

RUOLO BIOLOGICO DELLE MOLECOLE DI ADESIONE

GALEOTTI M.

*Unità di Patologia Comparata
Dipartimento di Scienze della Produzione Animale - Università di Udine.*

INTRODUZIONE

L'adesione è l'interazione di un recettore molecolare di superficie di una cellula con un altro recettore cellulare o con un ligando immobilizzato.

L'adesione è un processo secondario che avviene dopo un riconoscimento "ben riuscito" e che successivamente comporta cambiamenti nell'espressione dei geni nella organizzazione del citoscheletro.

Le molecole di adesione sono coinvolte in importanti fenomeni biologici come l'organogenesi, l'infiammazione, l'immunità e i tumori.

Esistono dei criteri di selezione per inserire una molecola nel novero delle molecole di adesione: 1) la sequenza primaria della molecola deve essere conosciuta; 2) la molecola deve incrementare l'affinità di una cellula per un'altra cellula e/o per la matrice extracellulare; 3) l'espressione artificialmente indotta di una molecola di adesione putativa su una cellula, deve conferire un nuovo fenotipo di adesione; 4) questa nuova funzione deve essere inibita da un anticorpo specifico.

Difficoltà insorgono dal fatto che poche molecole di adesione hanno solo la funzione di incrementare l'affinità di una cellula per un'altra. Un gran numero di queste molecole ha infatti anche un ruolo nei segnali tra cellule, e diventa spesso complicato comprendere quale è la funzione prevalente di una data molecola.

La maggioranza delle molecole di adesione sono state classificate in quattro famiglie: Caderine, Integrine, Selectine e Immunoglobuline. Esistono poi molecole orfane con classificazione ancora incerta.

FAMIGLIA DELLE CADERINE

Le caderine sono proteine di membrana presenti sulla superficie cellulare, che mediano l'adesione Ca-dipendente cellula-cellula in una grande varietà di tessuti e di specie. Le caderine classiche sono un gruppo di proteine integrali di membrana, che si è ben conservato nell'evoluzione delle specie. Nell'uomo ne sono state identificate 11 (tutte caratterizzate da un alto grado di omologia a livello amminoacidico). Sono state identificate anche in molti mammiferi, negli uccelli, negli anfibi e negli insetti. Una stessa caderina può indifferentemente fungere da ligando e da recettore (adesione omotipica), oppure una caderina può comportarsi da ligando per una diversa caderina che ne diventa il recettore (adesione eterotipica).

Da un punto di vista funzionale le caderine: a) mediano l'adesione omotipica o eterotipica cellula-cellula; b) agiscono come recettore e ligando; c) sono responsabili dell'adesione selettiva tra cellule e dello "smistamento" cellulare; d)

rivestono un ruolo fondamentale nel mantenimento dell'integrità di strutture multicellulari.

La loro espressione varia considerevolmente durante lo sviluppo e questo è sicuramente alla base dei fenomeni di migrazione delle cellule embrionali. Molti tipi cellulari esprimono molte subclasse di caderine contemporaneamente, tanto che si suppone che le proprietà adesive di singole cellule siano governate da una varia combinazione di caderine; inoltre sono coinvolte nell'invasione e nella metastatizzazione neoplastica. Esempi che giocano a favore di questo sono la prova che una aumentata espressione di caderine rende una cellula neoplastica meno invasiva, mentre la ridotta espressione o la perdita di attività delle caderine (per alterazione nella struttura) le rende più invasive. Alto potenziale invasivo e alta capacità di dare metastasi sono proprie anche di quei tumori poco differenziati con bassa espressione di caderine. Ancora, una espressione instabile di caderine oppure una aberrante attività di queste è spesso associata a un forte potenziale metastatico della neoplasia. E' peraltro vero che la perdita completa delle caderine sulla superficie cellulare non è sufficiente per rendere le cellule invasive.

