor clustering in the human kidney epithelial cell line TCL- 598. *J Biol Chem* 1997; 272: 28563-28567

Krauss K, Altevogt P. Integrin leukocyte funktion-associated antigen-1 mediated cell binding can be activated by clustering of membrane rafts.

J Biol Chem 1999; 274: 36921-36827

Kroon ME, Koolwijk P, van Goor H et al. Role and lokalization of urokinase receptor in the formation of new microvascular structures in fibrin matrices.

Am J Pathol 1999; 154: 1731

- Kroon ME, Koolwijk P, van Der Vecht B, van Hinsbergh VW.** Urokinase receptor expression on human microvascular endothelial cells is increased by hypoxia: implications for capillary-like tube formation in a fibrin matrix. *Blood* 2000; 96: 277
- Kruger A, Soeltl R, Lutz V, Wilhelm OG, Magdolen V, Rojo EE, Hantzopoulos PA, Graeff H, Gansvacher B, Schmitt M.** Reduction of breast carcinoma tumor growth and lung colonization by overexpression of the soluble urokinase-type plasminogen activator receptor (CD87). *Cancer Gene Ther* 2000; 7: 292-299
- Kusch A, Tkachuk S, Haller H, Dietz R, Gulba DC, Lipp M, Dumler I.** Urokinase Stimulates Human Smooth Muscle Cell Migration via a Phosphatidylinositol 3-Kinase-Tyk2 Interaktion. *J Biol Chem* 2000; 275: 38466-39473
- Lee KH, Chor EY, Hyun MS, Kim JR.** Involvement of MAPK pathway in hypoxia-induced up-regulation of urokinase plasminogen activator receptor in human prostatic cancer cell line, PC3MLN4. *Exp Mol Med* 2004; 36: 57-64
- Liang OD, Chavakis T, Kanse SM, Preissner KT.** Ligand binding regions in the receptor for urokinase-type plasminogen activator. Structural requirements for a multidomain binding region and receptor-receptor interaction. *J Biol Chem* 2001; 276: 28946-28953
- Lijnen HR, Zamarron C, Blaber M, Winkler ME, Collen D.** Plasminogen activation with single-chain urokinase type plasminogen activator (scu-PA). Studies with active site mutagenized plasminogen (Ser740- Ala) and plasmin-resistant scu-PA (Lys158-Glu). *J Biol Chem* 1990; 265: 5232-5236
- May AE, Kanse SM, Lund LR, Gisler RH, Imhof BA, Preissner KT.** Urokinase receptor (CD 87) regulates leukocyte recruitment via beta 2 integrins in vivo. *J Exp Med* 1998; 188: 1029-1037
- Mazar AP.** The Urokinase plasminogen activator receptor (uPAR) as a target for the diagnosis and therapy of cancer. *Antic- Cancer Drugs* 2001; 12: 387-400
- McCabe NP, Angwafo FF 3rd, Zaher A, Selman SH, Louinche A, Jankun J.** Expression of soluble urokinase plasminogen activator receptor may be related to outcome in prostate cancer patients. *Oncol Rep* 2000; 7: 879-882
- Min HY, Semnani R, Mizukami IF, Watt K, Todd RF, Liu DY.** cDNA for Mo3, a monocyte activation antigen, encodes the human receptor for urokinase plasminogen activator. *J Immunology* 1992; 148: 3636-3642

Mouawad R, Li Y, Anand- Srivastava MB. Atrial natriuretic peptide-C receptor induced attenuation of adenylyl cyclase signaling activates phosphatidylinositol turnover in A10 vascular smooth muscle cells.

Molecular Pharmacology 2004; 65: 917-924

Mukhina S, Stepanova V, Traktoewv D, Poliakov A, Beabealasjvilly R, Gursky YG, Minashkin MM, Shevelev A, Tkachuk V. The chemotactic action of urokinase on smooth muscle cells is dependent on its kringle domain. Characterization of interaction and contribution to chemotaxis. *J Biol Chem* 2000; 275: 16450-16459

Mustjoki S, Alitalo R, Stephens RW, Vaehri A. Blast cell-surface and plasma soluble urokinase receptor in acute leukemia patients: relationship to classification and response to therapy. *Thromb Haemost* 1999; 81: 705-710

Mustjoki S, Sidenius N, Sier CF, Blasi F, Elonen E, Alitalo R, Vaehri A. Soluble urokinase receptor levels correlate with number of circulation tumor cells in acute myeloid leukemia and decrease rapidly during chemotherapy.

