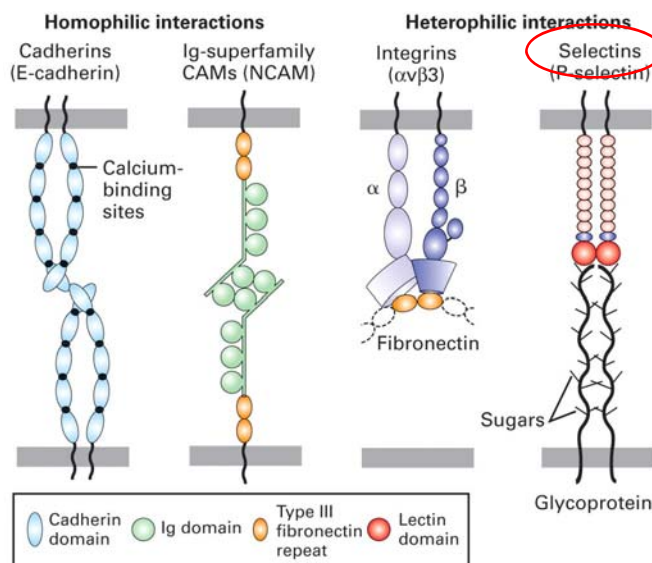


Figure 2-44 part 2 of 3 Immunobiology, 6/e. © Garland Science 2005

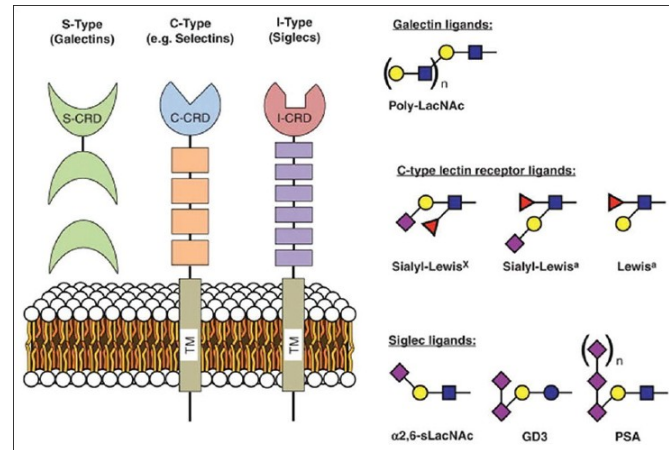
Molecole Adesione

2. Selectine

Principali molecole di adesione cellulare e recettori di adesione



Seminario

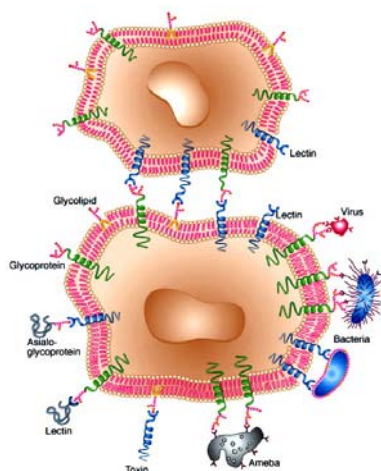


LECTINE

Kapoor C, Vaidya S, Kaur H, Jain A. **Role of lectins in clinical settings.** Clin Cancer Investig J 2014;3:472-477
http://www.ccij-online.org/articles/2014/3/6/images/ClinCancerInvestigJ_2014_3_6_472_142616_f3.jpg

Seminario

Lectine: proteine che si legano specificamente a carboidrati.



Interazioni fra lectine sulla superficie

cellulare e carboidrati. Le lectine fungono da punto di attacco sia fra tipi diversi di cellule, che fra virus ed altre cellule, tramite i **carboidrati superficiali** delle ultime. In alcuni casi, le lectine sulla superficie cellulare si legano a particolari **glicoproteine** (e.g., asialoglicoproteine), mentre in altri casi i carboidrati di **glicoproteine** o di **glicolipidi** sulla superficie cellulare servono da siti di attacco per molecole biologicamente attive che sono esse stesse lectine (e.g. tossine batteriche o vegetali specifiche per carboidrati, galectine).

Galectine: lectine che si legano a zuccheri di tipo β -galattoside (es. N-acetilglucosamina (Gal β 1-3GlcNAc o Gal β 1-4GlcNAc), che possono essere legati a proteine mediante glicosilazione **N-linked** o **O-linked**. Giocano un ruolo importante nella **stimolazione dei linfociti** e nell'**agglutinazione** delle cellule **tumorali**

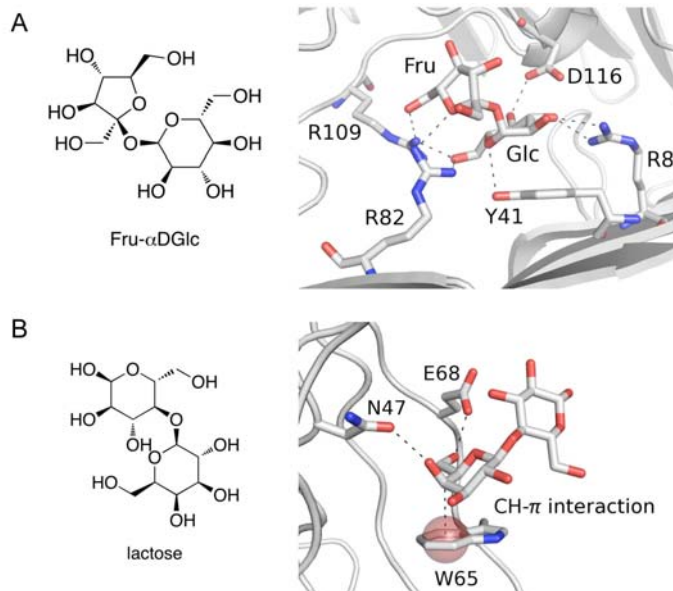
Sharon N, Lis H. **History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules.** Glycobiology. 14:53R-62R, 2004

Seminario

Interazioni carboidrato-proteine

- Le interazioni carboidrato-proteine sono di particolare importanza in un gran numero di processi e funzioni biochimiche.
- La formazione dei complessi di legame è in gran parte mediata da **interazioni deboli**, che danno origine ad associazioni specifiche fra le molecole dell'ospite (carboidrato) e quella dell'oste (recettore macromolecolare).
- I **gruppi ossidrilici (-OH) dei carboidrati** possono fungere sia come **donatori che accettori** di **legami di idrogeno**, e formano **molteplici ponti di idrogeno con la struttura del recettore**.
- Infatti, in strutture cristalline di complessi proteina-carboidrati sono state identificate **reti** strette di **legami di idrogeno**.
- Inoltre, gli **atomi di carbonio parzialmente positivi dei sistemi ad anello** possono **interagire con sistemi di elettroni π** (coinvolti nei legami aromatici) e formare **interazioni CH- π** fra i ligandi carboidrati e i loro recettori macromolecolari, di solito tramite sistemi aromatici. [N.B. **RICORDARE LEGAME HIV, tossine batteriche e proteina prionica CON GALATTOSILCERAMIDE NEI RAFTS**]
- Nelle proteine, le catene laterali degli aminoacidi **triptofano** (Trp), **fenilalanina** (Phe) e **tirosina** (Tyr) frequentemente riconoscono ligando aromatici.

<http://www.beilstein-institut.de/glycobioinf2011/Proceedings/Schneider/Schneider.html>



Formazione di ponti di idrogeno

Interazioni CH- π

<http://www.beilstein-institut.de/glycobioinf2011/Proceedings/Schneider/Schneider.html>

Seminario

CLASSIFICAZIONE DELLE LECTINE ANIMALI

- ✚ Le **strutture oligosaccaridiche complesse** presenti sulla superficie cellulare, incorporate nella matrice extracellulare o legate alle glicoproteine secrete, possono:
 - svolgere **ruoli strutturali**
 - **mediare movimenti intracellulari** dei glicconiugati dal Reticolo Endoplasmatico fino alla superficie cellulare
 - fungere da **marcatori** che mediano eventi di **riconoscimento** cellula-cellula o cellula - matrice.
- ✚ I ruoli non-strutturali degli zuccheri di solito richiedono la partecipazione di **lectine** che si legano agli zuccheri.
- ✚ Le **lectine** sono spesso proteine complesse, con **domini multipli**, ma l'attività di legame allo zucchero può di solito essere attribuita ad un **singolo modulo** nell'ambito del polipeptide, conosciuto come "**carbohydrate-recognition domain**" (**CRD**).