FAMIGLIA DELLE INTEGRINE

Le integrine sono glicoproteine intramembranarie eterodimeriche espresse su diversi tipi cellulari, considerate i maggiori recettori per la matrice extracellulare ed importanti molecole di adesione tra cellula e cellula

Dal punto di vista strutturale consistono di due subunità non covalentemente associate: a e b . Esistono 12 differenti subunità a e 8 subunità b . Subunità individuali a sono associate con più di un tipo di subunità b .

Si suddividono in 3 subfamiglie:

Integrine b 1 o proteine VLA

Integrine b 2 o leucams

Integrine b 3 o citoadesine

Le subunità b mostrano tutte una forte omologia, quasi del 50%, nella composizione aminoacidica. Le subunità a mostrano scarsa omologia nella sequenza aminoacidica, la porzione N-terminale contiene 3 o 4 siti di legame cationici.

Come molecole di adesione, le integrine rivestono un ruolo importante in numerosi processi biologici, quali: 1) migrazione dei tessuti durante l'embriogenesi; 2) infiammazione; 3) funzione immune; 4) riparazione delle ferite; 5) metastasi tumorale; 6) aggregazione piastrinica. Le integrine si legano con una vasta gamma di proteine della matrice extracellulare, tra le quali la laminina, il collagene, la trombospondina e la vitronectina. Si legano, inoltre, in maniera selettiva ai membri della superfamiglia delle Immunoglobuline: ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, VCAM-1.

FAMIGLIA DELLE SELECTINE

La sequenza proteica di queste molecole è stata ottenuta solo nel 1989.

Dal punto di vista strutturale sono costituite da 3 tipi di domini:

1° una parte N-terminale, costituita da una lectina Ca dipendente;

2° un dominio simile all' "epidermal growth factor" (EGF);

3° domini ripetuti di "complement regulatory proteins" (CRP).

Le selectine conosciute sono 3 (tab. 1). La forte omologia esistente fra le tre selectine, suggerisce un'origine da un gene ancestrale comune con successive diversificazioni dell' exone.

Tab. 1. Classificazione delle selectine conosciute

Selectin	- Earlier	- Expressed by	- target cell
L-selectin	MEL-14, LAM-1, LEU-8, TQ1, LECAM-1 DREG.56 CD62	PMNs, monocytes, lymphocyte subset, malignant leukocytes	High EC venules of lymph nodes, activated systemic ECs, MECA-79
E-selectin	ELAM-1 LECAM-2 CD62E	Cytokine- activated endothel	Sialyl- Lewis A. PMNs, monocytes, lymphocyte subset
P-selectin	GMP-140, PADGEM LECAM-3 CD62P	Rapidly- activated ECs, platelets megakaryoc.	Sialylated lactosamino- glycans, PMNs, monocytes, lymphocyte subset

E' ormai chiaro il loro coinvolgimento nella risposta infiammatoria, tanto da indicarle come probabili nuovi "target" terapeutici. Sono coinvolte nella fase precoce della cascata di eventi che portano alla fuoriuscita dei leucociti dai vasi (Fig. 2). Alle selectine è legato il fenomeno del "rolling", letteralmente il rotolamento dei leucociti sull'endotelio attivato. Il "rolling" richiede una interazione tra un recettore endoteliale e un contro-recettore sul leucocita in movimento. Questa interazione deve rompersi rapidamente e il ciclo ripetersi, altrettanto rapidamente. La struttura delle selectine garantisce queste rapide interazioni. La presenza di segmenti ripetuti conferisce alto grado di flessibilità alla molecola. Il residuo lectinico permette il legame a molecole di carboidrati presenti sulle cellule endoteliali. I ligandi carboidratici sono presenti in catene flessibili, questo permette alle selectine e ai ligandi carboidratici di adattarsi rapidamente alla nuova posizione assunta dalla cellula.