Cancer Res 2000; 60: 7126-7132

Nakata S, Ito K, Fujimori M et al. Involvement of vascular endothelial growth factor and urokinase-type plasminogen activator receptor in microvessel invasion in human colorectal cancers. *Int J Cancer* 1998; 79: 179

Nakayama M, Yoshida E, Sugiki M, Anai K, Maruyama M, Mihara H. Up-regulation of the urokinase-type plasminogen activator receptor by monocyte chemotactic proteins. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2002; 13: 383-391

Nassar T, Haj-Yehia A, Akkawi S, Kuo A, Bdeir K, Mazar A, Cines DB, Higazi AR. Binding of Urokinase to Low Density Lipoprotein-related Receptor (LRP) Regulates Vascular Smooth Muscle Cell Contraction. *J Biol Chem* 2002; 277: 40499-40504

Newham P, Humphries MJ. Integrin adhesion receptors: Structure, function and implications for biomedicine. *Mol Med Today* 1996; 6: 304-310

Nguyen DH, Catling AD, Webb DJ, Sankovic M, Walker LA, Somlyo AV, Weber MJ, Gonias SL. Myosin light chain kinase functions downstream of Ras/ ERK to promote migration of urokinase-type plasminogen activator-stimulated cells in an integrin-selective manner. *J Cell Biol* 1999; 146: 149-164

Nguyen DH, Webb DJ, Catling AD, Song Q, Dhakephalkar A, Weber MJ, Ravichandran KS, Gonias SL. Urokinase-type plasminogen activator stimulates the Ras/ Extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway and MCF-7 breast cancer cell migration by a mechanism that requires focal adhesion kinase,

Src, and Shc. Rapid dissociation of GRB2/ Sps-Shc complex is associated with the transient phosphorylation of ERK in urokinase treated cells.

J Biol Chem 2000; 275: 19382-19388

Okamoto T, Schlegel A, Scherer PE, Lisanti MP. Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing „preassembled signaling complexes“ at the plasma membrane. *J Biol Chem* 1998; 273: 5419-5422

Okumura Y, Kamikubo Y, Curriden SA, Wang J, Kiwada T, Futaki S, Kitagawa K, Loskutoff DJ. Kinetic Analysis of the Interaction between Vitronectin and the Urokinase Receptor. *J Biol Chem* 2002; 277:9395-9404

Ossowski L, Aguirro-Ghiso JA. Urokinase receptor and integrin partnership: coordination for signaling of cell adhesion, migration and growth.

Curr Opin Cell Biol 2000; 12: 613-620

Padró T, Mesers RM, Dankbar B, Hintelmann H, Bieker R, Kiehl M, Berdel WE, Kienast J. The catalytic domain of endogenous urokinase-type plasminogen activator is required for the mitogenic activity of platelet-derived and basic fibroblast growth factors in human vascular smooth muscle cells.

J of Cell Science 2002; 115: 1961-1971

Park JE, Keller GA, Ferrara N. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell* 1993; 4: 1317

Parton RG. Caveolae and caveolins. *Curr Opin Cell Biol* 1996; 8: 542-548

Pedersen TL, Yong K, Pedersen JO, Hansen NE, Plesner T. Impaired migration in vitro of neutrophils from patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria.

Br J Haematol 1996; 95: 45-51

Pedrozo HA, Schwartz Z, Robinson M, et al. Potential mechanisms for the plasmin-mediated release and activation of latent transforming growth factor- beta 1 from the extracellular matrix of growth plate chondrocytes. *Endocrinology* 1999; 140: 5806

Petzinger J, Preissner KT, Kanse SM. Urokinase receptor-mediated smooth muscle cell migration requires G_i-proteins and PI-3-kinase but is independent of p42/p44 MAPK.

2nd European Meeting on Vascular Biology and Medicine, Ulm 2001, Abstract.

Ploug M, Ellis V. Structure-function relationships in the receptor for urokinase- type plasminogen activator. Comparison to other members of the Ly-6 and snake venom alpha- neurotoxins. *FEBS Lett* 1994; 349: 163-168

Ploug M, Ellis V, Danø K. Ligand interaction between urokinase-type plasminogen activator and its receptor probed with 8-anilino-1-naphthalenesulfonate. Evidence for a hydrophobic binding site exposed only on the intact receptor.

