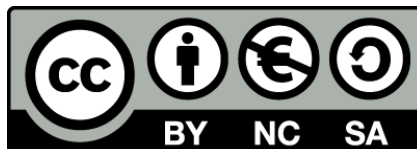




UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Contribució de la P-selectina en els processos inflamatoris

Anna Massaguer i Vall-Ilovera



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència Reconeixement- NoComercial – Compartir Igual 4.0. Espanya de Creative Commons.

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia Reconocimiento - NoComercial – Compartir Igual 4.0. España de Creative Commons.

This doctoral thesis is licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0. Spain License.



UNIVERSITAT DE BARCELONA



DEPARTAMENT DE BIOLOGIA CEL·LULAR I ANATOMIA PATOLÒGICA  
FACULTAT DE MEDICINA  
UNIVERSITAT DE BARCELONA

## CONTRIBUCIÓ DE LA P-SELECTINA EN ELS PROCESSOS INFLAMATORIS

Memòria presentada per  
**Anna Massaguer i Vall-Ilovera**  
per optar al grau de  
**Doctora en Farmàcia**

DIRECTORA

TUTOR

**Dra. M<sup>a</sup> Pilar Pizcueta Lanza**

**Dr. Carles Enrich Bastus**

Barcelona, març de 2003

# ÍNDIX

	Pàgina
1. Introducció.....	1
1.1. Molècules d'adhesió.....	2
1.1.1. Molècules d'adhesió implicades en la inflamació..	5
1.1.1.1. Família de les selectines.....	6
1.1.1.2. Família de les integrines.....	9
1.1.1.3. Superfamília de les immunoglobulines.....	10
1.2. P-selectina.....	13
1.2.1. Estructura.....	13
1.2.2. Expressió de la P-selectina.....	16
1.2.3. Lligants de la P-selectina.....	19
1.2.3.1. Lligant glicoproteic per a la P-selectina-1.....	21
1.2.3.2. CD24.....	23
1.2.3.3. Glicoproteïna Ib $\alpha$ .....	24
1.2.4. Funcions de la P-selectina.....	24
1.2.5. P-selectina com a receptor de senyalització.....	27
1.2.6. P-selectina soluble.....	29
1.2.7. P-selectina en diferents patologies.....	30
2. Justificació de la tesi.....	35
2.1. Justificació general.....	36
2.2. Justificació de l'article n <sup>o</sup> 1.....	37
2.3. Justificació de l'article n <sup>o</sup> 2.....	39
2.4. Justificació de l'article n <sup>o</sup> 3.....	40
3. Objectius.....	42
4. Articles originals.....	44
4.1. Article n <sup>o</sup> 1.....	45
4.1.1. Resum de l'article n <sup>o</sup> 1.....	46
4.1.2. Article n <sup>o</sup> 2.....	47
4.2.1. Resum de l'article n <sup>o</sup> 2.....	48
4.3. Article n <sup>o</sup> 3.....	49
4.3.1. Resum de l'article n <sup>o</sup> 3.....	50

5. Discussió.....	51
5.1. Producció d'anticossos monoclonals contra epítops conservats de la P-selectina.....	52
5.2. Caracterització de l'expressió de la P-selectina porcina en plaquetes i de la seva forma soluble.....	58
5.3. El dany hepàtic induït per Concanavalina A està severament disminuït en ratolins deficientes en P-selectina..	61
6. Conclusions.....	67
7. Bibliografia.....	70

# 1. INTRODUCCIÓ

## 1.1. MOLÈCULES D'ADHESIÓ

L'adhesió entre cèl·lules o entre cèl·lules i la matriu extracel·lular té un paper crucial en múltiples processos de gran importància biològica com el desenvolupament embrionari, la morfogènesi d'òrgans, l'angiogènesi, les respostes inflamatòries i immunològiques, la cicatrització de ferides i la coagulació sanguínia<sup>1</sup>. Aquesta adhesió està regulada per la expressió i activació coordinada de diferents receptors de la superfície cel·lular, coneguts com a molècules d'adhesió, que són responsables de l'especificitat i del control d'aquestes interaccions.

En el cas de les respostes inflamatòries i immunològiques, perquè aquestes siguin efectives és necessari que hi hagi una recirculació continua dels limfòcits a través del torrent sanguini i dels vasos limfàtics, i entre els teixits limfoides secundaris, on reconeixen els antígens estranys i s'activen, i una extravassació dels leucòcits, tant limfòcits, monòcits com granulòcits, dels vasos sanguinis cap als teixits perifèrics infectats o lesionats. Aquests processos depenen de la interacció entre els leucòcits i les cèl·lules de l'endoteli vascular i dels leucòcits amb components de la matriu extravascular i estan regulats per les molècules d'adhesió.

La migració cap el focus inflamatori és un procés dinàmic que es produeix principalment a les vècules postcapilars. Es desenvolupa en una seqüència temporal de tres etapes: "rolling", adhesió i diapèdesi, que estan controlada per molècules d'adhesió diferents<sup>2:3:4</sup>(Figura 1).

1. ROLLING: L'estímul pro-inflamatori indueix l'alliberament de factors vasoactius, que provoquen una dilatació de les vècules amb la conseqüent reducció en la velocitat del flux sanguini. Paral·lelament, es generen mediadors de la inflamació, com la histamina, radicals oxigen, leucotriens i citoquines, que indueixen l'expressió de selectines a les

cèl·lules endotelials activades (P- i E-selectina). La interacció de les selectines amb els seus lligants fa possible la unió inicial dels leucòcits circulants a l'endoteli vascular activat<sup>5</sup>. Aquesta interacció és làbil i reversible, i sota la força del flux sanguini, es trenca la unió selectina-lligant, que torna a formar-se ràpidament a mesura que els leucòcits tornen a desplaçar-se sobre l'endoteli. El resultat és un moviment de rodament o "rolling" dels leucòcits sobre la paret endotelial.

2. ADHESIÓ: A mesura que es desplacen, els leucòcits es van activant per les quimioquines que són sintetitzades tant per les cèl·lules endotelials com pels leucòcits presents ja als teixits perivasculars. S'incrementa l'afinitat de les integrines expressades a la seva membrana per unir-se als seus lligants, molècules membres de la superfamília de les immunoglobulines, que es troben expressades a la membrana de les cèl·lules endotelials. L'expressió dels membres de la superfamília de les immunoglobulines també s'indueix o s'incrementa amb l'activació de l'endoteli per mediadors inflamatoris com les quimioquines i les citoquines. La interacció entre les integrines i els membres de la superfamília de les immunoglobulines és forta i estable i com a conseqüència els leucòcits queden fermament adherits a la superfície de les cèl·lules endotelials<sup>6</sup>.

3. DIAPÈDESI: A continuació, es produeix la transmigració o diapèdesi dels leucòcits a través de l'endoteli vascular. Els leucòcits adherits canvien de forma i s'estenen sobre l'endoteli, mitjançant la interacció de integrines activades amb el citoesquelet cel·lular. L'endoteli vascular participa activament en aquest procés, generant senyals que activen la transmigració dels leucòcits i modulant l'estructura de les zones d'unió entre les cèl·lules endotelials, de manera que s'originen de forats per on poden transmigrar els leucòcits. En aquest procés hi participen molècules localitzades a les zones d'unió cel·lular interendotelial com PECAM-1 (CD31), VE-cadherina, JAM-1, ocluidina i CD99, tot i que la seva funció no està encara ben definida<sup>7</sup>.

Una vegada dins del teixit, els leucòcits es desplacen utilitzant les seves integrines per l'interior de la matriu de fibrina i fibronectina que es forma a partir del plasma extravassat. La migració extravascular està dirigida per gradients de quimioquines generats per leucòcits presents al lloc d'inflamació.

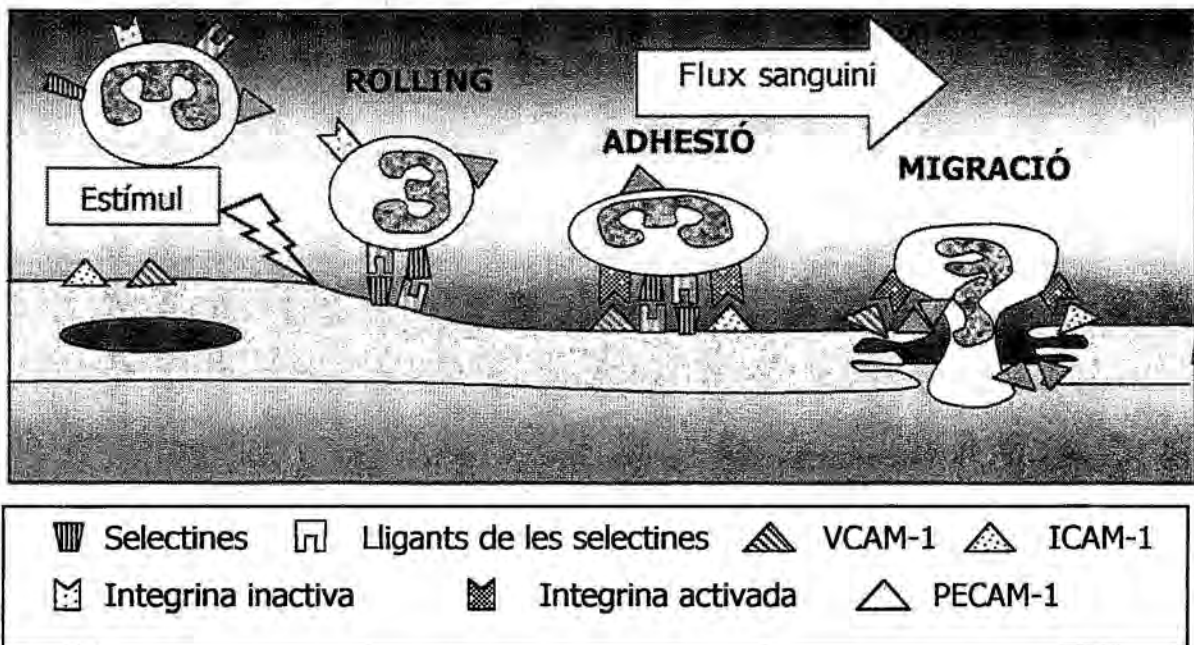


Figura 1. Esquema de les diferents fases del reclutament dels leucòcits en la resposta inflamatòria. En condicions normals, els leucòcits i les cèl·lules endotelials no interaccionen. L'estímul inflamatori indueix l'expressió de les selectines i es produeix el "rolling" dels leucòcits sobre la paret vascular. Els leucòcits activats s'uneixen a través de les integrines a membres de la família de les immunoglobulines (ICAM-1 i VCAM-1), i els leucòcits queden fermament adherits a les cèl·lules endotelials. Seguidament es produeix la migració transendotelial mitjançada per membres de la superfamília de les immunoglobulines com PECAM-1. (Figura adaptada de Kriegelstein CF et al., Am J Hypertens 2001;14:44S-54S)

La resposta inflamatòria és un mecanisme de defensa de l'organisme front infeccions o dany tissular. Normalment es limita a les zones dels teixits infectades o lesionades, i produeix un dany mínim a la paret vascular i els teixits adjacents. Però si la resposta inflamatòria escapa dels mecanismes de control, es pot produir una migració i activació excessiva de leucòcits en les zones extravasculares que pot generar



diferents graus de lesió cel·lular, dany o destrucció de teixits i la disfunció dels òrgans. Aleshores, la resposta inflamatòria per ella mateixa pot esdevenir un problema clínic, com seria en el cas de les malalties autoimmunes, l'aterosclerosi, isquemia-reperfusió, dany pulmonar agut, artritis reumatoide, asma, psoriasi i rebuig de trasplantaments d'òrgans. En tots aquests processos hi participen les molècules d'adhesió.

### 1.1.1 Molècules d'adhesió implicades en la inflamació

Les molècules d'adhesió que participen en la resposta inflamatòria s'agrupen en 3 famílies: Selectines, integrines i superfamília de les Immunoglobulines (Taula 1).

#### 1.1.1.1. Família de les selectines

La família de les selectines està formada per 3 glicoproteïnes transmembrana que es troben expressades en leucòcits (CD62L o L-selectina), cèl·lules endotelials activades (CD62P o P-selectina, CD62E o E-selectina) i plaquetes activades (CD62P o P-selectina)<sup>8</sup>. Són proteïnes tipus lectina, en les que la unió al lligant és depenent de calci. Les selectines interaccionen amb estructures formades per carbohidrats, principalment les formes sialilades i fucosilades de tetrasacàrids Lewis<sup>x</sup> (CD15) i Lewis<sup>a</sup>, units a proteïnes<sup>9</sup>.

La P-selectina està emmagatzemada en grànuls específics en plaquetes ( $\alpha$ -granuls) i cèl·lules endotelials (Weibel-Palade bodies) d'on és ràpidament mobilitzada a la membrana cel·lular sota l'acció dels mediadors inflamatoris com trombina, histamina, esters de forbol, ionofors de calci, i leucotriè C4. L'expressió de P-selectina també pot ser induïda a nivell transcripcional per diferents mediadors com LPS, citoquines com TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-4, radicals oxigen i oncostatina M, expressant-se a la membrana cel·lular hores després de l'estímul<sup>10;11</sup>.

Taula 1. Principals molècules d'adhesió que participen en la inflamació

Molècula d'adhesió	Nomenclatura	Localització	Lligant	Funció
<b>Família de les Selectines</b>				
L-selectina	CD62L LAM-1	Leucòcits	GlyCAM, CD34 MAdCAM-1	<i>Rolling</i>
P-selectina	CD62P PADGEM GMP-140	Cèl. endotelials i plaquetes	PSGL-1 CD24	<i>Rolling</i>
E-selectina	CD62E ELAM-1	Cèl. endotelials	ESL-1 PSGL-1 (CLA)	<i>Rolling</i>
<b>Família de les Integrines</b>				
CD11a/CD18	LFA-1 $\alpha_L\beta_2$	Leucòcits	ICAM-1 ICAM-2 ICAM-3	Adhesió /migració
CD11b/CD18	Mac-1 $\alpha_M\beta_2$	Granulòcits i monòcits	ICAM-1 iC3b; Fb	Adhesió /migració
CD11c/CD18	p150,95 $\alpha_X\beta_2$	Granulòcits i monòcits	iC3b; Fb	Adhesió /migració?
CD49d/CD29	VLA-4 $\alpha_4\beta_1$	Limfòcits, monòcits, eosinòfils i basòfils	VCAM-1 Molècules matriu extracel·lular	Adhesió
CD49d/ $\beta_7$	$\alpha_4\beta_7$	Limfòcits	VCAM-1, MAdCAM-1 Fibronectina	Adhesió
CD41/CD61	$\alpha_{IIb}\beta_3$ gpIIb/IIIa	Plaquetes	Von Willebrand factor, Fb, fibronectina	Adhesió Agregació palquetària
<b>Superfamília de les Immunoglobulines</b>				
ICAM-1	CD54a	Endoteli i leucòcits	CD11a/CD18 CD11b/CD18	Adhesió /migració
ICAM-2	CD102	Endoteli i leucòcits	CD11a/CD18 CD11b/CD18	Adhesió /migració
ICAM-3	CD50	Leucòcits	CD11a/CD18	Adhesió /migració
VCAM-1	CD106	Endoteli	CD49/CD29	Adhesió /Rolling
PECAM-1	CD31	Endoteli, leucòcits i plaquetes	PECAM-1	Adhesió /migració
MadCAM-1		Endoteli (intestí)	L-selectina CD49d/ $\beta_7$	Adhesió /migració

CAM = cell adhesion molecule; CLA = cutaneous lymphocyte antigen; (E)LAM = (endothelial) leukocyte adhesion molecule; ESL = E-selectin ligand; GMP = granule membrane protein; ICAM = intercellular CAM; LECAM = lymphocyte-endothelial CAM; LFA = lymphocyte function-associated antigen; MAdCAM = mucosal addressin CAM; PADGEM = platelet activation-dependent granule external membrane protein; PECAM = platelet endothelial CAM; PSGL = P-selectin glycoprotein ligand; VCAM = vascular endothelial CAM; VLA = very late antigen; Fb = Fibrinogen.

## *Introducció*

EL principal lligant de la P-selectina és el lligant glicoproteic per a la P-selectina-1 (PSGL-1), glicoproteïna expressada en granulòcits, monòcits i limfòcits<sup>12</sup>. La P-selectina també s'uneix a CD24 i a la glicoproteïna Iba $\alpha$ , tal com es descriu en l'apartat 1.2.3.

La L-selectina està expressada de forma constitutiva en tots els neutròfils, eosinòfils i monòcits de la sang, en la majoria dels limfòcits T i B, excepte els limfòcits T memòria, i en un subtipus de limfòcits natural killer<sup>13</sup>. Es troba localitzada en els extrems de les microvellositats dels leucòcits, el que facilita la seva interacció amb els lligants. La L-selectina s'uneix a Glycam-1 (glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1) proteoglicà expressat majoritàriament a les vècules endotelials altes (HEV) dels ganglis limfàtics<sup>14</sup>, la forma glicosilada i sulfatada de CD34, expressada en les cèl·lules endotelials de tot l'organisme i cèl·lules hematopoiètiques<sup>15</sup> i MadCAM-1 (mucosal addressin cell adhesion molecule-1), expressada a les vècules endotelials de les plaques de Peyer i ganglis limfàtics mesentèrics<sup>16</sup>. En resposta a diferents estímuls, com citoquines i esters de forbol, la L-selectina es desprèn de la superfície dels leucòcits mitjançant un mecanisme proteolític i es genera una forma soluble de la proteïna<sup>17</sup>. La L-selectina soluble competeix amb la L-selectina expressada a la membrana per la unió amb el lligant, i tot i que la importància fisiològica d'aquest procés no s'ha establert amb precisió, podria ser un mecanisme per a inhibir la migració leucocitària i regular la resposta inflamatòria<sup>18</sup>.

L'expressió d'E-selectina a la membrana de les cèl·lules endotelials és induïda per diferents citoquines com IL-1, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  i per LPS i està regulada a nivell de transcripció del RNA<sup>19</sup>. La màxima expressió de E-selectina es produeix a les 3-4 hores després de l'estímul i disminueix fins a valors basals a partir de les 24 hores. La E-selectina interacciona amb ESL-1 (E-selectin glycoprotein ligand-1), expressada en leucòcits<sup>20</sup> tot i que només en cèl·lules mieloides s'ha detectat una conformació de la glicoproteïna adequada per unir-se a E-selectina<sup>21</sup>. La E-selectina també pot unir-se a L-selectina i a PSGL-1<sup>22;23</sup> però la

rellevància fisiològica d'aquestes interaccions no ha estat definida. Un important contra-receptor per a la E-selectina és l'antigen de limfòcits cutani (CLA), que és un epítop tipus carbohidrat expressat a la glicoproteïna PSGL-1 d'una subpoblació de limfòcits T efectors i memòria que es localitzen en zones d'inflamació cutània<sup>24</sup>.

Nombrosos estudis han establert que les tres selectines participen tant *in vitro* com *in vivo* en el "rolling" sobre l'endoteli activat de neutròfils<sup>22</sup>, limfòcits<sup>25</sup>, monòcits<sup>26</sup> i eosinòfils<sup>27</sup>. A més, la L-selectina mitjança la recirculació dels limfòcits T i B als òrgans limfoides secundaris, com els ganglis limfàtics o las plaques de Peyer, ja que interacciona selectivament amb lligants expressats de forma constitutiva en les vècules endotelials altes dels nòduls limfàtics<sup>28</sup>. S'ha descrit que a més de les selectines, integrines  $\alpha 4$  dels limfòcits també poden mitjançar el "rolling" sobre l'endoteli, tot i que aquest és més inestable i sol conduir a la separació dels leucòcits de l'endoteli o generar ràpidament la seva adhesió<sup>29</sup>.

Les selectines participen de forma diferent en l'etapa inicial de la resposta inflamatòria i la seva activitat pot variar segons el tipus de cèl.lula (figura 2)<sup>30,31</sup>. La L-selectina és la responsable del "rolling" més ràpid (de 50 a 150  $\mu\text{m}$  per segon), mentre que el "rolling" sobre E-selectina és més lent (de 3 a 10  $\mu\text{m}$  per segon). La velocitat del "rolling" sobre la P-selectina té valors intermitjos (de 20 a 50  $\mu\text{m}$  per segon)<sup>8</sup>.

	<u>Neutròfils</u>	<u>Monòcits</u>	<u>Limfòcits T Nadius</u>	<u>Limfòcits T Memòria</u>	
	L>P>E	L>P>E	L-selectina	L>P>E	<u>Captura</u>
	L>P	L>P	L-selectina	L>P	<u>Rolling Ràpid</u>
	P<E	P<E i integrines $\alpha$ 4	L-selectina	P<E i/o integrines $\alpha$ 4	<u>Rolling Lent</u>
	Integrines $\beta$ 2	Integrines $\beta$ 2+ Integrines $\beta$ 1	Integrines $\beta$ 2 > $\beta$ 1	Integrines $\beta$ 2 + Integrines $\beta$ 1	<u>Adhesió</u>

**Figura 2:** Les diferents etapes en la interacció leucòcit-endoteli impliquen diferents velocitats i la participació diferents selectines. La L-selectina predomina en l'etapa de captura, o interacció inicial entre leucòcit i endoteli. La P-selectina hi contribueix significativament i la participació de E-selectina és pobre. El "rolling" ràpid és mitjançant principalment per L-selectina, i el "rolling" lent per P-selectina. La E-selectina participa en el "rolling" més lent, que en el cas dels monòcits està mitjançat també per integrines  $\alpha$ 4 (VLA-4). Els neutròfils han d'utilitzar E- o P-selectina per tenir un "rolling" prou lent per que les integrines  $\beta$ 2 puguin establir una adhesió estable. Pel contrari, els monòcits i un subtipus de limfòcits T memòria poden utilitzar E-selectina, P-selectina i VLA-4 en el "rolling" lent, i integrines  $\beta$ 2 i  $\beta$ 1 per l'adhesió. La recirculació dels limfòcits T nadius als ganglis limfàtics via L-selectina és molt eficient degut a la menor força del flux sanguini a les HEV i a una elevada densitat de lligants per L-selectina. (Figura adaptada de Kansas GS. Blood 1996; 88(9):3259-3287)

### 1.1.1.2. Família de les integrines

La família de les integrines està formada per glicoproteïnes heterodimèriques de la superfície cel·lular que constitueixen els principals receptors amb què les cèl·lules interaccionen amb la matriu extracel·lular. Les integrines leucocitàries són un subtipus dins la gran família de les integrines que estan expressades exclusivament en cèl·lules del llinatge hematopoiètic. Són molècules d'adhesió i

senyalització dels leucòcits compostes d'una cadena  $\alpha$  i una cadena  $\beta$  unides de forma no covalent. La unió al lligant es realitza per l'extrem amino-terminal i és depenent de cations divalents com el calci i el magnesi. La seva cua citoplasmàtica té una funció de transducció del senyal i enllaça l'exterior de la cèl·lula i el citoesquelet d'actina. Les integrines leucocitàries estan integrades per una subunitat  $\beta_1$  (definida com CD29),  $\beta_2$  (CD18) o  $\beta_7$ . L'expressió, funció i lligants de les principals integrines que participen a la resposta inflamatòria estan recollits a la taula 1.

Durant la resposta inflamatòria, la producció de quimioquines per l'endoteli activat indueix l'activació de les integrines leucocitàries<sup>6</sup>, especialment VLA-4, LFA-1 i Mac-1, i aquestes consoliden les interaccions leucòcit-endoteli iniciades per les selectines i mitjancen una adhesió estable dels leucòcits sobre l'endoteli<sup>2</sup>. A més, la seva interacció amb el citoesquelet d'actina els hi confereix un important paper en els processos de migració<sup>32</sup>. La funció d'adhesió de les integrines està regulada per canvis en la seva afinitat pel lligant, canvis en els nivells d'expressió de les integrines i canvis en l'expressió dels lligants<sup>33</sup>.

### 1.1.1.3. Superfamília de les immunoglobulines.

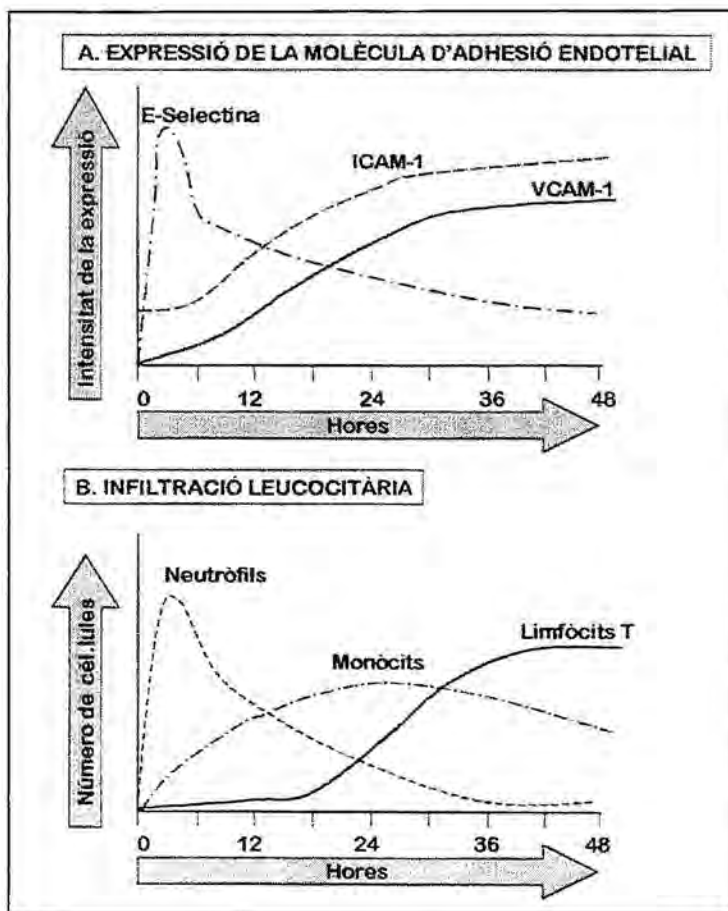
La superfamília de les immunoglobulines està composta per molècules de membrana que es caracteritzen per tenir un o més dominis immunoglobulina, constituïts per dues làmines peptídiques amb estructura  $\beta$ -plegada en disposició antiparalela i estabilitzada per ponts disulfur<sup>34</sup>. Els principals membres d'aquesta superfamília implicats en l'inflamació són ICAM-1 (intercellular cell adhesion molecule-1 o CD54), ICAM-2 (CD102) i ICAM-3 (CD50), VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1 o CD106), PECAM-1 (platelet-endothelial cell adhesion molecule o CD31) i MAdCAM-1 (mucosal addressin cell adhesion molecule-1). Participen en l'adhesió entre

leucòcits i endoteli i en la transmigració dels leucòcits a través de la paret vascular i poden interaccionar entre elles mateixes de forma homotípica o amb membres de les altres famílies de molècules d'adhesió (Taula 1).

**ICAM-1** està constitutivament present en diferents tipus cel·lulars, inclosos els monòcits, limfòcits i cèl·lules endotelials i la seva expressió augmenta amb l'activació per diferents mediadors inflamatoris com IL-1, TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$ <sup>17;35</sup>. El pic d'expressió de ICAM-1 a l'endoteli, que es produeix entre les 5 i les 24 h després de l'estímul, s'associa amb la màxima adhesió de leucòcits (figura 3). Durant la inflamació es pot detectar en el plasma una forma soluble de ICAM-1 que correspon a un fragment resultant de la proteolisi de ICAM-1 endotelial, i que pot ser funcionalment actiu<sup>36</sup>. **ICAM-2** està expressat de forma constitutiva en monòcits, limfòcits, plaquetes i cèl·lules endotelials, i la seva expressió no augmenta amb l'activació. La seva adhesió als lligants expressats en leucòcits és de menor afinitat que la de ICAM-1<sup>37</sup>. **ICAM-3** té una elevada expressió en leucòcits, però no en cèl·lules endotelials. Es pensa que pot intervenir en la unió dels limfòcits T a les cèl·lules presentadores d'antigen. **VCAM-1** està pràcticament absent en cèl·lules endotelials sense activar, però la seva expressió té un important increment de les 5 a les 9 hores després de l'estímul per citoquines<sup>38</sup>. VCAM-1 reconeix la integrina  $\alpha_4\beta_1$  i mitjança l'adhesió de limfòcits i monòcits a la paret vascular inflamada (figura 3). **PECAM-1** està expressada de forma constitutiva en plaquetes, en monòcits, neutròfils i limfòcits T CD8+ i en cèl·lules endotelials i participa en l'adhesió de les plaquetes i leucòcits a les cèl·lules endotelials mitjançant interaccions homofíliques. La seva expressió no s'incrementa amb l'activació, sinó sota l'acció de les citoquines es redistribueix a les zones intercel·lulars de l'endoteli on participa en les interaccions entre cèl·lules endotelials que permeten mantenir l'integritat de l'endoteli i que possibiliten la transmigració de leucòcits a través de la paret vascular cap a l'interior dels teixits<sup>39</sup>. **MAdCAM-1** es troba expressada a les vècules endotelials altes, a les vècules de la lamina pròpia de l'intestí prim i als sinus

marginals de la melsa. És el lligant de la L-selectina i de la integrina  $\alpha_4\beta_7$  i participa a la localització dels limfòcits a les plaques de Peyer.

El procés d'extravassació dels leucòcits durant la resposta inflamatòria està regulat de manera diferent en neutròfils, limfòcits i monòcits i s'ha descrit que per cada població leucocitària hi ha implicades citoquines, molècules d'adhesió i vies de senyalització específiques<sup>40</sup>. En la figura 3 es representa com l'expressió seqüencial a l'endoteli vascular de diferents molècules d'adhesió (E-selectina, VCAM-1 i ICAM-1), origina l'adhesió preferent de diferents tipus de leucòcits i la seva posterior infiltració.



**Figura 3.** Cinètica d'unió dels leucòcits a l'endoteli i infiltració als teixits. En resposta a les citoquines, les cèl·lules endotelials expressen seqüencialment diferents molècules d'adhesió com E-selectina, ICAM-1 i VCAM-1, que s'uneixen preferentment a diferents leucòcits (A). Això genera la infiltració dels leucòcits en els teixits, inicialment neutròfils i a continuació monòcits i limfòcits T (B). (Figura adaptada de. Immunología Celular y Molecular. Abul K. Abbas et Al. Ed. McGraw-Hill-Interamericana de España, S.A.U.)



## 1.2. P-SELECTINA

### 1.2.1.Estructura

Totes les selectines tenen una regió extracel·lular característica composta per un domini lectina amino-terminal depenent de calci que consta de 119 residus, un domini tipus EGF (factor de creixement epidèrmic) de 36 residus, i de 2 a 9 unitats consens curtes repetides (SCR) de 62 residus, homologues als dominis present en les proteïnes d'unió al complement. A continuació segueix la regió transmembrana i la cua intracitoplasmàtica carboxi-terminal (Figura 4).

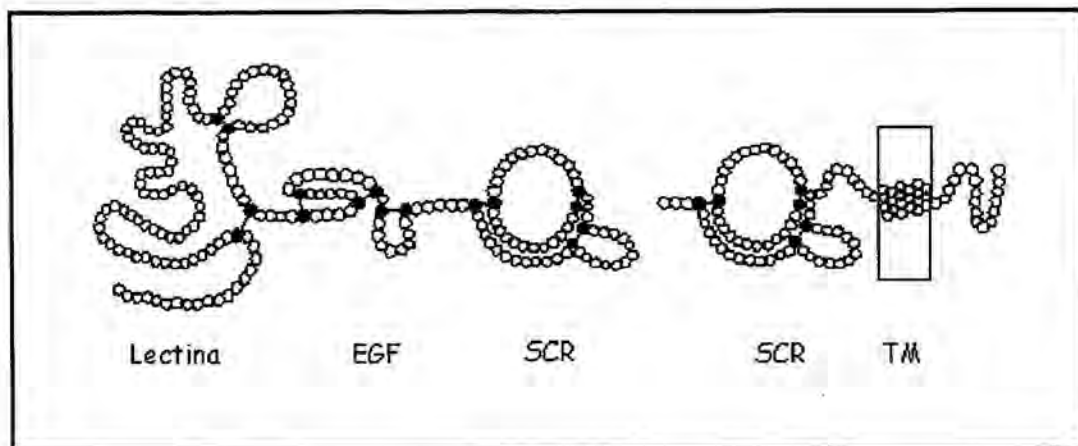


Figura 4. Estructura general de les selectines. Representació del domini lectina, el domini tipus factor de creixement epidèrmic (EGF), les unitats consens curtes repetides (SCR) i del domini transmembrana (TM). El nombre de dominis SCR varia segons l'espècie; la L-selectina humana consta de 2 dominis SCR, la E-selectina humana consta de 6 dominis SCR y la P-selectina humana té 9 dominis SCR. Els cercles negres indiquen les cisteïnes conservades que formen els enllaços disulfur. (Tedder T. et al. FASEB J. 1995; 9: 866-873)

El nombre de SCR depèn de les selectines i de les espècies animals. La L-selectina té 2 dominis SCR en totes les espècies, però en la E- i P-selectina el nombre de dominis SCR pot variar de 4 a 9. La E-selectina i P-selectina humanes tenen 6 i 9 dominis SCR respectivament. En el cas

de la P-selectina de ratolí, rata i ovella, el nombre de SCRs és de 8, mentre que els bovins i porcs només en presenten 6. La E-selectina de ratolí i gos té 6 dominis SCR, la de conill i rata 5, i la E-selectina de bovins i porc 4<sup>41</sup> (Figura 5).

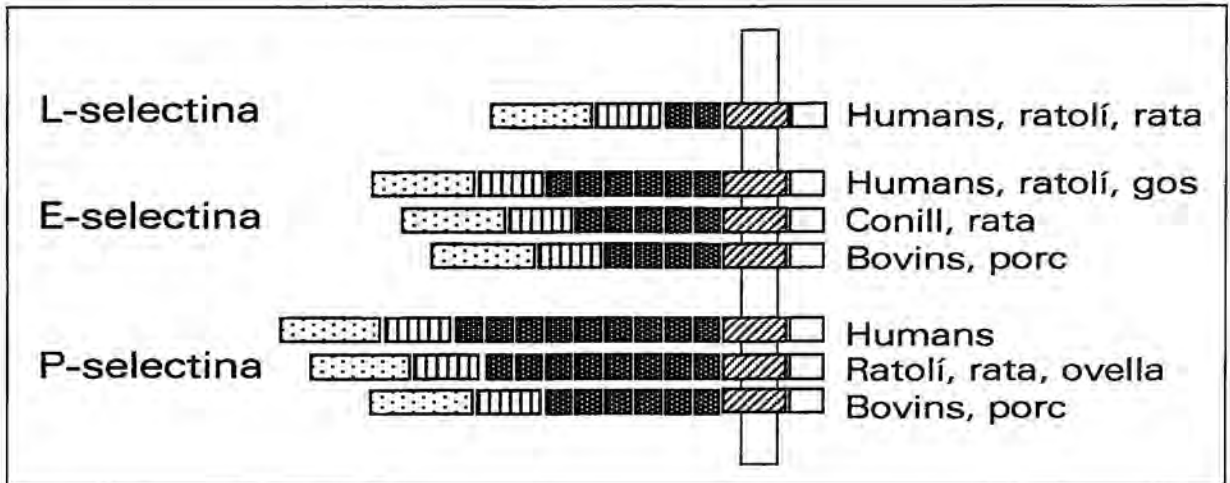







Figura 5. Estructura de les selectines en diferents espècies. □ Domini lectina, ▤ domini EGF (factor de creixement epidèrmic), ■ unitats SCR (consens curtes repetides), ▨ regió transmembrana, □ cua citoplasmàtica. El nombre d'unitats SCR és variable en funció de cada tipus de selectina i de cada espècie. (figura adaptada de Vestweber D. Et al. *Physiological Reviews* 1999;79(1):181)

Els tres dominis extracel·lulars de les selectines es troben disposats immediatament un al costat de l'altre, ja que la seva relació espacial és important per la seva funció de receptor. El domini lectina està directament implicat en l'adhesió i determina l'especificitat pel lligant. El domini EGF té un paper estructural molt important per la conformació del domini lectina, i intervé a l'adhesió encara que no contribueix directament a l'especificitat pel lligant. En el cas de la P-selectina, el domini EGF està altament conservat i podria contribuir al reconeixement del lligant<sup>42</sup>. Els dominis SCR participen indirectament en l'adhesió i funcionen com a elements estructurals per presentar de forma correcta i a una distància apropiada de la membrana els dominis lectina-EGF. Els dominis SCR poden ser intercanviats entre diferents selectines sense que s'afecti a la funció de la proteïna<sup>42</sup>.