L'espressione sequenziale di P-selectina e di E-selectina consente l'inizio della cascata dell'adesione. P-Selectina, conservata nei corpi di Weibel-Palade, è rapidamente espressa in superficie (Fig.2). E-Selectina (ELAM-1) è una molecola inducibile sulla superficie endoteliale (Bevilacqua; Science, 1989), media l'adesione di neutrofilo e di cellule T (CD4+ resting) (Shimizu; Nature, 1991).

SUPERFAMIGLIA DELLE IMMUNOGLOBULINE (IgSF)

Il concetto di IgSF è stato proposto nel 1982, da allora comprende oltre 70 membri. Il ruolo fondamentale di queste molecole è il controllo del

comportamento cellulare. Tale controllo è esercitato da molecole che agiscono come recettori, traducendo un segnale, o come molecole di adesione intercellulare, o in entrambi i modi. Molti dei membri della IgSF sono presenti sulla superficie cellulare anche se esistono isoforme solubili. La superfamiglia si divide in due gruppi maggiori:

- 1) un gruppo è specializzato per il riconoscimento specifico dell' antigene. Fra i suoi membri il BCR (immunoglobuline), il TCR e gli antigeni MHC.
- 2) l' altro gruppo include strutture di riconoscimento della superficie cellulare che non sono antigene-specifiche:

<i>IgSF</i>	<i>ligandi</i>
LFA-2 (CD2)	LFA-3 (CD58)
CD4	MHC class II
CD8	MHC class I
ICAM-1 (CD54)	LFA-1, MAC-1, CD43
ICAM-2	LFA-1
ICAM-3	LFA-1
LFA-3 (CD58)	CD2
VCAM-1 (CD106)	VLA-4 (Integrina alfa4-B1)
PECAM-1 (CD31)	PECAM-1 (altro?)
NCAM (CD56)	NCAM, eparan solfato,

eparina.

Vengono di seguito riportate in modo schematico le caratteristiche di due tra le più importanti molecole di adesione della IgSF.

ICAM-1 (CD54)

Distribuzione cellulare : Normalmente è espressa in discreta quantità su un limitato numero di cellule come monociti, granulociti e cell. endoteliali. Può essere indotta o “up” regolata su molte cellule B, T, timociti, cell. dendritiche, cell. endoteliali, fibroblasti, cheratinociti, condrociti e cell. epiteliali.

Funzione : E' fondamentale nella regolazione della risposta immune e infiammatoria. Media l' adesione delle cell. T con le APCs o con cell. target. E' coinvolta nell' adesione cell. T/T e cell. T/B. Il legame con ICAM- 1 ha effetto costimolatore sull' attivazione cell. T. E' importante nell' adesione di monociti, linfociti e neutrofili all' endotelio attivato. L' espressione dell' ICAM- 1 è implicata nel processo metastatico.

VCAM-1 (CD106)

- *Distribuzione cellulare* : cellule endoteliali attivate, macrofagi tissutali, cellule dendritiche, fibroblasti del midollo osseo, mioblasti.

- *Funzioni* : Coinvolta nell' adesione di linfociti, monociti ed eosinofili su endoteli attivati. Reclutamento dei leucociti nel sito infiammatorio. Coinvolta nell' interazione di linfociti e cell. dendritiche. Media l' adesione delle cellule mielomatose alle cell. endoteliali, è quindi coinvolta nel processo metastatico.

- *Regolazione dell' espressione* : E' indotta da IL1, IL4, TNFalfa, IFNgamma.

- *Ligandi* : Integrina alfa4/beta1 (VLA-4), integrina alfa4/beta7, entrambe linfocitarie.

Anticorpi anti-VCAM-1 inibiscono l' adesione dei linfociti T a cellule endoteliali TNF-stimolate.

HOMING LINFOCITARIO

Nella Fig. 1 vengono schematicamente rappresentate le varie tappe che caratterizzano il fenomeno definito "homing" linfocitario, con il coinvolgimento delle varie molecole di adesione che di volta in volta lo regolano.