Biochemistry 1994; 33: 8991-8997

Ploug M, Kjalke M, Rønne E, Weidle U, Høyer-Hansen G, Danø K. Localization of the disulfide bonds in the NH₂-terminal domain of the cellular receptor for human urokinase-type plasminogen activator. A domain structure belonging to a novel superfamily of glycolipid-anchored membrane proteins.

J Biol Chem 1993; 268: 17539-17546

Ploug M, Rønne E, Behrendt N, Jensen AL, Blasi F, Danø K. Cellular receptor for urokinase plasminogen activator. Carboxyl-terminal processing and membrane anchoring by glycosyl-phosphatidylinositol. *J Biol Chem* 1991; 266: 1926-1933

Poliakov A, Tkachuk V, Ovchinnikova T, Potapenko N, Bagryantsev S, Stepanova V. Plasmin-dependent elimination of the growth-factor-like domain in urokinase causes its rapid cellular uptake and degradation.

Biochem J 2001; 355: 639-645

Pollänen J, Hedman K, Nielsen LS, Danø K, Vaheri A. Ultrastructural localization of plasma membrane-associated urokinase-type plasminogen activator at focal contacts. *J Cell Biology* 1988; 106: 87-95

Quax PHA, Pederson N, Masucci MT et al; Complementation between urokinase-producing and receptor-producing cells in extracellular matrix degradation.

Cell Regulation 1991; 2: 793-803

Rabbani SA. Metalloproteases and urokinase in angiogenesis and tumor progression. *In Vivo* 1998; 12: 135-142

Redmond EM, Cahill PA, Hirsch M, Wang YN, Sitzmann JV, Okada SS. Effect of Pulse Pressure on Vascular Smooth Muscle Cell Migration: The Role of Urokinase and Matrix Metalloproteinase. *Thromb Haemost* 1999; 81: 293-300

Resnati M, Guttinger M, Valcamonica S, Sidenius N, Blasi F, Fazioli F. Proteolytic cleavage of the urokinase receptor substitutes for the agonist-induced chemotactic effect. *EMBO J* 1996; 15: 1572-1582.

Ribatti D, Leali D, Vacca A et al, In vivo angiogenic activity of urokinase: role of endogenous fibroblast growth factor-2. *J Cell Sci* 1999; 112: 4213

Rigolin GM, Tieghi A, Ciccone M, Zenone Bragotti F, Cavazzini F, Porta MD, Castagnari B, Carroccia R, Guerra G, Cuneo A, Castoidi G. Soluble urokinase-type plasminogen activator receptor predicting worse prognosis and extra-bone marrow involvement in multiple myeloma patients.

British J of Haematology 2003; 120: 953

Riisbro R, Christensen IJ, Piironen T, Greenall M, Larsen B, Stephens RW, Han C, Hoyer-Hansen G, Smith K, Brunner N, Harris AL. Prognostic significance of soluble urokinase plasminogen activator receptor in serum and cytosol of tumor tissue from patients with primary breast cancer.

Clin Cancer Res 2002; 8: 1132-1141

Riisbro R, Stephens RW, Brunner N, Christensen IJ, Nielsen HJ, Heilmann L, von Tempelhoff GF. Soluble urokinase plasminogen activator receptor in preoperatively obtained plasma from patients with gynecological cancer or benign gynecological diseases. *Gynecol Oncol 2001; 82: 523-531*

Roldan AL, Cubellis MV, Masucci MT et al. Cloning and expression of the receptor for human urokinase plasminogen activator, a central molecule in cell surface, plasmin dependent proteolysis. *EMBO J 1990; 9: 467-474*

Ross R. The Pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990's.

Nature 1993; 362:801-809

Rossignol P, Ho-Tin- Noe B, Vranckx R, Bouton MC, Meilhac O, Lijnen HR, Guillin MC, Michel JB, Angles- Cano E. Protease nexin-1 inhibits plasminogen activation-induced apoptosis of adherent cells.