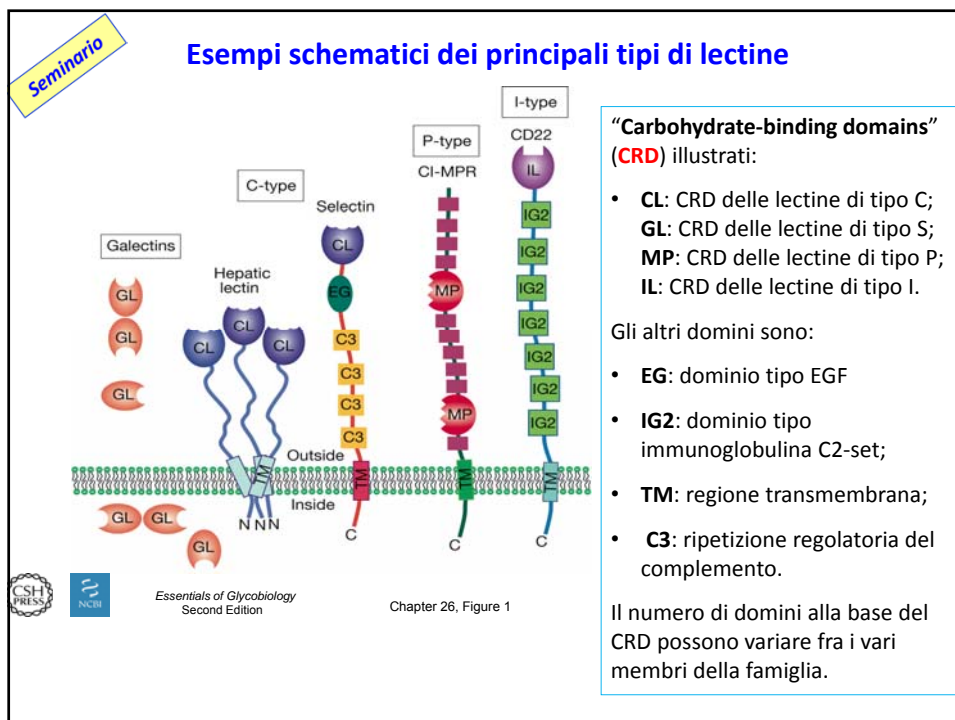
Seminario

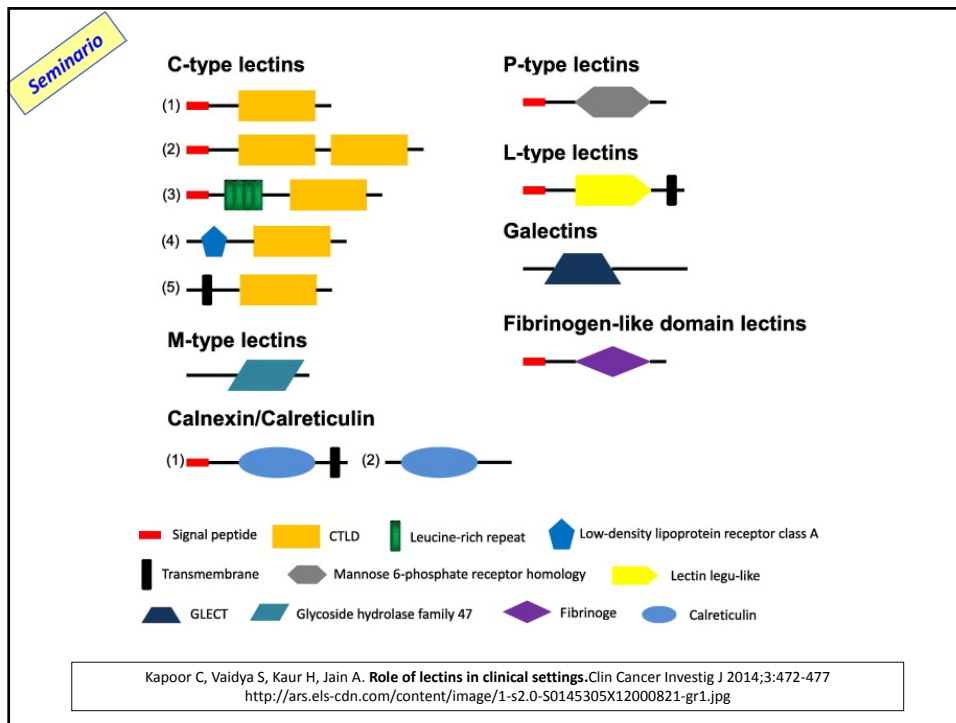
"Carbohydrate-recognition domain" (CRD)

- ✚ I **CRDs** nelle lectine dei Vertebrati appartengono a diverse famiglie di moduli proteici strutturalmente distinti.
- ✚ I moduli possono grossolanamente essere suddivisi in due categorie:
 - Le lectine che contengono CRDs in tre dei gruppi strutturali sono nella maggior parte localizzate **intracellularmente**, nei compartimenti luminali. Funzionano nel processo di **movimentazione, smistamento e indirizzamento delle glicoproteine nelle vie di secrezione e in altre vie.**
 - Le CRDs degli altri gruppi si trovano nelle lectine che funzionano soprattutto **fuori dalla cellula** e che sono:
 - secrete
 - localizzate sulla membrana plasmatica → **SELECTINE**

Seminario

Gruppo delle Lectine	Ligandi tipici	Esempi di funzioni
Calnexin	Glc ₁ Man ₉	Smistamento delle proteine nel reticolo endoplasmatico
M-type lectins	Man ₈	Degradazione delle glicoproteine associata al reticolo endoplasmatico
L-type lectins	Diversi	Smistamento delle proteine nel reticolo endoplasmatico
P-type lectins	Man 6-fosfato	Smistamento delle proteine post-Golgi
C-type lectins	Diversi	« Clearance » delle glicoproteine Immunità innata (collectins)
Galectins	β-Galactosidi	Cross-linking dei glicani nella matrice extracellulare
I-type lectins	Acido sialico	Adesione cellulare (Siglecs)
R-type lectins	Diversi	« Targetting » degli enzimi "Turnover" degli ormoni glicoproteici





Seminario

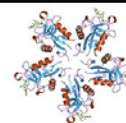
Lectin	Role in
Microorganisms	
Amoeba	Infection
Bacteria	Infection
Influenza virus	Infection
Plants	
Various	Defense
Legumes	Symbiosis with nitrogen-fixing bacteria
Animals	
Calnexin, calreticulin, ERGIC-53	Control of glycoprotein biosynthesis
Collectins	Innate immunity
Dectin-1	Innate immunity
Galectins	Regulation of cell growth and apoptosis; regulation of the cell cycle; modulation of cell-cell and cell-substratum interactions
Macrophage mannose receptor	Innate immunity; clearance of sulfated glycoprotein hormones
Man-6-P receptors	Targeting of lysosomal enzymes
→ L-selectin	Lymphocyte homing
→ E- and P-selectins	Leukocyte trafficking to sites of inflammation
Siglecs	Cell-cell interactions in the immune and neural system
Spermadhesin	Sperm-egg interaction

Funzioni delle lectine

Sharon N, Lis H. **History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules.** Glycobiology. 2004 Nov;14(11):53R-62R.

Seminario

Lectine di tipo C - a



- ✚ Le lectine di tipo C sono **proteine Ca²⁺-dipendenti che legano i glicani** e che condividono un'omologia nelle strutture primaria e secondaria dei loro domini di riconoscimento dei carboidrati (**«carbohydrate-recognition domains»; CRDs**).
- ✚ Queste proteine hanno una **piega lectinica di tipo C**, che è un ripiegamento con una sequenza proteica altamente variabile, presente anche in diverse proteine che non si legano ai carboidrati (**«C-type lectin domain [CTLD]-containing proteins»**).
- ✚ Le lectine di tipo C e le proteine con CTLDs si trovano in tutti gli organismi.

<http://www.glycoforum.gr.jp/science/word/lectin/LEA04E.html>

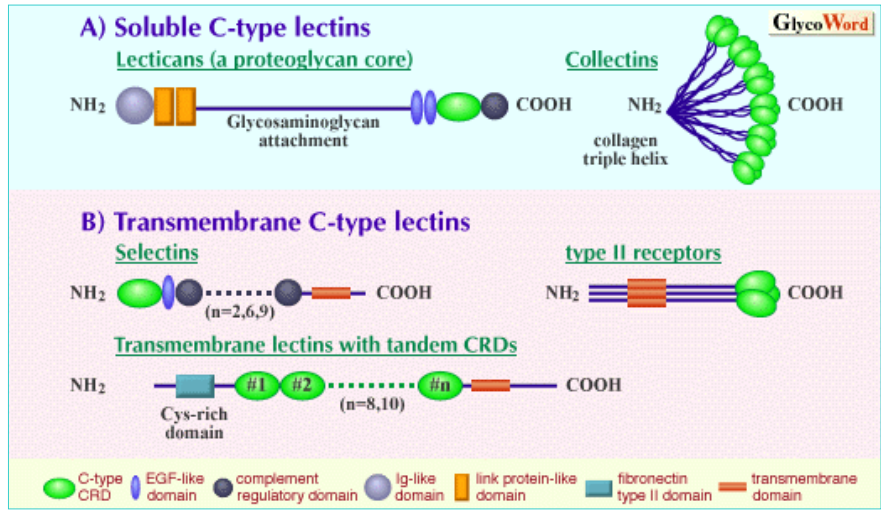
Seminario

Lectine di tipo C - b

- ✚ La grande famiglia delle lectine di tipo C comprende le **collectine**, le **selectine**, i **recettori di endocitosi**, e **proteoglicani**.
- ✚ Alcune di queste proteine sono secrete mentre altre sono proteine transmembrana.
- ✚ Esse spesso **oligomerizzano** in omodimeri, omotrimeri e oligomeri di elevato ordine, il che **aumenta la loro avidità verso ligandi multivalenti**.
- ✚ Nonostante condividano **omologia strutturale**, le lectine di tipo C di solito **differiscono in modo significativo nei tipi di glicani che riconoscono con grande affinità**.
- ✚ Queste proteine funzionano come **recettori di adesione** o **di segnalamento** in diverse processi di tipo immunologico, quali l'**infiammazione** e l'**immunità** verso cellule tumorali o infette da virus.