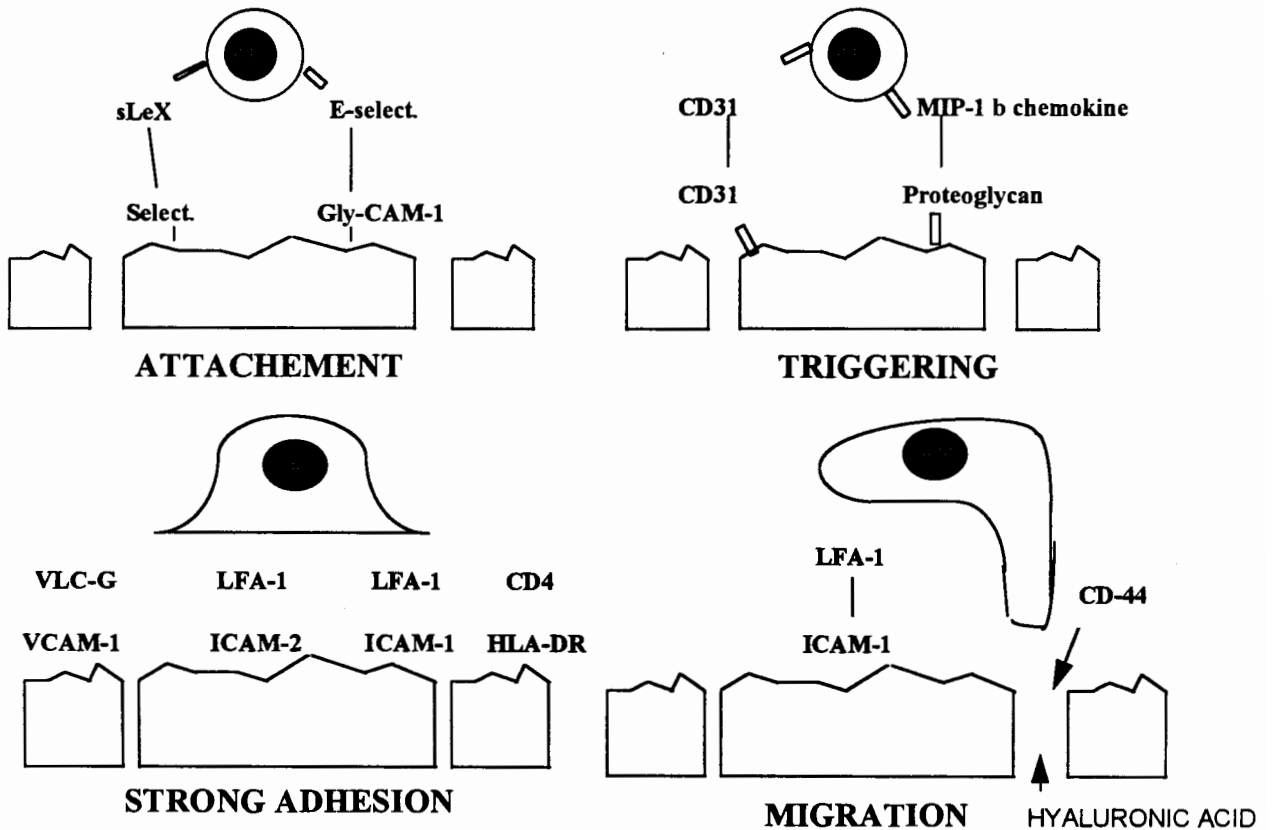


fig. 1. Le varie tappe che regolano l' homing linfocitario

ADESIONE DEI GRANULOCITI

Le varie tappe che regolano l'adesione dei granulociti ad un endotelio soggetto ad infiammazione sono riportate schematicamente nella Fig. 2.