J Biol Chem 2004; 279: 10346-10356

Ryu Y, Takuwa N, Sugimoto N, Sakurada S, Usui S, Okamoto H, Matsui O, Takuwa Y. Sphingosine-1-phosphate, a platelet- derived lysophospholipid mediator, negatively regulates cellular Rac activity and cell migration in vascular smooth muscle cells. *Circ Res 2002; 90: 325-332*

Schlaepfer DD, Hunter T. Integrin signalling and tyrosine phosphorylation: just the FAKs? *Cell Biol 1998; 8: 151-157*

Schmidt M, Hoppe F. Increased levels of urokinase receptor in plasma of head and neck squamous cell carcinoma patients. *Acta Otolaryngol 1999; 119: 949-953*

Schnitzer JE, McIntosh DP, Dvorak AM, Liu J, Oh P: Separation of Caveolae from associated microdomains of GPI- anchored Proteins. *Nature 1995; 269:1435-1439*

Schwab W, Schulze-Tanzil G, Mobasheri A, Dressler J, Kotzsch M, Shakibaei M. Interleukin-1beta-induced expression of the urokinase-type plasminogen activator receptor and its co-localization with MMPs in human articular chondrocytes.

*Histol Histopathol.*2004; 19: 105-112

Sier CF, Nocoletti I, Santovito ML, Frandsen T, Aletti G, Ferrari A, Lissoni A, Giavazzi R, Blasi F, Sidenius N. Metabolism of tumor-derived urokinase receptor and receptor fragments in cancer patients and xenograft mice.

Thromb Haemost 2004; 91: 403-411

Simon SI, Wie Y, Zhang L, Rao NK, Xu H, Chen Z, Liu Q, Rosenberg S, Chapman HA. Identification of a Urokinase Receptor-Integrin Interaction site.

J Biol Chem 2000; 275: 10228-10235

Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction.

Nature Reviews 2000; 1:31-39

Smedsrod B, Einarsson M, Pertoft H. Tissue plasminogen activator is endocytosed by mannose and galactose receptors of rat liver cells.

Thromb Haemost. 1988; 59: 480-484

Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate: a ligand for the EDG-1 family of G-protein coupled receptors. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 905: 54-60

Steins MB, Padro T, Schwaenen C, Ruiz S, Mesters RM, Berdel WE, Kienast J. Overexpression of urokinase receptor and cell surface urokinase-type plasminogen activator in the human vessel wall with different types of atherosclerotic lesions.

Blood Coagul Fibrinolysis 2004; 15: 383-391

Stepanova V, Mukhina S, Kohler E, Resink TJ, Erne P, Tkachuk VA. Urokinase plasminogen activator induces human smooth muscle cell migration and proliferation via distinct receptor-dependent and proteolysis dependent mechanisms.

Mol & Cell Biochemistry 1999; 195: 199-206

Stepanova V, Tkachuk VA. Urokinase as a multidomain protein and polyfunctional cell regulator. *Biochemistry (Mosc)* 2002; 67: 109-118

Stephens RW, Bokman AM, Myohanen HAT, Reisberg T, Tapiovaara H, Pedersen N, Gröndahl- Hansen J, Llinas M, Vaheri A. Heparin binding to the urokinase kringle domain. *Biochemistry* 1992; 31: 7572-7579

Stephens RW, Nielsen HJ, Christensen IJ, Thorlacius- Ussing O, Sorensen S, Dano K, Brunner N. Plasma urokinase receptor levels in patients with colorectal cancer: relationship to prognosis. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 869-874

Stephens RW, Pollänen J, Tapiovaara H, et al. Activation of prourokinase and plasminogen on human sarcoma cells: a proteolytic system with surface-bound reactants. *J Cell Biology* 1989; 108: 1987-1995

Stoppelli MP, Corti A, Soffientini A, Cassani G, Blasi F, Assoian RK; Differentiation-enhanced binding of the amino-terminal fragment of human urokinase plasminogen activator to a specific receptor on U937 monocytes.

Proc Natl Acad Sci USA 1985; 82: 4939-4943

Stunff HL, Milstien S, Spiegel S. Generation and metabolism of bioactive sphingosine-1-phosphate. *J Cell Biochem* 2004; 92: 882-899

Tang H, Kerins SM, Hao Q, Inagami T, Vaughan DE. The urokinase receptor mediates tyrosin phosphorylation of focal adhesion proteins and activation of mitogen-activated protein kinase in cultured endothelial cells.