## Introducció

L'estructura de les selectines ha estat molt ben conservada durant l'evolució dels mamífers i la seqüència d'aminoàcids manté gran homologia entre diferents espècies. Els dominis lectina, EGF i SCR són força homòlegs entre les diferents selectines i entre diferents espècies, tot i que els dominis lectina i EGF són més homòlegs per la mateixa selectina entre diferents espècies, que entre diferents selectines dins de la mateixa espècie. Els dominis transmembrana i intracitoplasmàtics són homòlegs per la mateixa selectina en diferents espècies, però no entre les diferents selectines, el que suggereix que tenen una funció específica en cada una de les selectines (Figura 6)<sup>8</sup>.

	Lectina	EGF	SCR	TM	Cito
NH <sub>2</sub>					
RESIDUS	~ 120	~36	~ 63	~23	17-35
<b>HOMOLOGIES</b>					
. mateixa selectina, diferents espècies	~72%	~60% (P-selectina > 90%)	~40%	~80% (L-selectina > 95%)	~75%
. diferents selectines, mateixa espècies	~52%	~47%	~35%	No	No

**Figura 6.** Homologia de les selectines. Es representa els diferents dominis, EGF (Factor creixement epidèrmic), SCR (unitats consens curtes repetides), TM (domini transmembrana) i Cito (domini intracitoplasmàtic) i 'indica l'homologia aproximada pels aminoàcids de cada domini, basada en les seqüències publicades per humans, ratolí i vaca. (figura adaptada de Kansas G. Blood 1996; 88(9):3259-3287)

Els gens per les selectines estan disposats en tàndem en l'ordre P-, L- E- selectina al cromosoma 1 tant en humà com en ratolí, reflexant un origen evolutiu comú<sup>43</sup>. El gen de la P-selectina humana es troba localitzat al braç llarg del cromosoma 1, en la posició 1q23. L'estructura dels gens és concordant amb l'estructura en diferents dominis de les selectines. Cada un dels diferents dominis extracel·lulars i la regió

transmembrana està codificada per un exò separat. El domini citoplasmàtic està codificat per dos exons diferents<sup>44;45</sup>.

### 1.2.2. Expressió de la P-selectina.

En cèl·lules endotelials i plaquetes en repòs, la P-selectina es sintetitza de forma constitutiva i es troba emmagatzemada en els cossos Weibel-Palade i grànuls  $\alpha$ , respectivament. Amb l'activació de les cèl·lules per diferents mediadors de la inflamació com trombina, histamina, esters de forbol, ionòfors de calci o proteïnes del complement, els grànuls d'emmagatzematge es fusionen amb la membrana cel·lular i s'externalitza el seu contingut, el que genera l'expressió ràpida i transitòria de P-selectina a la superfície de les cèl·lules<sup>46;47</sup>.

La P-selectina s'acumula dins dels grànuls  $\alpha$  de les plaquetes de manera que el seu domini extracel·lular està localitzat en el lumen del grànul, el domini transmembrana està disposat entre la membrana del grànul i la cua citoplasmàtica queda orientada cap el citoplasma de la plaqueta i pot interaccionar amb proteïnes plasmàtiques. Quan la plaqueta s'activa, la cua citoplasmàtica de la P-selectina és fosforilada. La membrana del grànul  $\alpha$  es fusiona amb la membrana plasmàtica, en un procés en el que hi ha implicades diferents proteïnes, com el complex de proteïnes SNARE (N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment receptor), que dirigeixen el moviment dels grànuls i la seva fusió amb la membrana plasmàtica. Pocs segons després de l'activació la P-selectina és externalitzada a la membrana de la plaqueta, des d'on el domini extracel·lular pot interaccionar amb els seus lligants expressats en altres cèl·lules<sup>48</sup>.

En cèl·lules endotelials l'expressió de P-selectina a la membrana és màxima als 5-10 minuts després de l'estímul inflamatori i després de 30-60 minuts desapareix de la superfície cel·lular per un procés endocitosi a través de cavitats de clatrina. En el procés d'internalitació

## Introducció

el domini citoplasmàtic de P-selectina s'associa a l'adaptador AP-2 a través d'un motiu que conté tirosines<sup>49</sup>. Les molècules de P-selectina poden ser reciclades dels endosomes al sistema trans-Golgi, des d'on són dirigides de nou als cossos Weibel-Palade<sup>50</sup>, encara que una quantitat important de les molècules de P-selectina internalitzades són lliurades dels endosomes a lisosomes per ser degradades<sup>51</sup>.

S'ha proposat que la P-selectina també podria ser eliminada de la membrana per un procés proteolític conegut com a "shedding", alliberant-se al plasma com a una forma soluble de la P-selectina que no conté la regió transmembrana<sup>52</sup>. En una resposta inflamatòria la proteolisi de P-selectina seria un mecanisme que, juntament amb l'internalització, disminuiria l'adhesió de leucòcits a l'endoteli, el que podria limitar un dany excessiu del procés inflamatori. Tot i que aquest mecanisme de "shedding" és vàlid per altres molècules d'adhesió, com la L-selectina, assaigs "in vitro" han demostrat que la P-selectina és resistent a la seva eliminació de la membrana cel·lular per agents proteolítics<sup>53</sup>, per tant la possible alliberació proteolítica de la P-selectina encara s'ha d'establir amb precisió.

La cua citoplasmàtica de la P-selectina compren 35 aminoàcids. En ella es troben les senyals implicades en distribució de P-selectina als grànuls, en la seva internalització per endocitosi des de la membrana plasmàtica i en el moviment dels endosomes a lisosomes<sup>51</sup>. El domini transmembrana potencia la localització de P-selectina en els grànuls d'emmagatzematge. Estudis en els que s'ha produït mutants amb delecions en la cua citoplasmàtica indiquen que els residus Leu<sup>768</sup> i/o Asn<sup>769</sup>, Tyr<sup>777</sup>, Gly<sup>778</sup>, Phe<sup>780</sup> són essencials en la senyalització per la distribució de la P-selectina als grànuls<sup>54</sup>. Però perquè hi hagi una alteració significativa en l'acumulació de P-selectina en grànuls, és necessària la deleción de la major part de la cua citoplasmàtica<sup>55</sup>. La deleción del domini citoplasmàtic afecta dràsticament la localització de P-selectina als cossos Weibel-Palade en cèl·lules endotelials no activades i la proteïna s'expressa directament a la membrana cel·lular,

però no altera la seva ubicació en els grànuls- $\alpha$  de les plaquetes. Això indica que els mecanismes de distribució són diferents en l'endoteli i plaquetes, segurament degut a les diferències entre els dos tipus de grànuls d'emmagatzematge implicats. La distribució de proteïnes als grànuls- $\alpha$  té uns requeriments menys restrictius, ja que poden acumular proteïnes del plasma a través d'endocitosi depenent o independent de receptor<sup>56</sup>. La informació necessària pel ràpid transport de la P-selectina al lisosomes després de ser internalitzada s'ha vist que està localitzada en el domini C1 de la cua citoplasmàtica, on s'ha identificat el motiu Lys-Cys-Pro-Leu que conté la Pro<sup>767</sup> crítica pel procés<sup>57</sup>.

L'expressió de P-selectina a la superfície de l'endoteli està també regulada a nivell transcripcional. L'increment de la síntesi de P-selectina satura les vies d'emmagatzematge en grànuls, i les molècules de P-selectina sintetitzades de nou s'expressen directament a la membrana cel·lular. Els mecanismes pels quals s'activa la maquinària de transcripció de la P-selectina són diferents entre espècies. El tractament amb LPS, radicals oxigen i amb diferents citoquines com TNF- $\alpha$  i IL-1 indueix la transcripció transitòria del gen de la P-selectina a les cèl·lules endotelials murines tant *in vitro* com *in vivo*, originant l'expressió de P-selectina a la membrana hores després de l'estímul. Aquest mediadors també s'ha descrit que augmenten la síntesi de mRNA de P-selectina en cèl·lules endotelials de rata, bovins i canins. En ratolins, el tractament amb TNF- $\alpha$  indueix un increment en la síntesi de la proteïna que és màxim a les 4 hores<sup>58</sup> i és funcionalment significant. La inducció de la síntesi del mRNA per P-selectina és també màxima a les 4 hores després de l'administració de LPS, i els nivells més elevats s'han trobat al fetge, pulmó, ronyó i cor<sup>58</sup>. En humans, l'activació transcripcional de l'expressió de P-selectina per mediadors com el TNF- $\alpha$  és font de controvèrsia. S'ha descrit que el tractament amb TNF- $\alpha$ , de cèl·lules endotelials humanes indueix l'expressió en membrana de P-selectina a les 6h, tornat a valors basals 24h més tard<sup>59</sup>. Però per altra banda, altres estudis sostenen que en humans, el tractament amb TNF- $\alpha$ , LPS

o IL-1 no produeix un increment de la síntesi de P-selectina<sup>11</sup>. Aquesta resposta específica de espècies seria deguda a que existeixen diferents mecanismes de regulació de la transcripció en el gens de la P-selectina humans i murins<sup>60</sup>. La incapacitat d'aquest mediadors per induir la transcripció de P-selectina *in vivo* també s'ha observat en primats i es pensa que tenen altres citokines implicades a la inducció de l'expressió de P-selectina<sup>61</sup>. Paral·lelament, en cèl·lules endotelials porcines, també s'ha descrit un increment molt modest de l'expressió de P-selectina al ser estimulades amb TNF- $\alpha$  i IL-1<sup>62</sup>.

La P-selectina pot trobar-se expressada en zones amb inflamació crònica, com en el cas d'artritis reumatoide<sup>63</sup>, pòlips nasals<sup>64</sup> plaques aterogèniques<sup>65</sup>. Les citokines IL-13 i IL-4 i la oncostatina- $\alpha$  induïxen l'expressió de P-selectina a la membrana de cèl·lules endotelials humanes 16 hores després de l'estímul i l'expressió pot durar almenys 4 dies<sup>66,67</sup>. IL-4 també s'ha descrit que estimula una expressió prolongada de P-selectina en cèl·lules endotelials de porc<sup>62</sup>.

### 1.2.3. Lligants de la P-selectina.

La presència del domini lectina a la estructura de les selectines determina que aquestes interaccionin amb carbohidrats. Els tetrasacàrits simples sialil-Lewis<sup>x</sup> (Sia $\alpha$ 2 $\rightarrow$ 3Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4(Fuca $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3)GlcNAc) (sLe<sup>x</sup>) i el seu isòmer sialil-Lewis<sup>a</sup> (sLe<sup>a</sup>) són prototips de les estructures reconegudes per les selectines<sup>68</sup>. En condicions fisiològiques, aquests tetrasacàrids han de trobar-se presentats en un esquelet proteic o lipídic adequat per poder interaccionar amb les selectines, això fa que els lligants de les selectines estiguin restringits a glicoproteïnes específiques d'entre les moltes que comptenen el sucre sLe<sup>x</sup> a la seva estructura.

Els lligants de les selectines han de ser modificats postraduccionalment per ser funcionalment actius, per tant necessiten estar expressats en cèl·lules que continguin el repertori adequat d'enzims<sup>41</sup>. En assaigs d'adhesió cel·lular s'ha vist que l'adhesió dels lligants a totes les selectines és depenent d'àcid siàlic, de fucosa i que en el cas de L- i P-selectina, també requereix sulfat<sup>69;70</sup>. Un defecte hereditari en el metabolisme de la fucosa origina el síndrome LAD II (leukocyte adhesion deficiency type-II), que és una malaltia hereditària caracteritzada per la incapacitat dels neutròfils de migrar als llocs d'inflamació degut a que no s'ha pogut generar lligants correctes per les selectines<sup>71</sup>. S'ha identificat dos enzims amb activitat  $\alpha$ -1-3 fucosiltransferasa que controlen la biosíntesi dels lligants de les selectines<sup>72</sup>, FucT-VII i FucT-IV. FucT-VII participa en la biosíntesi de lligants funcionals de la P-, E- i L-selectina, i la seva absència en ratolins produeix dèficits en la migració de neutròfils durant la inflamació i en la localització dels limfòcits als ganglis limfàtics<sup>73</sup>. FucT-IV intervé en la formació de lligants de E-selectina<sup>74</sup>. Un altre enzim identificat en la biosíntesi dels lligants de les selectines és el core 2 N-acetilglucosaminiltransferasa-I (C2GlcNAcT-I) i participa en la formació dels lligants de les selectines implicats en el reclutament de neutròfils durant la inflamació, però no en la recirculació de limfòcits als ganglis limfàtics<sup>75</sup>. Els animals genèticament deficients en aquest enzim presenten una alteració i fins i tot absència de "rolling" de neutròfils sobre les tres selectines *in vitro* i una alteració en l'acumulació de leucòcits al peritoneu inflammat<sup>75</sup>. S'ha identificat sis gens que codifiquen per enzims sialiltransferasa responsables de la unió  $\alpha$ 2-3 d'àcid siàlic (ST3Gal-I-VI) i que potencialment poden participar en la síntesi dels lligants de les selectines. D'aquests només ST3Gal-IV ha demostrat tenir un paper important en la formació dels lligants de les selectines.



### 1.2.3.1 Lligant glicoproteic per a la P-selectina-1

El principal lligant per la P-selectina és el lligant glicoproteic per a la P-selectina-1 (P-selectin Glycoprotein Ligand-1 o PSGL-1)(CD162). Es tracta d'una sialomucina homodimèrica formada per dues subunitats de 120 kd unides per un pont disulfur. PSGL-1 es troba expressada de forma funcional en neutròfils, monòcits, limfòcits, basòfils, eosinòfils i cèl·lules dendrítiques<sup>76</sup>. És una glicoproteïna minoritària en la membrana de les cèl·lules mieloides, però s'ha demostrat que l'eliminació selectiva de PSGL-1 de la membrana inhibeix l'adhesió a P-selectina<sup>77</sup>. PSGL-1 mitjança *in vitro* l'adhesió de les cèl·lules mieloides a P-selectina tant en condicions estàtiques com en condicions d'estrès de fregament fisiològic i s'ha demostrat que *in vivo* participa en el "rolling" dels leucòcits sobre l'endoteli després d'un estímul inflamatori<sup>78;79</sup>. PSGL-1 també es troba expressada en plaquetes de forma funcional i participa en les interaccions entre les plaquetes i l'endoteli<sup>80</sup>.

PSGL-1 necessita ser modificada postraduccionalment per poder-se unir a P-selectina mitjançant fucosilació  $\alpha$ 1-3, sialilació  $\alpha$ 2-3 i core-2 o-glicosilació a més de la sulfatació d'almenys una de les 3 tirosines presents dins el motiu tirosina sulfat de l'extrem amino-terminal de la proteïna madura<sup>81</sup>. A més, és necessària la presència d'un residu treonina just a continuació del motiu tirosina sulfat, possiblement per a la unió d'oligosacàrits ramificats, sialilats o fucosilats implicats en el reconeixement de la P-selectina<sup>82</sup>.

En condicions de flux fisiològic, la unió P-selectina-PSGL-1 ha de tenir suficient força mecànica per sostenir la interacció però ha de permetre una ràpida dissociació per facilitar el "rolling". La unió de PSGL-1 a P-selectina és d'alta afinitat ( $K_d=2.4$  nM). Quan els leucòcits s'activen, les molècules de PSGL-1 es reorganitzen a la membrana cel·lular, agrupant-se a les puntes dels microvilis en neutròfils, eosinòfils,

basòfils, monòcits i limfòcits<sup>83</sup>. Aquesta redistribució a la membrana cel·lular ajuda a incrementar l'afinitat de la interacció. Tant P-selectina com PSGL-1 són proteïnes molt extenses, que projecten el seu domini d'unió aminoterminal per sobre de la majoria dels sucres de la membrana cel·lular. Aquesta orientació també optimitza la seva interacció sota les condicions de flux.

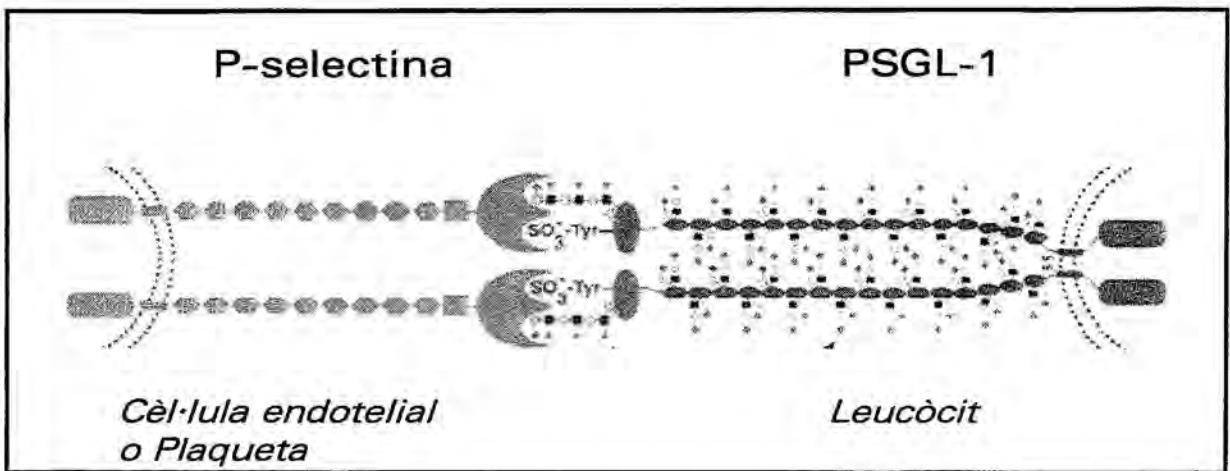
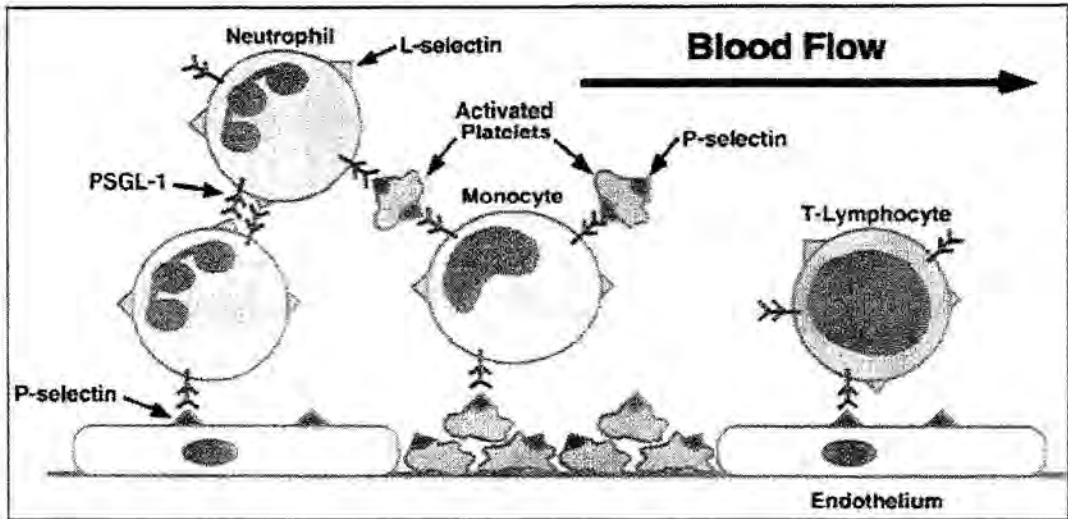


Figura 7. Model d'interacció entre P-selectina i PSGL-1. Es representa una molècula de P-selectina unida a cada una de les subunitats de PSGL-1. El domini lectina de P-selectina interacciona amb un tetrasacàrid sLe<sup>x</sup> aminoterminal amb o-glicans i un residu tirosina sulfatat de PSGL-1. En els o-glicans s'hi representa molècules d'àcid siàlic  $\diamond$ , galactosa  $\circ$ , N-acetilglucosamina  $\blacksquare$  i fucosa  $\blacktriangle$ . (McEver RP et al. J Clin Invest. 1997;100 (3):485-492)

PSGL-1 és també un lligant de L-selectina<sup>84</sup>, amb els mateixos requeriments de modificacions postraduccionals i d'enzims glicosiltransferases que la P-selectina. La unió de PSGL-1 a L-selectina és bloquejada per un anticòs anti-PSGL-1 (PL-1)<sup>85;86</sup> i assaigs d'adhesió en condicions de flux fisiològic van establir que la interacció entre L-selectina i PSGL-1 expressat en neutròfils<sup>87</sup> i els limfòcits<sup>88</sup> mitjançava un "rolling" secundari sobre altres leucòcits que ja es trobaven units a l'endoteli activat (Figura 8). La E-selectina també interacciona amb PSGL-1<sup>89</sup> encara que els requeriments per la unió són diferents que per

## Introducció

P-selectina. No és necessària la sulfatació de tirosines i l'afinitat d'unió és almenys 50 vegades menor que per P-selectina.



**Figura 8:** Interaccions multicel·lulars mitjançades per la unió de PSGL-1 a P-selectina i L-selectina en condicions de flux sanguini. La unió de PSGL-1 a P-selectina promou el "rolling" dels leucòcits sobre les cèl·lules endotelials activades i plaquetes. La interacció de PSGL-1 amb L-selectina fa que els leucòcits s'uneixin a altres leucòcits, el que amplifica el seu reclutament a la paret vascular. Les plaquetes activades també acumulen leucòcits al lloc d'inflamació a través de la interacció de la seva P-selectina amb PSGL-1. (McEver RP et al., 1997 J Clin Invest, 100 (3), 485-492)

### 1.2.3.2. CD24

Un altre lligant per a la P-selectina descrit en ratolí és CD24, també anomenat "heat stable antigen" (HSA). És una proteïna de membrana tipus mucina, expressada per neutròfils, cèl·lules B, timòcits immadurs i eritròcits. Consisteix en un polipèptid molt petit de només 27 aminoàcids que està altament glicosilat i que es troba unit a un grup glicosilfosfatidilinositol. La glicosilació varia molt entre diferents tipus de leucòcits. La interacció entre P-selectina i CD24 es va estudiar amb un anticòs anti-CD24, i es va observar que bloquejava la unió de boles de làtex unides a CD24 a cèl·lules d'endotelioma i plaquetes<sup>90</sup>. També es va veure que línies cel·lulars derivades de carcinomes de mama i pulmó, que no expressaven PSGL-1, s'unien a P-selectina i que CD24

purificat a partir d'aquestes línies interaccionaven amb proteïnes quimèriques P-selectina-Ig i amb cèl·lules transfectades amb P-selectina<sup>90</sup>. A més, cèl·lules provinents d'un adenocarcinoma humà transfectades amb CD24 van demostrar un increment d'unió a plaquetes expressant P-selectina. En humans, CD24 es troba expressat en granulocits i limfòcits B i està present en molts carcinomes. La interacció amb P-selectina podria tenir un paper en la metàstasi de tumors modulant l'adhesió de cèl·lules tumorals a plaquetes o a cèl·lules endotelials.

### 1.2.3.3. Glicoproteïna Ib $\alpha$

La glicoproteïna Ib $\alpha$  (GP Ib $\alpha$ ) present a les plaquetes s'ha identificat com un contrareceptor per P-selectina. GP Ib $\alpha$  és una sialomucina amb regions altament o-glicosilades i amb tirosines sulfatades en el extrem amino-terminal. La seva interacció amb P-selectina és independent de fucosilació o de la modificació dels carbohidrats<sup>91</sup>. Forma part del complex GP Ib $\alpha$ -IX-V, que interacciona amb el factor Von Willebrand i participa en l'adhesió i agregació de plaquetes en l'hemostàsia i mitjança l'adhesió de plaquetes a l'endoteli activat i al subendoteli en els llocs de lesió<sup>92</sup>. El complex GP Ib-IX-V juntament amb PSGL-1 expressat a la membrana de les plaquetes podria participar en el "rolling" de les plaquetes sobre l'endoteli activat<sup>92;93</sup> i permetria la unió de plaquetes activades i no activades a l'endoteli, que en processos d'hemostàsia afavoriria la formació del trombes.

### 1.2.4. Funcions de la P-selectina.

La P-selectina expressada a la membrana de l'endoteli als pocs minuts de l'estímul inflamatori és responsable del "rolling" més immediat en la resposta inflamatòria. Si l'estímul inflamatori persisteix, la P-selectina és induïda de forma transcripcional i la seva expressió es manté durant

## *Introducció*

hores, participant en un "rolling" més tardà que incrementa l'influx de leucòcits, majoritàriament de neutròfils, però també de monòcits i limfòcits T, a la zona lesionada<sup>8</sup>. La P-selectina també participa en processos d'inflamació crònica ja que la seva expressió pot estar mantinguda de forma constitutiva, com és el cas de la pell o el sinovi reumatòide<sup>63</sup>.

L'expressió de la P-selectina i els seus lligants no és la mateixa en tots els teixits i la seva activitat pot variar segons la seva localització. A la pell, la P-selectina es troba expressada de forma constitutiva a la superfície de l'endoteli, i es produeix el "rolling" de leucòcits encara que no hi hagi cap trauma<sup>94</sup>. Per contra, als alvèols capil·lars dels pulmons i als sinusoides del fetge, l'extravassació dels leucòcits es produeix per mecanismes independents de les selectines<sup>95 96</sup>

Els ratolins genèticament deficients en P-selectina no presenten defectes en el seu desenvolupament ni pateixen infeccions recurrents. S'ha descrit que tenen un nombre de neutròfils circulants dues vegades més elevat que un ratolí normal, encara que el nombre de leucòcits totals és normal. Tot i aquest increment en el nombre, l'extravassació de neutròfils en una peritonitis induïda per tioglicolat està significativament retardada de 2 a 4 h. A més presenten absència de "rolling" en les vènules mesentèriques<sup>97</sup>. L'entrada de monòcits als peritoneu inflammat en temps més tardans (48h) també està alterada en els animals deficients de P-selectina. Animals doblement deficients en P i E-selectina tenen un fenotip més sever, amb un increment de 4 vegades en el nombre de leucòcits circulants, dels quals un 50% són neutròfils, el que representa un increment de 16 vegades en el nombre de neutròfils respecte els valors normals. Aquests animals tenen alteracions en l'hematopoesi i són susceptibles a les infeccions espontànies. No es produeix "rolling" dels leucòcits en vènules mesentèriques activades amb TNF- $\alpha$ , i hi ha absència d'extravassació de neutròfils a les 4h després de la inducció d'una peritonitis<sup>98</sup>. Cal destacar que els animals deficients en E-selectina no presenten

defectes inflamatoris si la P-selectina no es troba simultàniament bloquejada, el que indica un funcionament cooperatiu entre les dues selectines<sup>99</sup>. Recentment s'ha generat animals deficientes en L i P-selectina, E i L-selectina i en les tres selectines a la vegada<sup>100</sup>. L'animal deficient en les tres selectines presenta una dràstica disminució en el nombre de cèl·lules que roden sobre l'endoteli activat i que posteriorment s'hi adhereixen. L'extravassació de neutròfils als llocs d'inflamació també està significativament reduïda. L'estudi d'aquests animals deficientes en les tres selectines ha revelat un paper predominat per la P-selectina en el procés de "rolling", posant de manifest que en absència de les altres selectines pot mitjançar uns nivells raonables de "rolling" dels leucòcits<sup>101</sup>.

La P-selectina expressada en plaquetes activades té un paper molt important en la interacció entre leucòcits i plaquetes durant l'hemostàsia i la cicatrització de ferides. Tot i que l'agregació de plaquetes o la seva adhesió a la matriu subendotelial no requereix P-selectina, la P-selectina mitjança la unió de les plaquetes activades a monòcits, neutròfils, cèl·lules NK i limfòcits T memòria i aquesta interacció serveix per amplificar l'acumulació d'aquests leucòcits, especialment dels monòcits i neutròfils als llocs amb dany vascular<sup>102;103</sup>. L'adhesió de leucòcits a les plaquetes activades també indueix la incorporació de fibrina als trombes en formació<sup>104</sup>. Encara que inicialment no es van descriure desordres significants en l'hemostàsia en els animals deficientes en P-selectina<sup>97</sup>, en posteriors estudis es van detectar algunes alteracions en determinats paràmetres hemostàtics com una prolongació del temps de sagnat i una major hemorràgia en situacions inflamatòries en aquests animals<sup>105;106</sup>. La P-selectina expressada a les plaquetes activades també mitjança el "rolling" secundari de neutròfils i monòcits sobre les plaquetes adherides a l'endoteli. Aquest "rolling" es veu totalment bloquejat per anticossos anti-P-selectina o anti-PSGL<sup>107</sup>. Les plaquetes també tenen un rodament sobre l'endoteli activat, però estudis amb animals deficientes en P-selectina han establert que en aquest procés hi participa

la P-selectina expressada a l'endoteli activat, mentre que la P-selectina plaquetària no és necessària<sup>108</sup>. La funció fisiològica d'aquest "rolling" de plaquetes sobre l'endoteli no es coneix. Podria constituir un mecanisme per acumular les plaquetes prop del lloc de la lesió, fent-les disponibles per una resposta immediata<sup>109</sup>. Si aquestes plaquetes són activades, llavors poden desenvolupar una superfície procoagulant, secretar citoquines i quimioquines proinflamàtòries que afectin a la resposta dels leucòcits i secretar factors de creixement que estimulin la cicatrització de ferides.

En resum, la P-selectina participa en diferents interaccions que cooperen per amplificar l'acumulació de plaquetes i leucòcits a la superfície vascular. Plaquetes activades adherides a l'endoteli poden interaccionar a través de la seva P-selectina amb leucòcits circulants que expressen PSGL-1 a la membrana, i dirigir aquest leucòcits a la superfície de les cèl·lules endotelials on poden interaccionar amb les selectines endotelials. Els leucòcits adherits a l'endoteli inflammat poden reclutar plaquetes circulants a través d'interaccions amb PSGL-1 o GPIIb/IIIa de la membrana de les plaquetes i els leucòcits també es poden acumular en els trombes plaquetaris dipositats en els teixits subendotelials a través de la unió a P-selectina expressada a les plaquetes.

### 1.2.5. P-selectina com a receptor de senyalització

Addicionalment al seu paper en l'adhesió, la P-selectina pot funcionar com un receptor transductor de senyals, transformant informació bioquímica de l'entorn extracel·lular en respostes funcionals específiques de les cèl·lules a través de l'activació de vies de senyalització intracel·lulars. S'ha descrit que l'entrecruament de P-selectina indueix un increment de la concentració de calci intracel·lular i un reordenament del citoesquelet en cèl·lules endotelials. Així mateix,

un anticòs que bloqueja el lligant de P-selectina PSGL-1 als leucòcits inhibeix els canvis de concentració de calci intracel·lular i del citoesquelet a les cèl·lules endotelials induïts per l'adhesió de monòcits o neutròfils<sup>110</sup>. També s'ha descrit que anticossos anti-P-selectina indueixen importants canvis morfològics en cèl·lules endotelials humanes activades, promovent la formació transitòria de forats entre les cèl·lules endotelials que afavoririen la transmigració de leucòcits<sup>111</sup>.

A més, la unió de P-selectina als seus lligants té conseqüències importants en les vies de senyalització dels leucòcits, induint o amplificant les seves respostes durant la inflamació o dany vascular. La unió de P-selectina al PSGL-1 expressat a monòcits i neutròfils genera la producció de radicals superòxid i l'activació d'integrines  $\beta_2$ <sup>112:113</sup> i potencia la resposta a estímuls com PAF (factor activador de plaquetes) i quimioquines. S'ha vist que la P-selectina intervé directament en l'activació de les integrines  $\beta_2$  en neutròfils, i que la seva unió a PSGL-1 indueix la adhesió de CD11a/CD18 i CD11b/CD18 a ICAM-1<sup>114</sup>. En els monòcits la unió de PSGL-1 a P-selectina expressada a les plaquetes indueix l'expressió de factor tissular, incrementa la fagocitosi<sup>115</sup> i estimula la síntesi de MCP-1 (proteïna quimiotàctica de monòcits-1) i TNF- $\alpha$ <sup>116:117</sup>.

S'està estudiant les vies de senyalització intracel·lular que s'activen en els leucòcits per la seva unió a P-selectina. S'ha vist que en neutròfils l'entrecreuament de PSGL-1 indueix la fosforilació de tirosines i l'activació de la via de senyalització de Ras<sup>118</sup>, mentre que l'adhesió a cellules CHO expressant P-selectina activa quinases de la família Src (p54<sup>lyn</sup> i p56<sup>hck</sup>)<sup>119</sup>. L'adhesió de limfòcits T a P-selectina també indueix la fosforilació de diverses proteïnes, inclosa la quinasa pp125<sup>FAK</sup><sup>120</sup>. Tot i això, aquesta àrea encara requereix més estudis.



### 1.2.6. P-selectina soluble

La P-selectina té una forma soluble, sP-selectina, que es troba en forma de proteïna circulant en el plasma d'individus sans en una concentració que oscil·la de 100 a 200 ng/ml<sup>121;122</sup>. En diferents trastorns inflamatoris i trombòtics com diabetis<sup>123</sup>, malària<sup>124</sup>, hepatitis<sup>125</sup>, malaltia cardíaca isquèmica<sup>126-128</sup>, i hipertensió<sup>129</sup>, s'ha descrit un marcat increment en els nivells plasmàtics de sP-selectina indicant una rellevància clínica per aquesta forma soluble.

Hi ha dues vies diferents per les quals receptors com les molècules d'adhesió poden generar formes solubles *in vivo*<sup>130;131</sup>. El més comú és el trencament proteolític que allibera la proteïna de la membrana cel·lular, però també es pot originar una forma soluble de la molècula a partir d'un processament alternatiu del RNA missatger on s'elimini un exò codificant per una regió com el domini transmembrana. En cèl·lules endotelials i plaquetes s'ha descrit una isoforma soluble de la P-selectina derivada del RNA missatger amb un processament alternatiu que suprimeix l'exò 14, codificant per la regió amb el domini transmembrana de la molècula<sup>44;132</sup>. S'ha establert que la sP-selectina plasmàtica prové majoritàriament de la secreció d'aquesta isoforma<sup>132;133</sup>, encara que l'eliminació proteolítica de la P-selectina expressada a la membrana de les plaquetes i de les cèl·lules endotelials després de la seva activació també podria originar un increment de sP-selectina<sup>134;135</sup>.

Diversos estudis on s'ha comparat l'increment de sP-selectina amb diferents marcadors circulants de l'activació de plaquetes o d'endoteli, han establert que les plaquetes activades són la major font de sP-selectina<sup>134;135</sup>. Per tant, l'increment de la concentració de sP-selectina al plasma ha estat associat majoritàriament amb desordres plaquetaris<sup>128;136</sup> encara que també pot reflexar activació de cèl·lules endotelials<sup>137</sup>.

La forma soluble de la P-selectina és potencialment activa perquè conté els dominis lectina i EGF, que són els necessaris per la unió al seu lligant en leucòcits. El paper fisiològic de la sP-selectina no està ben definit. Durant el dany vascular es genera de forma localitzada grans quantitats de sP-selectina. Aquesta podria tenir una funció antiinflamatòria inhibint l'adhesió dels leucòcits a l'endoteli activat<sup>138;139</sup> i limitar el desenvolupament de la trombosi prevenint una acumulació excessiva de plaquetes i leucòcits al trombes en formació<sup>108</sup>. Per contra, també s'ha descrit que la sP-selectina és un activador endogen del procés de coagulació<sup>140</sup>.