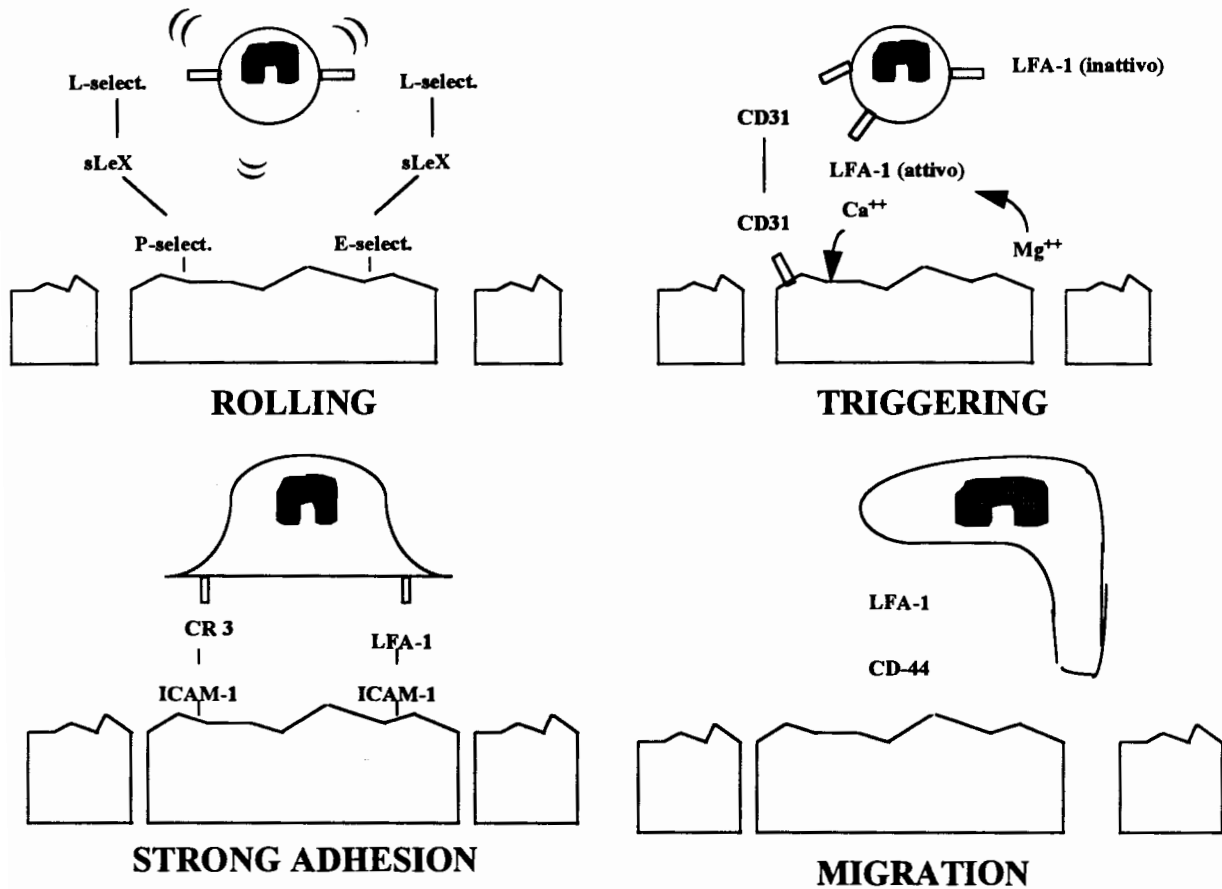


Fig. 1. Le varie tappe che regolano l'adesione dei granulociti ad un endotelio soggetto ad un processo infiammatorio

ESPRESSIONE DI MOLECOLE DI ADESIONE IN CELLULE ED ENDOTELI DI TESSUTI NORMALI E SOGGETTI AD INFIAMMAZIONE NEL BOVINO, CANE E GATTO