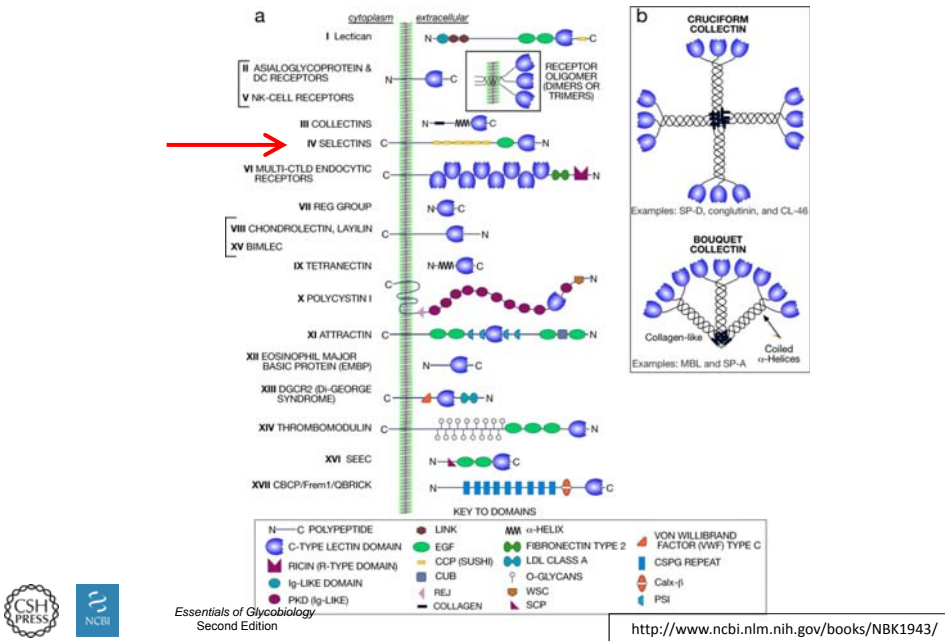
<http://www.glycoforum.gr.jp/science/word/lectin/LEA04E.html>

Seminario



<http://www.glycoforum.gr.jp/science/word/lectin/LEA04E.html>

Gruppi diversi di lectine di tipo C e la loro struttura a domini

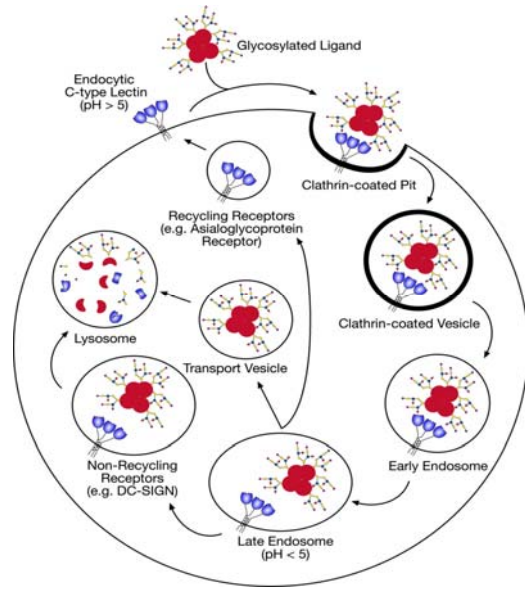


Essentials of Glycobiology, Second Edition

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1943/>

Lectine di tipo C che fungono da recettori di endocitosi

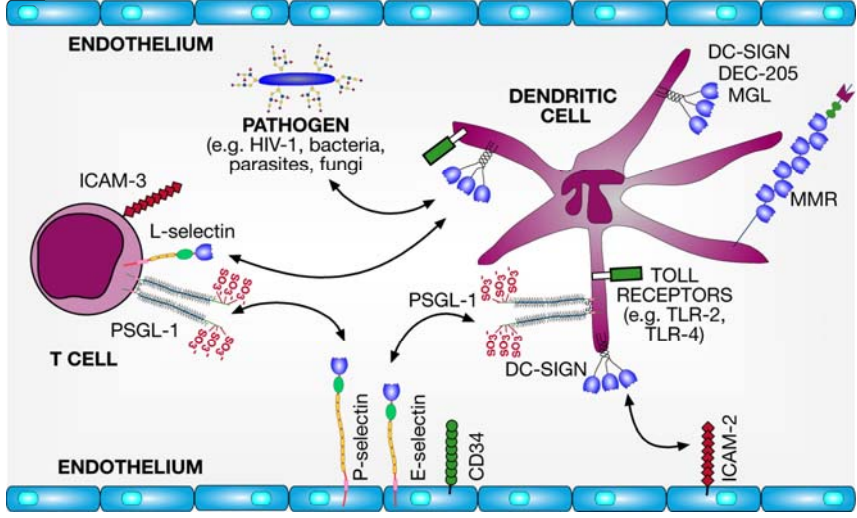
Seminario



<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1943/>

Seminario

Le lectine di tipo C funzionano nella risposta immune di tipo innato e svolgono una duplice funzione nel riconoscimento dei patogeni e nell'adesione cellulare

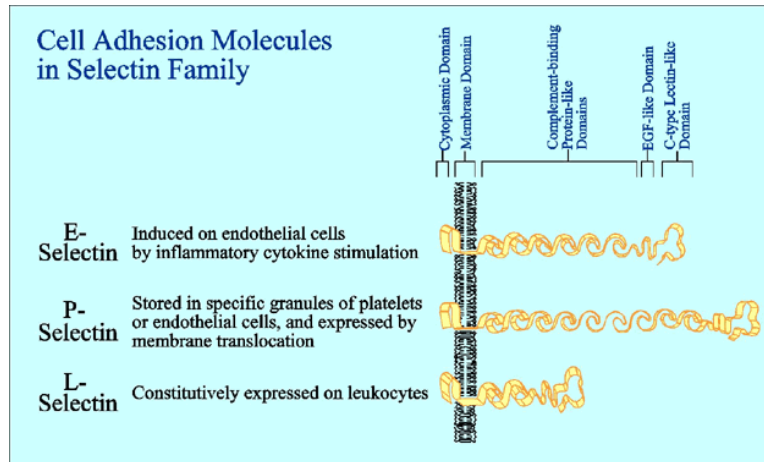


Essentials of Glycobiology
Second Edition

Chapter 31, Figure 5

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1943/>

LEZIONE !



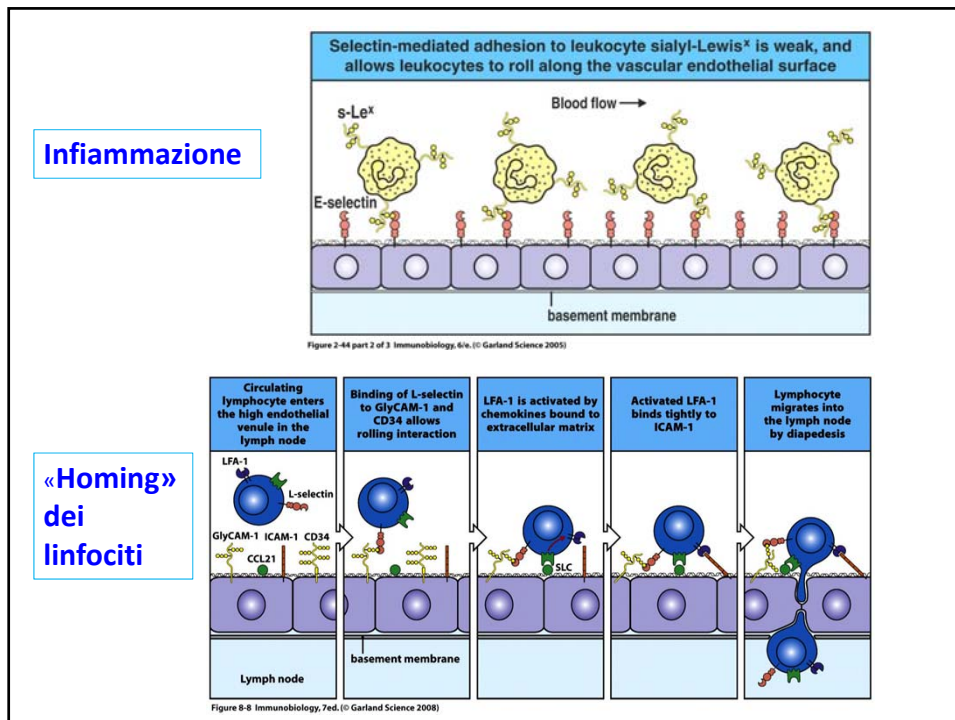
SELECTINE

<http://www.glycoforum.gr.jp/science/glycogenes/02/02E.html>

Selectine [1]

- ✚ Sono **lectine di tipo C**, espresse sulla superficie di **leucociti**, **piastrine** e **cellule endoteliali attivate**.
- ✚ Rallentando il rapido flusso nella circolazione, promuovono l'**aggancio** e il **rotolamento** di leucociti e piastrine sull'endotelio vascolare e sono importanti per lo «**homing**» dei **linfociti verso gli organi linfoidi secondari**, per il **reclutamento dei leucociti ai siti di infiammazione** e per l'**infiltrazione locale o formazione di metastasi di cellule maligne**.

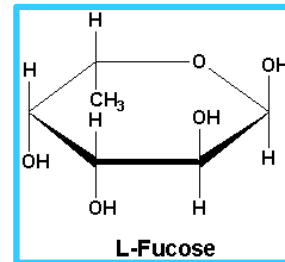
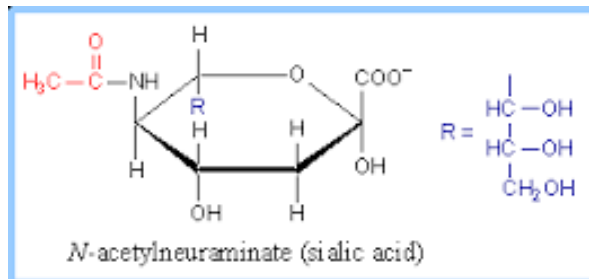
Coombe & Dye. In: Adhesion Molecules, CRC Press
<http://www.glycoforum.gr.jp/science/glycogenes/02/02E.html>



Selectine [2]

- ✚ Ci sono tre tipi di selectine:
 - ✚ **L-selettina**: espresse in tutti i leucociti, ad eccezione dei linfociti T:
 - ✚ **E-selettina**: espressa dalla cellule endoteliali attivate da citochine
 - ✚ **P-selettina**, espressa da piastrine e cellule endoteliali attivate.
- ✚ Sono coinvolte in legame **eterofilico** e interagiscono con **glicoproteine** e **glicolipidi** che contengono strutture con **acido sialico** legato in $\alpha 2,3$ e **fucosio** in $\alpha 1,3$ nelle loro ramificazioni terminali.