### 1.2.7. P-selectina en diferents patologies

En les respostes inflamatòries es produeix un reclutament de leucòcits al teixit afectat. Aquest procés és un mecanisme de defensa que facilita l'eliminació o el control del focus infecció, però que al mateix temps, si es produeix de forma excessiva, pot empitjorar el progrés de la patologia ja que pot originar diferents graus de dany cel·lular, destrucció de la matriu extracel·lular i fins i tot arribar a la disfunció dels òrgans, tant en malalties inflamatòries cròniques com agudes. Per tant, encara que la inflamació és primordialment una resposta de defensa de l'organisme, pot esdevenir una procés indesitjable que requereixi una teràpia.

L'expressió i activació de les molècules d'adhesió és imprescindible per el desenvolupament de la resposta inflamatòria i s'ha descrit la seva implicació en múltiples patologies. En el cas de la P-selectina, la utilització d'anticossos monoclonals i animals genèticament deficientes en P-selectina, han permès establir el seu paper en diferents processos inflamatoris:

## *Introducció*

Els animals deficientes en P-selectina presenten menys lesions en models experimentals d'isquèmia i reperfusió, trasplantament de pulmó i aterosclerosi<sup>141-143</sup>. En un model experimental de colitis s'ha establert que el bloqueig de la funció de la P-selectina, tant mitjançant animals genèticament deficientes, com mitjançant l'administració d'un anticòs monoclonal, disminueix significativament el "rolling" dels leucòcits i la seva adhesió a les vècules colòniques i redueix els signes clínics i patològics de la colitis<sup>144</sup>. Així mateix, s'ha vist que l'acumulació de limfòcits T CD4<sup>+</sup>, monòcits i neutròfils en un model experimental de reacció de hipersensibilitat retardada (DHT) es troba significativament reduïda en els animals deficientes en P-selectina comparat amb animals no deficientes<sup>145</sup>.

El dany en els teixits i els òrgans degut a una isquèmia i reperfusió és una part important de la patologia associada als infarts i determinats processos quirúrgics. Durant la reperfusió, els neutròfils poden produir danys al teixits afectats per la isquèmia mitjançant dos mecanismes diferents. Juntament amb els eritròcits i les plaquetes, poden impedir la reperfusió dels capil·lars, el que condueix a una hipòxia focal al teixit. A més, s'adhereixen a l'endoteli alterat per la isquèmia i migren cap al teixit, alliberant substàncies citotòxiques que produeixen lesions tant al vas com als teixits afectats. La hipòxia seguida de la reoxigenació indueix un increment de l'adhesió de neutròfils a cèl·lules endotelials mitjançada per P-selectina, E-selectina i ICAM-<sup>146</sup>. En diferents models experimentals s'ha demostrat que l'administració d'anticossos monoclonals que bloquegen la P-selectina redueix la lesió que segueix a la isquèmia en diferents teixits com el miocardi, el cervell o el ronyó<sup>147-150</sup>. Les plaquetes també participen activament al dany per isquèmia i reperfusió, ja que mitjançant microscopia intravital s'ha observat que tenen un "rolling" i posterior adhesió sobre les cèl·lules endotelials de la microvasculatura postisquèmica. Un cop activades, les plaquetes generen radicals oxigen i alliberen mediadors proinflamatoris que contribueixen a la lesió del teixit. A més poden modular les respostes funcionals dels leucòcits. Es va veure que el tractament amb anticossos

monoclonals anti-P-selectina disminuïa significativament les interaccions entre plaquetes i endoteli en resposta a la isquèmia i reperfusió<sup>109</sup> i es va descriure que aquesta interacció era depenent de la P-selectina expressada per les cèl·lules endotelials, mentre que la P-selectina expressada en plaquetes promovia la interacció de les plaquetes amb els leucòcits<sup>109</sup>.

La P-selectina també té un important paper en processos trombòtics<sup>151</sup>. Quan es produeix un dany en un vas sanguini es genera una ràpida adhesió de plaquetes en el punt amb lesió i la subseqüent formació d'un trombes. Seguidament els leucòcits interaccionen amb les plaquetes i passen a formar part del trombes, promovent la formació de fibrina i incrementant l'activació de les plaquetes<sup>104</sup>. En un model experimental de trombosi arterial coronària recurrent s'ha descrit que l'expressió de P-selectina a les plaquetes es troba incrementada dins dels trombes en els punts d'estenosi coronària i que la interacció entre P-selectina de les plaquetes i els sucres sialil-Lewis<sup>x</sup> presents a la membrana dels leucòcits té un paper important en la formació de trombes<sup>152</sup>. En un altre estudi *in vitro* amb un sistema artificial de flux sanguini, el tractament amb un anticòs anti-P-selectina va inhibir en un 70% l'adhesió de leucòcits als trombes de plaquetes<sup>153</sup>.

El paper de la P-selectina ha estat avaluat en el trasplantament d'òrgans. El rebuig d'un òrgan trasplantat està associat amb l'activació dels leucòcits, l'oclusió dels vasos sanguinis i amb el dany vascular. Quan es produeix un rebuig en el trasplantaments de ronyó, cor i fetge s'ha vist que hi ha un increment de l'expressió de molècules d'adhesió endotelials, degut probablement a les citoquines generades durant la resposta immune vers als antígens estranys a l'organisme i als efectes de la isquèmia i reperfusió que pateix l'òrgan durant el procés, entre d'altres factors. En un model experimental de trasplantament de cor es va estudiar el paper de la P-selectina en el rebuig agut. Es va observar una marcada expressió de P-selectina en l'endoteli dels empelts

## *Introducció*

cardíacs rebutjats 4 dies després del trasplantament. En aquest estudi, el tractament amb un anticòs anti-P-selectina durant els 5 dies següents al trasplantament va generar un increment en la supervivència de l'empelt<sup>154</sup>. Aquest model de trasplantament cardíac es va utilitzar en un altre estudi amb animals doblement deficients de P-selectina i ICAM-1 per avaluar el paper d'aquestes molècules d'adhesió en el rebuig cardíac més tardà. Es va veure que el dèficit de ICAM-1 i P-selectina en el donant va enrederir el rebuig parenquimal, però no va prevenir l'arteriosclerosi en la vasos vasculars de l'empelt. Per contra, el dèficit d'aquestes molècules en el receptor no va influir en el desenvolupament de l'empelt<sup>155</sup>. Contràriament, un estudi que utilitza el mateix model estableix que la absència de ICAM-1 o P-selectina en els donants no prolonga el temps de supervivència de l'empelt ni inhibeix les lesions vasculars associades amb el rebuig crònic<sup>156</sup>.

L'expressió de P-selectina també ha estat associada a síndromes crònics com l'artritis i el càncer:

S'ha descrit que la P-selectina es troba expressada en les cèl·lules endotelials de les vènules postcapilars sinovials<sup>157</sup> i que anticossos anti-P-selectina poden bloquejar l'adhesió dels monòcits a seccions de teixit sinovial reumatòide<sup>63</sup>. A més, en un model murí d'artritis sèptica induïda per la inoculació de *Staphylococcus aureus* es va observar que animals deficients en P-selectina presentaven una artritis menys severa en els primers estadis de la malaltia amb una hipertròfia sinovial i una destrucció de cartílag i d'os en les articulacions menys intensa que en els animals no deficients<sup>158</sup>.

En quant al càncer, en molts carcinomes les cèl·lules canceroses expressen a la membrana molècules enriquides amb els sucres sialil Lewis<sup>x</sup> i sialil Lewis, que poden interaccionar amb la P-selectina. L'expressió d'aquests carbohidrats es correlaciona amb el progrés del tumors i grau de metàstasi<sup>159</sup>. Durant la metàstasi es formen agregats entre les cèl·lules tumorals, leucòcits i plaquetes que poden interaccionar amb l'endoteli d'òrgans distants. La P-selectina participa

en aquesta interacció i promou el creixement del tumor i la seva metàstasi<sup>160</sup>. En un estudi es va descriure que en animals deficients en P-selectina la presència de plaquetes al voltant de cèl·lules tumorals està molt reduïda i que el nivell de creixement d'un tumor primari induït per la inoculació subcutànea de cèl·lules de carcinoma de colon humà presentava una reducció significant<sup>161</sup>. A més es va veure que la incidència de metàstasi de pulmó al injectar les cèl·lules tumorals intravenosament estava dramàticament reduïda en animals deficients en P-selectina quan es comparaven amb animals control i que la presència de P-selectina facilitava la localització de cèl·lules tumorals en el pulmó, i en menor proporció, en altres òrgans<sup>161</sup>.

En totes aquestes patologies, s'ha vist que la interacció entre leucòcits i les cèl·lules endotelials i leucòcits i plaquetes és un factor important pel desenvolupament de les lesions. Per tant la inhibició d'aquestes interaccions, mitjançant el bloqueig de la expressió i/o la funció de les molècules d'adhesió, té un gran potencial en la teràpia antiinflamatòria i el seu potencial terapèutic està sent intensament investigat.

## 2. JUSTIFICACIÓ DE LA TESI

## 2.1. JUSTIFICACIÓ GENERAL

La P-selectina és una molècula d'adhesió que mitjança la interacció de les cèl·lules endotelials i plaquetes activades amb els leucòcits. Desenvolupa un paper determinant en la resposta inflamatòria, ja que possibilita l'adhesió inicial dels leucòcits circulants a l'endoteli activat, generant un rodament dels leucòcits sobre la paret vascular que és clau per la posterior migració i acumulació dels leucòcits als llocs de lesió, on desenvolupen la seva resposta immunològica. La P-selectina també participa en la trombogènesi, promovent la interacció entre els leucòcits i les plaquetes, de manera que afavoreix la incorporació dels leucòcits als trombes en formació i la seva activació.

La P-selectina juga un paper important en diversos models inflamatoris experimentals i s'ha vist que la seva inhibició, bé mitjançant anticossos que bloquegen la seva funció o generant animals genèticament deficientes en la proteïna, millora l'evolució de la inflamació. Per tant, el bloqueig de la P-selectina en humans podria tenir un elevat potencial terapèutic. Però abans, és important definir amb precisió la seva funció específica en el desenvolupament de respostes inflamatòries concretes, de cara a avaluar l'eficàcia del seu bloqueig com a tractament en desordres inflamatoris. És per això que l'objectiu general de la present tesi és caracteritzar la contribució de la P-selectina als processos inflamatoris.

Amb aquesta fi, el primer treball que ens vam proposar va ser generar anticossos monoclonals específics per la P-selectina que reconeguin epítops conservats de la molècula presents en diferents espècies animals. L'avantatge d'aquests nous anticossos, és que el mateix anticòs pot ser utilitzat en l'estudi de la P-selectina en diferents models animals i posteriorment aplicat a possibles teràpies antiinflamatòries en humans. El següent objectiu va ser la caracterització de la P-selectina porcina, donat el creixent interès dels porcs com a models experimentals i font d'òrgans en xenotrasplantament. La forma soluble



de P-selectina no havia estat prèviament descrita en porcs, per tant vam proposar-nos establir un nou assaig per a la seva detecció, que va implicar la preparació d'un nou anticòs monoclonal específic per la P-selectina porcina. Finalment, vam avaluar el paper de la P-selectina en un model experimental d'inflamació al fetge, similar a l'hepatitis autoimmune humana, on es produeix una gran migració de leucòcits del torrent sanguini cap al parènquima hepàtic i la seva interacció amb plaquetes activades, dos processos en els que la P-selectina hi juga un paper clau.

El conjunt d'aquests treballs proporciona nous anticòs específics per la P-selectina de diverses espècies animals, que constitueixen uns reactius únics tant per la recerca en múltiples models animals com en possibles teràpies antiinflamatòries. A més, han aportat tècniques que milloren l'estudi de la P-selectina en diferents models experimentals i han contribuït a la definició de la funció de la P-selectina en la inflamació.

## 2.2. JUSTIFICACIÓ DE L'ARTICLE N° 1

Production and characterization of monoclonal antibodies against conserved epitopes of P-selectin (CD62P).

Anna Massaguer, Sofía Perez del Pulgar, Jaime Bosch, Pablo Engel, Pilar Pizcueta.

Tissue Antigens 2000, 56: 117-128.

La interacció entre els diferents tipus cel·lulars que intervenen en la resposta inflamatòria és clau pel desenvolupament de posteriors fenòmens fisio-patològics. Aquesta interacció està mitjançada per molècules d'adhesió i per tant, el bloqueig de la funció d'aquestes molècules està essent àmpliament investigat com a mecanisme per a limitar la resposta inflamatòria. En la majoria dels estudis la inhibició

de la funció de la molècula d'adhesió es realitza mitjançant la seva immunoneutralització amb un anticòs monoclonal específic. Aquesta estratègia ha demostrat ser molt efectiva en diversos models animals d'inflamació, tant crònica com aguda, i el seu potencial terapèutic s'ha avaluat en diferents estudis clínics amb humans<sup>162-164</sup>.

En el cas de la P-selectina, el seu bloqueig mitjançant anticossos redueix el "rolling" inicial dels leucòcits sobre l'endoteli inflamat i atenua la interacció entre plaquetes i leucòcits<sup>107;165</sup>. S'ha vist que anticossos monoclonals que bloquegen la funció de la P-selectina poden reduir la progressió de la resposta inflamatòria en diferents models animals<sup>166, 144;147 150 148</sup> i per tant podrien ser valuoses eines de cada a futures teràpies antiinflamatòries.

A la bibliografia hi ha descrits diferents anticossos dirigits contra la P-selectina, però alguns d'ells són policlonals<sup>167-169</sup>, d'altres han estat generats contra la P-selectina humana i tenen una reactivitat creuada amb altres espècies que molts cops ha estat poc caracteritzada, i d'altres s'han generat específicament contra una espècie animal<sup>170-173</sup>. A més, hi ha diferents espècies animals per a les que no es disposa d'anticossos específics per a la P-selectina. L'elevada homologia en l'estructura de la P-selectina entre diferents espècies de mamífers fa difícil obtenir anticossos que reconeixin epítops de la proteïna conservats entre espècies seguint les estratègies habituals de producció d'anticossos.

Per tant, seguint una estratègia basada en la utilització d'animals genèticament deficientes en P-selectina, ens vam proposar generar nous anticossos monoclonals contra epítops conservats de la P-selectina, de manera que un mateix anticòs pogués reconèixer la proteïna en diferents espècies animals. Aquest anticossos serien unes eines molt valuoses i útils per a l'estudi de la P-selectina, ja que podrien ser utilitzat en diferents models animals d'inflamació i posteriorment aplicats en potencials teràpies antiinflamatòries en humans.

## 2.3. JUSTIFICACIÓ DE L'ARTICLE N° 2

### Characterization of -platelet and soluble-porcine P-selectin- (CD62P)

Anna Massaguer, Pablo Engel, Victoria Tovar, Sandra March, Montserrat Rigol, Núria Solanes, Jaume Bosch, Pilar Pizcueta.

Enviat a publicar

Els porcs han esdevinguts models animals de gran valor en la recerca científica degut a que la seva fisiologia és molt similar a la dels humans i al fet de que s'estan establint com a potencial font d'òrgans en xenotransplantament. Però la investigació amb models experimentals porcins es troba amb un greu inconvenient, i és la falta de reactius específics per a les molècules de porc, que fa que moltes molècules amb potencial interès clínic hagin estat poc caracteritzades.

La P-selectina es pot trobar en forma soluble, com a proteïna circulant, al plasma. En humans, nivells augmentats de P-selectina soluble s'han associat a diverses patologies<sup>123-126;129</sup>. Aquesta forma de la P-selectina s'ha descrit que s'origina majoritàriament a partir de RNA amb un processament alternatiu que fa que es perdi la regió transmembrana de la proteïna i per tant que aquesta es secreti directament al medi amb l'activació de la cèl·lula<sup>132</sup>. L'alliberació per mecanismes proteolítics de la P-selectina expressada a la membrana de les cèl·lules també podria contribuir a generar P-selectina soluble<sup>134</sup>. S'ha descrit que la P-selectina circulant al plasma prové principalment de plaquetes activades i la mesura dels nivells de P-selectina soluble s'ha establert com un marcador d'activació plaquetària més fiable que la quantificació de la P-selectina expressada a la superfície de les plaquetes per citometria de flux<sup>174;175</sup>. A més, té l'avantatge que pot ser aplicat com a mètode de monitorització no invasiu.

En el primer treball de la tesi es va produir dos anticossos monoclonals reactius contra la P-selectina de porc. Aquests dos anticossos reconeixen el mateix epítot de la P-selectina, el que fa no puguin ser utilitzats en un assaig ELISA, ja el anticòs de captura i l'anticòs de detecció han d'anar dirigits contra determinats diferent de la proteïna. L'obtenció d'un nou anticòs anti-P-selectina porcina que reconegui un epítot diferent de la proteïna, permetria posar a punt un ELISA per a determinar la P-selectina porcina de forma quantitativa.

Fins al moment només en un article, en el que es va desenvolupar un anticòs contra la P-selectina porcina, s'ha analitzat l'expressió de P-selectina en porc. Aquest treball es va centrar en l'estudi de la inducció de l'expressió de P-selectina per citokines inflamatòries en cèl·lules endotelials porcines<sup>62</sup>. Però l'expressió de P-selectina en plaquetes i la forma circulant de la proteïna en porc no han estat fins al moment estudiades.

Per tant, la caracterització de la P-selectina en plaquetes de porc, així com el desenvolupament d'un sistema ELISA que permeti quantificar la proteïna, té un elevat interès ja que contribuiria a establir el paper de la P-selectina en processos inflamatoris i trombòtics en porc. A més la possibilitat de determinar els nivells de P-selectina circulant mitjançant el sistema ELISA, permetria establir el seu valor clínic en diferents models experimentals i patologies porcines

## 2.4. JUSTIFICACIÓ DE L'ARTICLE N° 3

**Concanavalin-A-induced liver injury is severely impaired in mice deficient in P-selectin.**

Anna Massaguer, Sofía Perez-del-Pulgar, Pablo Engel, Joan Serratosa, Jaime Bosch, Pilar Pizcueta.

Journal of Leukocyte Biology, 2002; 72: 262-270

La Concanavalina A (Con A) és una lectina que activa mitogènicament els limfòcits T i que un cop administrada als ratolins es localitza selectivament al fetge. La hepatitis induïda per Con A s'ha establert com a un model experimental d'hepatitis autoimmune humana<sup>176</sup>. Aquesta hepatitis aguda es caracteritza per la infiltració i activació de leucòcits, majoritàriament limfòcits T, al teixit perivascular i parènquima hepàtic, on segreguen citoquines proinflamatòries que produeixen una degeneració hepatocel·lular massiva que condueix a l'aparició de lesions necròtiques al fetge<sup>177;178</sup>.

La migració dels limfòcits a través de l'endoteli és un requisit indispensable per la seva acció. En aquest procés hi ha implicades diverses molècules d'adhesió. Alguns estudis han analitzat el paper d'algunes molècules com ICAM-1, E-selectina i VCAM-1 en la hepatitis induïda per Con A<sup>179;180</sup>, però la funció de la P-selectina no ha estat establerta.

A més, s'ha descrit que la P-selectina participa en processos inflamatoris del fetge com la endotoxèmia i l'isquèmia i reperfusió hepàtica<sup>181;182</sup>. En aquests processos el dany al teixit està associat a la migració de neutròfils i monòcits. Però el paper de la P-selectina en un procés patològic hepàtic mitjançat per limfòcits T no ha estat descrit.

Per tot això, utilitzant ratolins genèticament deficients de P-selectina i ratolins tractats amb un anticòs bloquejant de la P-selectina, ens vam proposar investigar el paper de la P-selectina en aquest model experimental d'hepatitis autoimmune depenent de limfòcits T i avaluar el seu potencial terapèutic.

### 3. OBJECTIUS

Estudi de la contribució de la P-selectina en els processos inflamatoris.

1. Producció i caracterització d'anticossos monoclonals contra epítops conservats de la P-selectina presents en diferents espècies animals.

- 1.1. Producció d'anticossos monoclonals anti-P-selectina, utilitzant animals genèticament deficients en P-selectina.
- 1.2. Caracterització dels anticossos.
- 1.3. Estudi de la seva reactivitat amb diferents espècies de mamífers.
- 1.4. Desenvolupament d'un ELISA per a quantificar P-selectina soluble en diferents espècies.

2. Caracterització de l'expressió de P-selectina en plaquetes de porc i estudi de la inducció de la forma soluble de P-selectina porcina.

- 2.1. Clonatge del cDNA de P-selectina porcina i preparació de transfectants estables de la proteïna.
- 2.2. Producció i caracterització de nous anticossos monoclonals específics per la P-selectina de porc per a desenvolupar un ELISA per a quantificar la P-selectina porcina.
- 2.3. Caracterització l'expressió P-selectina en plaquetes de porc i anàlisi de la generació de la seva forma soluble.

3. Estudi del paper de la P-selectina en un model experimental d'hepatitis autoimmune induït per Concanavalina A.

- 3.1. Anàlisi de l'expressió de P-selectina a l'endoteli hepàtic i a les plaquetes a diferents temps.
- 3.2. Avaluació del paper de la P-selectina, mitjançant ratolins genèticament deficients de P-selectina i ratolins tractants amb un anticòs bloquejant de la P-selectina, en:
  - . L'adhesió de limfòcits als vasos hepàtics.
  - . Desenvolupament d'hemostàsia intrasinusoidal.
  - . Infiltració de leucòcits a les zones perivasculars hepàtiques.
  - . Evolució del dany hepàtic.

## 4. ARTICLES ORIGINALS



## 4.1. ARTICLE N° 1

**Production and characterization of monoclonal antibodies against conserved epitopes of P-selectin (CD62P).**

Anna Massaguer, Sofía Perez del Pulgar, Jaime Bosch, Pablo Engel, Pilar Pizcueta.

Tissue Antigens 2000, 56: 117-128.

#### 4.1.1. Resum de l'article nº1:

La P-selectina és una molècula d'adhesió implicada en la unió inicial dels leucòcits a l'endoteli inflammat. Estudis amb anticossos monoclonals i animals genèticament deficients en P-selectina han demostrat que la P-selectina pot ser una diana en la teràpia antiinflamatòria. La majoria d'anticossos específics per la P-selectina no reconeixen epítops conservats de la proteïna, ja que la P-selectina de diferents espècies de mamífers conserva una gran homologia en la seva seqüència d'aminoàcids. Per tant, l'objectiu d'aquest treball és generar nous anticossos específics per la P-selectina que siguin reactius contra dominis conservats de la proteïna presents en diferents espècies animals.

Amb aquesta fi, es va immunitzar animals deficients en P-selectina amb cèl·lules murines pre-B transfectades amb el cDNA de la P-selectina humana. Es va obtenir dotze anticossos monoclonals que reconeixen la P-selectina humana (P-sel.KO.2.1-12). Es va determinar quins d'ells eren reactius amb plaquetes activades de rata, ratolí, conill o porc i es van caracteritzar mitjançant citometria de flux, immunohistoquímica, assaigs d'adhesió i immunoprecipitacions.

Quatre dels anticossos (P-sel.KO.2.3, P-sel.KO.2.4, P-sel.KO.2.7, P-sel.KO.2.12) reconeixien P-selectina humana, de rata i ratolí. Els anticossos P-sel.KO.2.2, P-sel.KO.2.11 i P-sel.KO.2.12 van bloquejar la unió de P-selectina al seu lligant, i es va determinar que aquests anticossos s'unien a epítops molt propers de la proteïna. Utilitzant els anticossos P-sel.KO.2.3 i P-sel.KO.2.12, es va dissenyar un assaig ELISA per mesurar la P-selectina soluble humana, de rata i ratolí.

Aquests anticossos són únics en el reconeixement d'epítops conservats de la P-selectina i poden ser molt útils en el seu estudi en models inflamatoris en diferents espècies.

A. Massaguer  
P. Engel  
S. Pérez-del-Pulgar  
J. Bosch  
P. Pizcueta

## Production and characterization of monoclonal antibodies against conserved epitopes of P-selectin (CD62P)

### Key words:

adhesion molecule; inflammation; monoclonal antibody; P-selectin

### Acknowledgments:

We thank Dr. Carlos Enrich (Department of Cellular Biology, Medical School, University of Barcelona, Barcelona, Spain) for providing rabbit anti-ASGPR polyclonal, Dr. Miquel Lozano (Hospital Clínic, Barcelona, Spain) for providing human platelets, and Maria Calvo for helping with immunohistochemistry experiments. We would also like to thank Isabel Sánchez for assistance with the experiments and Anna Bosch for assistance with the confocal microscopy. This study was supported by grants from the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (SAF 96-0120 and SAF 99-0007), the Fondo Investigaciones Sanitarias (FIS 00-0995) and Fundació Clínic per a la Recerca Biomèdica. S.P.P. is a recipient of a grant from Formació del Personal Investigador (FP95 46731316).

**Abstract:** P-selectin (CD62P) is an adhesion molecule expressed on the activated endothelium and activated platelets that is involved in the initial attachment of leukocytes to inflamed vascular endothelium. Blocking monoclonal antibodies (mAbs) and P-selectin-deficient mice have shown that P-selectin is a potential target in anti-inflammatory therapy. Most mAbs against P-selectin do not bind to conserved epitopes, including the ligand-binding region, since P-selectin from mammalian species shares high amino acid sequence homology. The aim of this study was to generate a novel panel of anti-P-selectin mAbs against the conserved epitopes present in several animal species. To produce these mAbs, P-selectin-deficient mice were immunized with a pre-B-cell line transfected with human P-selectin cDNA. Twelve mouse mAbs that recognize human P-selectin were obtained. Individual mAbs that bound to human, rat, mouse, rabbit and pig activated platelets were characterized by flow-cytometry, immunohistochemistry, adhesion assays and immunoprecipitation. Four of these mAbs (P-sel.KO.2.3, P-sel.KO.2.4, P-sel.KO.2.7 and P-sel.KO.2.12) cross-reacted with human, rat and mouse P-selectin. Another three mAbs (P-sel.KO.2.2, P-sel.KO.2.11 and P-sel.KO.2.12) blocked the attachment of HL60 cells to P-selectin-transfected COS cells, demonstrating that these mAbs inhibit P-selectin-mediated adhesion. MAb cross-blocking experiments showed that these three mAbs bind to very close and overlapping epitopes. An ELISA assay using mAbs P-sel.KO.2.3 and P-sel.KO.2.12 was designed to measure soluble rat, mouse and human P-selectin. These anti-P-selectin mAbs are unique since they recognize common epitopes conserved during mammalian evolution and they may be useful for studying P-selectin function in inflammatory models in various species.

### Authors' affiliations:

A. Massaguer<sup>2</sup>,  
P. Engel<sup>2</sup>,  
S. Pérez-del-Pulgar<sup>1</sup>,  
J. Bosch<sup>1</sup>,  
P. Pizcueta<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Hepatic Hemodynamic Laboratory, Liver Unit, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Hospital Clínic, Barcelona, Spain.

<sup>2</sup>Immunology Unit, Department of Cellular Biology and Pathology, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Medical School, University of Barcelona, Spain

### Correspondence to:

Dr. Pilar Pizcueta  
Fundació Clínic per a la Recerca Biomèdica  
C/Villarroel 170  
E-08036 Barcelona  
Spain  
Tel: +34 (3) 2275400  
ext. 2905  
Fax: +34 (3) 4515272  
e-mail:  
pizcueta@medicina.ub.es

L-, P- and E-selectin mediate the initial attachment and rolling of leukocytes to the activated endothelium. These three molecules contain a common structure composed of an amino-terminal lectin domain, an epidermal growth factor (EGF)-like domain, variable number of short consensus repeat (SCR) units, homologous to domains found in complement binding proteins, a transmembrane domain and a cytoplasmic region. Cloning of the selectin genes shows structural and functional conservation during recent mammalian

Received 6 December 1999, revised, accepted for publication 15 May 2000

Copyright © Munksgaard 2000  
Tissue Antigens, ISSN 0001-2815

Tissue Antigens 2000; 56: 117-128  
Printed in Denmark. All rights reserved

evolution since human, mouse, rat and bovine selectins share high amino acid sequence homology (1).

P-selectin is constitutively present in  $\alpha$ -granules of platelets and Weibel-Palade bodies of endothelial cells, and is mobilized to the cell surface after activation by thrombogenic and inflammatory mediators (2, 3). During acute inflammation, surface expression of P-selectin is induced in a few minutes by histamine, thrombin or complement components (4). The expressed P-selectin is then rapidly internalized and resorted to Weibel-Palade bodies or lysosomes for degradation. Prolonged surface expression of P-selectin on endothelial cells has been observed when these cells are stimulated with oxygen radicals, lipopolysaccharides (LPS) or cytokines (5, 6).

P-selectin overexpression has been associated with inflammatory disorders like atherosclerosis, arthritis (7, 8), cancer (9) and acute processes such as thrombosis (10–12), ischaemia-reperfusion injury (13, 14), myocardial infarction (15, 16) or transplant rejection (17, 18). P-selectin has a crucial function in early phases of inflammation regulating the first interaction of leukocytes with the activated endothelium (19) and mediating leukocyte-platelet interactions that enhance the recruitment of leukocytes and platelets to the site of vascular injury (20). Blocking P-selectin function substantially reduces the initial rolling of leukocytes and studies on P-selectin knockout mice show absence of rolling in mesenteric venules, increase the number of circulating neutrophils, and delayed recruitment of neutrophils to the peritoneal cavity upon inflammation (21). Therefore, P-selectin is considered as a target in anti-inflammatory therapy. Hence, the use of specific blocking mAbs is a potential strategy for the treatment of several inflammatory diseases. The study of P-selectin in various animal models is essential to determine the role of this selectin in several inflammatory disorders, since the contribution of each adhesion molecule is specific, depending on the particular type of inflammatory process. However, due to the lack of availability of mAbs specific against P-selectin for many animal species, either polyclonal antibodies or poorly characterized cross-reacting mAbs have been used in most of the studies blocking P-selectin function.

Therefore, the aim of the present study was to produce a new panel of mAbs that could recognize conserved epitopes on P-selectin immunizing P-selectin deficient mice.

## Material and methods

### Animals

C57BL/6 and P-selectin-deficient mice (21) were obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbour, ME, USA). Blood from Sprague-

Dawley rats (Charles River, Saint Aubin-lès-Elbeuf, France) and mice was collected from inferior cava vein. Pig and rabbit blood was withdrawn from superficial ear veins.

The experiments performed in this study were conducted according to the criteria of the Committee for the Care and Use of Laboratory Animals of the Hospital Clinic i Provincial (Barcelona, Spain).

### Cell lines

Murine pre-B-cell line 300.19 (provided by Dr. Streuli, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA, USA) was maintained in complete medium (RPMI 1640 supplemented with 10% fetal calf serum, antibiotics and 10 mmol/l glutamine and 2-mercaptoethanol 50  $\mu$ M) (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA). Stable P-selectin transfectants were produced by transfecting the murine pre-B-cell line 300.19 with human P-selectin c-DNA in pCneo expression vector. The 300.19 cells were transfected by electroporation with subsequent selection of stable transfectants using 1.2 mg/ml of G418 (Gibco-BRL), as previously described (22). HL-60, a human myelo-monocytic cell line and NS-1 myeloma cell lines were obtained from the ATTC and cultured in complete RPMI medium.

### MAb production

MAbs reactive with P-selectin were generated by fusion of NS-1 myeloma cells with splenocytes from a P-selectin deficient mouse, previously immunized three times with P-selectin-transfected 300-19 cells ( $10 \times 10^6$ ). Supernatant fluid from 782 hybridoma-containing wells was screened for mAbs reactive with the cell line used as immunogen. Hybridomas producing antibodies specific for P-selectin were determined by flow-cytometry. Of the screened supernatants, 27 reacted with P-selectin-transfected cells, but not with untransfected 300.19 cells. Twelve of these hybridomas were chosen for further characterization and subcloned by limiting dilution. Antibody isotypes were determined using a mouse mAb isotyping kit (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany). Eight of them were IgG<sub>1</sub>, two IgG<sub>2b</sub>, and two IgG<sub>2a</sub>. MAbs were used either as undiluted culture supernatant or purified with a protein A column (Bio Rad, Hercules, CA, USA) from concentrated supernatant obtained from the culture of the hybridomas in INTEGRA CL 350 flasks (Integra Biosciences AG, Switzerland). Purified mAbs were dialyzed extensively against phosphate-buffered saline (PBS) and stored at  $-20^\circ\text{C}$  and then, some of them were biotinylated using Biotinamidocaproate N-hydroxysuccinimide ester (Sigma, St. Louis, MO, USA).

## Antibodies

The mouse anti-human P-selectin blocking mAb WAPS 12.2 (IgG<sub>1K</sub>) (Zymed, San Francisco, CA, USA) was used as a positive control. An anti-CD41 mAb conjugated to R-Phycoerythrin (R-PE) (Serotec, UK) was used to stain human platelets. Streptavidin-FITC-conjugated (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), streptavidin-RPE-conjugated (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL, USA), FITC-conjugated goat F(ab') anti-mouse IgG(H+L) (Caltag, San Francisco, CA, USA) were used for indirect immunofluorescence staining.

## Platelet isolation

Mouse, rat and rabbit blood was collected into a solution containing 9 parts of PBS and 1 part of acid-citrate-dextrose (38 mmol/l citric acid, 75 mmol/l trisodium citrate, and 100 mmol/l dextrose) and centrifuged at 280 *g* for 5 min at room temperature to obtain platelet-rich plasma (PRP). Platelets were isolated by further centrifugation at 2,000 $\times$ *g* for 6 min and washed twice in PIPES buffer (25 mmol/l PIPES, 137 mmol/l NaCl, 4 mmol/l KCl and 0.1% wt/vol dextrose) pH 6.1. Platelets were then resuspended in PIPES Buffer either at pH 7.0 for experiments using resting platelets or at pH 7.4 to optimize the activation in platelets. To activate platelets, the preparation was incubated with human thrombin (Sigma) 0.2 U/ml for 15 min at 37°C. Thrombin was removed by washing in PIPES buffer, and platelets were resuspended in PBS-0.1% FCS.

Human blood was collected into Vacutainer tubes containing sodium citrate 0.129 M (Becton Dickinson). Blood was centrifuged at 400 $\times$ *g* for 10 min at room temperature to isolate PRP. To obtain porcine platelets, fresh pig blood was collected into 0.38% sodium citrate as anticoagulant. Porcine platelet-rich plasma PRP was removed by centrifugation at 400 $\times$ *g* for 6 min at room temperature. Human and porcine PRP were resuspended with an equal volume of PBS. Platelets were further isolated by centrifugation of PRP at 2,000 $\times$ *g* for 6 min, washed with PBS and centrifuged again at 2,000 $\times$ *g* for 6 min. Platelets were then resuspended with PBS+0.5% FCS. For experiments using activated platelets human and porcine platelets were treated with thrombin (0.1 U/ml) for 10 min at 37°C.

## Immunofluorescence analysis

Indirect immunofluorescence analysis was carried out after washing the cells twice. The cells were incubated for 25 min on ice with 50  $\mu$ l of hybridoma supernatant or with an irrelevant mAb as negative control. Platelets were incubated for 25 min at room temperature.

After washing, the cells were treated for 20 min at 4°C with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-mouse IgG antibodies (Caltag). Fluorescence was analyzed using a FACSCalibur (Becton Dickinson) equipped with the CellQuest<sup>TM</sup> software. Fluorescence intensity was analyzed on a 4 decade log scale (1–10000); 10,000 cells were analyzed for each sample. Cells were identified and gated by their characteristic forward and side scatter. Platelet acquisition was performed at logarithmic scale and human platelets were identified using CD41 mAb.