L'identificazione di molecole di adesione nei tessuti di animali è limitata dallo scarso numero di anticorpi specifici esistenti. Nella letteratura sono, infatti, pochi i lavori sulla preparazione di anticorpi contro molecole di adesione di specie animali che non siano il topo o il ratto. Altresì sono disponibili molti anticorpi verso molecole di adesione dell'uomo. In questa indagine preliminare sono stati scelti alcuni anticorpi monoclonali, gentilmente messi a disposizione da due ditte (Immunotech, S.A., Delta Biologicals Roma; Sambio-Monosan, S.p.A. - BIO DIVISION, Milano), per tentare di identificare molecole di adesione in tessuti di bovino, cane e gatto. Gli anticorpi utilizzati sono rispettivamente l'anti-ICAM-1 (84H10), VCAM-1 (1G11) della Immunotech, e l'anti-ICAM-1 (MEM111), E-selectina (ENA1), Endogлина (PN-E2), E-caderina (6F9), della Sambio-Monosan. E' stato inoltre utilizzato un anticorpo monoclonale anti-MHC Classe II DR della VMRD di Washington (USA). Tutti gli anticorpi sono stati utilizzati

su tessuti congelati, mediante una tecnica immunocitochimica classica, che prevede in breve: preincubazione, incubazione dell'ab. primario per 2 h, anticorpo secondario biotinato, complesso biotina-avidina-fosfatasi, cromogeno con evidenziazione in rosso dell'avvenuta reazione. Le prove effettuate sullo stesso materiale, fissato in formalina, non hanno fornito nessuna positività. I risultati ottenuti sono riportati nella tabelle 2 e 3.

Tab. 2. Identificazione di molecole di adesione e m.a. accessorie in cellule ed endoteli linfonodali

mAbs	VENULE / ARTERIOLE	HEV	LINFOCITI	MACROFAGI	IDC
ICAM-1 (I)	(-) b (cute)	(-) b	(-)	(-)	(-)
VCAM - 1 (I)	(-) b (mil.) (+) c	+ c	+ c (alcuni)	n.t.	n.t.
E- SELECT. (S)	(-) b + c (-) g	(-) b + c (-) g	(-) b ++/+++ c (num.) (-) g	(-) b n.t. c n.t. g	(-) b ++/+++ c n.t. g
ENDOGL (S)	(-) c (+) g	(-) b (+) g	(-) c (-)g	(-) c (-) g	(-) c (-) g
MHCII DR (VMRD)	+b (-) c	+b (-) c	++b + c	+++b n.t.	+++ b +++ c n.t.g

I = Immunotech; S = Sambio-Monosan; VMRD = Veterinary Medical Research Development; b = cane; g = gatto; n.t. = non testato; (-) = negativo; (+) = incostante; + = debole; ++ = media; +++ = forte positività

Tab. 3. Identificazione di molecole di adesione e m. a. accessorie in cellule ed endoteli reattivi e in tessuti flogistici

mAbs	VENULE / ARTERIOLE	HEV	LINFOCITI	MACROFAGI
ICAM-1 (I)	(-) b	(+) b (-) g	++ b (scarsi) (-) g	++ b
VCAM - 1 (I)	(-) b (+) c (cute) (+) g (cute)	(-) b (-) c (-) g	(-) b (-) c + g ?	(-) b (-) c + g ?
E- SELECT. (S)	+ c (cute) (+) g (cute)	- (-) g	(-) g	(+) g ?
ENDOGL (S)	(-) c ++/+++ g	(-) c N.T. g	n.t. c (-) g	N.V. c (-) g
MHCII DR (VMRD)	++ b (-) g (-) c + b (cute)	++ b (-) c (-) g	+++ b ++ c + g	+++ b (cute) +++ b (+) g