Acido sialico e Fucosio



Il **L-Fucosio** è un raro **L**-zucchero che si trova nelle catene oligosaccaridiche di glicoproteine O- e N-linked.

https://www.rpi.edu/dept/bcbp/molbiochem/MBWeb/m_b1/part2/images/sialic.gif

<http://oregonstate.edu/dept/biochem/hhmi/hhmiclasses/bb450/winter2002/EF/FUCOSE.GIF>

Tipi di selectine

- ✚ **L-selectine**: di solito espresse da quasi tutti i leucociti
- ✚ **E-selectine**: inducibili nell'endotelio vascolare dopo stimolazione con citochine dovuto ad attivazione trascrizionale.
- ✚ **P-selectine**: originariamente individuate nelle piastrine attivate; tuttavia, la loro espressione può anche essere **indotta** nell'endotelio vascolare attivato. Sono pre-immagazzinate in granuli citoplasmatici (**corpi di Weibel-Palade**) sotto forma di proteine transmembrana pre-formate, e vengono traslocate sulla superficie cellulare dopo stimolazione.

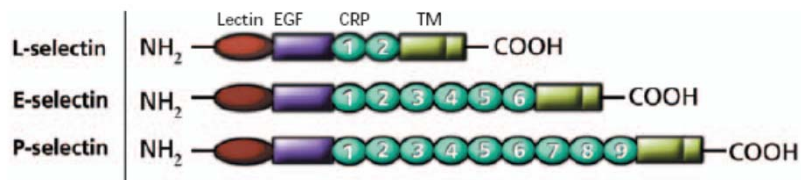


Figure 1. Selectin Structure. Each selectin is composed of an amino terminal C-type lectin domain (Lectin), an epidermal growth factor-like domain (EGF), a variable number of complement regulatory protein-like domains (CRP), a transmembrane domain (TM), and a short cytoplasmic domain.

Pharmingen / Transduction Laboratories
- BD: Cell Adhesion Molecules; http://www.bdi.co.jp/pdf/55-10_00-6081-74-B1.pdf

1

✚ L'adesione cellulare mediata dalle selectine è basata sul **riconoscimento di carboidrati da parte di lectine Calcio-dipendente.**

✚ In genere, i **ligandi della L-selettina si trovano sulle cellule endoteliali**, mentre quelli per le **E- e P-selectine si trovano sui leucociti.**

L: lectin domain
E: Epidermal Growth Factor-like domain (EGF)
C: Complement regulatory protein-like domain

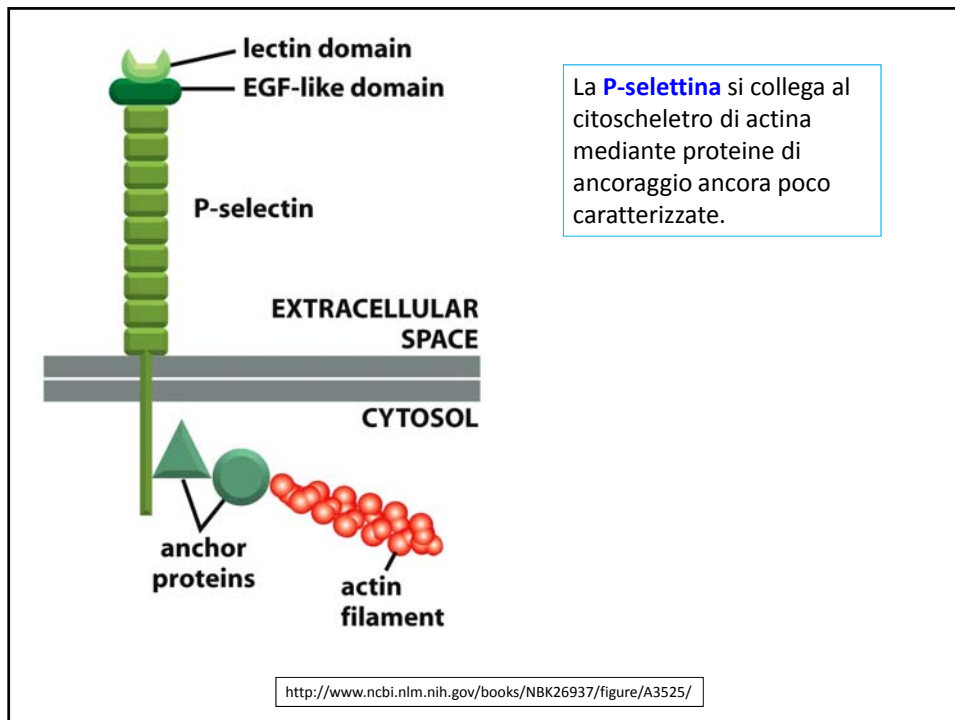
<http://www.glycoforum.gr.jp/science/word/lectin/LEA05E.html>

GlycoWord

Struttura delle selectine

- ✚ Le **lectine di tipo C** sono proteine leganti carboidrati caratterizzate dalla presenza di un «**Carbohydrate Recognition Domain**» (**CRD** di circa 120 aminoacidi).
- ✚ Sono molecole **rigide** ed **estese** e le loro regioni extracellulari comprendono un dominio N-terminale **CRD**, che media il legame con le componenti di carboidrati, un dominio tipo **EGF** e un numero diverso di «**short consensus repeats**» (**SCR**) (noti anche come moduli «**Complement Control Protein**» (**CCP**)).
- ✚ Le differenze di dimensioni fra le selectine riflettono il n° di domini SCR:
 - La **L-selettina** ha **2** SCRs
 - La **E-selettina** ha **6** SCRs
 - La **P-selettina** ha forme derivate da splicing alternativo con **6 o 9** SCRs.
- ✚ I domini **transmembrana** e **intracitoplasmatico** sono abbastanza divergenti, il che indica che essi **interagiscano con proteine intracellulari differenti.**

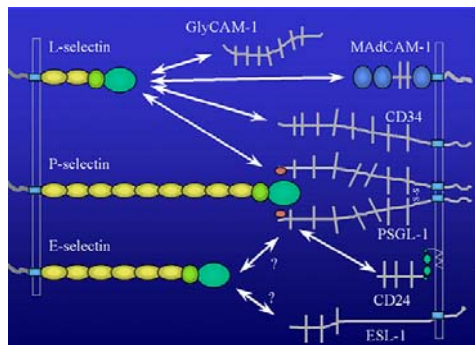
Coombe & Dye. In: Adhesion Molecules, CRC Press



Ligandi per le selectine

- ✚ L'adesione mediata da selectine è parzialmente regolata dal livello di espressione delle singole selectine.
- ✚ L'adesione è inoltre regolata dinamicamente **dall'espressione di specifici ligandi** (carboidrati), che sono **riconosciuti dal dominio lectinico di tipo C**.
- ✚ Poiché i domini di tipo C-lectina dei tre membri della famiglia delle selectine sono abbastanza omologhi si era previsto che i tre membri avessero specificità di legame simili.
- ✚ Tuttavia, **ogni membro della famiglia ha specificità di legame con i carboidrati distinta**, che condiziona il complesso processo dello homing dei vari sottotipi di leucociti e la mobilitazione infiammatoria dei leucociti attivati.

<http://www.glycoforum.gr.jp/science/glycogenes/02/02E.html>

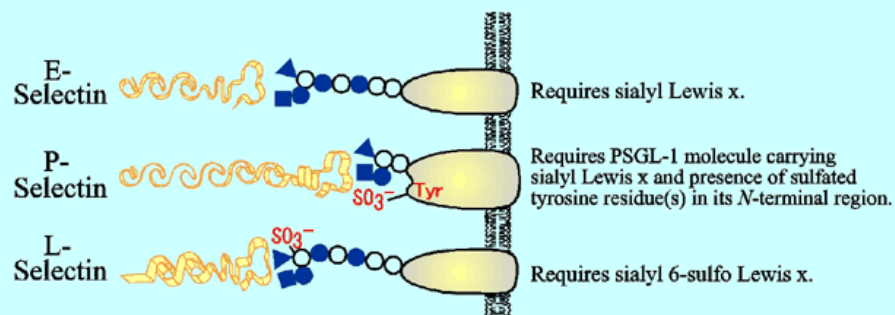


Ligandi per le selectine

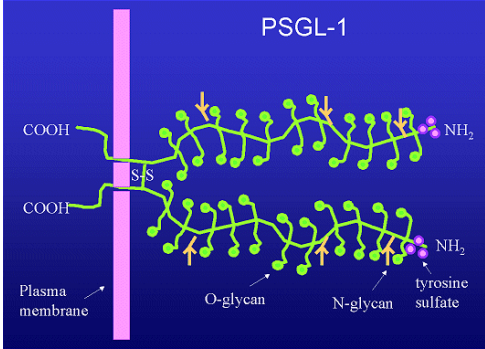
Durante la **risposta infiammatoria**, l'adesione dei leucociti alle cellule endoteliali è controllata dal legame delle **selectine vascolari** a **carboidrati complementari**. Tutti i ligandi delle selectine noti sono **glicoproteine transmembrane** che presentano strutture oligosaccaridiche alle selectine. La **formazione transiente di legami tra le selectine e i loro ligandi** media il **passo iniziale della cascata di adesione**. Tutti i tre tipi di selectina possono riconoscere glicoproteine e/o glicolipidi che contengono il **tetrasaccaride "sialyl-Lewis x (sialyl-CD15)"**. Questo tetrasaccaride **si trova in tutte le cellule circolanti della serie mieloide** ed è composto di **acido sialico, galattosio, fucosio e N-acetil-galattosamina**. Non è chiaro come le selectine riescano a svolgere interazioni specifiche con i loro ligandi, dato questo comune carboidrato di riconoscimento.

http://bme.virginia.edu/ley/selectin_ligands.html

Ligand Specificity of Selectins



<http://www.glycoforum.gr.jp/science/glycogenes/02/02E.html>



The diagram illustrates the structure of PSGL-1, a transmembrane protein. It is shown as a dimeric protein with two polypeptide chains connected by a disulfide bond (S-S) in the plasma membrane. The extracellular domain is heavily glycosylated, featuring O-linked glycans (green circles) and N-linked glycans (purple circles). Tyrosine sulfates (NH₂) are also present. The cytoplasmic tail contains two carboxyl groups (COOH). The protein is labeled 'PSGL-1' and 'Plasma membrane'.