## Adhesion assay

COS cells were transfected with 4  $\mu$ g of human P-selectin cDNA using the LipofectAMINE Plus<sup>TM</sup> Reagent (Gibco/BRL). After transfection (24 h), the cells were trypsinized and transferred to 35-mm tissue culture dishes and cultured for an additional 24 h. Cell surface P-selectin expression was examined after 48 h by immunohistochemical analysis as described (23) using a P-selectin mAb WAPS 12.2. Cellular adhesion blocking experiments were performed as described (22). P-selectin transfected COS cells were pre-incubated with the P-selectin mAbs for 30 min at 4°C, and HL60 cells were then added to the dishes (2 $\times$ 10<sup>6</sup> HL60 cells/35-mm dish). Cells were incubated for 30 min at 4°C. Adhesion of HL60 cells to COS cells was examined by observing cellular rosettes around transfected COS cells. Blocking mAbs were determined by the absence of rosettes. The binding of HL60 cells to P-Sel COS cells was quantified by counting the number of cells bound per field of COS cells, and calculating the mean number of cells bound per COS cell (22).

## MAb cross-blocking experiments

P-selectin transfected 300.19 cells (1 $\times$ 10<sup>6</sup>) were first incubated with saturating concentrations of test mAb (10  $\mu$ g/ml of purified Ab) for 30 min on ice. After this incubation, biotinylated P-sel.KO.2.12 mAb was added to the tube at suboptimal concentration for immunofluorescence staining (1  $\mu$ g/ml). After 30 min of further incubation, the cells were washed and incubated for 20 min with streptavidin-RPE. After washing the cells twice, the immunofluorescence staining was assessed immediately by flow cytometry.

## Immunoprecipitation analysis

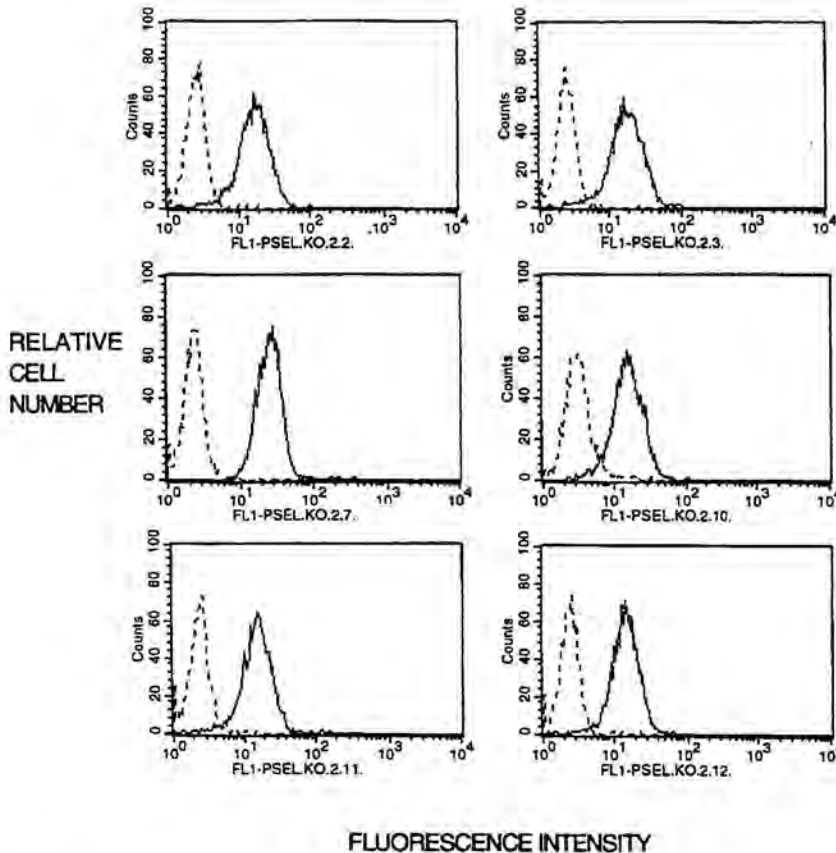
Approximately 6 $\times$ 10<sup>9</sup> human and rat platelets were washed twice in PBS, and then activated with thrombin (Sigma) 0.1 U/ml for 10 min at 37°C. Platelets were then washed again and surface labeled with 300  $\mu$ l of Sulfo-NHS-Biotin 1 mg/ml (Sigma) for 30 min at 4°C as described (24). Cell were lysed and pre-cleared three times for 2 h

at 4°C using 40 µl of protein G Sepharose™ (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) and 10 µg of an unreactive mAb. Immunoprecipitations were carried out using 10 µg of purified P-selectin MAb or 100 µl of hybridoma culture supernatant, and 10 µg of purified CD84 mAb as control. Immunoprecipitates were washed and then analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) as described (24). The samples were run in the presence of 5% 2-mercaptoethanol (reducing conditions). Mr was determined using a pre-stained standard molecular weight marker (Sigma). The proteins were transferred by electroblotting with glycine transfer buffer to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Immobilon; Millipore, Boston, MA, USA), incubated with avidin-peroxidase 100 ng/ml (Sigma). After 45 min the membranes were developed using Amersham's Enhancer Chemoluminescence reagent (Amersham International, Little Chalfont, UK).

**Immunohistochemistry**

The liver of rat treated with LPS (250 µg i.p.) for 4 h was perfused through the portal vein with a peristaltic pump at a rate of 10 ml/

min with PBS (50 ml) followed by 2% paraformaldehyde (w/v) in PBS (40 ml). After perfusion, liver portions (1–1.5 cm<sup>3</sup>) were fixed with 2% paraformaldehyde for 1 h at 4°C and cryoprotected overnight in a 30% sucrose solution (w/v) at 4°C. Frozen liver sections (8 µm) were fixed in 4% paraformaldehyde and permeabilized in 0.1% Triton X-100 in PBS. The liver sections were stained and evaluated for P-selectin expression by double fluorescence immunohistochemistry. Samples were incubated for 1 h at 37°C with mAbs P-sel.KO.2.2, P-sel.KO.2.3, P-sel.KO.2.4, P-sel.KO.2.7, P-sel.KO.2.11 and P-sel.KO.2.12 at 5 µg/ml; mouse anti-RECA-1 mAb (Serotec, UK) was used as positive control, and PBS-1% bovine albumin (BSA) (Sigma) as negative control. The sections were also treated with a rabbit anti-ASGPR (anti-asyaloglycoprotein) polyclonal antibody diluted at 1:150, followed by a 45 min incubation at 37°C with a FITC-labeled sheep anti-rabbit IgG mAb (Roche Diagnostics) at 10 µg/ml and with a cyanine-labeled rabbit anti-mouse IgG mAb (Jackson Immuno Research Labs, West Grove, PA, USA) at 10 µg/ml. All mAbs were diluted in PBS with 1% BSA. Samples were analyzed by confocal microscopy (Leica TCS NT, Heidelberg, Germany).



**Fig. 1.** Specificity of the P-sel.KO.2 mAbs for P-selectin by flow cytometry. Representative histograms obtained after indirect immunofluorescence staining of untransfected 300.19 cells (dashed lines) and 300.19 cells transfected with human P-selectin c-DNA (solid lines) with P-sel.KO.2.2, P-sel.KO.2.3, P-sel.KO.2.7, P-sel.KO.2.10, P-sel.KO.2.11, P-sel.KO.2.12 mAbs. P-sel.KO.2 mAbs stained P-selectin transfected cells being unreactive with untransfected 300.19 cells. Fluorescence intensity is shown on a 4-decade log scale.

### Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for soluble P-selectin

The P-Sel.KO.2.3 mAb, that reacts with human, mouse and rat P-selectin, was used as the capture antibody. Microtiter plates (Costar) were coated overnight at 4°C with P-Sel.KO.2.3 diluted at 4 µg/ml in PBS. The plates were washed three times with PBS containing 0.1% Tween 20 (PBS-T) (Sigma) and blocked with PBS containing 2% BSA for 1 h at 37°C. Rat samples were run in triplicate and diluted 1/10 to obtain a measurement in the linear range of our assay. The samples were incubated for 1 h at room temperature. The presence of soluble P-selectin was revealed incubating with biotinylated P-sel.KO.2.12 (reactive with human, mouse and rat P-selectin) mAb at 4 µg/ml for 1 h at room temperature. After three washes, avidin-peroxidase (Sigma) was added and the activity was measured with 0-phenylene-diamine (0.125% wt/vol) (Sigma) as a substrate. Absorbances at 450 nm were determined using a MRX Microplate ELISA reader (Dynatech, Denkendorf, Germany). To as-

ess the sensitivity and specificity of the ELISA, serial dilutions of recombinant human P-selectin (CD62P) (Bender Medsystems, Vienna, Austria) were used to generate a standard curve.

Rats ( $n=14$ ) were treated intraperitoneally with 5 mg/kg LPS (E.Coli Serotype 011:B4, endotoxin; Sigma) or PBS as control. Whole blood was collected from the cava vein 24 h after the injection. The heparinized blood samples were centrifuged at 1400×g for 7 min at 4°C to remove cells and collect the plasma. Plasma samples were used to determine rat soluble P-selectin.

## Results

### Production of P-selectin mAbs generated in P-selectin-deficient mice

A panel of new mAbs specific for P-selectin was generated by immunizing P-selectin-deficient mice with the 300.19 murine pre-B-cell line transfected with human P-selectin cDNA. Twelve hybridomas producing mAb reactive with P-selectin-transfected cells, but not untransfected 300.19 cells (P-sel.KO.2.1–12) (Fig. 1) were subcloned and further characterized.

To confirm their specificity, these mAbs were also examined by immunofluorescence staining of human resting and thrombin-activated platelets. To identify activated platelets, two-color flow cytometry was performed, with a platelet marker (CD41) in one color and anti-P-selectin mAbs in the other (Fig. 2). All mAbs specifically stained human activated platelets, but did not stain resting platelets (see Table 2).

### Characterization of blocking mAbs

To study the ability of each mAb to block P-selectin-dependent adhesion, intercellular binding assays between HL60 myelomonocytic cell line and cells expressing P-selectin were performed (25). HL60 cells bound to COS cells transfected with P-selectin cDNA but not to cells transfected with the expression vector alone or with an unrelated cDNA (Fig. 3). COS-P-selectin cells were pre-treated with supernatant fluid from the hybridomas and the cellular rosettes formed by HL60 cells were examined. Two mAbs (P-sel.KO.2.2 and P-sel.KO.2.11) completely blocked the binding of HL60 cells to P-selectin transfected-COS cells, whereas mAb P-sel.KO.2.12 blocked 80% of adhesion (Fig. 3). In contrast, irrelevant antibodies used as negative control and the other mAbs produced in the present study had no significant effect on the binding of HL60 cells to COS-P-selectin cells (Table 1, and data not shown).

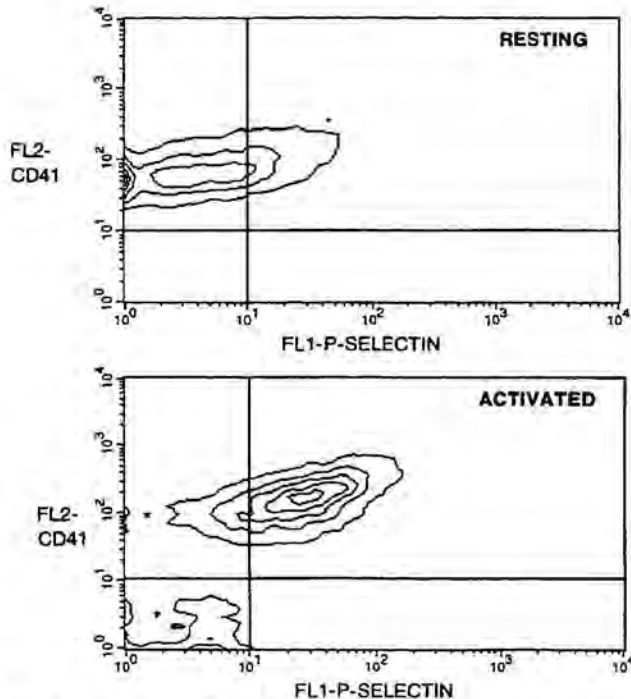
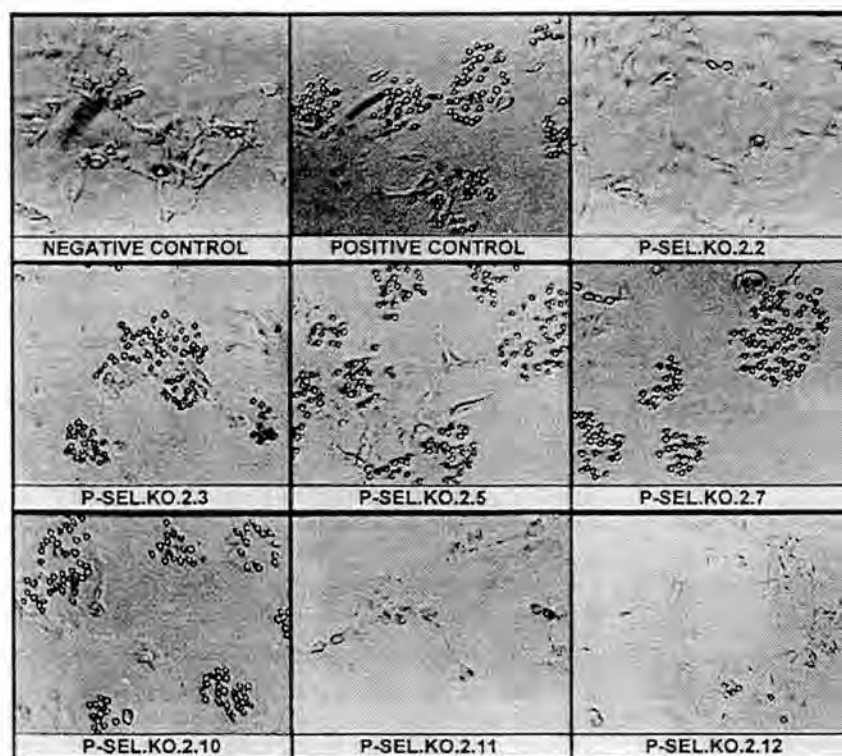


Fig. 2. Reactivity of P-sel.KO.2 mAbs with resting and activated human platelets. Platelets were stained for two-color flow cytometry. Electronic scatter gating was used to select the specific platelet population. Horizontal and vertical lines delineating positive and negative staining were set with appropriate negative control. Each of the P-sel.KO.2 mAbs was reactive with activated platelets.



**Fig. 3. Blocking of P-selectin mediated adhesion by P-sel.KO.2 mAbs.** To determine cellular adhesion blocking mAbs, P-selectin transfected COS cells (positive control) and untransfected COS cells (negative control) were pre-incubated with each of the P-sel mAbs (5 µg/mL) and HL60 cell attachment was assessed. As shown in the figure, P-sel.KO.2.2, P-sel.KO.2.11, and P-sel.KO.2.12 mAbs blocked the interaction of P-selectin transfected cells with HL60.

**Characterization of P-selectin monoclonal antibodies generated in P-selectin-deficient mice**

Antibody	Isotype	Intercellular adhesion-blocking <sup>a</sup>
P-sel.KO.2.1	IgG <sub>1</sub>	-
P-sel.KO.2.2	IgG <sub>2b</sub>	+++
P-sel.KO.2.3	IgG <sub>1</sub>	-
P-sel.KO.2.4	IgG <sub>1</sub>	-
P-sel.KO.2.5	IgG <sub>1</sub>	-
P-sel.KO.2.6	IgG <sub>2a</sub>	-
P-sel.KO.2.7	IgG <sub>1</sub>	-
P-sel.KO.2.8	IgG <sub>1</sub>	-
P-sel.KO.2.9	IgG <sub>1</sub>	-
P-sel.KO.2.10	IgG <sub>2a</sub>	-
P-sel.KO.2.11	IgG <sub>2b</sub>	+++
P-sel.KO.2.12	IgG <sub>1</sub>	++

<sup>a</sup> P-Selectin transfected COS cells were pre-incubated at 4°C with mAbs (5 µg/ml) for 30 min and cultured with HL60 cells to evaluate which mAb blocks P-selectin-mediated cell adhesion. Values represent the amount of blocking of adhesion: +++ (90-100% blocking), ++ (80-90% blocking), - (no significant blocking).

**Table 1**

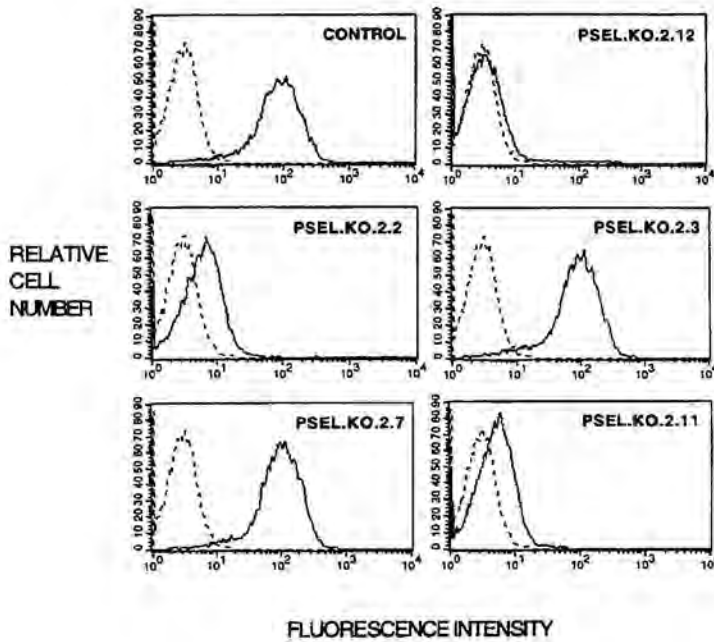
**Epitope analysis of the adhesion-blocking P-Sel.KO.2 mAbs**

Antibody cross-blocking studies with the adhesion-blocking mAbs P-Sel.KO.2.2, P-Sel.KO.2.11 and P-Sel.KO.2.12 showed that these mAbs significantly inhibited binding of fluorochrome-labeled P-Sel.KO.2.12 mAb to P-selectin transfected cells. As shown in Fig. 4, the blocking effect of P-Sel.KO.2.2 and P-Sel.KO.2.11 was not complete (68% and 84%, respectively). This partial blocking effect was not attributed to a low concentration of these mAb because higher concentrations of the mAb blocked to a similar extent (data not shown). These results indicate that these three mAbs recognize distinct but overlapping epitopes. In contrast, P-Sel.KO.2.3 and P-Sel.KO.2.7, that do not block P-selectin adhesion, had no significant blocking effect on P-Sel.KO.2.12 binding (Fig. 4).

**Reactivity of P-selectin mAbs with different species**

The anti-P-selectin mAbs were examined by indirect immunofluorescence with thrombin-activated platelets from mouse, rat, pig and rabbit. Five of the mAbs (P-sel.KO.2.3, P-sel.KO.2.4, P-sel.KO.2.7, P-sel.KO.2.10 and P-sel.KO.2.12) recognized platelets from wild-type mice but did not react with platelet from P-selectin deficient mice.





**Fig. 4. Epitope analysis of the adhesion-blocking P-Sel.KO.2 mAbs.** Cross-blocking of P-Sel.KO.2.12 binding to P-Selectin transfected cells by P-sel.KO.2.12, P-Sel.KO.2.2 and P-Sel.KO.2.11 mAbs. Cells were incubated with media (control), or saturating amounts of P-Sel.KO.2.12, P-Sel.KO.2.2, P-Sel.KO.2.3, P-Sel.KO.2.7 and P-Sel.KO.2.11 before treatment with biotinylated P-sel.KO.2.12 mAb. Solid lines indicate the fluorescence intensity of biotinylated P-sel.KO.2.12-treated cells stained with streptavidin-RPE as assessed by flow cytometry. Dotted lines indicate background staining with streptavidin-RPE alone.

Five mAbs (P-sel.KO.2.3, P-sel.KO.2.4, P-sel.KO.2.7, P-sel.KO.2.11, and P-sel.KO.2.12) were reactive with rat activated platelets (Table 2). Two mAbs stained porcine activated platelets (P-sel.KO.2.5 and P-sel.KO.2.9) and one mAb stained rabbit activated platelets (P-sel.KO.2.10) (Table 2). Flow cytometric analysis also indicated that four

of the mAbs (P-sel.KO.2.3, P-sel.KO.2.4, P-sel.KO.2.7, and P-sel.KO.2.12) identified human, rat and mouse P-selectin (Fig. 5), indicating that these 4 mAbs recognize an epitope that is highly conserved in these species. Hence, the reactivity of these new mAbs is not restricted to human P-selectin, and these mAbs recognized P-selectin of several other mammalian species.

**Reactivity of P-Selectin antibodies with human, mouse, rat, pig and rabbit activated platelets**

Antibody	Reactivity with platelets <sup>a</sup>				
	human	mouse	rat	pig	rabbit
P-sel.KO.2.1	+++	-	-	-	-
P-sel.KO.2.2	++	-	-	-	-
P-sel.KO.2.3	++++	++++	+++	-	-
P-sel.KO.2.4	++++	+++	+++	-	-
P-sel.KO.2.5	++	-	-	+++	-
P-sel.KO.2.6	+++	-	-	-	-
P-sel.KO.2.7	++++	++++	+++	-	-
P-sel.KO.2.8	++	-	-	-	-
P-sel.KO.2.9	++	-	-	++	-
P-sel.KO.2.10	++	++	-	-	+++
P-sel.KO.2.11	+++	-	++	-	-
P-sel.KO.2.12	++	++	++	-	-

<sup>a</sup> Mean fluorescence staining intensities of the mAbs were determined by flow cytometry of activated platelets: -, no reactivity above background staining with + to ++++ indicating increasing fluorescence intensity.

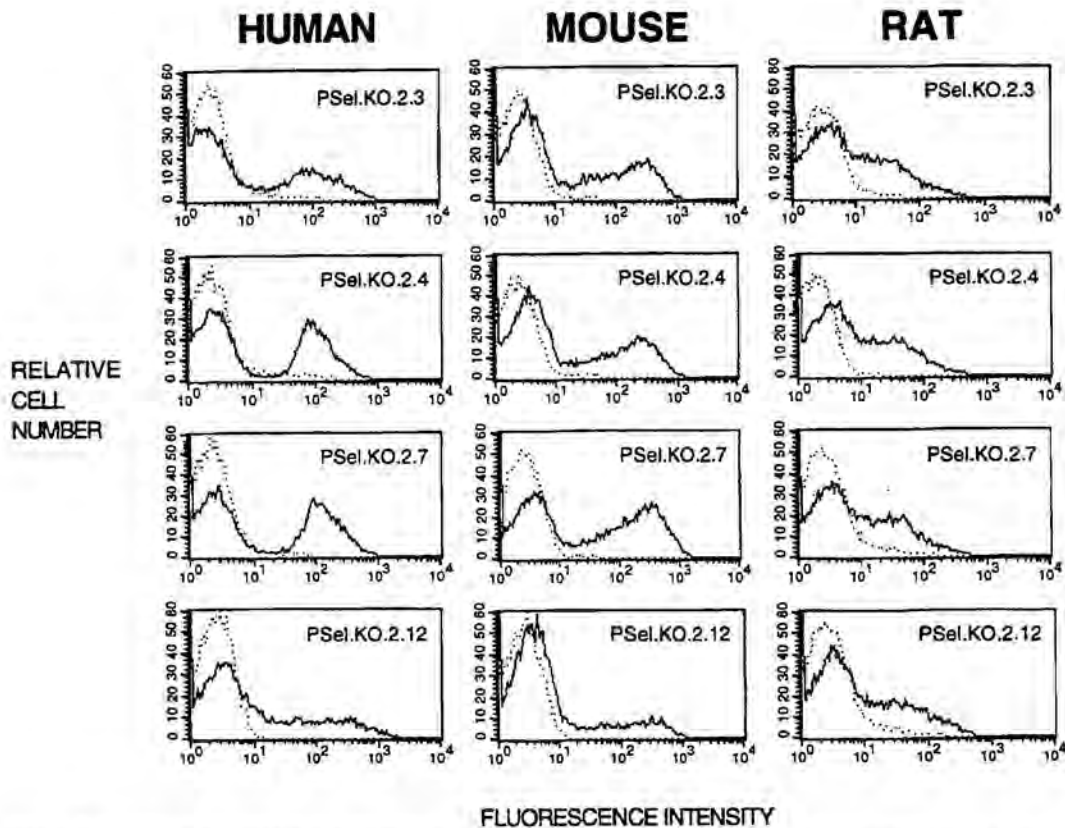
**Table 2**

To further show the specificity of these mAbs, P-selectin staining was evaluated in rat liver tissue from LPS-treated animals by immunohistochemistry. Liver sections were incubated with the mAbs reactive with rat activated platelets. As shown in Fig. 6, mAbs P-sel.KO.2.3, P-sel.KO.2.4, P-sel.KO.2.7, P-sel.KO.2.11 and P-sel.KO.2.12 specifically stained LPS-activated endothelial cells, whereas P-sel.KO.2.2 that only recognizes human P-selectin did not stain activated endothelium.

**Immunoprecipitation of the generated mAbs**

All mAbs specifically immunoprecipitated a protein that migrated as a single band of 140 kDa, which corresponds to the Mr of P-selectin (Fig. 7, data not shown).

Moreover, P-sel.KO.2.2 and P-sel.KO.2.3 were evaluated for immunoprecipitation using rat platelets. P-sel.KO.2.3 mAb precipitated a band of approximately 140 kDa (Fig. 8). P-sel.KO.2.2 did not immunoprecipitate any specific band, consistent with the finding that the reactivity of this mAb is restricted to human P-selectin (Table 2).



**Fig. 5.** Reactivity of P-sel.KO.2.3, P-sel.KO.2.4, P-sel.KO.2.7 and P-sel.KO.2.12 mAbs with human, mouse and rat platelets. Representative flow cytometry histograms obtained after indirect immunofluor-

escence staining of activated platelets are depicted as solid lines. Staining of resting platelets are shown as dotted lines. Fluorescence intensity is shown on a 4-decade log scale.

**Detection of soluble P-selectin by ELISA**

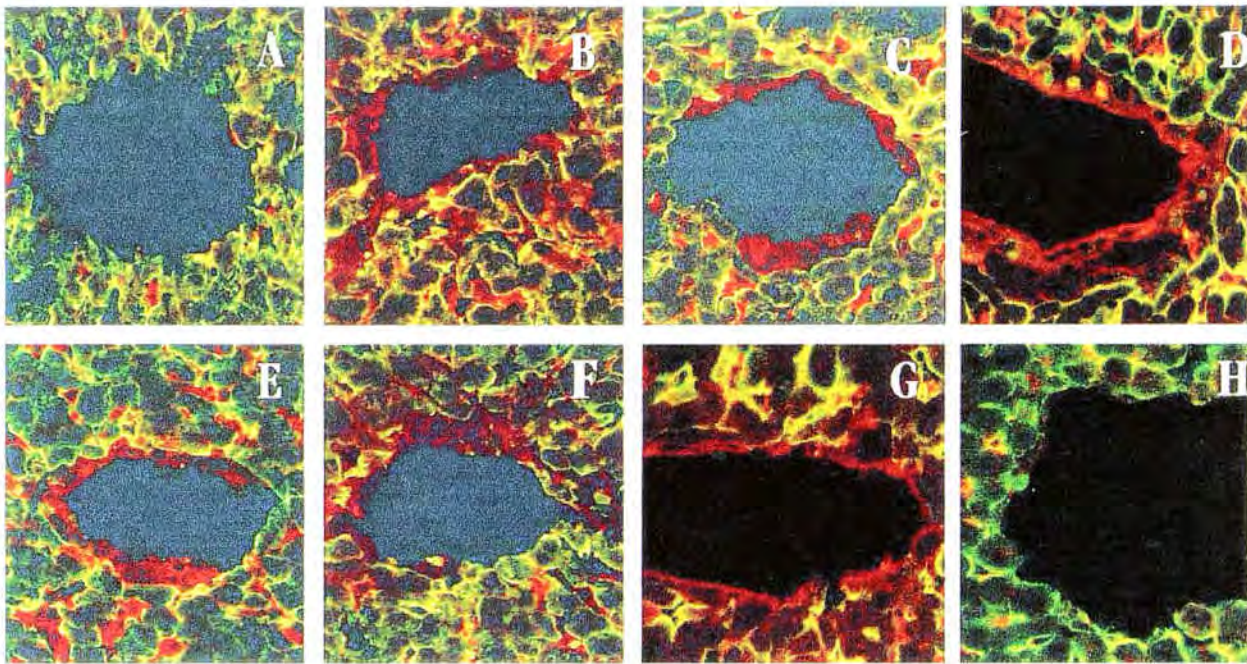
The quantification of soluble P-selectin may be specially useful for *in vivo* studies since activated platelets tend to be sequester in the organs involved in the pathogenic process. A sandwich ELISA was developed with the P-Sel.KO.2.3 and P-Sel.KO.2.12 mAbs. These two mAbs were chosen since they bind to non-overlapping epitopes and react with human, mouse and rat P-selectin. This assay successfully detected recombinant human P-selectin in a dose-dependent manner (Fig. 9A). The semi-logarithmic representation of the results showed a standard curve with a range from 2 ng/ml to 140 ng/ml with a correlation of  $r=0.9793$ . The sensitivity of the assay was about 1 ng/ml of soluble P-selectin. This ELISA system was used to detect rat soluble P-selectin (Fig. 9B). In order to induce the presence of soluble P-selectin in the plasma, rats were treated with LPS. The mean O.D. value was  $0.116 \pm 0.042$  for control rats vs.  $0.451 \pm 0.096$  for LPS-treated rat plasma, ( $P < 0.05$ ); showing that treatment of animals with LPS induced a four-fold increase of soluble P-selectin

levels. These results demonstrate that this ELISA system could be a useful technique to detect soluble human and rat P-selectin.

**Discussion**

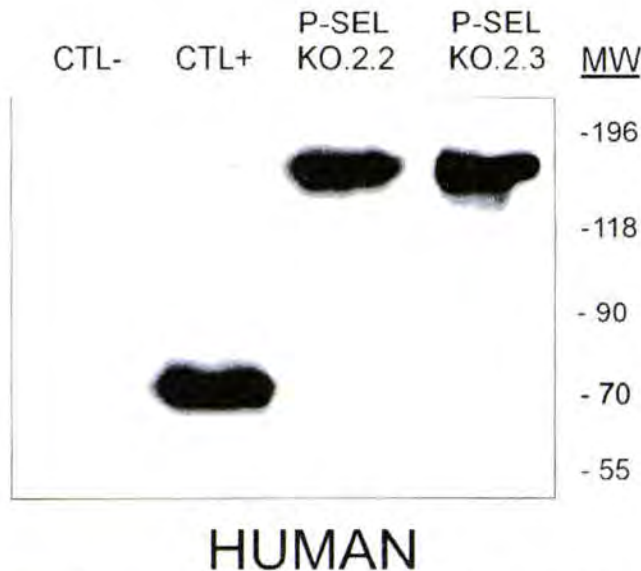
New strategies in anti-inflammatory research are focused on the inhibition of cell adhesion molecules. Therapeutic agents that block selectin function such as mAbs have been shown to reduce the progression of inflammatory response in several animal models (11, 26, 27).

P-selectin has been proposed to play a crucial role in various pathologies as shown in experiments using several animal models of myocardial infarction (26, 28), inflammatory lung injury (29–31), intestinal ischaemia-reperfusion injury (32, 33), delayed-type hypersensitivity (DTH) (34) and arthritis (8). However, most of these studies were performed using either polyclonal antibodies (35–37)



**Fig. 6.** P-selectin staining of liver sections from a LPS-treated rat. Hepatocytes (green) were localized using a rabbit anti-asialoglycoprotein (ASGPR) polyclonal antibody and a FITC-labeled anti-rabbit IgG mAb. In the negative control sample there was no staining of the endothelium (A).

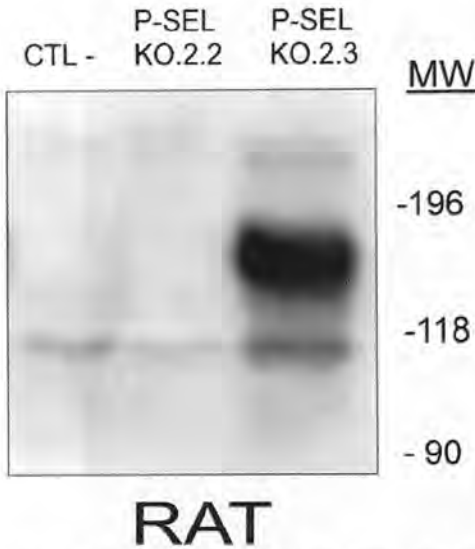
Endothelial cells (red) were detected with a mouse anti-RECA-1 monoclonal antibody (B). Strong P-selectin staining of endothelial cells with the mAbs P-sel.KO.2.3 (C), P-sel.KO.2.4 (D), P-sel.KO.2.7 (E), P-sel.KO.2.11 (F) and P-sel.KO.2.12 (G). No staining of the endothelium with P-sel.KO.2.2 (H).



**Fig. 7.** Immunoprecipitation of P-selectin from human platelets with P-sel.KO.2.2 and P-sel.KO.2.3 mAbs. Human activated and surface biotinylated platelets were lysed and immunoprecipitated with P-sel.KO.2.2 and P-sel.KO.2.3 mAbs. A mAb against CD84 was used as positive control, and an irrelevant mAb as negative control. Samples were run on a SDS-PAGE gel under reducing conditions and blotted onto PVDF membrane. Membrane was treated with HRP avidin and the bands developed. Molecular weight markers (kDa) are indicated.

or murine anti-human monoclonal antibodies that were cross-reactive with other animal species (10, 16, 27, 32). The flaw of these antibodies is that only a small fraction of them are cross-reactive, due to the high sequences homology of P-selectin in mammalian species.

The production of mAbs immunizing mice that lack a specific gene product due to target gene inactivation (knockout (KO)-mice) was first described by Roes et al. (38). This strategy is based on immunological tolerance, which restricts the production of mAbs to determinants different from those of the host animal. A broad spectrum of mAbs specific for a large number of determinants can be generated since the product of the inactivated gene would therefore be recognized as 'foreign' by the immune system and induce a very efficient antibody response. MAbs produced in this way recognize epitopes of the homologous gene product of different species including mouse (38, 39). In this study, a panel of 12 new mAbs directed against P-selectin were developed by immunizing P-selectin-deficient mice with the mouse pre-B-cell line 300.19 transfected with human P-selectin cDNA, in order to generate mAbs against human P-selectin which could also recognize evolutionary conserved epitopes. Each mAb reacted with human P-selectin cDNA-transfected cells but not with untransfected parental cells. In addition, the mAbs stained activated human platelets, but not resting platelets.

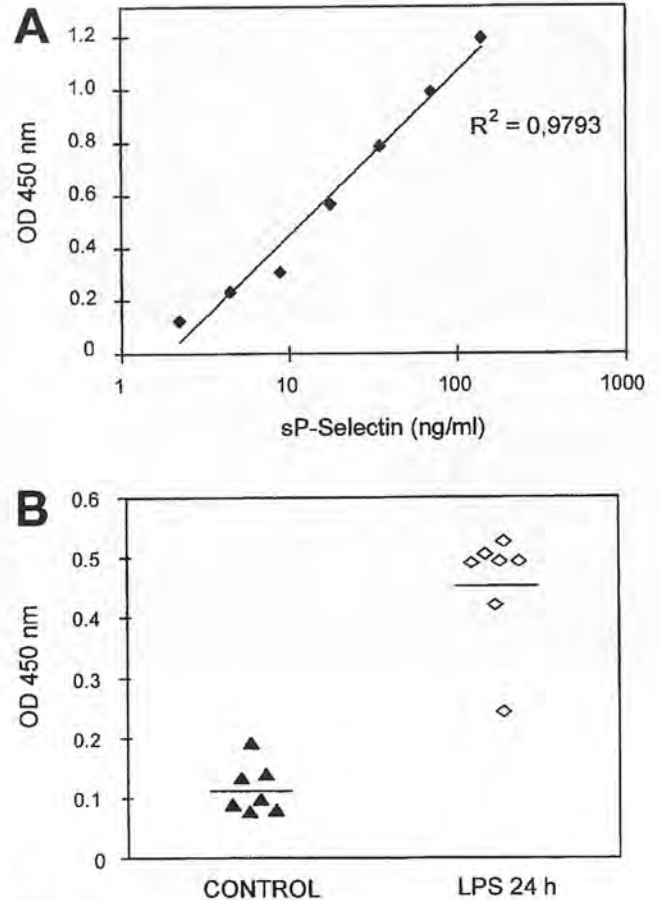


**Fig. 8. Immunoprecipitation of P-selectin from rat platelets with P-sel.KO.2.2 and P-sel.KO.2.3. mAbs.** Rat-activated and biotin-labeled platelets were lysed and immunoprecipitated with P-sel.KO.2.2 and P-sel.KO.2.3 mAbs. An irrelevant mAb was used as negative control. Immunoprecipitates were analyzed as described for human platelets.