I = Immunotech; S = Sambio-Monosan; VMRD = Veterinary Medical Research Development; b = c = cane; g = gatto; n.t. = non testato; (-) = negativo; (+) = incostante; + = debole; ++ = media; +++ = forte positività

Da questa esperienza preliminare si evince che utilizzando l'anti ICAM-1 l'evidenziazione della molecola è molto scarsa in tutte e tre le specie, tranne che per i linfociti di bovino, così come per l'anti VCAM-1 dove solo nel gatto si osserva una debole positività linfocitaria e macrofagica. Con l'anti-E-selectina si riesce ad evidenziare positività soltanto nel cane, sia a livello endoteliale, ma soprattutto di linfociti e di cellule IDC linfonodali. Il monoclonale anti-Endoglina marker di attivazione endoteliale, manifesta forte positività per le strutture endoteliali del gatto, con un forte incremento della reazione negli endoteli di venule ed arteriole di tessuti flogistici. L'antiMHC di Classe II evidenzia forte espressione della molecola negli endoteli di bovino, come riportato in un precedente lavoro (Galeotti et al., 1993), e assenza di reazione nelle strutture endoteliali del cane e del gatto.

ESPRESSIONE DI MOLECOLE DI ADESIONE NELLE NEOPLASIE MAMMARIE DEI CARNIVORI DOMESTICI

L'espressione di molecole di adesione è evento cruciale nel processo di trasformazione neoplastica nell'uomo, nell'invasione dei tessuti circostanti da parte delle cellule tumorali e nella metastatizzazione. La cascata metastatica è un processo multiplo, che coinvolge l'attacco di cellule tumorali all'endotelio

vascolare, seguito dalla retrazione o distruzione delle cellule endoteliali e dalla migrazione delle cellule tumorali dentro la matrice subendoteliale. Per molti aspetti questo processo è equivalente alla fuoriuscita di leucociti nel sito infiammatorio. E' stato dimostrato che cellule metastatiche mostrano preferenza nell'adesione alle cellule endoteliali di alcuni organi, suggerendo che il riconoscimento cellula neoplastica/cellula endoteliale possa giocare un ruolo importante nella formazione di metastasi in siti specifici. Fra le molte molecole di adesione coinvolte nel processo neoplastico, l'espressione di ICAM-1 sulle cellule tumorali è stata correlata con un aumento di rischio di progressione del tumore e con la formazione di metastasi. Alcuni tumori dell'uomo, come il melanoma e l'osteosarcoma, usano la VCAM-1 per l'adesione alle cellule endoteliali, mentre le cellule metastatiche del cancro del colon effettuano l'adesione mediante le selectine.

Appare di estremo interesse lo studio dell'espressione delle molecole di adesione anche nelle neoplasie animali, con il duplice aspetto di indagine comparativa per l'uomo, e di individuazione di markers di validità prognostica.

Vengono qui riportati i dati preliminari ottenuti da una indagine effettuata per valutare la possibilità di identificare molecole di adesione nelle neoplasie del cane e del gatto, utilizzando anticorpi specifici per l'uomo. Gli anticorpi utilizzati sono quelli riportati nel paragrafo precedente, le modalità di esecuzione delle prove e di conservazione dei tessuti sono le stesse. Nella tabella 4 sono riportati i dati ottenuti per le neoplasie mammarie e per il carcinoma squamoso della cute del gatto, mentre nella tabella 5 sono riportati i dati riguardanti la mammella normale e le neoplasie mammarie del cane.