P-selectin glycoprotein ligand-1 is a 240 kDa homodimer consisting of two 120kDa polypeptide chains.

PSGL-1 is constitutively expressed on all leukocytes. PSGL-1 is primarily found on the tips of the microvilli. PSGL-1 can bind to P-selectin on the endothelium when decorated with appropriate sugars. The structure of functional PSGL-1 includes the **sialyl-Lewis-x component**. The PSGL-1 gene encodes a **transmembrane polypeptide rich in proline, serine and threonine residues typical of mucin-type glycoproteins**. The O-linked glycans displayed by PSGL-1 must **undergo two specific post-translational modifications** in order for it to function as a counter-receptor for P-selectin: **α(1,3) fucosylation and α(2,3) sialylation**. Bonds between P-selectin and PSGL-1 primarily mediate the rolling phase of the adhesion cascade.

<http://bme.virginia.edu/ley/psgl-1.html>

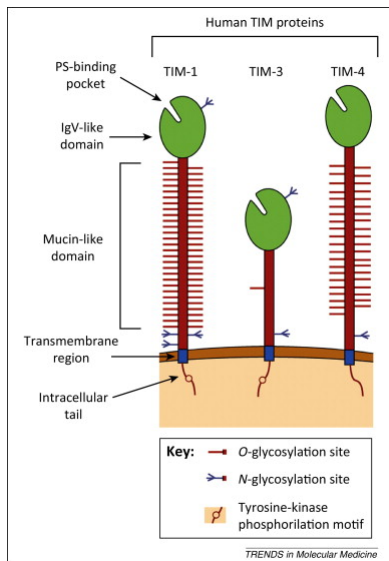
Regulation of T cell trafficking by the T cell immunoglobulin and mucin domain 1 glycoprotein

Stefano Angiari and Gabriela Constantin

Leukocyte trafficking is generally considered the **initial stage of any immune response**, and it involves a multistep intravascular process including **capture, rolling, activation, arrest, crawling, and transmigration**. Both **capture and rolling are predominantly mediated by selectins**, which allow **circulating leukocytes to sense activating signals on the endothelium and adhere to vessel walls**. In this review, we discuss recent data showing that **the T cell immunoglobulin and mucin domain 1 (TIM-1) protein is a major ligand for endothelial P-selectin, mediating T helper (Th) cell Th1 and Th17 trafficking in inflamed tissues**. We highlight structural and functional features showing that TIM-1 can be included in the restricted group of major adhesion receptors involved in leukocyte trafficking with a pathophysiological role in inflammation and autoimmunity.

Angiari S, Constantin G. Regulation of T cell trafficking by the T cell immunoglobulin and mucin domain 1 glycoprotein. Trends Mol Med. 2014 Dec;20(12):675-84.

Ligandi tipici delle selettine



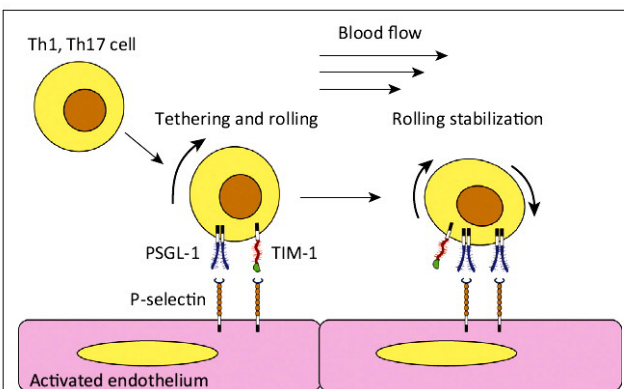
The structure of human T cell immunoglobulin and mucin domain (TIM) proteins.

The extracellular portion of human TIM proteins is highly conserved, with an **N-terminal IgV-like domain adjacent to a mucin-like domain**. The latter is glycosylated to different degrees in different TIM proteins, with TIM-1 and TIM-4 bearing the most glycan chains (57 and 41 predicted O-glycosylation sites respectively). The intracellular tails of TIM-1 and TIM-3 also contain at least one tyrosine-kinase phosphorylation motif, whereas TIM-4 does not mediate direct transmembrane signals. TIM proteins also contain a phosphatidylserine-binding site in the IgV-like domain. In mice, the TIM-2 protein has also been identified, and a further four related genes (*Tim-5* to *Tim-8*) are predicted but the corresponding proteins are not yet characterized. Abbreviations: IgV, immunoglobulin V; PS, phosphatidylserine; TIM, T cell immunoglobulin and mucin domain molecule.

Angiari S, Constantin G. Regulation of T cell trafficking by the T cell immunoglobulin and mucin domain 1 glycoprotein. Trends Mol Med. 2014 Dec;20(12):675-84.

N.B. Sono coinvolte anche nell'ancoraggio delle vescicole extracellulari

Interazioni con l'endotelio vascolare, mediate dalla P-selettina, fra cellule Th helper 1 (Th1) e Th17 durante l'infiammazione

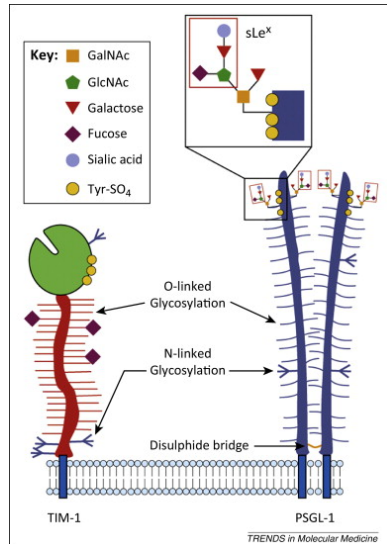


Angiari S, Constantin G. Regulation of T cell trafficking by the T cell immunoglobulin and mucin domain 1 glycoprotein. Trends Mol Med. 2014 Dec;20(12):675-84.

PSGL-1, P-selectin glycoprotein ligand-1; **Th**, T helper; **TIM-1**, T cell immunoglobulin and mucin domain-1

La **P-selettina** cattura le cellule Th1 e Th7 circolanti sulla parete attivata del vaso sanguigno mediante legame a «P-selectin glycoprotein ligand-1» (**PSGL-1**) e «T cell immunoglobulin and mucin domain-1» (**TIM-1**). Questi due ligandi controllano insieme il collegamento delle cellule T e l'inizio del «rolling» sul letto vascolare. La stabilizzazione del «rolling» seguente sembra richiedere soltanto PSGL-1, che controlla la velocità di «rolling velocity».

Structural determinants involved in P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) and T cell immunoglobulin and mucin domain-1 (TIM-1) binding to endothelial selectins.



Vedi didascalìa

Abbreviations: GalNAc, N-acetylgalactosamine; PSGL-1, P-selectin glycoprotein ligand-1; TIM-1, T cell immunoglobulin and mucin domain-1.

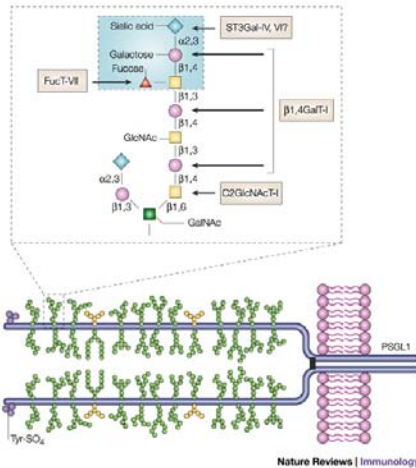
Angiari S, Constantin G. Regulation of T cell trafficking by the T cell immunoglobulin and mucin domain 1 glycoprotein. Trends Mol Med. 2014 Dec;20(12):675-84.

Didascalìa Fig. Angiari

- PSGL-1 requires capping of the NH₂-terminal core-2-O-linked glycans with the sialyl Lewis X epitope (sLe^x; red box) for fully efficient binding to P- and E-selectin.
- N-acetylglucosamine (GlcNAc) and galactose residues from the sLe^x epitope are glycosylated by α1-3 fucosylation and α2-3 sialylation, respectively.
- Sulfation of three tyrosines in the protein sequence (Tyr-SO₄) is also required for high affinity binding of PSGL-1 to P-selectin, but not E-selectin.
- The structure of TIM-1 glycans has not yet been determined.
- TIM-1 requires α1-3 fucosylation but not sialylation of O-linked glycans in the mucin domain for efficient selectin binding.
- Tyr-SO₄ moieties are also necessary for the high affinity binding between TIM-1 and endothelial selectins.
- All tyrosine residues in the extracellular portion of TIM-1 are located in the IgV-like domain, potentially explaining the involvement of this domain in TIM-1/selectin interaction.

Angiari S, Constantin G. Regulation of T cell trafficking by the T cell immunoglobulin and mucin domain 1 glycoprotein. Trends Mol Med. 2014 Dec;20(12):675-84.

PSGL1: PROTOTIPO DI UN LIGANDO PER LE SELETTINE



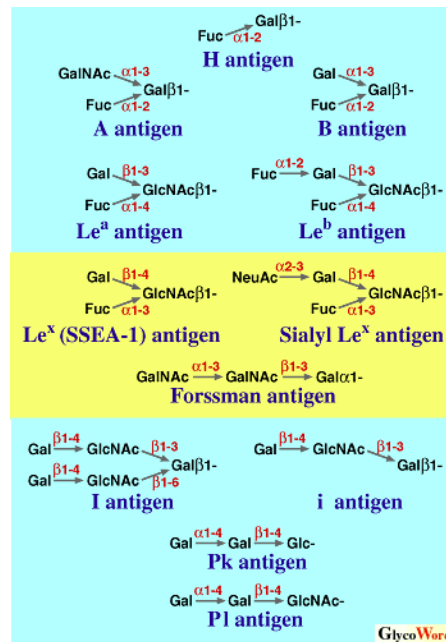
Struttura di carboidrati che si lega alle selectine è "O-linked", mediante un residuo di N-acetilgalattosamina, ad un residuo di serina o di treonina.