Furthermore, the mAbs immunoprecipitated a 140-kDa protein, corresponding to the molecular weight described for human P-selectin, consistent with their recognition of P-selectin on activated platelets (40). Three of the 12 mAbs, P-sel.KO.2.2, P-sel.KO.2.11 and P-sel.KO.2.12, blocked (80–100%) the binding of HL60 cells to P-selectin-transfected COS cells, demonstrating that these mAbs recognize the ligand binding site on P-selectin. The rest of the mAbs had little or no effect on cell binding. Cross-blocking assays show that P-sel.KO.2.2 and 2.11 recognize distinct epitopes but in close proximity to the epitope identified by P-sel.KO.2.12. In contrast, P-sel.KO.2.3 and 2.7 mAbs did not inhibited P-sel.KO.2.12 binding, indicating that these two non-blocking mAbs react with different epitopes from those detected by blocking mAbs.

Eight out of the 12 mAbs described in this paper cross-reacted with other animal species; five mAbs (P-sel.KO.2.3, P-sel.KO.2.4, P-sel.KO.2.7, P-sel.KO.2.10, and P-sel.KO.2.12) reacted with mouse P-selectin, five mAbs (P-sel.KO.2.3, P-sel.KO.2.4, P-sel.KO.2.7, P-sel.KO.2.11, and P-sel.KO.2.12) against rat P-selectin. P-sel.KO.2.5 and P-sel.KO.2.9 recognized pig P-selectin, and P-sel.KO.2.10 bound rabbit P-selectin. From the three adhesion-blocking mAbs, two (Psel.KO.2.11 and Psel.KO.2.12) recognized at least two of the tested species.

Since, platelets tend to be sequestered in the organs involved in the pathologic process (41, 42), the detection of soluble CD62P has been shown to be a good marker to monitor platelet activation in



**Fig. 9. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for soluble P-selectin.** Detection of human recombinant soluble P-selectin. The average absorbance values at 450 nm for each set of dilutions was determined (A). Detection of soluble rat P-selectin in plasma. Plasma samples were obtained from PBS, as control (▲) (n=7), and LPS (5 mg/kg, i.p.) treated rats (◇) (n=7), 24 h after injection (B).

inflammatory and thrombotic events (43–45). The ELISA assay described in the present study is very sensitive and useful for measuring soluble P-selectin from several species.

In conclusion, the mAbs produced and characterized in this study recognize conserved epitopes of P-selectin. These mAbs may prove to be useful in studying the role of this adhesion molecule in inflammation in a large number of experimental models, and may eventually be used as therapeutic agents in humans. However, more investigation prior to the use of these mAbs in human therapy has to be done to exclude reactivity with other molecules which share high homology with P-selectin. These mAbs might also be helpful in the diagnosis of platelet activation and adhesion in several animal species.

## References

1. Tedder TF, Steeber DA, Chen A, Engel P. The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J* 1995; 9: 866-73.
2. McEver RP, Beckstead JH, Moore KL, Marshall-Carlson L, Bainton DF. GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J Clin Invest* 1989; 84: 92-9.
3. Berman CL, Yeo EL, Wencel-Drake JD, Furie BC, Ginsberg MH, Furie B. A platelet alpha granule membrane protein that is associated with the plasma membrane after activation. Characterization and subcellular localization of platelet activation-dependent granule-external membrane protein. *J Clin Invest* 1986; 78: 130-7.
4. Geng JG, Bevilacqua MP, Moore KL et al. Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. *Nature* 1990; 343: 757-60.
5. Gotsch U, Jager U, Dominis M, Vestweber D. Expression of P-selectin on endothelial cells is upregulated by LPS and TNF-alpha *in vivo*. *Cell Adhes Commun* 1994; 2: 7-14.
6. Sanders WE, Wilson RW, Ballantyne CM, Beaudet AL. Molecular cloning and analysis of *in vivo* expression of murine P-selectin. *Blood* 1992; 80: 795-800.
7. Bevilacqua MP, Nelson RM, Mannori G, Cecconi O. Endothelial-leukocyte adhesion molecules in human disease. *Annu Rev Med* 1994; 45: 361-78.
8. Birner U, Issekutz TB, Issekutz AC. The role of selectins in VLA-4 and CD18-independent neutrophil migration to joints of rats with adjuvant arthritis. *Eur J Immunol* 1999; 29: 1094-100.
9. Vijayan KV, Advani SH, Zingde SM. Chronic myeloid leukemic granulocytes exhibit reduced and altered binding to P-selectin: modification in the CD15 antigens and sialylation. *Leuk Res* 1997; 21: 59-65.
10. Eguchi H, Ikeda H, Murohara T et al. Endothelial injuries of coronary arteries distal to thrombotic sites: role of adhesive interaction between endothelial P-selectin and leukocyte sialyl LewisX. *Circ Res* 1999; 84: 525-35.
11. Downing LJ, Wakefield TW, Strieter RM et al. Anti-P-selectin antibody decreases inflammation and thrombus formation in venous thrombosis. *J Vasc Surg* 1997; 25: 816-27.
12. Palabrica T, Lobb R, Furie BC et al. Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated *in vivo* by P-selectin on adherent platelets. *Nature* 1992; 359: 848-51.
13. Massberg S, Enders G, Leiderer R et al. Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin. *Blood* 1998; 92: 507-15.
14. Kurose I, Wolf R, Cerwinka W, Granger DN. Microvascular responses to ischemia/reperfusion in normotensive and hypertensive rats. *Hypertension* 1999; 34: 212-6.
15. Ohnishi M, Yamada K, Morooka S, Tojo SJ. Inhibition of P-selectin attenuates neutrophil-mediated myocardial dysfunction in isolated rat heart. *Eur J Pharmacol* 1999; 366: 271-9.
16. Chen LY, Nichols WW, Hendricks JB, Yang BC, Mehta JL. Monoclonal antibody to P-selectin (PBL3) protects against myocardial reperfusion injury in the dog. *Cardiovasc Res* 1994; 28: 1414-22.
17. Talbott GA, Sharar SR, Harlan JM, Winn RK. Leukocyte-endothelial interactions and organ injury: the role of adhesion molecules. *New Horiz* 1994; 2: 545-54.
18. Pinsky DJ, Naka Y, Liao H et al. Hypoxia-induced exocytosis of endothelial cell Weibel-Palade bodies. A mechanism for rapid neutrophil recruitment after cardiac preservation. *J Clin Invest* 1996; 97: 493-500.
19. Jones DA, Abbassi O, McIntire LV, McEver RP, Smith CW. P-selectin mediates neutrophil rolling on histamine-stimulated endothelial cells. *Biophys J* 1993; 65: 1560-9.
20. Kuijper PH, Gallardo Torres HI, van der Linden JA et al. Platelet-dependent primary hemostasis promotes selectin- and integrin-mediated neutrophil adhesion to damaged endothelium under flow conditions. *Blood* 1996; 87: 3271-81.
21. Mayadas TN, Johnson RC, Rayburn H, Hynes RO, Wagner DD. Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P-selectin-deficient mice. *Cell* 1993; 74: 541-54.
22. Engel P, Nojima Y, Rothstein D et al. The same epitope on CD22 of B lymphocytes mediates the adhesion of erythrocytes, T and B lymphocytes, neutrophils, and monocytes. *J Immunol* 1993; 150: 4719-32.
23. Engel P, Wagner N, Miller AS, Tedder TF. Identification of the ligand-binding domains of CD22, a member of the immunoglobulin superfamily that uniquely binds a sialic acid-dependent ligand. *J Exp Med* 1995; 181: 1581-6.
24. de la Fuente MA, Pizcueta P, Nadal M, Bosch J, Engel P. CD84 leukocyte antigen is a new member of the Ig superfamily. *Blood* 1997; 90: 2398-405.
25. Ley K, Tedder TF, Kansas GS. L-selectin can mediate leukocyte rolling in untreated mesenteric venules *in vivo* independent of E- or P-selectin. *Blood* 1993; 82: 1632-8.
26. Weyrich AS, Ma XY, Lefer DJ, Albertine KH, Lefer AM. *In vivo* neutralization of P-selectin protects feline heart and endothelium in myocardial ischemia and reperfusion injury. *J Clin Invest* 1993; 91: 2620-9.
27. Winn RK, Liggett D, Vedder NB, Paulson JC, Harlan JM. Anti-P-selectin monoclonal antibody attenuates reperfusion injury to the rabbit ear. *J Clin Invest* 1993; 92: 2042-7.
28. Momii H, Shimokawa H, Oyama J et al. Inhibition of adhesion molecules markedly ameliorates cytokine-induced sustained myocardial dysfunction in dogs *in vivo*. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30: 2637-50.
29. Ohnishi M, Imanishi N, Tojo SJ. Protective effect of anti-P-selectin monoclonal antibody in lipopolysaccharide-induced lung hemorrhage. *Inflammation* 1999; 23: 461-9.
30. Hayashi H, Koike H, Kurata Y, Imanishi N, Tojo SJ. Protective effects of sialyl Lewis X and anti-P-selectin antibody against lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rabbits. *Eur J Pharmacol* 1999; 370: 47-56.

31. Mulligan MS, Polley MJ, Bayer RJ, Nunn MF, Paulson JC, Ward PA. Neutrophil-dependent acute lung injury. Requirement for P-selectin (GMP-140). *J Clin Invest* 1992; **90**: 1600-7.
32. Davenpeck KL, Gauthier TW, Albertine KH, Lefer AM. Role of P-selectin in microvascular leukocyte-endothelial interaction in splanchnic ischemia-reperfusion. *Am J Physiol* 1994; **267**: H622-30.
33. Carden DL, Young JA, Granger DN. Pulmonary microvascular injury after intestinal ischemia-reperfusion: role of P-selectin. *J Appl Physiol* 1993; **75**: 2529-34.
34. Tipping PG, Huang XR, Berndt MC, Holdsworth SR. P-selectin directs T lymphocyte-mediated injury in delayed-type hypersensitivity responses: studies in glomerulonephritis and cutaneous delayed-type hypersensitivity. *Eur J Immunol* 1996; **26**: 454-60.
35. Nolte D, Schmid P, Jager U et al. Leukocyte rolling in venules of striated muscle and skin is mediated by P-selectin, not by L-selectin. *Am J Physiol* 1994; **267**: H1637-42.
36. Coughlan AF, Hau H, Dunlop LC, Berndt MC, Hancock WW. P-selectin and platelet-activating factor mediate initial endotoxin-induced neutropenia. *J Exp Med* 1994; **179**: 329-34.
37. Coughlan AF, Berndt MC, Dunlop LC, Hancock WW. *In vivo* studies of P-selectin and platelet activating factor during endotoxemia, accelerated allograft rejection, and discordant xenograft rejection. *Transplant Proc* 1993; **25**: 2930-1.
38. Roes J, Muller W, Rajewsky K. Mouse anti-mouse IgD monoclonal antibodies generated in IgD-deficient mice. *J Immunol Methods* 1995; **183**: 231-7.
39. Steeber DA, Engel P, Miller AS, Sheetz MP, Tedder TF. Ligand of L-selectin through conserved regions within the lectin domain activates signal transduction pathways and integrin function in human, mouse, and rat leukocytes. *J Immunol* 1997; **159**: 952-63.
40. Gu J, Liu Y, Xia L et al. Construction and expression of mouse-human chimeric antibody SZ-51 specific for activated platelet P-selectin. *Thromb Haemost* 1997; **77**: 755-9.
41. Männel DN, Grau GE. Role of platelet adhesion in homeostasis and immunopathology. *J Clin Pathol Mol Pathol* 1997; **50**: 175-85.
42. Blann AD, Lip GY, Islim IF, Beevers DG. Evidence of platelet activation in hypertension. *J Hum Hypertens* 1997; **11**: 607-9.
43. Katayama M, Handa M, Araki Y et al. Soluble P-selectin is present in normal circulation and its plasma level is elevated in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura and haemolytic uraemic syndrome. *Br J Haematol* 1993; **84**: 702-8.
44. Frijns CJ, Kapelle LJ, van Gijn J, Nieuwenhuis HK, Sixma JJ, Fijnheer R. Soluble adhesion molecules reflect endothelial cell activation in ischemic stroke and in carotid atherosclerosis. *Stroke* 1997; **28**: 2214-8.
45. Blann AD, Lip GYH, Beevers DG, McCollum CN. Soluble P-selectin in atherosclerosis: A comparison with endothelial cell and platelet markers. *Thromb Haemost* 1997; **77**: 1077-80.

## 4.2. ARTICLE N° 2

**Characterization of  $\alpha$ -platelet and soluble-porcine-P-selectin (CD62P).**

Anna Massaguer, Pablo Engel, Victoria Tovar, Sandra March, Montserrat Rigol, Núria Solanes, Jaume Bosch, Pilar Pizcueta.

Enviat a publicar

#### 4.2.1. Resum de l'article nº2:

La P-selectina (CD62P) pot trobar-se com a proteïna circulant en el plasma d'individus sans i la seva concentració incrementa en diferents situacions patològiques. Hi ha espècies animals, entre les que es troba el porc, on no s'ha caracteritzat aquesta forma soluble de P-selectina degut a la manca de reactius específics. L'objectiu d'aquest article és analitzar l'expressió de P-selectina en plaquetes de porc i estudiar la seva forma soluble. Per això es va produir un nou anticòs monoclonal (SwPsel.1.9) específic per a la P-selectina porcina, que juntament amb un anticòs prèviament obtingut al nostre laboratori, va permetre desenvolupar un ELISA per a mesurar la P-selectina de porc. No es va detectar nivells significants de P-selectina soluble en el plasma d'animals sans, però la seva concentració va augmentar després de sotmetre als animals a un alotrasplantament de l'artèria femoral. Es va quantificar la concentració de P-selectina continguda en les plaquetes de porc, observant-se que és similar a la dels humans. L'expressió de P-selectina a la membrana de les plaquetes es va induir ràpidament *in vitro* després del tractament amb trombina i PMA, però aquests activadors no van estimular l'alliberament de P-selectina soluble. El tractament amb PMA tampoc va induir l'eliminació proteolítica de la P-selectina expressada a la membrana de cèl·lules COS transfectades. Aquestes dades senyalen que la P-selectina soluble podria ser utilitzada com un indicador de lesions inflamatòries i trombosi en porc i que aquesta es genera per mecanismes diferents de la seva eliminació proteolítica des de la membrana de les plaquetes.



## **Characterization of $\alpha$ -platelet and soluble-porcine P-selectin (CD62P)**

Anna Massaguer<sup>abd</sup>, Pablo Engel<sup>ad\*</sup>, Victoria Tovar<sup>ad</sup>, Sandra March<sup>ad</sup>, Montserrat Rigol<sup>cd</sup>, Núria Solanes<sup>cd</sup>, Jaume Bosch<sup>bd</sup>, Pilar Pizcueta<sup>bd</sup>.

<sup>a</sup>Immunology Unit, Department of Cellular Biology and Pathology, Medical School, University of Barcelona; <sup>b</sup>Hepatic Hemodynamic Laboratory, Liver Unit, Hospital Clinic and <sup>c</sup>Cardiovascular Institute, Hospital Clinic. <sup>d</sup>Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain.

\*Corresponding Author: Dr. Pablo Engel, Unidad de Inmunología, Departamento de Biología Celular, Facultad de Medicina, C/Casanova 143, Barcelona E-08036, Spain.

E-mail address: [engel@medicina.ub.es](mailto:engel@medicina.ub.es).

Phone: +34 93 227 54 00 ext. 2905; FAX No: +34 93 451 52 72

## **Abstract**

P-selectin (CD62P), an adhesion molecule expressed on activated endothelial cells and platelets, mediates the initial attachment of leukocytes to the stimulated endothelium upon inflammation and the interaction between leukocytes and platelets. A soluble form of P-selectin is present in the serum of healthy individuals as a circulating protein and high levels have been described in various pathological situations. The aim of this study was to characterize P-selectin on porcine platelets and investigate the soluble form of this protein, which are uncharacterised in several animal species including pigs. A new monoclonal antibody (mAb) (SwPsel.1.9) against porcine P-selectin was produced using a mouse cell line transfected with pig P-selectin cDNA. This mAb together with a previously described mAb (P-sel.KO.2.5), produced in our laboratory, was used to develop an ELISA to quantify porcine P-selectin. No significant levels of soluble porcine P-selectin were observed in healthy animals. However, the total amount of P-selectin measured in porcine platelets was similar to that found in humans. Increased levels of this circulating protein were detected in the plasma from pigs after allograft implantation. In vitro, P-selectin expression on platelet membrane was rapidly induced by PMA and thrombin, as assessed by flow cytometry. However, these activators did not stimulate the release of soluble P-selectin. Analysis of the proteolytic cleavage of this protein from COS-transfected cells revealed that PMA treatment failed to cause the shedding of membrane-bound P-selectin. These data suggest that porcine P-selectin is a suitable marker for inflammation and that the mechanism involved in the generation of circulating P-selectin is not proteolytic release.

*Keywords:* pig, platelets, soluble adhesion molecules, P-selectin

*Abbreviations:* ADP, Adenine diphosphate; FITC, Fluorescein isothiocyanate; mAb, monoclonal antibody; PAEC, Porcine aortic endothelial cells; PRP, Platelet-rich plasma; RPE, Phycoerythrin; SCR, Short consensus repeat

## 1. Introduction

P-selectin (CD62P) is an adhesion molecule expressed on activated platelets and endothelial cells. In early phases of inflammation, it mediates the initial rolling of leukocytes on the vascular endothelium (Geng et al., 1990; McEver, 1991). Expressed on platelets, it is a key mediator of leukocyte-platelet adhesion, and supports the recruitment of leukocytes into developing thrombi (Palabrica et al., 1992).

P-selectin is a glycoprotein composed by an amino-terminal  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent lectin region followed by an epidermal growth factor-like domain and a varying number of short consensus repeat (SCR) units, homologous to domains found in complement binding proteins. The number of SCRs varies between species: human P-selectin contains nine, one more than mouse, rat and sheep P-selectin, while bovine and porcine P-selectin have six SCR units (Vestweber et al., 1999; Stocker et al., 2000). P-selectin is anchored in the cell membrane by a single transmembrane domain followed by a short cytoplasmatic region positioned at the carboxyl terminus of the protein (Tedder et al., 1995).

In resting platelets and endothelial cells, P-selectin is synthesized and accumulated in the  $\alpha$ -granules and Weibel-Palade bodies, respectively. Exposure of the cells to a variety of inflammatory mediators induces the fusion of the P-selectin-containing granules with the cell membrane, resulting in P-selectin expression at the cell surface within minutes. Many of the known platelets activators, including thrombin, collagen, adenine diphosphate (ADP) and PMA, induce P-selectin cell surface expression (Berman et al., 1986). Histamine,

thrombin, oxygen radicals and complement fragments are physiological inducers of P-selectin on endothelial cells (Kubes et al., 1994; Hattori et al., 1989; Foreman et al., 1994). P-selectin is then rapidly internalised (within 30-60 min) from the cell surface by endocytosis (Hattori et al., 1989). P-selectin persistence on the endothelium is stimulated at later point times by cytokines and LPS through transcription-dependent mechanisms (Sanders et al., 1992; Auchampach et al., 1994; Weller et al., 1992; Khew-Goodall et al., 1999).

A soluble form of P-selectin has been detected as a circulating protein in plasma from healthy individuals (Katayama et al., 1992; Ushiyama et al., 1993). In particular, it has been established as a consistent marker of platelet activation (Ferroni et al., 1999; Blann and Lip, 1997a). High levels of this circulating protein have been associated with several inflammatory and thrombotic disorders in humans, such as diabetes (Jilma et al., 1996b), malaria (Facer et al., 1994), hepatitis (Ferroni et al., 2001), hypertension (Blann et al., 1997d), atherosclerosis and ischaemic heart disease (Blann et al., 1998; Blann et al., 1997b; Chong et al., 1994).

Soluble P-selectin is mainly originated by alternative splicing of a P-selectin mRNA that lacks the exon encoding the transmembrane domain (Ishiwata et al., 1994), although the proteolytic cleavage of membrane P-selectin may also contribute to the generation of circulating P-selectin (Berger et al., 1998; Fijnheer et al., 1997). Platelets are the major source of soluble P-selectin (Jilma et al., 1996a; Blann et al., 1995; Blann et al., 1997c; Chong et al., 1994).

Pigs are a very useful animal model for biomedical studies given their physiological similarity to humans. Furthermore, they offer graft potential as

organ donors for xenotransplantation (Platt, 1996). In our laboratory, we produced two monoclonal antibodies (P-sel.KO.2.5 and P-sel.KO.2.9) against conserved epitopes present in human and pig P-selectin (Massaguer et al., 2000). Cross-blocking analyses revealed that the two mAbs recognize overlapping determinants of the protein. These antibodies have been used as markers of porcine platelet activation in several studies (Massaguer et al., 2000; Mirabet et al., 2002; Barrabes et al., 2002). Another reported mAb against porcine P-selectin was applied to evaluate P-selectin expression on porcine aortic endothelial cells (PAEC) (Stocker et al., 2000). However, the expression of P-selectin on porcine platelets induced by inflammatory activators remains to be accurately characterized. Furthermore, circulating P-selectin has not been described in pigs, owing to the lack of reagents to detect this soluble form of the protein. To develop an ELISA to detect soluble P-selectin, a new mAb reactive with an epitope of porcine P-selectin distinct from that recognized by P-sel.KO.2.5 and P-sel.KO.2.9 mAbs was produced and characterized. This mAb was used to characterize P-selectin in porcine platelets and to quantify P-selectin.

## **2. Material and methods**

### *2.1. Antibodies*

The murine anti-P-selectin mAbs P-sel.KO.2.5 and P-sel.KO.2.9 were produced in our laboratory (Massaguer et al., 2000). Phycoerythrin (RPE)-conjugated streptavidin (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL, USA), fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat F(ab') anti-mouse IgG (H+L) (Caltag, South San Francisco, CA, USA) and biotin anti-mouse IgG kappa light chain (BD PharMingen, San Diego, CA, USA) were used for indirect immunofluorescence staining. The goat anti-human IgG (Fc specific) and anti-human IgG (Fc specific) peroxidase conjugated mAbs were from Sigma (Sigma, St. Louis, MO, USA). The human thrombin was purchased from Sigma and the PMA was from Calbiochem (Calbiochem, Darmstadt, Germany).

### *2.2. Cloning of swine P-selectin cDNA*

Total RNA from porcine aortic endothelial cells (PAEC) activated for 3h with TNF (10 ng/ml) was prepared with Trizol reagent (Life Technologies, Rockville, MD, USA). RNA was reverse transcribed into cDNA using a First-Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR avian myeloblastic virus (AMV) and then amplified by PCR with the Taq polymerase Expand High Fidelity™ (Roche Diagnostics, Ottweiler, Germany) following the manufacturer instructions. The cycling conditions were 94<sup>0</sup>C for 4 min, 35 cycles at 94<sup>0</sup>C for 30 s, 55<sup>0</sup>C for 1 min, and

72°C for 2 min. RT-PCR of swine P-selectin was performed using the following primers: 5'AACGGAGGGGAGGCAACAAGAC3' (sense primer) and 5'GTGAGGGGACCAAGAGAAG3' (antisense primer). The amplified product was electrophoresed in 1% agarose gel and subcloned into the pcDNA3.1/V5/His-TOPO expression vector (Life Technologies). COS-7 cells were transiently transfected with 4 µg of the swine P-selectin cDNA using the LipofectAMINE Plus™ Reagent (Life Technologies). 48 h after transfection, cells were trypsinized and the surface expression of swine P-selectin was examined by flow cytometry with the P-sel.KO.2.9 mAb followed by incubation with the biotin anti-mouse IgG kappa mAb (Pharmingen) and R-PE-conjugated streptavidin (Southern Biotechnology Associated).

### 2.3. Cell lines

Murine pre-B-cell line 300.19 (provided by Dr. Streuli, Dana-Farber Cancer Institute; Boston; MA) was maintained in complete medium (RPMI 1640 supplemented with 10% fetal calf serum, antibiotics and 10 mmol/l glutamine and 2-mercaptoethanol 50mM) (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, USA). Stable Swine P-selectin transfectants were produced by transfecting 300.19 cells with the porcine P-selectin c-DNA in pcDNA3.1/V5/His-TOPO expression vector. The 300.19 cells were transfected by electroporation with subsequent selection of stable transfectants using 1.2 mg/ml of G418 (GIBCO-BRL), as described elsewhere (Engel et al., 1993). COS-7 and NS-1 cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATTC) (Manassas, VA, USA)



## 2.4 Monoclonal antibody production

A new mAb reactive with porcine P-selectin was generated by fusion of NS-1 myeloma cells with splenocytes from BALB-c mouse, previously immunized twice with 300-19 cells stably transfected with swine P-selectin DNA ( $10 \times 10^6$  cells). Supernatant fluid from 285 hybridoma-containing wells was screened for mAbs reactive with the cell line used as immunogen by flow cytometry. One hybridoma (SwPsel.1.9) reacted with P-selectin-transfected cells, but not with untransfected 300.19 cells. This hybridoma was subcloned by limiting dilution and further characterized. The antibody isotype was determined using the IsoStrip mouse monoclonal Antibody Isotyping Kit (Roche Diagnostics). The mAb was used either as undiluted culture supernatant or following purification on a protein A column (Bio Rad, Hercules, CA, USA) from concentrated supernatant obtained from the culture of the hybridoma in INTEGRA CL 350 flasks (Integra Biosciences AG, Switzerland). The purified mAb was dialyzed extensively against PBS and stored at  $-20^\circ\text{C}$ .

## 2.5. Adhesion Assay

COS-7 cells transiently transfected with porcine P-selectin cDNA were trypsinized and transferred to 35-mm tissue culture dishes. After 24 h, cellular adhesion blocking experiments were performed as described (Engel et al., 1993). Transfected COS cells were pre-incubated with the SwPsel.1.9 mAb or an

irrelevant antibody for 30 min at 4 °C, and HL60 cells were then added to the dishes ( $2 \times 10^6$  HL60 cells/35-mm dish). Cells were incubated for 30 min at 4 °C and washed. The adhesion of HL60 cells to COS cells was assessed by observing cellular rosettes around transfected COS cells. Blocking mAbs were determined by the absence of rosettes.

### *2.6. MAb cross-blocking experiment*

300.19 cells transfected with porcine P-selectin ( $1 \times 10^6$ ) were first incubated with saturating concentrations ( $10 \mu\text{g/ml}$  of purified mAb) of SwPsel.1.9 mAb, P-sel.KO.2.5 and medium alone (as positive control) for 30 min on ice. Thereafter, biotinylated P-sel.KO.2.5 mAb was added to the tube at a suboptimal concentration for immunofluorescence staining ( $1 \mu\text{g/ml}$ ). After 30 min of further incubation, the cells were washed and incubated for 20 min with Streptavidin-RPE (Southern Biotechnology Associated). After washing the cells twice, immunofluorescence staining was assessed by flow cytometry.

### *2.7 Construction of the SwP-selectin-Fc fusion protein*

The SwP-selectin-Fc fusion protein containing the CD33 leader peptide and the Fc region of human IgG<sub>1</sub> was obtained by inserting the swine P-selectin sequence corresponding to the extracellular domains into the mammalian expression vector signal plg-Tail (R+D systems, Minneapolis, MM, USA). The P-selectin oligonucleotides were: as forward nucleotide,

5'CAGCGGATCCATGGACCTATAATTATAGC and as reverse oligonucleotide, 5'GCGGATCCACTTACCTGTTAGGCAGGTTGGCATCGTA. The construct was transiently transfected in COS cells using the Cell line Nucleofector™Kit V (AMAXA Biosystems, Koeln, Germany). The supernatant was collected and tested for the fusion protein concentration by ELISA using the goat anti-human IgG (Fc specific) mAb as a capture antibody (3µg/ml) and the anti-human IgG (Fc specific) peroxidase conjugated mAb (Sigma) as a detection antibody. Serial dilutions of purified human IgG (Sigma) were used to generate a standard curve.

#### *2.8. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for soluble P-selectin*

A sandwich ELISA was developed to determine porcine sP-selectin concentration. The SwPsel.1.9 mAb was used as the capture antibody. Microtiter plates (Costar) were coated overnight at 4°C with SwPsel.1.9 diluted at 4 µg/ml in PBS. The plates were washed three times with PBS containing 0.1% Tween 20 (Sigma) and blocked with PBS containing 2% BSA (Sigma) for 1 hour at 37°C. Samples were properly diluted to obtain a measurement in the linear range of the assay and run in triplicate. They were incubated for 1 hour at room temperature. Soluble P-selectin was detected by incubating with biotinylated P-sel.KO.2.5 mAb at 1 µg/ml for 1 hour at room temperature. After three washes, avidin-peroxidase (Sigma) was added and the activity was measured with 0-phenylene-diamine (0.125% wt/vol) (Sigma) as a substrate. Absorbance at 450 nm was determined using a Multiskan RC reader (ThermoLabsystems, Finland). Serial dilutions of swine P-selectin fusion protein were made to generate a standard curve.

Blood samples were obtained from Landrace-Largewhite pigs. Pigs were sedated, intubated and ventilated mechanically and anaesthesia was maintained with propofol and phentanyl. The femoral artery was dissected and a 3-cm segment was excised and replaced by a femoral graft from a donor pig. Blood samples were collected pre- and post-surgery and centrifuged at 1400xg for 7 min at 4°C to remove cells and collect the plasma. The relative concentration of sP-selectin in the samples was calculated by comparing the mean OD obtained from the triplicate wells to the semi-logarithmic standard curve using a linear regression analysis.

### *2.9. Quantification of P-selectin levels*

The concentration of P-selectin in platelets was examined. Platelets were isolated from fresh pig blood collected into acid-citrate-dextrose (38 mmol/l citric acid, 75 mmol/l trisodium citrate, and 100 mmol/l dextrose) (9:1) as anticoagulant. Blood was centrifuged at 400 *g* for 6 min at room temperature to obtain platelet-rich plasma (PRP). PRP was resuspended with an equal volume of PIPES buffer (25 mmol/l PIPES, 137 mmol/l NaCl, 4 mmol/l KCl and 0.1% wt/vol dextrose) pH 6.1 and platelets were further isolated by centrifugation at 2000 x *g* for 6 min, washed with PIPES buffer pH 6.1 and centrifuged again at 2000 x *g* for 6 min. Platelets were then resuspended with PBS to 1 x10<sup>9</sup> cells per ml. The number of platelets was assessed using the ADVIA™120 Hematology system (Bayer Diagnostics, Tarrytown, NY, USA). Platelets were serially diluted and lysis buffer was added to each sample. Platelets were lysed for 30 min at 4 °C, followed by a centrifugation at 14000 rpm for 15 min

The supernatants were then collected and P-selectin concentration in each sample was analyzed by ELISA.

#### 2.10. *Platelet activation*

Porcine platelets were isolated from fresh blood as described above, resuspended with PBS + 0.5% FCS and then activated for 10 min at 37 °C with various concentrations of human thrombin (Sigma) (0.1, 0.5, 1 and 2 U/ml) and PMA (Calbiochem) (1, 5, 10 and 20 ng/ml). After activation, platelets were centrifuged at 2000 x g for 6 min and the supernatants were collected to determine the levels of soluble P-selectin by ELISA. The supernatants were centrifuged at 14000 rpm for 15 min at 4 °C and stored at -20 °C. The platelet pellets were washed with PBS + 2% FCS and surface expression of P-selectin was then determined by indirect immunofluorescence using the SwPsel.1.9 mAb. Aliquots of the activated platelets were lysed for 30 min at 4 °C and centrifuged at 14000 rpm for 15 min at 4°C, and the amount of P-selectin in the supernatant was determined by ELISA.

#### 2.11. *Immunofluorescence analysis*

Indirect immunofluorescence analyses were performed after washing the cells twice. The cells were incubated for 25 min on ice with 50 µl of SwPsel.1.9 supernatant or with an irrelevant mAb as negative control. Platelets were incubated for 25 min at room temperature. After washing, the cells were treated

for 20 min at 4 °C with FITC-conjugated goat anti-mouse IgG antibody (Caltag). Fluorescence was analyzed using a FACSCalibur (Becton Dickinson, Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA) equipped with the CellQuest™ software. Fluorescence intensity was analyzed on a 4-decade log scale (1-10000). 10,000 cells were analyzed for each sample. Cells were identified and gated by their characteristic forward and side scatter. Platelet acquisition was performed at logarithmic scale.

### 2.12. Immunoprecipitation

Porcine platelets were activated with thrombin (Sigma) 0.1 U/ml for 10 min at 37°C. Platelets were washed with PBS and surface labeled with 300 µl of Sulfo-NHS-Biotin 1 mg/ml (Sigma) for 30 min at 4°C as described (de la Fuente et al., 1997). Cell were lysed and pre-cleared three times for 2 h at 4°C using 40 µl of protein G Sepharose™ (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) and 10 µg of an unreactive mAb. Immunoprecipitation was performed using 20 µg of purified SwPsel.1.9 mAb and an irrelevant antibody as a negative control. Immunoprecipitates were washed and then analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The samples were run in the presence of 5% 2-mercaptoethanol (reducing conditions). Mr was determined using a pre-stained standard molecular weight marker (Sigma). The proteins were transferred by electroblotting with glycine transfer buffer to polyvinylidene difluoride membranes (Immobilon; Millipore, Boston, MA, USA) and incubated with avidin-peroxidase 100 ng/ml (Sigma). After 45 min, the membranes were

developed using Amersham's Enhancer Chemiluminescence reagent (Amersham International, Little Chalfont, UK).

### 2.13. *Analysis of the proteolytic release of P-selectin*

COS-7 cells were transiently transfected with 4  $\mu$ g of swine P-selectin cDNA cloned in the pcDNA-3.1/V5/His-TOPO expression vector and with 4  $\mu$ g of TNFR2 full-length cDNA cloned in the pcR 3.1 vector (Invitrogen, San Diego, CA) using the Cell Line Nucleofector™ Kit V (Amaxa Biosystems, Koeln, Germany). 48 hours after transfection an aliquot of the cells was trypsinized and protein expression on the cells surface was assessed by indirect immunostaining using the SwPsel.1.9 mAb and a mouse anti-human TNFR2 mAb. Transfected COS cells were then washed and incubated for 30 min with medium alone as a control or with medium with 50 ng/ml of PMA (Calbiochem) to induce the proteolytic release of the proteins. The supernatants were then collected and centrifuged at 12000 rpm for 10 min. The levels of soluble P-selectin were determined in the supernatants by ELISA. TNFR2 was detected using the s-TNFR (80KDA) Human ELISA module set (Bender Med Systems, Vienna, Austria) and served as a control of proteolysis induction by PMA.