Tab. 4. Espressione di molecole di adesione nelle neoplasie mammarie e nel carcinoma squamoso della cute del gatto

	CELL. CARCINOM.	TESS. CONN. INTERSTIZ.	MACR. E LINF. INF.	VASI
ICAM-1 (I)	(-) m.c.m (-) c.m	(+)/+	(-) c.s.c.	(-) c.s.c.
VCAM - 1 (I)	(-) m.c.m (-) c.m	(-)	+ c.s.c.	(+) c.s.c. (+) m.c.m.
E- SELEC. (S)	(-) m.c.m (-) c.m	(-) m.c.m (-) c.m	(+) c.m. + c.s.c.	(-) HEV c.s.c. (+) picc. vasi c.s.c. (-) c.m.
ENDOGL. (S)	(-)	(-)	(-)	++/+++ c.s.c ++/+++ m.c.m.
MHCII DR (VMRD)	(-) m.c.m. (-) c.s.c. (-) c.m.	(-) m.c.m. (++) c.m.	N.T.	N.T.

c.m. = carc. mammario; c.s.c. = carc. squamoso cute; m.c.m. = metastasi carc.

I = Immunotech; S = Sambio-Monosan; VMRD = Veterinary Medical Research

Tab. 5. Espressione di molecole di adesione nella mammella normale e nelle neoplasie mammarie del cane

	ALVEOLI E DOTTI	IPERPLASIA LOBULARE	CELL. CARCINOM.	CELL. MIOEPITEL.	TESS. CONNET. INTERSTIZ.	MACROFAGI E LINFOCITI	VASI
ICAM-1 (I)	(-)	(+)+	(-)	(-)	++	(-)	(-)
ICAM-1 (S)	N.T.	N.T.	(-)	(-)	+++	(-)	(-)
VCAM - 1 (I)	(-)	(+)+	+ (?)	(+)	+	+ (?)	(+)
E- SELECT. (S)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)+
ENDOGL. (S)	N.T.	N.T.	(-)	(-)	(-)	N.V.	(-)
E-CAD. (S)	(-)	(-)	(-)/(+)	(-)	(+)/(?)	(-)	(-)
MHC II DR (VMRD)	(+)+	(+)+	(-)/(+)	+ / ++	+++ / +++	++	(-)

I = Immunotech; S = Sambio-Monosan; VMRD = Veterinary Medical Research

Nel gatto gli anticorpi testati non mostrano alcuna positività, se si eccettua una debole reazione della VCAM-1 per gli endoteli vasali, e una forte positività dell'anticorpo anti-endoglina per gli endoteli dei piccoli vasi del carcinoma squamoso della cute e per quelli contenuti nelle metastasi di carcinoma mammario nel linfonodo. Nel cane si ha una discreta espressione di ICAM-1 a livello di tessuto connettivo interstiziale delle neoplasie. L'espressione della VCAM-1 sembra essere incostante un po' a tutti i livelli della neoplasia, mentre si apprezza una positività costante della E-selectina per gli endoteli. Interessante il dato che scaturisce con il monoclonale anti-MHC di Classe II (DR): colora debolmente, ma in modo costante, gli alveoli e i dotti della mammella normale e in modo più incostante i lobuli iperplastici, non colora le cellule carcinomatose dei vari tipi di neoplasia. Colora in modo marcato le cellule del connettivo interstiziale. Inoltre fornisce reazione positiva anche per le cellule mioepitaliali, anche se in modo più debole rispetto al connettivo, e per le numerose cellule macrofagiche (IDC) e alcuni linfociti nel contesto della neoplasia.

I dati ottenuti per l'MHC di Classe II, anche se preliminari, sono raffrontabili con quelli ottenuti nel carcinoma mammario della donna. I dati che si ottengono dall'uso degli altri anticorpi sembrerebbero indicare una generale scarsa cross-reattività per le molecole di adesione delle specie testate. Fanno eccezione il monoclonale per la E-selectina che fornisce una discreta positività nel cane, e quello per la Endoglina che evidenzia una forte espressione della molecola nel gatto.

Questi dati, assieme a molti altri presenti nella letteratura, avvallano l'utilizzo di anticorpi specifici per l'uomo nello studio dell'espressione delle molecole di adesione nei vari processi patologici degli animali domestici ed esortano nella prosecuzione delle indagini in un settore di così grande interesse per la patologia comparata.