L'enzima di ramificazione specifico per il nucleo 2 dell'oligosaccaride, 2,1,6-glucosaminiltransferasi-I (C2GlcNAc-T-I), collega un residuo di GlcNAc in 1,6. La catena viene ulteriormente estesa da una galattosiltransferasi (1,4GalT-I), e può contenere numeri variabili di unità ripetute di lattosamina. L'ultimo residuo di N-acetilglucosamine viene fucosilato mediante un legame 1,3 dalla fucosiltransferasi-VII (FucT-VII), mentre la FucT-IV avrebbe aggiunto un residuo di **fucosio** al penultimo GlcNAc (non illustrato). La struttura viene conclusa da un residuo di **acido sialico** collegato dalla sialil-3-galattosiltransferasi (ST3Gal-IV) e possibilmente dalla ST3Gal-VI. Il riquadro azzurro indica la struttura detta "**sialyl-Lewis x**". Quest'ultima, o una simile struttura di ligando, si trova sulla treonina 57 del "**P-selectin glycoprotein ligand 1; PSGL1**" umano; **impalcatura proteica in blu**; glicani "O-linked" in verde; glicani "N-linked" in giallo e **tirosine solfatate in porpora**.

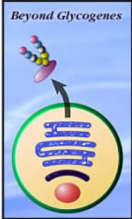
Seminario


Ogni selettina ha affinità verso oligosaccaridi con **determinanti antigenici di tipo sialil-Le^x o sialil-Le^a**, tuttavia l'affinità per gli oligosaccaridi non è elevata.

I principali antigeni dei gruppi sanguigni sono indicati nei quadri azzurri e gli antigeni correlati nel quadro in giallo.



<http://www.glycoforum.gr.jp/science/word/glycoprotein/GPA04E.html>





Reiji Kannagi:

Selectin-mediated Cell Recognition and its Structural Basis

Granulocytes and monocytes constitutively express carbohydrate ligands for selectins. In contrast, carbohydrate ligands on lymphocytes are highly inducible. Selectin ligands on leukocytes are mainly synthesized by Fuc-T VII and Fuc-T IV. Most resting lymphocytes in human peripheral blood do not express sialyl Lewis^x, but its expression is strongly induced when lymphocytes are activated by inflammatory stimuli, and activated lymphocytes exhibit vigorous adhesion to endothelial P- and E-selectins. This accompanies remarkable induction of Fuc-T VII and IV gene transcription. Dynamic regulation of transcription of Fuc-T VII and IV genes is observed upon stimulation of leukocytes by inflammatory cytokines.⁴²⁻⁴⁸

<http://www.glycoforum.gr.jp/science/glycogenes/02/02E.html>

E-Selettina - 1 (ELAM-1, o CD62E)

- ✚ E' espressa de novo in cellule endoteliali stimulate da citochine infiammatorie (TNF- α o IL-1) e riconosce un gran numero di glicoproteine su leucociti che portano il gruppo SLe^x, incluso il PSGL-1.
- ✚ La posizione del sito di legame per il SLe^x è conservata nelle selectine P- e E-.
- ✚ La **coda citoplasmatica** della selettina E interagisce con elementi del **citoscheletro**.
- ✚ Quando non è più necessaria, la selettina E viene internalizzata mediante fossette rivestite di clatrina.

Coombe & Dye. In: Adhesion Molecules, CRC Press
<http://www.glycoforum.gr.jp/science/glycogenes/02/02E.html>

E-Selettina - 2

- ✚ L'antigene **sialyl Lewis^x** è spesso frequentemente **espresso da cellule epiteliali maligne** e viene considerato come carboidrato-determinante associato ai tumori.
- ✚ Un altro e ben noto carboidrato-determinante associato al cancro, il **sialyl Lewis^a**, può servire da ligando per la E-selettina.
- ✚ Le cellule tumorali che esprimono sialyl Lewis^x oppure sialyl Lewis^a aderiscono alle cellule endoteliali attivate in test di adesione in vitro.
- ✚ Si pensa che i determinanti sialyl Lewis^x e sialyl Lewis^a espressi dalle cellule tumorali siano coinvolti nei processi di **disseminazione metastatica per via sanguigna**.

<http://www.glycoforum.gr.jp/science/glycogenes/02/02E.html>

L- Selettina - 1 (LAM-1, LECAM-1, gp90mel, or CD62L)

- ✚ E' espressa costitutivamente nei **microvilli dei leucociti**.
- ✚ I livelli superficiali di L-selettina sono regolati da scissione, mediata da metalloproteinasi, del dominio extracellulare in seguito all'attivazione dei leucociti.
- ✚ La coda intracitoplasmatica della L-selettina si lega alla calmodulina e al citoscheletro di actina mediante la α -actinina e la famiglia di proteine ezrina/radizina/moesina.
- ✚ L'equilibrio fra queste interazioni competitive citoplasmatiche può influenzare la scissione proteolitica del dominio extracellulare.
- ✚ Il dominio extracellulare della L-selettina si lega sia alla glicoproteina PSGL-1 (CD162; «P-selectin glycoprotein ligand-1») su cellule mieloidi o linfociti T attivati, che a glicoproteine che si trovano sulle cellule endoteliali specializzate dalle **venule endoteliali alte del tessuto linfoide periferico**.

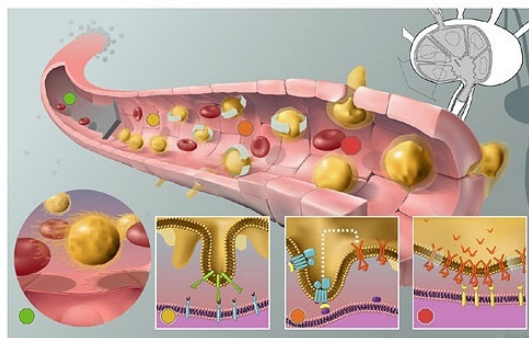
Coombe & Dye. In: Adhesion Molecules, CRC Press

L- Selettina - 2

- ✦ E' stata inizialmente descritta come recettore per i linfociti coinvolto nel «homing» dei linfociti «naïive» verso i linfonodi periferici.
- ✦ Si sa che le «**High Endothelial Venules; HEV**») fungono da entrata per i linfociti che «home» verso i linfonodi periferici.
- ✦ Poichè la L-selettina è espressa nei leucociti, si pensava che le cellule endoteliali delle HEV esprimessero il carboidrato-ligando corrispondente per la L-selettina, che studi precedenti suggerivano essere il sialyl Lewis^x, ma che non è stato identificato.
- ✦ Invece sono stati recentemente identificati determinanti sialyl Lewis^x solfatati sulle HEV: sialyl -6-sulphate Lewis^x.

<http://www.glycoforum.gr.jp/science/glycogenes/02/02E.html>

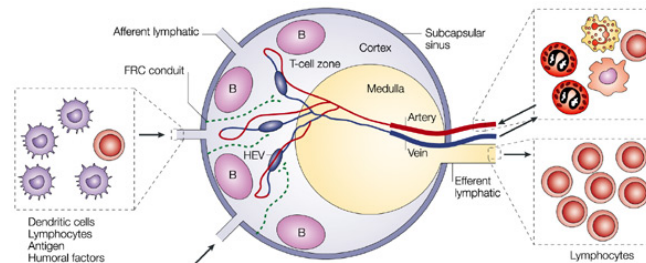
«Homing» dei linfociti verso organi linfoidi secondari (a)



Naive T lymphocytes homing to a peripheral lymph node via high endothelial venules"

http://sciencecareers.sciencemag.org/career_magazine/previous_issues/articles/2005_04_01/nodoi.10926960522152145967

«High endothelial venules»



Nature Reviews | Immunology

Lymphocytes and dendritic cells (DCs) enter lymph nodes by different routes. Most lymphocytes migrating to lymph nodes enter from the peripheral blood. Although various types of leukocyte are found in the arteries of lymph nodes, only lymphocytes can interact with and extravasate through **high endothelial venules (HEVs) to migrate into the lymph-node parenchyma**. T and B cells subsequently segregate into the T-cell zones and B-cell zones, respectively. By contrast, most DCs, together with small numbers of lymphocytes, enter lymph nodes through the afferent lymphatics. They then accumulate in the vicinity of HEVs. The HEVs are surrounded by fibroblastic reticular cells (FRCs), which form channels — called FRC conduits — that project from the subcapsular sinus into the T-cell zone. Some chemokines produced extranodally might reach HEVs through the FRC conduit.

http://www.nature.com/nri/journal/v4/n5/fig_tab/nri1354_F1.html

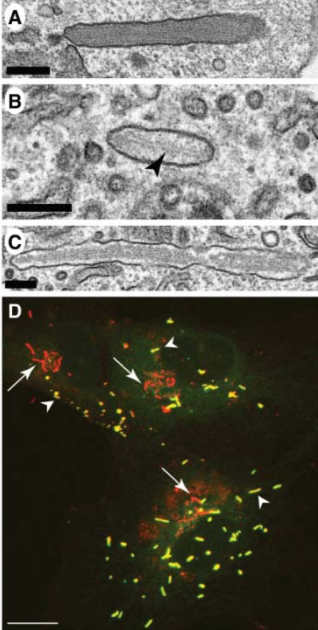


P-Selettina (PADGEM, GMP-140, o CD62P)

- ✚ E' espressa costitutivamente nei **megacariociti**, e nelle piastrine e cellule endoteliali è immagazzinata in granuli citoplasmatici preformati che si fondono con la membrana plasmatica in seguito ad attivazione.
- ✚ Può essere internalizzata mediante fossette rivestite da clatrina e indirizzate ai granuli di secrezione per riciclaggio, oppure ai lisosomi per degradazione.
- ✚ Il principale ligando della P-selettina è il «**P-selectin glycoprotein Ligand 1**» (**PSGL-1**), una sialomucina espressa dai leucociti in proiezioni simili a microvilli.
- ✚ **Le interazioni tra la P-selettina e il PSGL-1 sono fondamentali per indurre i leucociti ad ancorarsi e a rotolare sulle cellule endoteliali, oppure su piastrine immobilizzate che esprimono la P-selettina.**
- ✚ La P-selettina si lega anche debolmente ad alcune forme di eparina e di eparan solfato e ad alcune glicoproteine che portano la struttura antigenica «**syalated Lewis X (SLe^x)**».