### 3. Results

#### 3.1. *Production of swine P-selectin antibodies*

Swine P-selectin cDNA was cloned by RT-PCR from PAEC cells activated with TNF (10 ng/ml). The cDNA was transiently transfected into COS-7 cells leading to the expression of P-selectin on the cell surface, as assessed by indirect immunofluorescence (data not shown). To generate new mAbs specific for porcine P-selectin, BALB-c mice were immunized with the 300.19 murine pre-B-cell line stably transfected with the swine P-selectin cDNA. We obtained a mAb, SwPsel.1.9 (IgG2b kappa) that was reactive with the swine P-selectin transfected cells, but not with untransfected 300.19 cells (Fig. 1A). The SwPsel.1.9 mAb was also reactive with COS cells transiently transfected with swine P-selectin cDNA but did not react with untransfected COS cells (Fig. 1B). Moreover, SwPsel.1.9 mAb specifically immunoprecipitated a single band of approximately 130 kDa from thrombin-activated porcine platelets (Fig. 1C), which corresponds to the molecular mass of porcine P-selectin (Stocker et al., 2000).

The reactivity with SwPsel.1.9 mAb was negative on all porcine blood cells, except on activated platelets (see below), as determined by indirect immunofluorescence (data not shown). SwPsel.1.9 mAb was tested with 300.19 cells transfected with human P-selectin and no staining was observed (data not shown). The intercellular binding assay between the HL60 myelomonocytic cell line and COS cells expressing swine P-selectin revealed that the Swpsel.1.9 mAb did not block the P-selectin-dependent adhesion (data not shown).



### *3.2 ELISA for soluble porcine P-selectin*

Cross-blocking experiments revealed that the SwPsel.1.9 mAb and the P-sel.KO.2.5 mAb, previously produced in our laboratory (Massaguer et al., 2000) bind to non-overlapping epitopes of swine P-selectin (Fig. 2). These antibodies were used to develop a sandwich ELISA to measure porcine soluble P-selectin. SwPsel.1.9 was used as the capture antibody and biotinylated P-sel.KO.2.5 as the detection antibody. A Swine P-selectin fusion protein (SwP-selectin-Fc), containing the extracellular region of swine P-selectin and the constant domain of human immunoglobulin G was produced and served as positive control and standard. SwP-selectin-Fc was detected in a dose-dependent manner by the ELISA. The semi-logarithmic representation of the results showed a standard curve ranging from 75 ng/ml to 2 ng/ml with a correlation of  $r = 0.9627$  (Fig. 3). The sensitivity of the assay was about 1 ng/ml of soluble P-selectin. These results suggest that this ELISA system is a useful technique to detect soluble porcine P-selectin.

### *3.3. Quantification of porcine soluble P-selectin in plasma*

Soluble P-selectin levels were determined in 15 pigs undergoing cryopreserved femoral artery implantation. Plasma samples were obtained pre- and post-surgery. Soluble P-selectin was not detected in the samples pre-surgery, whereas 6 of the 15 samples post-surgery contained increased levels of

sP-selectin (Fig. 4). Concentrations in the positive samples ranged from 7.97 to 14.25 ng/ml, with a mean of 10.40 ng/ml. These results show that the soluble form of P-selectin is generated *in vivo* in pigs after the graft implantation and can be accurately quantified by the ELISA in plasma samples.

#### *3.4. P-selectin concentration in porcine platelets*

The concentration of soluble P-selectin in the platelets lysates was assessed. The minimum number of platelets that gave a reliable measurement by the ELISA was  $5 \times 10^6$  platelets (Fig. 5). Our results indicate that the amount of P-selectin is 16.8 ng/ml per  $1 \times 10^7$  platelets.

#### *3.5. Induction of P-selectin on porcine platelets*

Two platelet activators, thrombin and PMA, were used to evaluate the induction of P-selectin expression on porcine platelet membranes and the generation of soluble P-selectin. Platelets were treated for 10 min with different concentrations of the activators and P-selectin expression was then assessed by flow cytometry using the SwPsel.1.9 mAb. Histograms show a very low level of P-selectin expression on resting platelets. However, incubation of platelets with both thrombin and PMA induced P-selectin on the surface of activated platelets (Fig. 6). The correlation between the activator dose and P-selectin expression was also evaluated (Fig. 7). Treatment with 0.1 U/ml thrombin induced the expression of P-selectin in 14.31% of the platelets with a mean fluorescence

intensity of 40.16. This expression was only slightly increased with doses up to 2 U/ml. PMA showed a high dose-response correlation. P-selectin expression on platelets increased from 5.7% of positive platelets with a mean fluorescence of 12.60 when treated with 1 ng/ml of PMA to 23.18% of positive cells with a mean fluorescence of 147.15 when the dose of the activator was increased to 20 ng/ml (Fig. 7).

Soluble P-selectin released by the platelets after activation was determined in platelet supernatants by ELISA. Results revealed that soluble P-selectin was not induced after the incubation with both thrombin and PMA, soluble P-selectin levels were insignificant in resting and activated platelet supernatants (data not shown). However, high P-selectin concentrations were found in platelet lysates (mean 379.7 ng/ml) and did not vary significantly.

### *3.6. P-selectin is not shed from the membrane of transfected cells*

COS cells were transiently transfected with swine P-selectin full-length cDNA. After 48 h, 33.3% of the COS cells expressed P-selectin on their surface (mean fluorescence intensity 393). These cells were incubated with PMA (50ng/ml), which is the best-known proteolytic cleavage-inducing agent. Soluble P-selectin or cell-surface expressed protein levels did not vary (Fig. 8, and data not shown). In contrast, TNFR2 receptor was proteolytically cleaved from cell-surface of the transfected cells using the same experimental conditions (Fig 8).

#### 4. Discussion

We studied the expression of P-selectin in porcine platelets and developed an ELISA that allowed us to quantify porcine soluble P-selectin and determine the absolute amount of P-selectin in platelets.

Circulating P-selectin was not detected in plasma from untreated pigs, whereas concentrations ranging from 0.1 to 0.2  $\mu\text{g/mL}$  have been reported in healthy humans (Dunlop et al., 1992; Ushiyama et al., 1993; Berger et al., 1998) and about 0.3  $\mu\text{g/mL}$  in mice (Andre et al., 2000). These variations cannot be attributed to a lower number of circulating platelets in pigs, as platelet concentrations in human and porcine blood are similar (Merhi et al., 1999). The molecular bases of this difference is difficult to understand, but it is unlikely to be due to differences in the ELISA systems, since the same ELISA procedure revealed that the content of P-selectin in porcine platelets was 16.8 ng/mL per  $1 \times 10^7$  platelets, similar to the concentration found in humans (Kamath et al., 2002). Moreover, we detected soluble P-selectin in porcine plasma samples after allograft implantation, indicating that a circulating form of P-selectin can also be generated in pigs under pathological situations. The mean concentration of soluble P-selectin in the positive samples was 10.4 ng/mL, which is about 25-fold lower than that of soluble P-selectin determined in several human pathologies (Frijns et al., 1997; Blann et al., 1996; Katayama et al., 1993). Human soluble P-selectin is indicative of an increased risk of adverse cardiovascular events in patients with ischaemic heart disease (Hillis et al., 2002) and an independent marker of future cardiovascular risk, as inferred from a large-scale study of

healthy women (Ridker et al., 2001). Therefore, the detection of increased levels of circulating P-selectin may be of predictive value in experimental models of inflammatory or thrombotic disorders developed in pigs.

The amount of P-selectin per platelet can vary in health and disease and can be altered by antithrombotic therapy, as described in atrial fibrillation (Kamath et al., 2002). The measurement of the absolute content of P-selectin per platelet may be an alternative method to assess platelet disorders, as the amount of P-selectin released after platelet activation may not be sufficient to account for a significant difference from the plasma levels of soluble P-selectin, but may significantly decrease platelet P-selectin contents. However, further studies are required to determine whether changes in the amount of P-selectin are of clinical relevance.

We analyzed P-selectin in porcine platelets after the *in vitro* treatment with two known platelet activators, thrombin and PMA (Whiss et al., 1998). Both activators induced rapid P-selectin expression on porcine platelets-surface. However, the activation failed to generate detectable levels of soluble P-selectin in the platelet supernatants. This can not be attributed to the low platelet number in the samples, as high P-selectin concentrations were determined in the platelet lysates. No significant variations in the total amount of P-selectin were detected between resting and activated platelets; supporting the finding that P-selectin was not released from the platelets after activation.

Soluble adhesion molecules can be generated *in vivo* in two ways. The most common one is proteolytic cleavage, which releases the protein from the cell surface membrane. Examples of shed receptors include L-selectin, TNF- $\alpha$  and

IL-6 (Schleiffenbaum et al., 1992; Mullberg et al., 1994; Arribas et al., 1996). Alternative splicing, which deletes the transmembrane domain of the molecule, can also give rise to soluble isoforms of surface receptors. The plasma P-selectin is mainly derived from the secretion of a soluble isoform from spliced mRNA lacking the 14th exon, that encodes the region containing the transmembrane domain of the intact molecule (Ishiwata et al., 1994). Human platelets contain approximately equal amounts of mRNA coding for P-selectin with and without the transmembrane domain (Johnston et al., 1990). Moreover, the proteolytic cleavage of membrane expressed P-selectin shortly after activation may increase the levels of soluble P-selectin in plasma (Berger et al., 1998; Fijnheer et al., 1997). However, PMA treatment, which is a strong shedding inductor, failed to induce the proteolytic cleavage of P-selectin from the surface of porcine activated platelets and from the membrane of COS cells transfected with porcine P-selectin. These results are consistent with a previous study in humans, where chimeric P- and L-selectin receptors were generated to assess the requirements that regulate the endoproteolytic release of surface receptors (Chen et al., 1995). The mutant containing the extracellular domain of L-selectin attached to the transmembrane and cytoplasmic domains of P-selectin was resistant to PMA-induced proteolytic cleavage, whereas the reciprocal receptor, containing the transmembrane domain of L-selectin was shed after PMA-treatment (Chen et al., 1995). Therefore, as described for humans, the alternative splicing of the protein should be involved in the origin of the circulating form of porcine P-selectin. However, additional studies are required to further elucidate the origin of soluble P-selectin in pigs.

The circulating form of P-selectin can be active because only the lectin and the epidermal growth factor domains are required to bind to its receptor on leukocytes. The physiological role of soluble P-selectin has not been clearly defined. During vascular injury, large amounts are locally generated and may have an anti-inflammatory function, inhibiting leukocyte adhesion to the activated endothelium (Gamble et al., 1990; Wong et al., 1991). Soluble P-selectin may also limit the thrombosis development by preventing excessive platelet and leukocyte recruitment to the growing thrombus (Frenette et al., 1995). Moreover, it has been described that soluble P-selectin is an endogenous activator the coagulation in mice. Concentrations of about 1  $\mu\text{g/ml}$  of circulating P-selectin are required to accelerate the hemostatic processes in these mice (Andre et al., 2000). Likewise, concentrations of soluble L-selectin higher than 2  $\mu\text{g/ml}$  are necessary to inhibit murine L-selectin function (Tu et al., 2002). Therefore, the low concentrations of circulating P-selectin detected in pig are unlikely to be functionally active at systemic levels.

The novel mAb and ELISA described in this paper have allowed us to characterize porcine P-selectin expression and may be useful tools to assess the clinical relevance of the circulating form of P-selectin in several experimental models of inflammation in pig.

## **Acknowledgements**

This study was supported by Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología Grant SAF99-0007 and Fundació Marató TV3, Grant 4310/2000.

## References

- Andre,P., Hartwell,D., Hrachovinova,I., Saffaripour,S., Wagner,D.D., 2000. Procoagulant state resulting from high levels of soluble P-selectin in blood. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97, 13835-13840.
- Arribas,J., Coodly,L., Vollmer,P., Kishimoto,T.K., Rose-John,S., Massague,J., 1996. Diverse cell surface protein ectodomains are shed by a system sensitive to metalloprotease inhibitors. *J.Biol.Chem.* 271, 11376-11382.
- Auchampach,J.A., Oliver,M.G., Anderson,D.C., Manning,A.M., 1994. Cloning, sequence comparison and in vivo expression of the gene encoding rat P-selectin. *Gene* 145, 251-255.
- Barrabes,J.A., Garcia-Dorado,D., Mirabet,M., Lidon,R.M., Soriano,B., Ruiz-Meana,M., Pizcueta,P., Blanco,J., Puigfel,Y., Soler-Soler,J., 2002. Lack of effect of glycoprotein IIb/IIIa blockade on myocardial platelet or polymorphonuclear leukocyte accumulation and on infarct size after transient coronary occlusion in pigs. *J.Am.Coll.Cardiol.* 39, 157-165.
- Berger,G., Hartwell,D.W., Wagner,D.D., 1998. P-Selectin and platelet clearance. *Blood* 92, 4446-4452.
- Berman,C.L., Yeo,E.L., Wencel-Drake,J.D., Furie,B.C., Ginsberg,M.H., Furie,B., 1986. A platelet alpha granule membrane protein that is associated with the plasma membrane after activation. Characterization and subcellular



localization of platelet activation-dependent granule-external membrane protein. *J.Clin.Invest.* 78, 130-137.

Blann,A.D., Dobrotova,M., Kubisz,P., McCollum,C.N., 1995. von Willebrand factor, soluble P-selectin, tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor in atherosclerosis. *Thromb.Haemost.* 74, 626-630.

Blann,A., Morris,J., McCollum,C., 1996. Soluble L-selectin in peripheral arterial disease: relationship with soluble E-selectin and soluble P-selectin. *Atherosclerosis* 126, 227-231.

Blann,A.D., Lip,G.Y., 1997a. Hypothesis: is soluble P-selectin a new marker of platelet activation? *Atherosclerosis* 128, 135-138.

Blann,A.D., Faragher,E.B., McCollum,C.N., 1997b. Increased soluble P-selectin following myocardial infarction: a new marker for the progression of atherosclerosis. *Blood Coagul.Fibrinolysis* 8, 383-390.

Blann,A.D., Lip,G.Y., Beevers,D.G., McCollum,C.N., 1997c. Soluble P-selectin in atherosclerosis: a comparison with endothelial cell and platelet markers. *Thromb.Haemost.* 77, 1077-1080.

Blann,A.D., Lip,G.Y., Islim,I.F., Beevers,D.G., 1997d. Evidence of platelet activation in hypertension. *J.Hum.Hypertens.* 11, 607-609.

Blann,A.D., McCollum,C.N., 1998. Increased soluble P-selectin in peripheral artery disease: a new marker for the progression of atherosclerosis. *Thromb.Haemost.* 80, 1031-1032.

- Chen,A., Engel,P., Tedder,T.F., 1995. Structural requirements regulate endoproteolytic release of the L- selectin (CD62L) adhesion receptor from the cell surface of leukocytes. *J.Exp.Med.* 182, 519-530.
- Chong,B.H., Murray,B., Berndt,M.C., Dunlop,L.C., Brighton,T., Chesterman,C.N., 1994. Plasma P-selectin is increased in thrombotic consumptive platelet disorders. *Blood* 83, 1535-1541.
- de la Fuente,M.A., Pizcueta,P., Nadal,M., Bosch,J., Engel,P., 1997. CD84 leukocyte antigen is a new member of the Ig superfamily. *Blood* 90, 2398-2405.
- Dunlop,L.C., Skinner,M.P., Bendall,L.J., Favalaro,E.J., Castaldi,P.A., Gorman,J.J., Gamble,J.R., Vadas,M.A., Berndt,M.C., 1992. Characterization of GMP-140 (P-selectin) as a circulating plasma protein. *J.Exp.Med.* 175, 1147-1150.
- Engel,P., Nojima,Y., Rothstein,D., Zhou,L.J., Wilson,G.L., Kehrl,J.H., Tedder,T.F., 1993. The same epitope on CD22 of B lymphocytes mediates the adhesion of erythrocytes, T and B lymphocytes, neutrophils, and monocytes. *J.Immunol.* 150, 4719-4732.
- Facer,C.A., Theodoridou,A., 1994. Elevated plasma levels of P-selectin (GMP-140/CD62P) in patients with *Plasmodium falciparum* malaria. *Microbiol.Immunol.* 38, 727-731.

- Ferroni,P., Pulcinelli,F.M., Lenti,L., Gazzaniga,P.P., 1999. Is soluble P-selectin determination a more reliable marker of in vivo platelet activation than CD62P flow cytometric analysis? *Thromb.Haemost.* 81, 472-473.
- Ferroni,P., Mammarella,A., Martini,F., Paoletti,V., Cardarello,C.M., Labbadia,G., Donnarumma,L., De Matteis,A., Gazzaniga,P.P., Musca,A., Basili,S., 2001. Increased soluble P-selectin levels in hepatitis C virus-related chronic hepatitis: correlation with viral load. *J.Investig.Med.* 49, 407-412.
- Fijnheer,R., Frijns,C.J., Korteweg,J., Rommes,H., Peters,J.H., Sixma,J.J., Nieuwenhuis,H.K., 1997. The origin of P-selectin as a circulating plasma protein. *Thromb.Haemost.* 77, 1081-1085.
- Foreman,K.E., Vaporciyan,A.A., Bonish,B.K., Jones,M.L., Johnson,K.J., Glovsky,M.M., Eddy,S.M., Ward,P.A., 1994. C5a-induced expression of P-selectin in endothelial cells. *J.Clin.Invest* 94, 1147-1155.
- Frenette,P.S., Johnson,R.C., Hynes,R.O., Wagner,D.D., 1995. Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92, 7450-7454.
- Frijns,C.J., Kappelle,L.J., van Gijn,J., Nieuwenhuis,H.K., Sixma,J.J., Fijnheer,R., 1997. Soluble adhesion molecules reflect endothelial cell activation in ischemic stroke and in carotid atherosclerosis. *Stroke* 28, 2214-2218.

- Gamble,J.R., Skinner,M.P., Berndt,M.C., Vadas,M.A., 1990. Prevention of activated neutrophil adhesion to endothelium by soluble adhesion protein GMP140. *Science* 249, 414-417.
- Geng,J.G., Bevilacqua,M.P., Moore,K.L., McIntyre,T.M., Prescott,S.M., Kim,J.M., Bliss,G.A., Zimmerman,G.A., McEver,R.P., 1990. Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. *Nature* 343, 757-760.
- Hattori,R., Hamilton,K.K., McEver,R.P., Sims,P.J., 1989. Complement proteins C5b-9 induce secretion of high molecular weight multimers of endothelial von Willebrand factor and translocation of granule membrane protein GMP-140 to the cell surface. *J.Biol.Chem.* 264, 9053-9060.
- Hillis,G.S., Terregino,C., Taggart,P., Killian,A., Zhao,N., Dalsey,W.C., Mangione,A., 2002. Elevated soluble P-selectin levels are associated with an increased risk of early adverse events in patients with presumed myocardial ischemia. *Am.Heart J.* 143, 235-241.
- Ishiwata,N., Takio,K., Katayama,M., Watanabe,K., Titani,K., Ikeda,Y., Handa,M., 1994. Alternatively spliced isoform of P-selectin is present in vivo as a soluble molecule. *J.Biol.Chem.* 269, 23708-23715.
- Jilma,B., Eichler,H.G., Vondrovec,B., Breiteneder,H., Kyrle,P.A., Kitzweger,E., Kapiotis,S., Speiser,W., 1996a. Effects of desmopressin on circulating P-selectin. *Br.J.Haematol.* 93, 432-436.

- Jilma,B., Fasching,P., Ruthner,C., Rumpfmayr,A., Ruzicka,S., Kapiotis,S., Wagner,O.F., Eichler,H.G., 1996b. Elevated circulating P-selectin in insulin dependent diabetes mellitus. *Thromb.Haemost.* 76, 328-332.
- Johnston,G.I., Bliss,G.A., Newman,P.J., McEver,R.P., 1990. Structure of the human gene encoding granule membrane protein-140, a member of the selectin family of adhesion receptors for leukocytes. *J.Biol.Chem.* 265, 21381-21385.
- Kamath,S., Blann,A.D., Caine,G.J., Gurney,D., Chin,B.S., Lip,G.Y., 2002. Platelet P-selectin levels in relation to plasma soluble P-selectin and beta-thromboglobulin levels in atrial fibrillation. *Stroke* 33, 1237-1242.
- Katayama,M., Handa,M., Ambo,H., Araki,Y., Hirai,S., Kato,I., Kawai,Y., Watanabe,K., Ikeda,Y., 1992. A monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for human GMP-140/P-selectin. *J.Immunol.Methods* 153, 41-48.
- Katayama,M., Handa,M., Araki,Y., Ambo,H., Kawai,Y., Watanabe,K., Ikeda,Y., 1993. Soluble P-selectin is present in normal circulation and its plasma level is elevated in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura and haemolytic uraemic syndrome. *Br.J.Haematol.* 84, 702-710.
- Khew-Goodall,Y., Wadham,C., Stein,B.N., Gamble,J.R., Vadas,M.A., 1999. Stat6 activation is essential for interleukin-4 induction of P-selectin transcription in human umbilical vein endothelial cells. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 19, 1421-1429.

- Kubes,P., Kanwar,S., 1994. Histamine induces leukocyte rolling in post-capillary venules. A P-selectin-mediated event. *J.Immunol.* 152, 3570-3577.
- Massaguer,A., Engel,P., Perez-del-Pulgar,S., Bosch,J., Pizcueta,P., 2000. Production and characterization of monoclonal antibodies against conserved epitopes of P-selectin (CD62P). *Tissue Antigens.* 56, 117-128.
- McEver,R.P. 1991 GMP-140: a receptor for neutrophils and monocytes on activated platelets and endothelium. *J.Cell Biochem.*, 45, 156-161.
- Merhi,Y., Provost,P., Chauvet,P., Theoret,J.F., Phillips,M.L., Latour,J.G., 1999. Selectin blockade reduces neutrophil interaction with platelets at the site of deep arterial injury by angioplasty in pigs. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 19, 372-377.
- Mirabet,M., Garcia-Dorado,D., Insete,J., Barrabes,J.A., Lidon,R.M., Soriano,B., Azevedo,M., Padilla,F., Agullo,L., Ruiz-Meana,M., Massaguer,A., Pizcueta,P., Soler-Soler,J., 2002. Platelets activated by transient coronary occlusion exacerbate ischemia-reperfusion injury in rat hearts. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 283, H1134-H1141.
- Mullberg,J., Oberthur,W., Lottspeich,F., Mehl,E., Dittrich,E., Graeve,L., Heinrich,P.C., Rose-John,S., 1994. The soluble human IL-6 receptor. Mutational characterization of the proteolytic cleavage site. *J.Immunol.* 152, 4958-4968.

- Palabrica,T., Lobb,R., Furie,B.C., Aronovitz,M., Benjamin,C., Hsu,Y.M., Sajer,S.A., Furie,B., 1992. Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by P-selectin on adherent platelets. *Nature* 359, 848-851.
- Platt,J.L., 1996. Xenotransplantation: recent progress and current perspectives. *Curr.Opin.Immunol.* 8, 721-728.
- Ridker,P.M., Buring,J.E., Rifai,N., 2001. Soluble P-selectin and the risk of future cardiovascular events. *Circulation* 103, 491-495.
- Sanders,W.E., Wilson,R.W., Ballantyne,C.M., Beaudet,A.L., 1992. Molecular cloning and analysis of in vivo expression of murine P-selectin. *Blood* 80, 795-800.
- Schleiffenbaum,B., Spertini,O., Tedder,T.F., 1992. Soluble L-selectin is present in human plasma at high levels and retains functional activity. *J.Cell Biol.* 119, 229-238.
- Stocker,C.J., Sugars,K.L., Harari,O.A., Landis,R.C., Morley,B.J., Haskard,D.O., 2000. TNF-alpha, IL-4, and IFN-gamma regulate differential expression of P- and E-selectin expression by porcine aortic endothelial cells. *J.Immunol.* 164, 3309-3315.
- Tedder,T.F., Steeber,D.A., Chen,A., Engel,P., 1995. The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J.* 9, 866-873.

- Tu, L., Poe, J.C., Kadono, T., Venturi, G.M., Bullard, D.C., Tedder, T.F., Steeber, D.A., 2002. A functional role for circulating mouse L-selectin in regulating leukocyte/endothelial cell interactions in vivo. *J.Immunol.* 169, 2034-2043.
- Ushiyama, S., Laue, T.M., Moore, K.L., Erickson, H.P., McEver, R.P., 1993. Structural and functional characterization of monomeric soluble P-selectin and comparison with membrane P-selectin. *J.Biol.Chem.* 268, 15229-15237.
- Vestweber, D., Blanks, J.E., 1999. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol Rev.* 79, 181-213.
- Weller, A., Isenmann, S., Vestweber, D., 1992. Cloning of the mouse endothelial selectins. Expression of both E- and P-selectin is inducible by tumor necrosis factor alpha. *J.Biol.Chem.* 267, 15176-15183.
- Whiss, P.A., Andersson, R.G., Srinivas, U., 1998. Kinetics of platelet P-selectin mobilization: concurrent surface expression and release induced by thrombin or PMA, and inhibition by the NO donor SNAP. *Cell Adhes.Commun.* 6, 289-300.
- Wong, C.S., Gamble, J.R., Skinner, M.P., Lucas, C.M., Berndt, M.C., Vadas, M.A., 1991. Adhesion protein GMP140 inhibits superoxide anion release by human neutrophils. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88, 2397-2401.



## Figure legends

Fig. 1. SwPsel.1.9 mAb recognizes porcine P-selectin. Indirect immunofluorescence staining with Swpsel.1.9 mAb of A) 300.19 cells and B) COS cells. SwPsel.1.9 specifically stained P-selectin transfected cells (solid lines) but was unreactive with untransfected cells (dotted lines). Fluorescence intensity is shown in a 4-decade log scale. C) Immunoprecipitation of P-selectin from porcine platelets with SwPsel.1.9 mAb. Porcine activated platelets were surface-biotinylated and immunoprecipitated with the SwPsel.1.9 mAb and an irrelevant mAb as negative control. Samples were run on SDS-PAGE 8% gel in reducing conditions and blotted onto PVDF membrane. Membrane was treated with HRP-avidin and the bands developed with ECL.

Fig. 2. Cross-blocking analysis of the swine P-selectin specific antibodies SwPsel.1.9 and P-sel.KO.2.5. Swine P-selectin-transfected 300.19 cells were incubated with medium (positive control) and saturating amounts of P-sel.KO.2.5 (blocking control) and SwPsel.1.9 mAbs before treatment with biotinylated P-sel.KO.2.5 mAb. They were then stained with streptavidin-RPE. Solid lines represent the fluorescence intensity of the cells as assessed by flow cytometry. Dotted lines indicate the background staining of the cells treated with streptavidin-RPE alone.

Fig. 3. ELISA for porcine soluble P-selectin. Serial dilutions of the recombinant swine P-selectin fusion protein (SwPsel-Fc) were used to generate a standard

curve. The average absorbance values at 450 nm for each set of dilutions are represented.

Fig. 4. Detection of porcine circulating P-selectin. Plasma samples from pigs (n=15) undergoing allotransplantation of cryopreserved femoral veins were obtained pre- and post-surgery. Samples were run in triplicate and the relative concentration of soluble P-selectin in each sample was determined by ELISA. Horizontal bars indicate the mean value of each group.

Fig. 5. Determination of the absolute amount of P-selectin in porcine platelets. Samples containing serial numbers of porcine platelets were lysed and P-selectin concentrations in the supernatants were measured by ELISA. Samples were run in duplicate and the average P-selectin concentration was represented.

Fig. 6. P-selectin expression on activated porcine platelets. Porcine platelets were treated for 10 min at 37 °C with medium alone (resting platelets), human thrombin (1 U/ml) and PMA (10 ng/ml). Representative flow cytometry histograms of P-selectin staining on the platelets with the Swpsel.1.9 mAb are depicted as solid lines. Staining with an irrelevant antibody is shown as dotted lines. Fluorescence intensity is shown in a 4-decade log scale.

Fig. 7. Correlation between the activator dose and P-selectin expression on porcine platelets. Porcine platelets were treated for 10 min at 37°C with increasing doses of thrombin (0.1, 0.5, 1 and 2 U/ml) and PMA (1, 5, 10, 20

ng/ml), and medium alone (resting platelets). The expression of P-selectin on platelet surface was evaluated by indirect immunofluorescence using the SwPsel.1.9 mAb. The mean fluorescence (A) and percentage of positive platelets for P-selectin expression (B) was determined by flow cytometry. The average value from five experiments is represented.

Fig. 8. Quantification of PMA-induced proteolytic release of surface receptors by ELISA. COS cells expressing swine P-selectin (33,3 % positive cells, mean fluorescence of 393) or human TNFR2 (41,6 % positive cells, mean fluorescence of 286) were cultured with medium alone and medium containing 50 ng/ml of PMA for 30 min at 37°C. The supernatants were collected and soluble P-selectin (A) and TNFR2 (B) levels were determined by ELISA.