J Biol Chem 1998; 273: 18268-18272

Tanimoto T, Lungu AO, Berk BC. Sphingosine 1-phosphate transactivates the platelet-derived growth factor beta receptor and epidermal growth factor receptor in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 2004; 94: 1050-1058

Tarui T, Mazar AP, Cines DB, Takada Y. Urokinase-type plasminogen activator receptor (CD 87) is a ligand for integrins and mediates cell-cell interaction.

J Biol Chem 2001; 276: 3983-3990

Tkachuk V, Stepanova V, Little PJ, Bobik A. Regulation and role of urokinase plasminogen activator in vascular remodelling.

Clin Exp Pharmacol Physiol 1996; 23: 759-765

Todd RF, Barnathan ES, Bohuslav J, et al. CD87 cluster workshop report: In: Schlossmann SF, Boumsell L, Gilks W et al : Leukocyte Typing v. white cell differentiation antigens. Oxford: *Oxford University Press* 1995; 932- 939

Tomura H, Itoh H, Sho K, Sato K, Nagao M, Ui M, Kondo Y, Okajima F. Beta-gamma subunits of pertussis toxin sensitive G-Proteins mediate A(1) adenosine receptor agonist-induced activation of Phospholipase C in collaboration with thyrotropin- a novel stimulatory mechanism through the cross-talk of two types of receptors. *J Biol Chem* 1997; 272: 23130- 23137

Trisciuglio D, Iervolino A, Candiloro A, Fibbi G, Fanciulli M, Zangemeister-Wittke U, Zupi G, Del Bufalo D. bcl-2 induction of urokinase plasminogen activator receptor expression in human cancer cells through Sp1 activation: involvement of ERK1/ ERK2 activity. *J Biol Chem* 2004; 279: 6737- 6745

Van Leeuwen RTJ; Extracellular proteolysis and the migrating vascular smooth muscle cell. *Fibrinolysis* 1996; 10: 55-74

Vassalli JD, Baccino D, Belin D; A cellular binding site for the M 55,000 form of the human plasminogen activator urokinase. *J Cell Biology* 1985; 100: 86-92

Webb CP, Hose CD, Koochekpour S. The geldanamycins are potent inhibitors of the hepatocyte growth factor / scatter factor-met-urokinase plasminogen activator-plasmin proteolytic network. *Cancer Res* 2000; 60: 342

Webb DJ, Nguyen DH, Sankovic M, Gonias SL. The very low density lipoprotein receptor regulates urokinase receptor catabolism and breast cancer cell motility in vitro. *J Biol Chem* 1999; 274: 7412-7420

Wei Y, Waltz DA, Rao N, Drummond RJ, Rosenberg S, Chapman HA. Identification of the urokinase receptor as an adhesion receptor for vitronectin. *J Biol Chem* 1994; 269: 32380-32388

Wei Y, Yang X, Liu Q, Wilkins JA, Chapman HA. A role for caveolin and the urokinase receptor in integrin-mediated adhesion and signaling. *J Cell Biol* 1999; 144: 1285-1294

Whitelock JM, Murdoch AD, Iozzo RV, Underwood PA; The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast growth factor by stromelylin, collagenase, plasmin and heparinases. *J Biol Chem* 1996; 271: 10079

Xu C, Hansen- Schwartz J, Edvinsson L. Sphingosine signaling and atherogenesis. *Acta Pharmacol Sin* 2004; 25: 849-854

Yatomi Y, Ruan F, Hakomori S, Igarashi Y. Sphingosine-1-phosphate: a platelet-activating sphingolipid released from agonist-stimulated human platelets. *Blood* 1995; 86: 193-202

Yebra M, Goretzki L, Pfeifer M, Mueller BM. Urokinase-type plasminogen activator binding to its receptor stimulates tumor cell migration by enhancing integrin-mediated signal transduction. *Exp Cell Res* 1999; 250: 231-240

Zhang H, Colman RW, Sheng N. Regulation of CD 11b/CD18 (Mac-1) adhesion to fibrinogen by urokinase receptor (uPAR). *Inflamm Res* 2003; 52: 86-93

Zhu Y, Bujo H, Yamazaki H, Ohwaki K, Jiang M, Hirayama S, Kanaki T, Shibasaki M, Takahashi K, Schneider WJ, Saito Y. LR11, an LDL receptor gene family member, is a novel regulator of smooth muscle cell migration. *Circ Res* 2004; 94: 752-758