Coombe & Dye. In: Adhesion Molecules, CRC Press

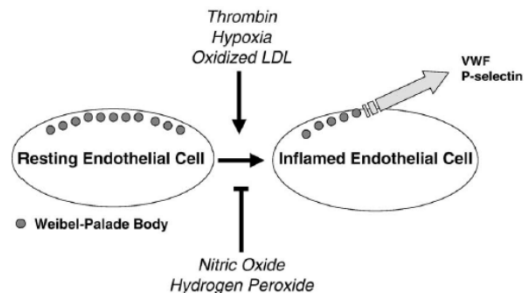
Corpi di Weibel-Palade [1]



- ✚ I **corpi di Weibel-Palade** (“Weibel-Palade bodies; WPB”) sono organelli di secrezione regolata presenti nelle cellule endoteliali.
- ✚ Queste strutture a forma di sigaro circondate da membrana giocano un ruolo sia nell'**emostasi** che nell'**infiammazione**, ma la loro biogenesi è poco nota.
- ✚ Il contenuto dei WPB è determinato dal fattore di emostasi “**von Willebrand factor; VWF**” la cui complessa biogenesi culmina con la formazione di multimeri ad alto peso molecolare.
- ✚ Il VWF è anche organizzato in tubuli proteinacei che si trovano alla base del contenuto striato dei WBPs, come si vede in microscopia elettronica.

Michaux G, Cutler DF. How to roll an endothelial cigar: the biogenesis of Weibel-Palade bodies. Traffic 5: 69-78, 2004

Corpi di Weibel-Palade (WPBs) [2]



Una gran varietà di agonisti scatenano le cellule endoteliali a riposo a rilasciare i contenuti dei WPBs nel torrente sanguigno, attivando l'infiammazione vascolare e la trombosi. Il NO e il H₂O₂ sono inibitori dell'esocitosi.

“... I **corpi di Weibel-Palade (WPBs)** sono granuli delle cellule endoteliali che immagazzinano il **fattore di von Willebrand (VWF)**, la **P-selectina** e altri **modulatori vascolari**. Le cellule endoteliali secernono WPBs in risposta a **danno vascolare**, rilasciando VWF, che scatena il “rolling” delle piastrine e l'esternalizzazione di P-selettina, la quale a sua volta attiva il traffico di leucociti. **L'esocitosi nelle cellule endoteliali è una delle risposte precoci al danno vascolare** e gioca un ruolo di grandissima importanza nella **trombosi e infiammazione**...”

Lowenstein CJ, Morrell CN, Yamakuchi M. Regulation of Weibel-Palade body exocytosis. Trends Cardiovasc Med. 15: 302-308, 2005.

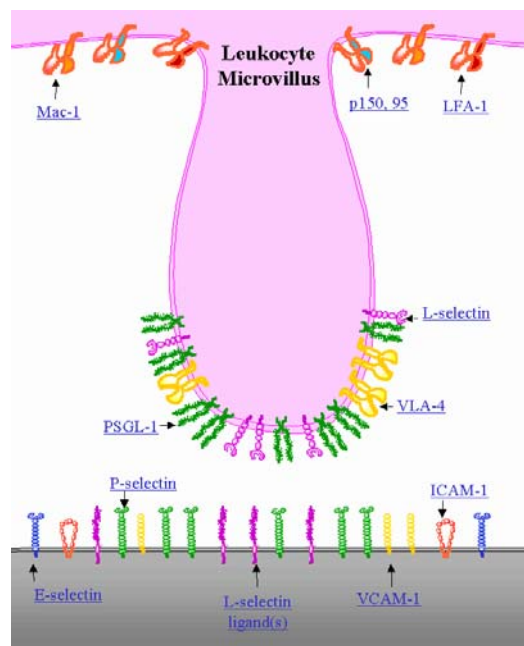
Corpi di Weibel-Palade (WPBs) [3]

Table 1. Contents of WPBs

WPB contents	Vascular function	Mechanism
VWF	Thrombosis	Links platelets to injured vessel wall
Factor XIIIa	Thrombosis	Transglutaminase cross-links fibrin
Tissue plasminogen factor	Fibrinolysis	Proenzyme that degrades fibrin
P-Selectin	Inflammation	Supports leukocyte and platelet rolling
IL-8	Inflammation	Attracts and activates neutrophils
Eotaxin	Inflammation	Recruits and activates eosinophils
α 1,3-fucosyltransferase VI	Inflammation	Synthesis of selectin ligands
CD63 (Lamp3)	Unknown	Unknown
Endothelin 1	Vasoconstriction	Interacts with endothelin receptor B
Endothelin-converting enzyme	Vasoconstriction	Cleaves big endothelin 1 into endothelin 1
Calcitonin-gene-related peptide	Vasodilation	Increases NO synthesis
Angiopoietin 2	Angiogenesis	Blocks angiopoietin 1-induced angiogenesis

Lowenstein CJ, Morrell CN, Yamakuchi M. Regulation of Weibel-Palade body exocytosis. Trends Cardiovasc Med. 15: 302-308, 2005.

Le molecole presentatrici di carboidrati, che possono dare origine ad **interazioni** di tipo **multivalente fra le catene di carboidrati e i domini lectinici** giocano un ruolo importante nell'adesione leucocito/endotelio.

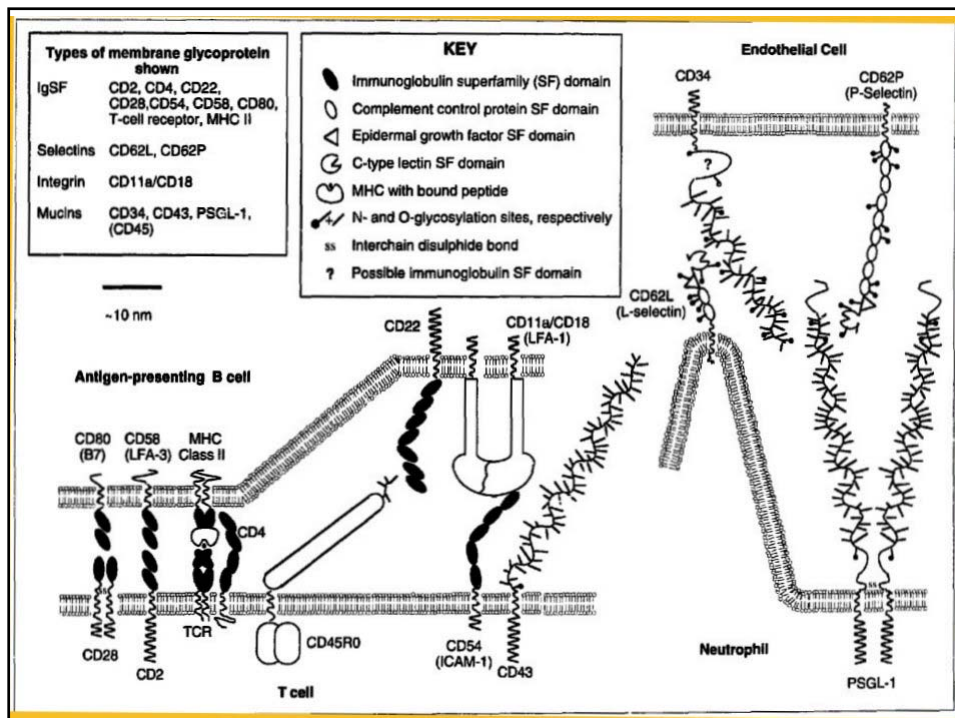


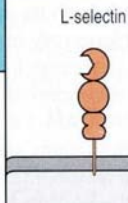
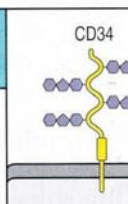
TIBS 19 – SEPTEMBER 1994

Transient intercellular adhesion: the importance of weak protein-protein interactions

P. Anton van der Merwe and A. Neil Barclay

Intercellular adhesion is a complex phenomenon central to the development, structure and functioning of all multicellular organisms. Adhesion is mediated by distinct families of cell-adhesion molecules (CAMs), and recent studies have identified key characteristics of CAMs that influence their function. Affinity and kinetic analyses using a novel technique based on surface plasmon resonance have shown that CAM interactions that mediate transient cell adhesion may have surprisingly low affinities and extremely fast dissociation rate constants.