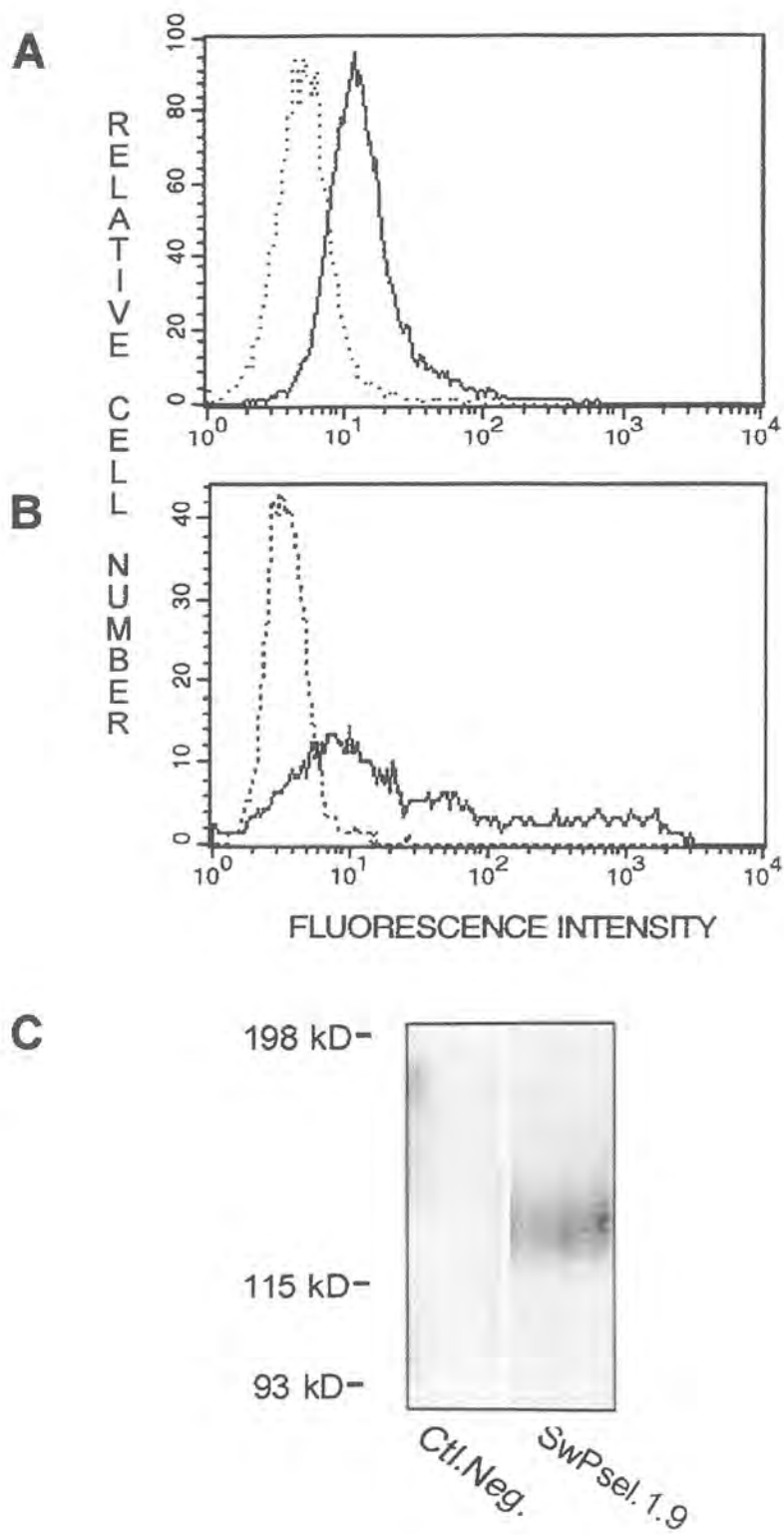


Figura 1

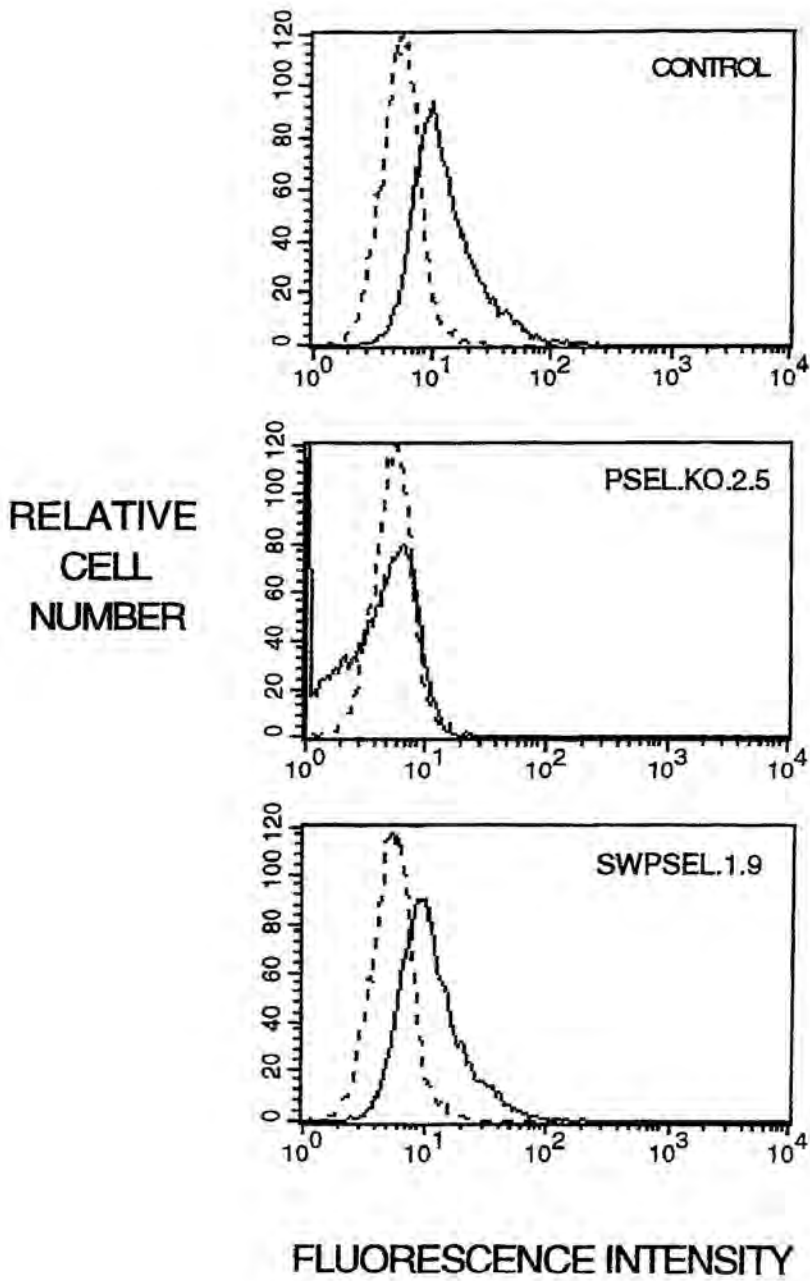


Figura 2

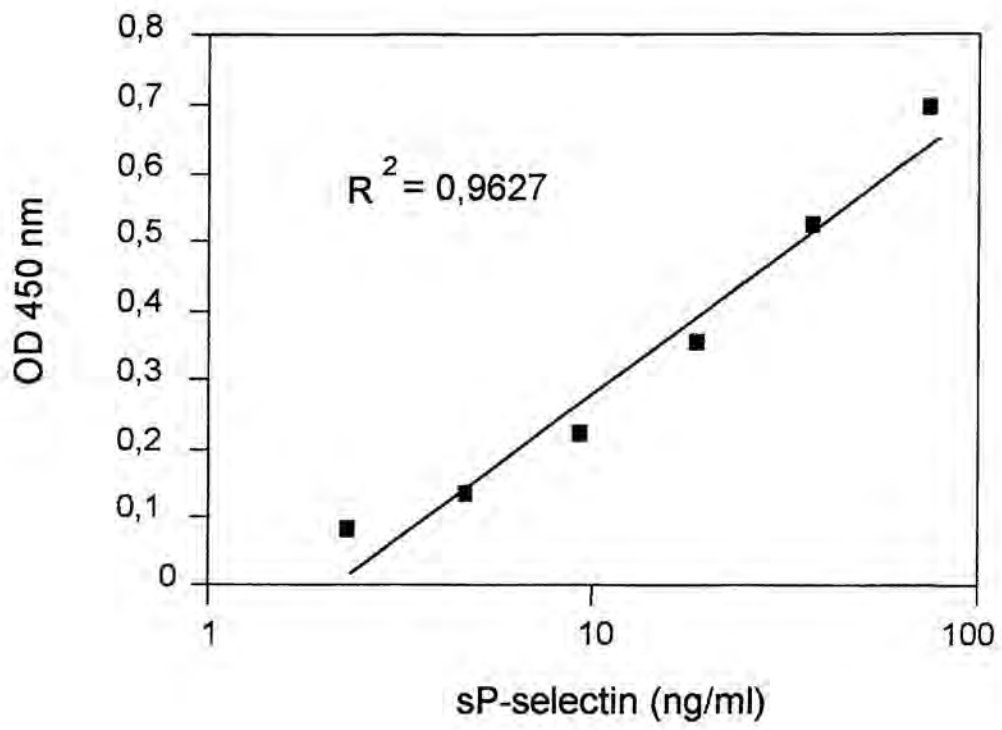


Figura 3

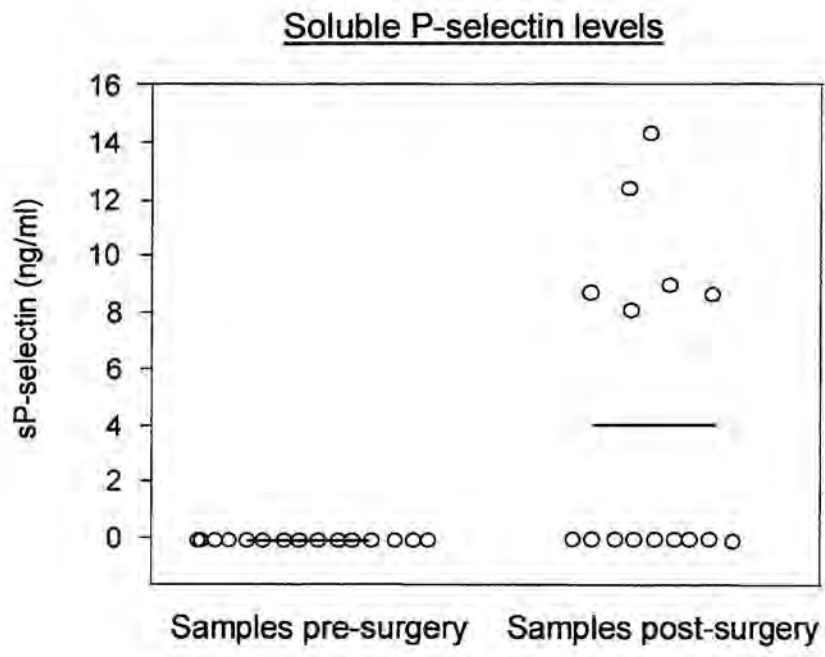


Figura 4

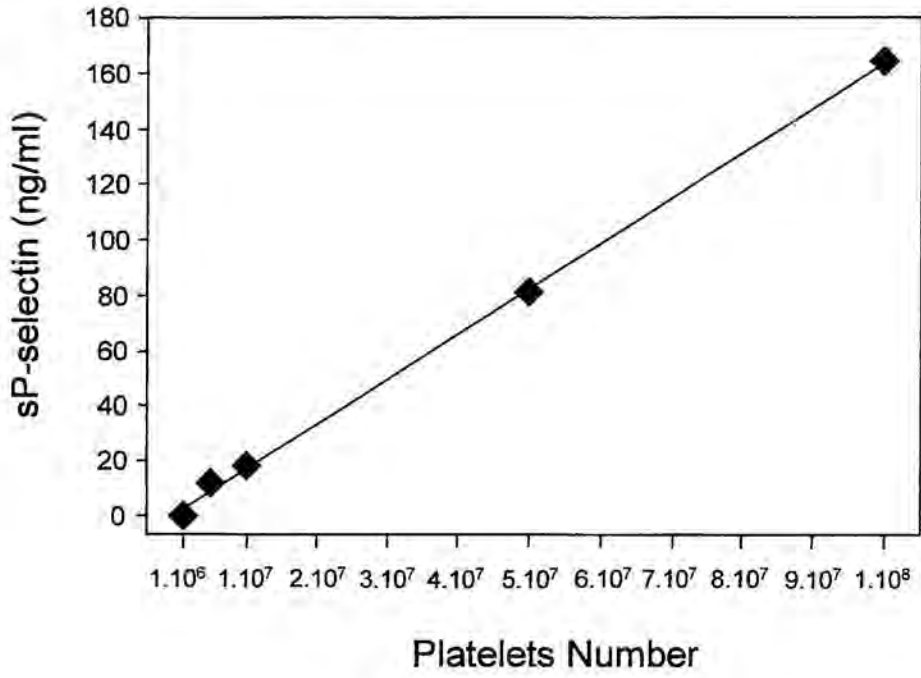


Figura 5



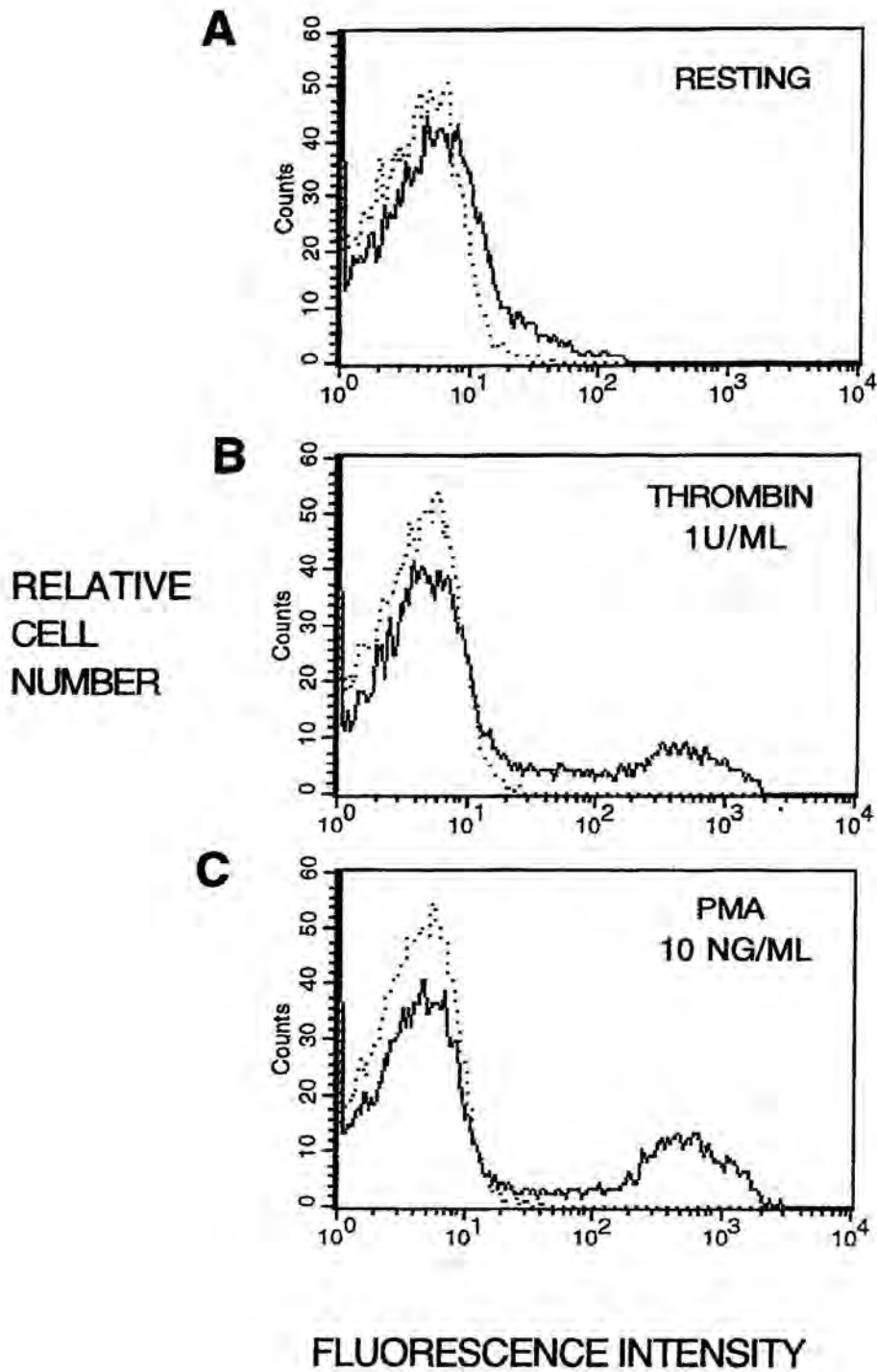


Figura 6

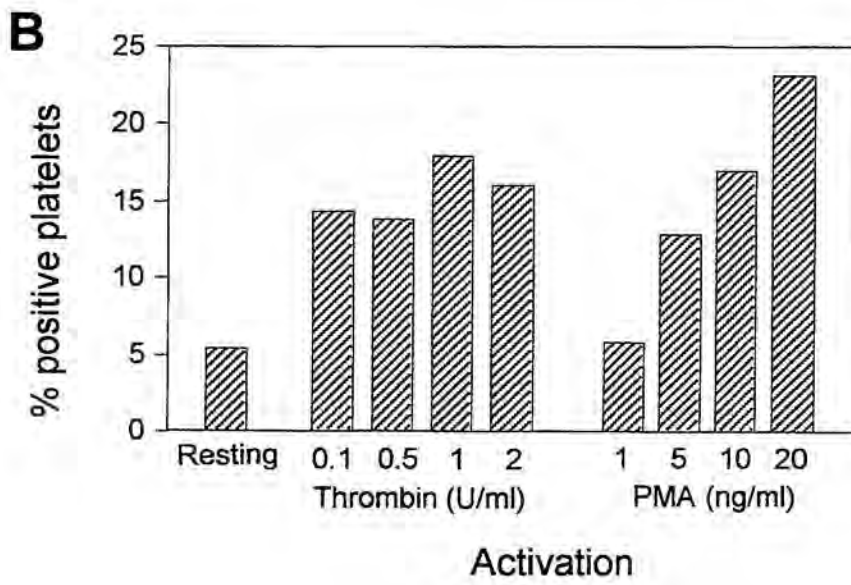
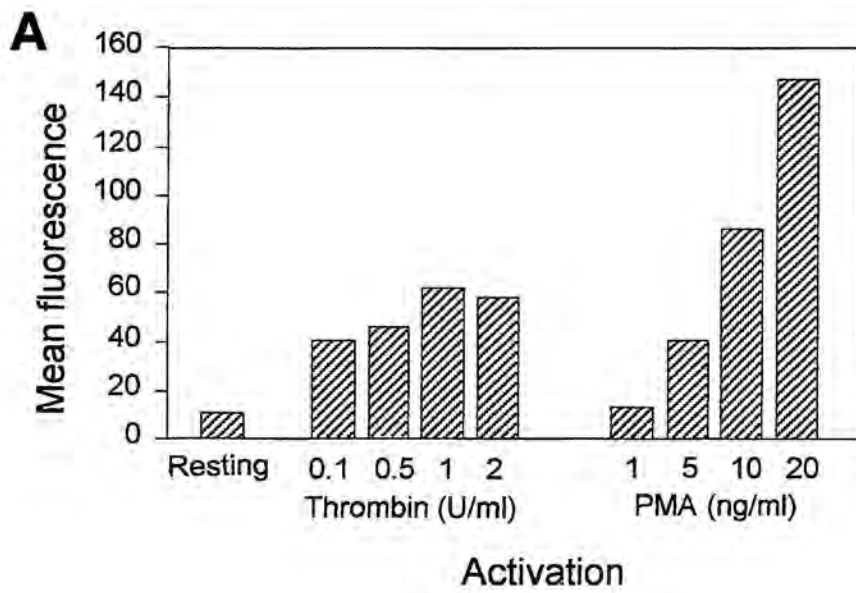


Figura 7

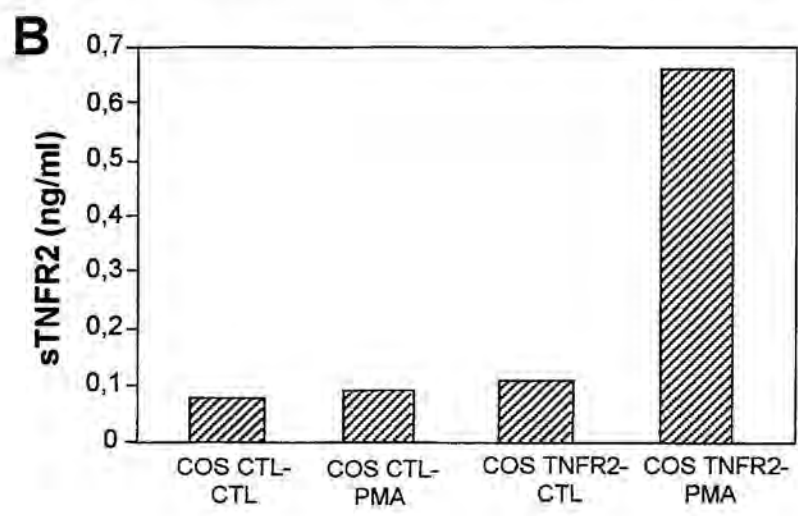
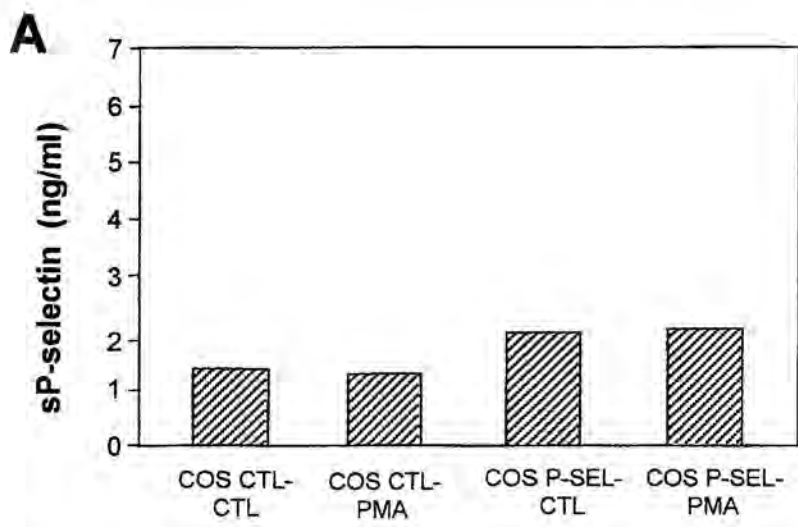


Figura 8

### 4.3. ARTICLE N° 3

**Concanavalin-A-induced liver injury is severely impaired in mice deficient in P-selectin.**

Anna Massaguer, Sofía Perez-del-Pulgar, Pablo Engel, Joan Serratosa, Jaime Bosch, Pilar Pizcueta.

Journal of Leukocyte Biology, 2002; 72: 262-270

### 4.3.1. Resum de l'article nº3:

En aquest treball s'avalua el paper de la P-selectina en la hepatitis induïda per Concanavalina A (Con A), un model caracteritzat per l'activació i infiltració al fetge de limfòcits T CD4+.

El tractament amb Con A va induir una expressió transitòria de P-selectina a les vènules hepàtiques i plaquetes. Després de la injecció de Con A, ratolins genèticament deficients en P-selectina van presentar una disminució de l'adhesió de limfòcits a les vènules del fetge i als sinusoides, una important reducció de l'oclusió intrasinusoïdal i una infiltració de limfòcits al parènquima hepàtic més reduïda. Així mateix, es va observar que els nivells de transaminases eren menors i una abolició casi complerta de la lesió necròtica, demostrant que el dany hepàtic era menor en els animals deficients en P-selectina. El pretractament de ratolins amb un anticòs bloquejant de la funció de la P-selectina va atenuar la oclusió sinusoïdal i va reduir l'increment de transaminases després del tractament amb Con A. Aquests resultats impliquen la P-selectina en el desenvolupament del dany hepàtic induït per Con A i revelen l'efecte protector del bloqueig de P-selectina en aquesta hepatitis.

# Concanavalin-A-induced liver injury is severely impaired in mice deficient in P-selectin

Anna Massagué,<sup>\*,†</sup> Sofia Perez-del-Pulgar,<sup>†,‡</sup> Pablo Engel,<sup>\*,†</sup> Joan Serratosa,<sup>†,§</sup> Jaime Bosch,<sup>†,‡</sup> and Pilar Pizcueta<sup>†,‡</sup>

<sup>‡</sup>Hepatic Hemodynamic Laboratory, Liver Unit, Hospital Clínic, Barcelona, Spain; <sup>\*</sup>Immunology Unit, Department of Cellular Biology and Pathology, Medical School, University of Barcelona, Spain; <sup>§</sup>Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Barcelona, Spain; and <sup>†</sup>Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Barcelona, Spain

**Abstract:** P-selectin (CD62P) is an adhesion molecule that mediates the initial attachment of leukocytes to activated platelets and endothelial cells in damaged tissues. We evaluated the role of P-selectin in concanavalin A (Con A)-induced hepatitis, a model characterized by CD4<sup>+</sup> T cell activation and infiltration of the liver. Con A injection induced transient P-selectin expression on hepatic venules and platelets. Mice lacking P-selectin showed impaired lymphocyte adhesion to liver venules and sinusoids, a striking reduction in intrasinusoidal occlusion, and decreased lymphocyte infiltration of liver parenchyma. The reduction in transaminase levels and the almost complete abolition of necrotic injury demonstrated that liver damage was lower in P-selectin-deficient mice. In wild-type mice, pretreatment with the P-selectin-blocking monoclonal antibody attenuated the sinusoidal occlusion and reduced the rise in transaminases after Con A treatment. These results implicate P-selectin in the development of Con A-induced liver injury and reveal the protective effect of blocking P-selectin in this hepatitis. *J. Leukoc. Biol.* 72: 262–270; 2002.

**Key Words:** hepatitis · necrosis · T lymphocyte · adhesion molecule

## INTRODUCTION

P-selectin (CD62P), a glycoprotein present in the  $\alpha$ -granules of platelets and Weibel-Palade bodies of endothelial cells, is rapidly translocated to the cell surface upon activation by thrombogenic and inflammatory mediators [1]. Prolonged surface expression of P-selectin on endothelial cells has been observed when these cells are stimulated with oxygen radicals, lipopolysaccharide (LPS), or cytokines [2, 3]. P-selectin supports the initial rolling of leukocytes and platelets on activated endothelium and mediates platelet-leukocyte adhesion [4–6]. Furthermore, P-selectin binds to monocytes, neutrophils, mast cells, eosinophils, natural killer cells, and T cells, especially memory CD4<sup>+</sup> T cells, via the P-selectin glycoprotein ligand (PSGL-1) molecule [7, 8].

Blocking P-selectin function prevents various pathologies in experimental animal models including myocardial infarction [9, 10], lung injury [11, 12], delayed-type hypersensitivity [13], and arthritis [14, 15]. P-selectin is also involved in liver inflammatory disturbances such as endotoxemia [16] and hepatic ischemia/reperfusion [17]. Neutrophils and monocytes induce tissue damage in these experimental models. However, the role of P-selectin in lymphocyte cell-mediated hepatic inflammation is unclear. For instance, in human autoimmune liver disease, the predominant cells infiltrating the liver are CD4<sup>+</sup> T lymphocytes [18]. Additionally, the disease activity in chronic active hepatitis B or C is associated with the T helper cell type 1 (Th1) cytokine response of intrahepatic CD4<sup>+</sup> lymphocytes [19, 20].

Concanavalin A (Con A)-induced hepatitis is an experimental model of human autoimmune hepatitis. Hepatocyte injury is associated with massive CD4<sup>+</sup> lymphocyte activation and infiltration into the liver parenchyma, leading to secretion of the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), interleukin (IL)-2, IL-6, granulocyte macrophage-colony stimulating factor, and IL-1 [21–24]. Con A also induces intrasinusoidal hemostasis by leukocyte, platelet, and erythrocyte aggregates, which contribute to the development of liver damage [25].

Lymphocyte transmigration through the endothelial barrier into the inflamed tissue is a prerequisite for the action of effector cells. This is a multiple-step process that involves several adhesion receptors [26]. Few studies have examined the role of adhesion molecules in Con A-induced hepatic injury. Whereas one report describes the inhibitory effects of anti-E-selectin and anti-vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) monoclonal antibodies (mAb) [27], another study shows that these adhesion molecules have no known role and that intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is not involved in Con A-induced liver disease [28]. To our knowledge, the function of P-selectin has not been established in this experimental model.

Correspondence: Dr. Pilar Pizcueta, Fundació Clínic per a la Recerca Biomèdica, C/Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain. E-mail: pizcueta@medicina.ub.es

Received October 18, 2001; revised March 1, 2002; accepted March 18, 2002.

Therefore, we examined the involvement of P-selectin in Con A-induced hepatitis. We used P-selectin-deficient mice and blocking anti-P-selectin mAb in wild-type mice to establish the therapeutic potential of this molecule in autoimmune hepatitis.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

C57BL/6 wild-type and P-selectin-deficient mice [29] were obtained from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Mice were 8–14 weeks old at the time of use. They were housed in a pathogen-free barrier facility and were screened regularly for pathogens. All studies and procedures were performed in accordance with the principles of laboratory animal care (National Institutes of Health publication no. 86-23, revised 1985) and the guidelines of procedures for animal experiments from the Generalitat de Catalunya.

### Reagents

Con A was from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). The mouse anti-P-selectin-blocking mAb P-sel.ko.2.12 [immunoglobulin G (IgG)1] and anti-P-selectin nonblocking mAb P-sel.ko.2.3 (IgG1) were produced in our laboratory [30]. Protein G-Sepharose (Pharmacia Biotech AB, Upsala, Sweden)-purified mAb were obtained from concentrated supernatant (Integra CL350 flasks, Integra Biosciences, Switzerland). Phycoerythrin (PE) anti-CD41, anti-E-selectin, fluorescein isothiocyanate (FITC) anti-CD4, PE anti-CD8a, and PE anti-CD11b mAb were from Pharmingen (San Diego, CA). Cy<sup>TM</sup>3-conjugated Streptavidin (Jackson ImmunoResearch Labs, West Grove, PA), FITC-conjugated goat anti-rat IgG, biotin-conjugated goat anti-rat IgG (Caltag, San Francisco, CA), and R-PE-conjugated streptavidin (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL) were used as secondary reagents for immunofluorescence or immunocytochemistry analysis.

### Mice treatment

Con A was dissolved in sterile, pyrogen-free phosphate-buffered saline (PBS; Gibco-BRL, Gaithersburg, MD) and injected intravenously via tail vein at a dose of 20 mg/kg per mouse. In control-treated animals, only PBS was injected. C57BL/6 wild-type mice were pretreated intraperitoneally (i.p.) with anti-P-selectin-blocking mAb (P-sel.ko.2.12) or anti-P-selectin isotype antibody-matched, nonblocking mAb (P-sel.ko.2.3) at a dose of 100 µg/mouse, 5 min before Con A administration. None of the mAb treatments caused neutropenia. LPS (*Escherichia coli* serotype O111:B4; Sigma Chemical Co.) was injected i.p. at a dose of 10 mg/kg per mouse.

### Immunohistochemistry

Livers from wild-type and P-selectin-deficient mice were perfused through the portal vein with a peristaltic pump at a rate of 6 ml/min with 10 ml PBS followed by 2% paraformaldehyde (w/v) in PBS. Liver portions (1–1.5 cm<sup>3</sup>) were then fixed with 2% paraformaldehyde for 1 h at 4°C, cryoprotected overnight in a 30% sucrose solution (w/v) at 4°C, and frozen in liquid nitrogen. Liver sections of 8 µm were obtained and fixed in 4% paraformaldehyde. Sections were then evaluated for P-selectin and E-selectin expression by fluorescence immunohistochemistry. Samples were incubated overnight at 4°C with the primary mAb, biotinylated P-sel.ko.2.12 (5 µg/ml), rat anti-mouse E-selectin (5 µg/ml), or PBS-1% bovine serum albumin (Sigma Chemical Co.) as negative control. Thereafter, sections were treated with Cy<sup>TM</sup>3-conjugated streptavidin (Jackson ImmunoResearch Labs; 1:6000) to detect P-selectin and with a biotin-conjugated anti-rat IgG mAb (Caltag; 5 µg/ml) followed by Cy<sup>TM</sup>3-conjugated streptavidin (1:6000) to detect E-selectin. Incubations were performed for 1 h at room temperature. Samples were analyzed by confocal laser-scanning microscopy (Leica TCS NT, Heidelberg, Germany).

The number of platelets accumulated in the liver sinusoids at 2 h and 6 h after Con A treatment was determined in wild-type and P-selectin-deficient mice. Three mice were included in each group. Liver sections of 8 µm were obtained and incubated overnight at 4°C with a rat anti-mouse CD41 mAb (Pharmingen; 10 µg/ml) followed by incubation with an anti-rat IgG FITC-

conjugated mAb (Caltag; 5 µg/ml). Five confocal images at 400× magnification were randomly obtained from each liver section. Images were processed with the Scion image analyzing system (Scion Corporation, Frederick, MD), and the average number of platelets per microscopic field was calculated for each sample. The mean value for the three mice receiving the same treatment was then established.

### Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis

Total RNA from mouse liver samples at 0 h and at 4 h of LPS treatment and 6 h of Con A treatment was prepared with Trizol reagent (Life Technologies, Rockville, MD). RNAs were reverse-transcribed into cDNA using a First-Strand cDNA synthesis kit for RT-PCR avian myeloblastis virus and were then amplified by PCR with the Taq polymerase Expand High Fidelity<sup>TM</sup> (Roche Diagnostics, Ottweiler, Germany), according to the manufacturer's instructions. Cycling conditions for this amplification were 35 cycles of 94°C for 30 s, 58°C for 1 min, and 72°C for 1 min, preceded by 94°C for 4 min. RT-PCR of mouse P-selectin was performed using the following primers: 5'TGTGAAGC-TATTGCGTGTGGAACC3' (sense primer) and 5'TTGATGGCTTCACACGT-GGGAGC3' (antisense primer). The amplified product was electrophoresed in 1% agarose gel and stained with ethidium bromide.

### Histological examinations

The livers from wild-type and P-selectin-deficient mice were obtained 0, 2, 6, 12, 24, and 48 h after Con A treatment and were fixed in 10% formalin. Four mice were used for each group. Liver portions were dehydrated through alcohol series and xylene and embedded in paraffin. For the histological studies, 5 µm-thick sections were obtained and stained with hematoxylin and eosin. Sections were examined under a light microscope (Zeiss Axioplan, Jena, Germany).

### Assessment of lymphocyte adhesion

The number of lymphocytes adhering to sinusoidal endothelium and hepatic and portal venules was determined in each histological section, 0 h, 2 h, and 6 h after Con A treatment. Lymphocytes were distinguished from other leukocytes by the morphology of their nucleus. Ten microscopic fields (×400) were taken at random from each sample, and all the lymphocytes included in the field were analyzed. The mean value in the four mice was then calculated.

### Assessment of leukocyte infiltration

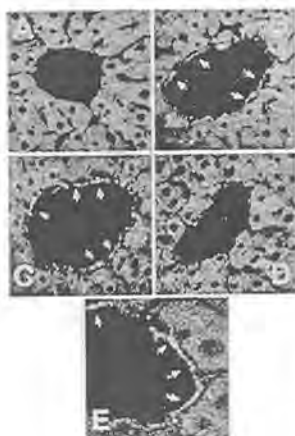
The number of infiltrating leukocytes into the liver parenchyma was counted in the periportal areas and around hepatic venules from hematoxylin- and eosin-stained sections at 24 h and 48 h after Con A treatment. Cells were counted as described above.

To characterize the infiltrating leukocytes, livers from wild-type and P-selectin-deficient mice were removed 24 h after Con A treatment. Livers were cut into small pieces, digested with Collagenase A (Roche Diagnostics; 0.1 mg/ml PBS) for 5 min at 37°C, and gently pressed through a cell strainer (100 µm; Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ). The cell liver suspension was washed and then resuspended in RPMI-1640 medium supplemented with 2% fetal calf serum (FCS; Gibco-BRL). An aliquot of total cell suspension was stained with Methyl violet (Merck, Darmstadt, Germany) and was analyzed by light microscopy to assess the percentage of polymorphonuclear leukocytes (PMN) infiltrating the liver versus mononuclear leukocytes (MNC). MNC were then isolated by Ficoll density gradient centrifugation (1000 g for 20 min). MNC were washed twice and resuspended in RPMI-1640 medium supplemented with 2% FCS. The cells were analyzed by flow cytometry for the expression of CD4, CD8, and CD11b cell surface markers. Four animals were included in each group, and the mean value was calculated.

### Evaluation of liver hemostasis

Liver hemostasis was defined as occlusion of sinusoids by aggregates formed by erythrocytes, platelets, and leukocytes. It was evaluated by calculating the percentage of sinusoidal area occluded with cell aggregates in the liver samples at baseline, 2 and 6 h after Con A injection. Ten microscopic fields (×200) were obtained from each sample using the Zeiss microscope provided with a TV camera. The Scion image analyzing program was used to determine

**Fig. 1.** Time course of P-selectin expression on the hepatic endothelium after Con A treatment. Immunofluorescent staining of P-selectin on liver sections from wild-type mice, 0 (A), 2 (B), 6 (C), and 12 (D) h after Con A treatment was performed using the biotin-conjugated P-sel.ko.2.12 mAb and Cy<sup>TM</sup>3-streptavidin. Arrows indicate the staining on endothelial cells. Original magnification,  $\times 400$ . Higher magnification (original,  $\times 1200$ ) of P-selectin staining 2 h after Con A treatment is represented (E).



the area of each sinusoid and the area of cell aggregates inside the sinusoids. An average of 50 sinusoids was evaluated in each sample, and four mice were used in each situation. The percentage of sinusoidal occlusion was established for each group of mice.

### Histological determination of hepatic necrosis

Hepatic necrosis was assessed in each section as the percentage of liver parenchyma with necrotic damage. To this end, eight microscopic fields of each sample were obtained at  $25\times$  magnification. Images were processed with the Scion image analyzing system. The total hepatic parenchyma area and the necrotic area were measured for each sample, and the percentage of necrotic area was established for each mouse. Each value is the average of four animals.

### Platelets isolation

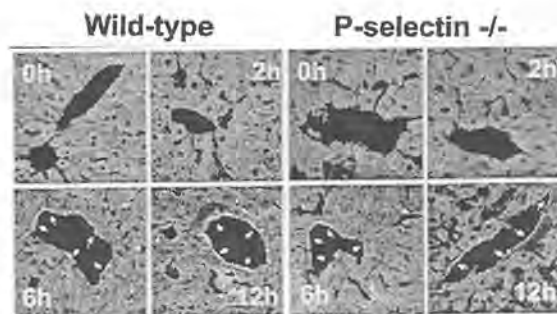
Blood from wild-type and P-selectin-deficient mice was collected from inferior cava vein into a solution containing nine parts of PBS and one part of acid-citrate-dextrose (38 mmol/l citric acid, 75 mmol/l trisodium citrate, and 100 mmol/l dextrose), at 0 h, 2 h, and 6 h after Con A treatment. Blood was centrifuged at 280 *g* for 5 min at room temperature to obtain platelet-rich plasma, and platelets were then isolated by further centrifugation at 2000 *g* for 6 min. Platelets were washed twice in PIPES buffer, pH 6.1 (25 mmol/l PIPES, 137 mmol/l NaCl, 4 mmol/l KCl, and 0.1% wt/vol dextrose) and were resuspended in PIPES buffer, pH 7.0, for flow cytometry analysis with the CD41 and P-sel.ko.2.12 mAb.

### Flow cytometry analysis

MNC cells were analyzed by single and double immunofluorescence using FITC or PE directly labeled mAb (CD4-FITC, CD8a-PE, CD11b-PE). Platelets were studied by double immunofluorescence with the biotinylated P-sel.ko.2.12 and rat anti-mouse CD41 mAb (PharMingen). After washing, the platelets were treated with goat anti-rat IgG FITC-conjugated (Caltag) and PE-conjugated streptavidin (Southern Biotechnology Associates). Platelet acquisition was performed at logarithmic scale, and the platelet population was identified using CD41 mAb. Fluorescence was analyzed using a FACSCalibur (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA) equipped with the CellQuest<sup>TM</sup> software. Fluorescence intensity was represented on a four decade log scale (1–10,000). At least 5000 cells were analyzed.

### Transaminase measurements

Blood was collected from the inferior cava vein into Microtainer brand tubes with ethylenediaminetetraacetate (Becton Dickinson Vacutainer Systems, Franklin Lakes, NJ), 0, 2, 6, 12, 24, and 48 h after Con A injection. Samples were immediately centrifuged at 2000 *g* for 7 min. Aspartate aminotransferase (ASAT) and alanine aminotransferase (ALAT) activities in plasma were measured on the Dimension R $\times$ L<sup>®</sup> clinical chemistry system (Dade-Behring Inc., Deerfield, IL) following the International Federation of Clinical Chemistry guidelines [31].



**Fig. 2.** E-selectin expression on the hepatic endothelium after Con A treatment in wild-type and P-selectin-deficient mice. E-selectin expression was evaluated in liver samples at 0, 2, 6, and 12 h after Con A injection. Sections were stained with anti-E-selectin mAb, and binding sites were detected with a biotin-conjugated anti-rat-IgG mAb and Cy<sup>TM</sup>3-streptavidin. Arrows indicate the staining on endothelial cells. Original magnification,  $\times 400$ .

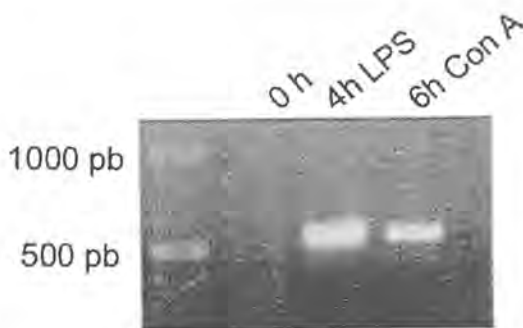
### Statistical analysis

All data were analyzed using analysis of variance and Student's unpaired *t*-test. All results are reported as mean  $\pm$  SEM. Statistical significance was set at  $P < 0.05$ .