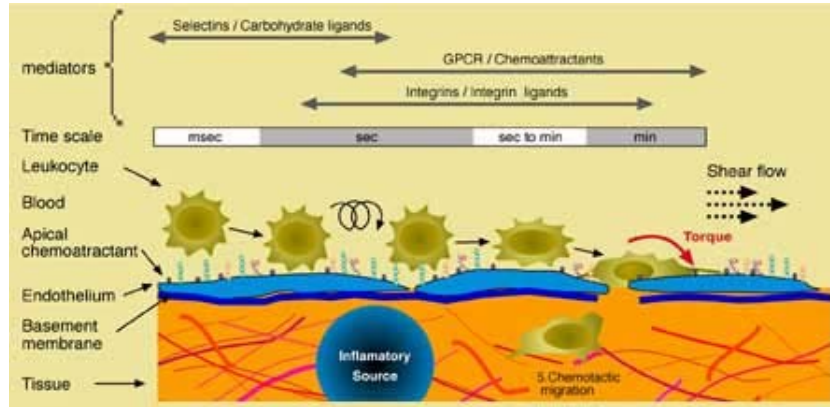
		Name	Tissue distribution	Ligand
Selectins Bind carbohydrates. Initiate leukocyte: endothelial interaction	 L-selectin	L-selectin (MEL-14, CD62L)	Naive and some memory lymphocytes, neutrophils, monocytes, macrophages, eosinophils	Sulfated sialyl Lewis ^x , GlyCAM-1, CD34, MAdCAM-1
		P-selectin (PADGEM, CD62P)	Activated endothelium and platelets	Sialyl Lewis ^x , PSGL-1
		E-selectin (ELAM-1, CD62E)	Activated endothelium	Sialyl Lewis ^x
Mucin-like vascular addressins Bind to L-selectin. Initiate leukocyte: endothelial interaction	 CD34	CD34	Endothelium	L-selectin
		GlyCAM-1	High endothelial venules	L-selectin
		MAdCAM-1	Mucosal lymphoid tissue venules	L-selectin, integrin $\alpha_4\beta_7$

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27122/figure/A211/>

Reclutamento di leucociti ai siti di infiammazione (a)



Reclutamento di leucociti ai siti di infiammazione (b)



«Homing» dei linfociti verso organi linfoidi secondari (b)

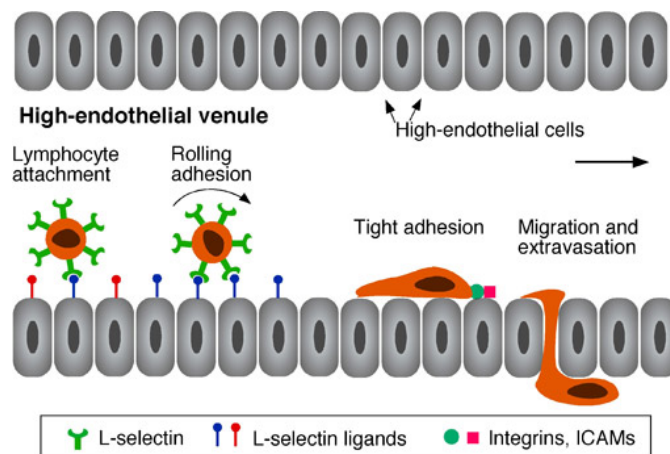
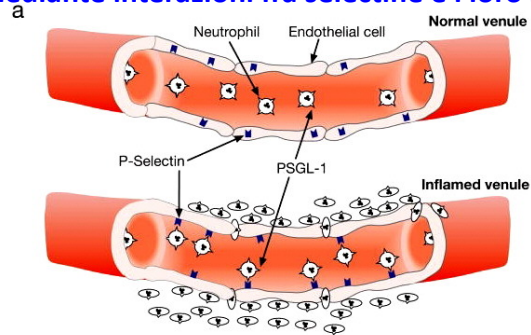


Figure 1. Lymphocyte-endothelial cell interactions in lymphocyte homing to secondary lymphoid organs

<http://www.helsinki.fi/biosciences/biochemistry/pictures/LeppanenLymphocyteUusi.jpg>

Ancoraggio dei leucociti circolanti all'endotelio attivato mediante interazioni fra selectine e i loro ligandi



(a) Nelle **venule normali** i leucociti fluiscono senza interazioni adesive con l'endotelio, ma nei **vasi infiammati**, vengono **esprese sulla superficie delle cellule endoteliali selectine e ligandi per le integrine**. Questo porta all'ancoraggio, rottolamento ("rolling"), e arresto dei leucociti circolanti e la loro finale extravasazione dalla circolazione verso il tessuto circostante. Ad esempio, la P-selettina è normalmente espressa nei **corpi di Weibel-Palade** delle **cellule endoteliali**, ma entro pochi minuti dopo l'attivazione delle cellule endoteliali mediante trombina, istamina, ipossia o danno, questi corpi si fondono con la membrana plasmatica, promuovendo l'espressione della P-selettina sulla superficie della cellula endoteliale. Allo stesso modo, la P-selettina immagazzinata nei **granuli α** delle **piastrine** viene espressa sulla superficie delle piastrine pochi minuti dopo l'attivazione piastrinica. I leucociti si ancorano e rottolano sulle cellule endoteliali attivate e le piastrine.

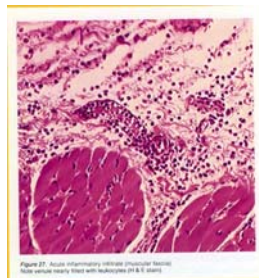
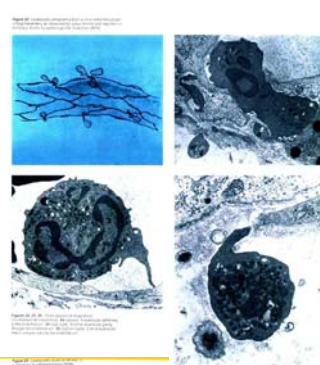


Figure 27. Acute inflammatory infiltrate (vascular lesion).
This venule nearby filled with leukocytes (H & E, 400x).

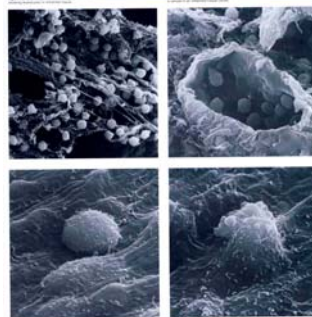


Fig. 4.14 Section of venule in acute inflammation. Showing pavementing of polymorphonuclear leukocytes. $\times 1000$.

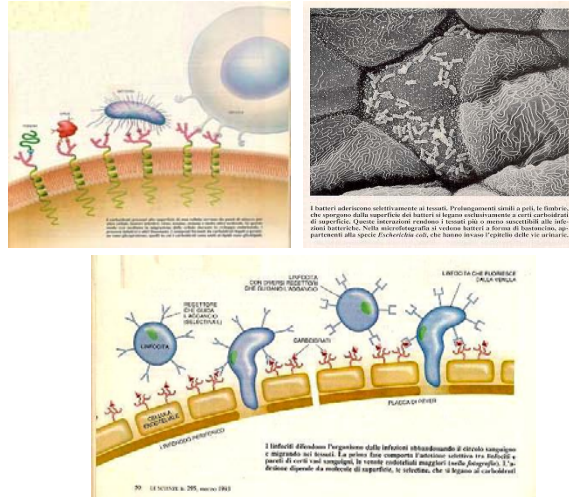


✚ **L'extravasazione dei leucociti** è un importante processo sia nei meccanismi di auto-difesa nei siti di infiammazione che nell'"homing" dei linfociti (verso gli organi linfoidi).

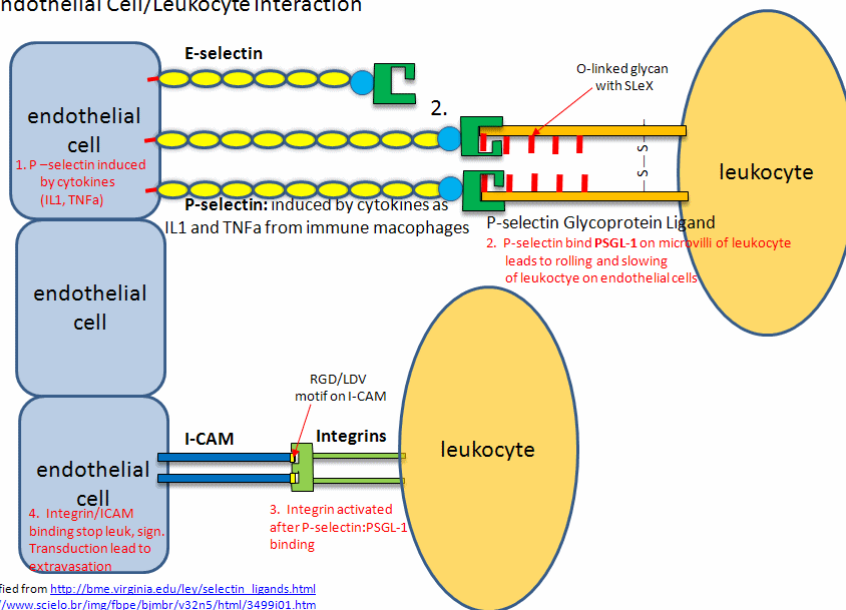
✚ E' inoltre importante come processo responsabile della patogenesi dei disturbi infiammatori.



Lo svantaggio dei carboidrati espressi sulla superficie cellulare è che le cellule che rivestono la trachea, stomaco o intestino aprono una strada che permette ai microorganismi e ai virus di invadere le cellule.

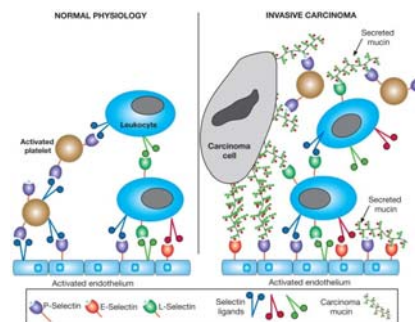


Endothelial Cell/Leukocyte Interaction



✚ Durante lo sviluppo dell'embrione del topo si osserva una notevole alterazione dell'espressione di antigeni di superficie, che sono soprattutto carboidrati. Il trattamento degli embrioni che contengono zuccheri **aptenici**, con inibitori biosintetici delle glicosiltrasferasi o con glicosidasi di processamento ha provocato l'arresto dello sviluppo in certi stadi, suggerendo che gli antigeni carboidrati sono essenziali, probabilmente a causa del loro coinvolgimento nelle interazioni cellulari. A favore di questa ipotesi, è stata identificata una molecola di tipo lectina nelle cellule dell'embrione di rana nella fase di segmentazione.

✚ Nelle cellule **tumorali** è stata osservata un'alterata glicosilazione delle proteine di superficie, che è coinvolta nei processi di **metastatizzazione**.



Selectins Facilitate Carcinoma Metastasis and Heparin Can Prevent Them

Lubor Borsig

Physiology 19:16-21, 2004. ;