## RESULTS

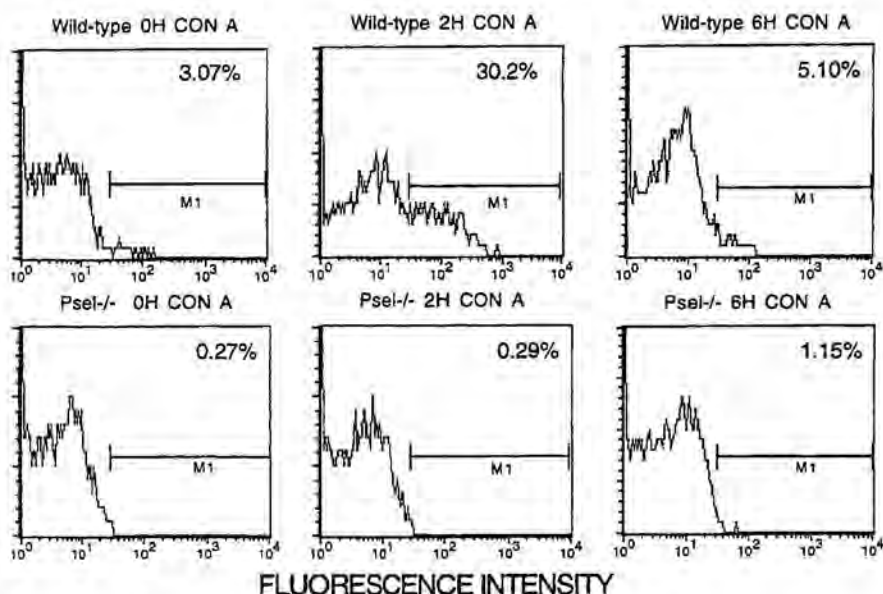
### P-selectin expression on the hepatic endothelium and platelets after Con A administration

The expression of P-selectin on the liver endothelium of wild-type mice was evaluated 0, 2, 6, 12, 24, and 48 h after Con A injection. Endothelial cells showed no staining of P-selectin before the treatment (Fig. 1A). However, 2 h after Con A treatment, P-selectin expression was detected in endothelial cells of portal and hepatic veins (Fig. 1B), which persisted at 6 h (Fig. 1C) but was not seen after 12 h (Fig. 1D). P-selectin expression on sinusoidal lining cells and hepatocytes was not detected. E-selectin expression on the hepatic vasculature was also evaluated in wild-type and P-selectin-deficient mice, as TNF can also induce E-selectin expression and might be an



**Fig. 3.** RT-PCR analysis of P-selectin expression in the liver. Total liver RNA was isolated from wild-type mice at baseline (0 h), 4 h after LPS treatment, and 6 h after Con A treatment. These time points correspond to maximum P-selectin expression as assessed by immunohistochemistry. mRNA was reverse-transcribed and amplified by PCR with primers specific for murine P-selectin. Ethidium bromide staining of the PCR products after gel analysis.





**Fig. 4.** Immunofluorescence analysis of P-selectin expression on platelets after Con A treatment. Platelets were stained for two-color flow cytometry. CD41 mAb was used to select the specific platelet population. Representative flow cytometry histograms of P-selectin staining on platelets are shown. Fluorescence intensity is shown on a four-decade log scale.

important factor for leukocyte adhesion in the absence of P-selectin. E-selectin expression was also induced by Con A treatment (Fig. 2). E-selectin was first detected at 6 h after Con A treatment on endothelial cells in portal and hepatic veins as well as sinusoids. In contrast to P-selectin, E-selectin expression persisted at 12 h after Con A treatment. No differences in the kinetics or the level of E-selectin expression were observed between the wild-type and P-selectin-deficient animals.

The expression of P-selectin was further demonstrated by the presence of P-selectin mRNA in livers from Con A-treated mice (Fig. 3). Con A treatment induced similar P-selectin mRNA levels to those observed in LPS-treated mice.

P-selectin expression on platelets was analyzed by double immunofluorescence at 0 h, 2 h, and 6 h after Con A injection. Platelet population was identified using CD41 mAb. Analyses revealed that 30.2% of platelets from wild-type mice were positive for P-selectin staining 2 h after Con A injection (Fig. 4). However, P-selectin expression on platelets returned to baseline at 6 h. As expected, platelets from P-selectin-deficient mice showed no staining with the P-selectin mAb. These results showed that P-selectin is transiently expressed on endothelial cells and platelets after Con A treatment.

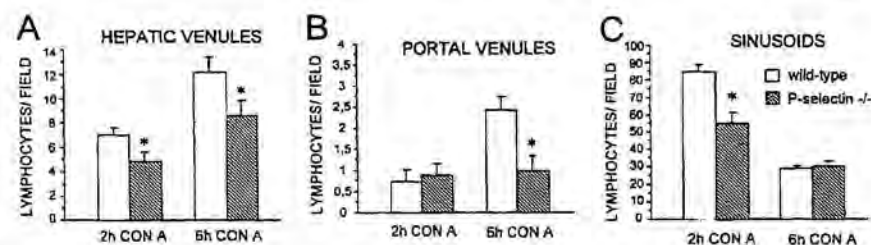
#### Lymphocyte adhesion to hepatic and portal veins and sinusoids decreased in P-selectin-deficient mice

The lymphocytes attached to the endothelium of hepatic and portal veins, and sinusoids were counted. At baseline, lympho-

cyte adhesion was restricted to sinusoids ( $19.1 \pm 0.7$  lymphocytes/field in wild-type mice and  $17.2 \pm 3.4$  in P-selectin-deficient mice) and was hardly found in portal and hepatic veins. Two hours after Con A treatment, lymphocytes started to adhere preferentially to hepatic veins (Fig. 5A) and sinusoids (Fig. 5C), but also to portal veins (Fig. 5B). Adhesion was further enhanced 6 h after Con A treatment in hepatic and portal veins, whereas it decreased in sinusoids. It was significantly lower in P-selectin-deficient mice 2 h and 6 h after Con A treatment in hepatic venules, at 6 h in portal venules, and at 2 h in hepatic sinusoids. Thus, lymphocyte adhesion was significantly lower in P-selectin-deficient mice after Con A injection.

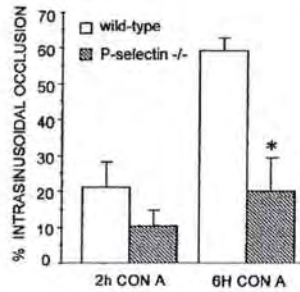
#### P-selectin was involved in the development of intrasinusoidal hemostasis

Intrasinusoidal hemostasis plays a critical role in the development of Con A hepatic injury [25]. Two hours after Con A injection, histological examinations of liver sections revealed increased leukocyte infiltration of sinusoids, accompanied by massive presence of red blood cells. Immunohistochemistry of liver samples with the CD41 mAb revealed high platelet infiltration into hepatic sinusoids at 2 h and 6 h after Con A injection. However, when the number of platelets in filtering the liver was evaluated in wild-type and P-selectin-deficient mice, no significant differences were observed (data not shown). To quantify the involvement of P-selectin in intrasinusoidal hemostasis, the percentage of sinusoidal area occluded by cell aggregates was measured in each sample with



**Fig. 5.** Number of adherent lymphocytes in hepatic veins (A), portal veins (B), and sinusoids (C) in wild-type and P-selectin-deficient mice. Measurements were performed 2 and 6 h after Con A injection. Four mice were included in each group. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. \*,  $P < 0.05$  versus wild-type mice.

**Fig. 6.** Con A induced intrasinusoidal occlusion in wild-type and P-selectin-deficient mice. The percentage of intrasinusoidal area occluded by cell aggregates was determined in liver sections at baseline, 2 and 6 h after Con A injection. The increase in sinusoidal congestion from basal values is represented as mean  $\pm$  SEM. \*,  $P < 0.05$  versus wild-type mice.

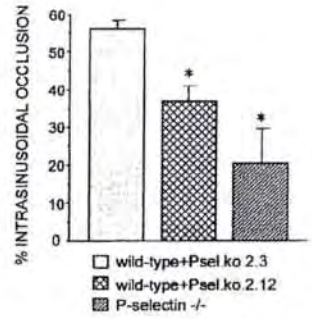


the Scion image analyzing program, revealing an increase in sinusoidal congestion from baseline, 2 and 6 h after Con A injection (Fig. 6). Intrasinusoidal occlusion was lower in P-selectin-deficient mice at 2 and 6 h than in wild-type mice. The maximum sinusoidal congestion (at 6 h) was 59% in wild-type mice versus 20% in P-selectin-deficient mice. To confirm the pathophysiological role of P-selectin in occlusion, wild-type mice were pretreated with anti-P-selectin-blocking P-sel.ko.2.12 mAb and control mice with nonblocking P-sel.ko.2.3 mAb. Pretreatment with the blocking mAb reduced the sinusoidal area occupied by cell aggregates as demonstrated visually in Figure 7. Morphometric analyses confirmed this observation. The P-selectin-blocking mAb significantly reduced sinusoidal occlusion to 36% (Fig. 8). These experiments revealed that the lack of P-selectin significantly decreases intrasinusoidal occlusion induced by Con A injection.

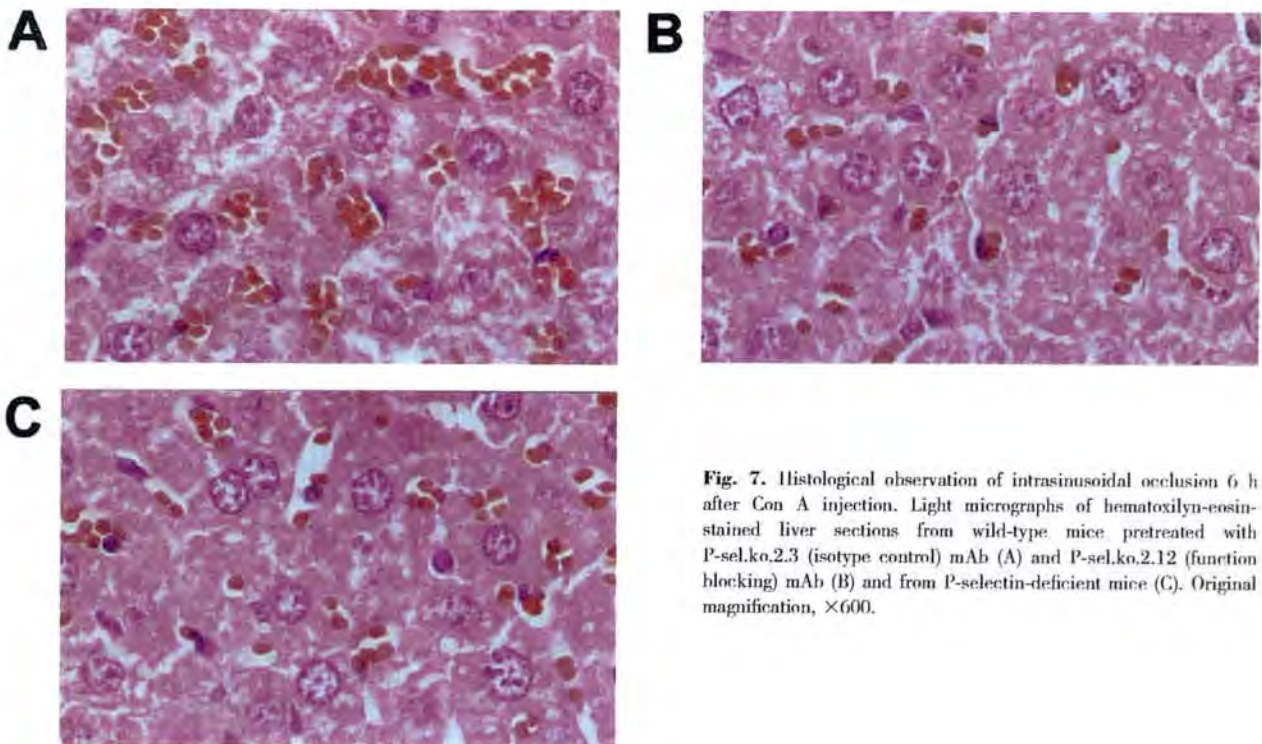
#### Leukocyte infiltration was decreased in P-selectin-deficient mice

Leukocyte infiltration around hepatic and portal venules was measured 24 and 48 h after Con A challenge, when maximum

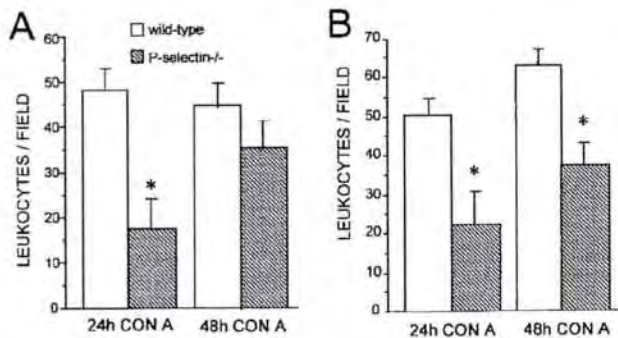
**Fig. 8.** Involvement of P-selectin in Con A-induced intrasinusoidal occlusion. The increase in sinusoidal occlusion from baseline values was determined in wild-type mice pretreated with P-sel.ko.2.3 (isotype control) mAb and P-sel.ko.2.12 (function blocking) mAb and in P-selectin-deficient mice. Results are represented as mean  $\pm$  SEM. Four animals were included in each group. \*,  $P < 0.05$  versus wild-type mice pretreated with P-sel.ko.2.3.



inflammatory infiltration was detected. Leukocyte infiltration was reduced in P-selectin-deficient mice in both areas at 24 h after Con A treatment (Fig. 9, A and B). This reduction was also observed 48 h after Con A in the periportal area (Fig. 9B). Although a decrease could be detected 48 h after Con A injection around hepatic veins (Fig. 9A), the reduction was not statistically significant. Less than 7% of the infiltrating leukocytes were PMN cells. No differences in the percentage of PMN cells were observed between the wild-type ( $5.7\% \pm 2.5$ ) and the P-selectin-deficient mice ( $6.4\% \pm 1.1$ ) after 24 h Con A treatment. This indicates that the main infiltrating cells were MNC. Analyses of isolated MNC from livers after 24 h Con A treatment by flow cytometry showed that  $28.1\% \pm 5.8$  in the wild-type mice and  $23.7\% \pm 6.0$  in the P-selectin-deficient mice corresponded to monocytic CD11b<sup>+</sup> cells. Similarly, no significant differences were observed in the CD4/CD8 ratio ( $2.2 \pm 0.4$  in wild-type mice vs.  $2.1 \pm 0.4$  in P-selectin-deficient mice). This indicates that the decreased infiltration in the liver of the P-selectin-deficient mice was not due to a specific leukocyte type or lymphocyte subset.



**Fig. 7.** Histological observation of intrasinusoidal occlusion 6 h after Con A injection. Light micrographs of hematoxylin-eosin-stained liver sections from wild-type mice pretreated with P-sel.ko.2.3 (isotype control) mAb (A) and P-sel.ko.2.12 (function blocking) mAb (B) and from P-selectin-deficient mice (C). Original magnification,  $\times 600$ .



**Fig. 9.** Leukocyte infiltration around hepatic (A) and portal veins (B) in wild-type and P-selectin-deficient mice. The number of leukocytes was determined 24 and 48 h after Con A injection. Four mice were used for each group. \*,  $P < 0.05$  versus wild-type mice.

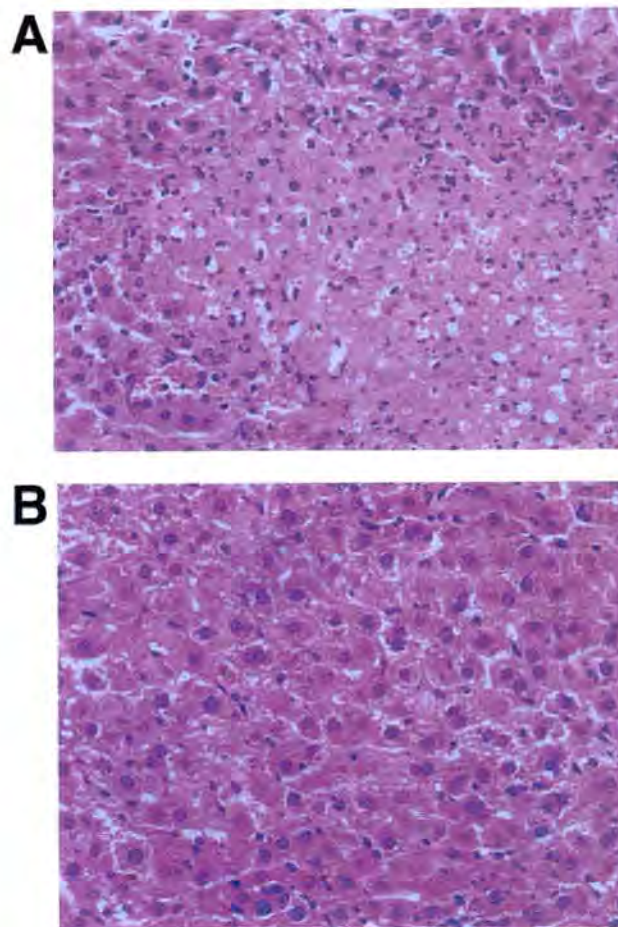
### Hepatic tissue damage induced by Con A was lower in P-selectin-deficient mice than in wild-type

Histopathological examination of livers revealed the characteristic injury caused by Con A treatment. At 12 h, widespread foci of necrotic hepatocytes, with loss of nuclei detail and well-defined cellular borders, started to appear in the liver parenchyma. After 24 h of Con A treatment, necrotic hepatocytes clearly were distinguished from the surrounding parenchyma and showed coagulative necrosis with small, chromatin-dense nuclei and eosinophilic cytoplasm (Fig. 10A). At 24–48 h, necrotic injury in P-selectin-deficient mice was significantly reduced (Fig. 10B). To establish the extent of liver damage, the percentage of hepatic parenchyma with necrotic injury was determined in each sample by image analysis. Necrosis after 24 h of Con A treatment affected about 4.4% of the parenchymal area in wild-type mice versus 0.2% of parenchyma in P-selectin-deficient mice (Fig. 11). At 48 h, the necrotic area decreased to 0.7% in wild-type mice, and P-selectin-deficient mice showed an almost complete recovery. Thus, the lack of P-selectin prevents the development of necrotic damage after Con A treatment.

### Effects of P-selectin on Con A-induced hepatotoxicity

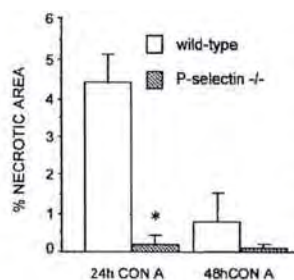
The serum levels (U/l) of ASAT and ALAT were used as markers of hepatic injury. The kinetics of ASAT and ALAT plasma levels were measured 0, 2, 6, 12, 24, and 48 h after Con A treatment in wild-type and P-selectin-deficient mice. Con A increased ASAT levels, especially in wild-type mice, with a peak at 12 h, which returned to baseline levels 48 h after administration (Fig. 12A). The highest values were detected at 12 h ( $1958 \pm 377$  vs.  $608 \pm 140$ ;  $P < 0.05$ ). Con A also raised ALAT levels at 12 h and 24 h, particularly in wild-type mice. At 12 h, wild-type and P-selectin-deficient mice showed the greatest difference in ALAT levels ( $864 \pm 190$  vs.  $247 \pm 103$ ;  $P < 0.05$ ; Fig. 12B).

To confirm that the lack of P-selectin had a protective effect, wild-type mice were pretreated with anti-P-selectin-blocking mAb (P-sel.ko.2.12) or anti-P-selectin-nonblocking mAb (P-sel.ko.2.3). Transaminase serum levels were evaluated 12 h



**Fig. 10.** Histopathological examination of Con A-induced liver injury. Light micrographs of hematoxylin-eosin-stained liver sections from wild-type and P-selectin-deficient mice at 24 h after Con A injection. Large necrotic areas were visible in wild-type animals (A) and markedly reduced in P-selectin mice (B). Original magnification,  $\times 200$ .

after Con A treatment, the point of maximum liver damage. Anti-P-selectin-blocking mAb reduced ASAT and ALAT levels by about 48% and 57%, respectively (Fig. 13, A and B). No increase in transaminase was observed when mice were injected with the vehicle alone (PBS), excluding the presence of endotoxin in the vehicle used in these experiments (Fig. 13). These data indicate that the lack of P-selectin prevents the development of Con A-induced hepatotoxicity.



**Fig. 11.** Evaluation of Con A-induced liver damage in wild-type and P-selectin-deficient mice. The percentage of liver parenchyma with necrotic injury was established in liver sections at 24 and 48 h after Con A injection. Results represent mean  $\pm$  SEM of four animals. \*,  $P < 0.05$  versus wild-type.

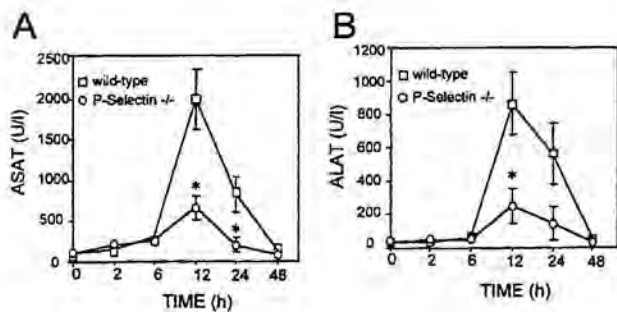


Fig. 12. Time course of plasma transaminase activities in wild-type and P-selectin-deficient mice following Con A injection (20 mg/kg). (A) Plasma ASAT and (B) plasma ALAT levels were assessed 0, 2, 6, 12, 24, and 48 h after Con A injection. Four animals were included in each group. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM; \*,  $P < 0.05$  versus wild-type.

## DISCUSSION

The pathology of human acute and chronic hepatitis is characterized by prominent infiltration of leukocytes, mainly lymphocytes, in the parenchyma and perivascular interstitial tissue of the liver [18, 19]. Lymphocyte attachment to endothelial cells of the central veins and portal veins and lymphocyte migration to the subendothelial layer are common features of inflammatory human liver diseases. Injection of Con A in mice induces T cell-associated hepatic injury, and it is considered an experimental model of human autoimmune hepatitis.

This study establishes that P-selectin is an important determinant of injury in Con A-induced hepatitis. This consisted of rapid lymphocyte adhesion, infiltration, marked congestion, and necrosis of hepatic tissue with a concomitant increase of serum transaminases in the wild-type mice. In contrast, P-selectin-deficient mice showed significantly less lymphocyte adhesion and infiltration, hemostasis, necrosis, and levels of transaminases. Moreover, blocking P-selectin function using mAb protected mice from Con A-induced hepatic damage.

The main infiltrating lymphocytes after Con A treatment are T cells [21, 32]. CD4<sup>+</sup> lymphocytes efficiently interact with P-selectin [33]. The expression of the functional PSGL-1 and specific chemokine receptors dictates the capacity of the T cell to migrate to different tissues. Moreover, the CD4<sup>+</sup> Th1 phenotype is the T cell subset that preferentially adheres to P-selectin, thus facilitating migration through the inflamed endothelium [33]. Several studies have established the role of P-selectin and its ligand PSGL-1 in T cell migration to the inflamed skin in a contact-hypersensitivity model [34–36], sensitized skin [37], psoriatic lesions, and colitis [38].

The expression of P-selectin is limited to the portal tract (arterial and venous) and central vein endothelia in normal and inflamed human livers [39]. In two reports, no P-selectin expression was observed after Con A injection in mice [27, 28]. Although conflicting results on the expression of several adhesion molecules in Con A-induced hepatitis have been reported [27, 28], we demonstrate that P-selectin is not constitutively present but transiently expressed in portal and hepatic venules and negative in the sinusoids. P-selectin protein expression was detected in a narrow time frame from 2 to 6 h after Con A

injection. These immunohistochemical data were corroborated by the finding of elevated levels of P-selectin mRNA. The kinetics of P-selectin expression is identical to that observed in other mouse experimental models such as ischemia, reperfusion, and endotoxemia [16, 17]. However, P-selectin staining in livers of Con A-treated mice was less intense than that observed in the liver endothelium after LPS treatment using the same P-selectin mAb [30]. Consistent with this observation, endotoxin also caused higher P-selectin mRNA levels than Con A. The main difference is that LPS induces the expression of P-selectin on the sinusoidal endothelium, whereas this was not observed after Con A treatment. We also observed transient expression of P-selectin on platelets.

Lymphocyte adhesion in hepatic and portal veins was lower in the P-selectin-deficient mice than in wild-type mice. Hepatic veins and to a lesser extent portal veins are the main sites of lymphocyte adhesion/transmigration during Con A-induced hepatitis in mice [27]. Our results confirm that lymphocytes started to adhere to the endothelium 2 h after Con A injection, sharply increased in number at 6 h, quickly decreased at 12 h, and were almost absent at 24 h [27]. Therefore, there was a high correlation between P-selectin expression and lymphocyte adhesion. Thus, the inhibition of P-selectin-dependent lymphocyte recruitment to the hepatic venules may be responsible for the protective effects observed in P-selectin-deficient mice and after anti-P-selectin antibody treatment in wild-type mice.

Lymphocyte adhesion to the sinusoids is lower than to the hepatic veins [27]. Adhesion to the sinusoids was maximum at 2 h and very low at later time points. However, if we consider the large area of sinusoidal beds involved, the total number of infiltrating lymphocytes is quantitatively very important. The number of lymphocytes adhering to the sinusoids decreased significantly 2 h after Con A injection in P-selectin-deficient mice. Whereas the reduction in lymphocyte adhesion to hepatic venules in the P-selectin-deficient mice can be explained by the lack of expression of this adhesion molecule on the endothelium, this is unlikely for the decrease in lymphocyte adhesion to the sinusoids, as sinusoids do not express P-selectin after Con A treatment. Moreover, leukocyte adhesion to hepatic sinusoids appears to be less dependent on selectins [40]. As E-selectin is expressed at later time points, a role of this adhesion molecule in the lymphocyte adhesion to the sinusoids cannot be ruled out.

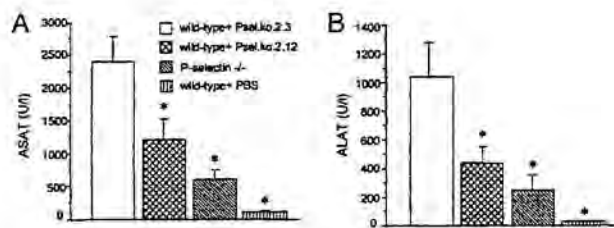


Fig. 13. Levels of plasma transaminase 12 h after Con A injection in P-sel.ko.2.3 (isotype control) mAb and P-sel.ko.2.12 (function blocking) mAb pretreated wild-type mice and P-selectin-deficient mice. Control-treated (PBS) animals were included. (A) Plasma ASAT and (B) plasma ALAT levels were represented as mean  $\pm$  SEM. Four animals were included in each group. \*,  $P < 0.05$  versus wild-type + P-sel.ko.2.3.

P-selectin on activated platelets may be involved in the delivery of lymphocytes to sinusoids shortly after the injection of Con A. This idea is consistent with our observation that Con A induced the expression of P-selectin on platelets. The decrease in lymphocyte adhesion to the sinusoids, observed in the P-selectin-deficient mice, is correlated in time (2 h) with the expression of P-selectin on platelets in wild-type animals. No differences in the number of adhering lymphocyte to the sinusoids in wild-type and P-selectin-deficient mice were observed at 6 h after treatment when P-selectin was absent on platelets. Therefore, the presence or the absence of P-selectin expression on platelets may determine the lymphocyte adhesion to the sinusoids. Several reports show that the interaction of P-selectin on activated platelets with its ligand(s) on leukocytes induces integrin-mediated leukocyte adhesion to the endothelium [41, 42]. Moreover, P-selectin expressed on activated platelets enhances lymphocyte binding to endothelial cells [6]. Thus, the absence of platelet P-selectin may affect the adhesion of lymphocytes to sinusoids, which do not express P-selectin.

We emphasize the role of P-selectin in the generation of intrasinusoidal hemostasis caused by Con A treatment. This process includes erythrocyte agglutination, platelet deposition, and degranulation and lymphocyte/neutrophil adhesion, contributing to the development of hepatic damage [25]. TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  are also involved by inducing sinusoidal alterations and serotonin-mediated sinusoidal constriction [25]. After hemostasis, confluent hepatic necrosis occurs within the congested area of the liver parenchyma. Anticoagulant (heparin) and antiserotonin (cyproheptadine) agents mitigate hemostasis and liver injury [25]. We measured the sinusoidal area occupied by cell aggregates in Con A-induced hepatitis. The occlusion of hepatic sinusoids by leukocyte and erythrocyte aggregates in the P-selectin-deficient mice significantly decreases after 6 h of Con A treatment. Moreover, the blocking P-selectin mAb also reduces intrasinusoidal occlusion.

P-selectin-deficient and wild-type mice showed equivalent numbers of platelet aggregates in the liver sinusoids. Therefore, the differences in sinusoidal congestion are not a result of the impaired platelet aggregation. This was unexpected, as P-selectin is involved in platelet aggregation [43]. Moreover, alterations in hemostasis have been reported in P-selectin-deficient mice [44]. In a recent study, platelet sequestration in the liver was significantly reduced in P-selectin-deficient mice following ischemia reperfusion [17]. We cannot rule out that other P-selectin-dependent functions on platelets affect the process of hemostasis and participate in the occlusion of sinusoids.

Between 24 and 48 h, leukocyte infiltration into perivascular areas significantly decreased in the absence of P-selectin. Leukocyte infiltration around hepatic venules was less affected 48 h after Con A, indicating that other adhesion molecules were able to compensate the absence of P-selectin. This infiltration is mostly formed by mononuclear cells, as the percentage of infiltrating neutrophils was always lower than 7%. The percentage of the different mononuclear leukocytes population including the ratio CD4/CD8 T lymphocytes in wild-type and P-selectin-deficient mice was similar. A significant percentage of monocytic (CD11b+) cells was detected. However, no dif-

ferences in the percentage of CD11b+ cells were observed between the two groups of animals.

No overexpression of E-selectin was observed in the P-selectin-deficient mice. The expression of these selectins on hepatic venules indicates that E-selectin would not be able to compensate the deficiency of P-selectin, as it appears later. It is conceivable that other adhesion molecules, including E-selectin, VCAM-1, and ICAM-1, participate in the rolling and adhesion leukocytes to the liver in this experimental model [27], as the number of adhering cells is not completely reduced in the P-selectin-deficient mice. The up-regulation of these adhesion molecules may be a secondary effect caused by the cytokines released from activated T cells [28]. Thus, the impaired P-selectin-dependent lymphocyte adhesion at early times may dramatically affect the lymphocyte infiltration observed at a later time.

Lymphocyte infiltration through the vascular endothelial barrier and the ischemia produced by the obstruction of sinusoids are thought to be the main causes of the liver necrosis [21, 22, 25]. Our study confirmed that the reduction in the extent of lymphocyte migration and intrasinusoidal hemostasis avoids hepatic necrosis. Few if any necrotic foci developed in animals lacking P-selectin. Therefore, transaminase levels after Con A injection are lower in P-selectin mice than in the wild-type, showing that P-selectin-deficient mice were less susceptible to Con A-induced liver damage. Anti-P-selectin mAb also attenuated liver injury, as measured by transaminase levels. This finding further supports the role of P-selectin in Con A-induced hepatic injury.

This study is the first to show the critical role of P-selectin in T cell-dependent hepatic damage using an *in vivo* experimental model. Although the function of P-selectin expressed on activated endothelial cells and platelets is complex, our results show that P-selectin is a potential, therapeutic target in inflammatory pathologies in which T cell infiltration causes tissue damage.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grants from the Comisi6n Interministerial de Ciencia y Tecnologfa (SAF 99-0007) and the Fondo de Investigaci6n Sanitaria (FIS 00-0995). P. P. is a recipient of a career development award from FIS. We thank Dr. Miquel Lozano and Dr. Rosa Miquel (Hospital Cl6nic, Barcelona, Spain) for their excellent scientific support and Dr. Juli6n Alicarte Domingo (Hospital Cl6nic, Barcelona, Spain) for performing the transaminase measurements. We also thank Isabel S6nchez for technical assistance with these experiments and Anna Bosch for assistance with the confocal microscopy.

## REFERENCES

1. Berman, C. L., Yeo, E. L., Wencel-Drake, J. D., Furie, B. C., Ginsberg, M. H., Furie, B. (1986) A platelet alpha granule membrane protein that is associated with the plasma membrane after activation. Characterization and subcellular localization of platelet activation-dependent granule-external membrane protein. *J. Clin. Invest.* 78, 130-137.

2. Gotsch, U., Jager, U., Domirits, M., Vestweber, D. (1994) Expression of P-selectin on endothelial cells is upregulated by LPS and TNF-alpha in vivo. *Cell Adhes. Commun.* 2, 7-14.
3. Sanders, W. E., Wilson, R. W., Ballantyne, C. M., Beaudet, A. L. (1992) Molecular cloning and analysis of in vivo expression of murine P-selectin. *Blood* 80, 795-800.
4. Hamburger, S. A., McEver, R. P. (1990) GMP-140 mediates adhesion of stimulated platelets to neutrophils. *Blood* 75, 550-554.
5. McEver, R. P. (1991) GMP-140: a receptor for neutrophils and monocytes on activated platelets and endothelium. *J. Cell. Biochem.* 45, 156-161.
6. Diacovo, T. G., Roth, S. J., Morita, C. T., Rosat, J. P., Brenner, M. B., Springer, T. A. (1996) Interactions of human alpha/beta and gamma/delta T lymphocyte subsets in shear flow with E-selectin and P-selectin. *J. Exp. Med.* 183, 1193-1203.
7. Kansas, G. S. (1996) Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood* 88, 3259-3287.
8. Yang, J., Furie, B. C., Furie, B. (1999) The biology of P-selectin glycoprotein ligand-1: its role as a selectin counterreceptor in leukocyte-endothelial and leukocyte-platelet interaction. *Thromb. Haemostasis* 81, 1-7.
9. Ohnishi, M., Yamada, K., Morooka, S., Tojo, S. J. (1999) Inhibition of P-selectin attenuates neutrophil-mediated myocardial dysfunction in isolated rat heart. *Eur. J. Pharmacol.* 366, 271-279.
10. Chen, L. Y., Nichols, W. W., Hendricks, J. B., Yang, B. C., Mehta, J. L. (1994) Monoclonal antibody to P-selectin (PBL3) protects against myocardial reperfusion injury in the dog. *Cardiovasc. Res.* 28, 1414-1422.
11. Ohnishi, M., Imanishi, N., Tojo, S. J. (1999) Protective effect of anti-P-selectin monoclonal antibody in lipopolysaccharide-induced lung hemorrhage. *Inflammation* 23, 461-469.
12. Mulligan, M. S., Polley, M. J., Bayer, R. J., Nunn, M. F., Paulson, J. C., Ward, P. A. (1992) Neutrophil-dependent acute lung injury. Requirement for P-selectin (GMP-140). *J. Clin. Investig.* 90, 1600-1607.
13. Tipping, P. G., Huang, X. R., Berndt, M. C., Holdsworth, S. R. (1996) P-selectin directs T lymphocyte-mediated injury in delayed-type hypersensitivity responses: studies in glomerulonephritis and cutaneous delayed-type hypersensitivity. *Eur. J. Immunol.* 26, 454-460.
14. Bevilacqua, M. P., Nelson, R. M., Mannori, G., Ceconi, O. (1994) Endothelial-leukocyte adhesion molecules in human disease. *Annu. Rev. Med.* 45, 361-378.
15. Birner, U., Issekutz, T. B., Issekutz, A. C. (1999) The role of selectins in VLA-4 and CD18-independent neutrophil migration to joints of rats with adjuvant arthritis. *Eur. J. Immunol.* 29, 1094-1100.
16. Essani, N. A., Fisher, M. A., Simmons, C. A., Hoover, J. L., Farhood, A., Jaeschke, H. (1998) Increased P-selectin gene expression in the liver vasculature and its role in the pathophysiology of neutrophil-induced liver injury in murine endotoxin shock. *J. Leukoc. Biol.* 63, 288-296.
17. Yadav, S. S., Howell, D. N., Steeber, D. A., Harland, R. C., Tedder, T. F., Clavien, P. A. (1999) P-Selectin mediates reperfusion injury through neutrophil and platelet sequestration in the warm ischemic mouse liver. *Hepatology* 29, 1494-1502.
18. Lohr, H. F., Schlaak, J. F., Lohse, A. W., Bocher, W. O., Arenz, M., Gerken, G., Meyer, Z. B. K. (1996) Autoreactive CD4+ LKM-specific and anticonotypic T-cell responses in LKM-1 antibody-positive autoimmune hepatitis. *Hepatology* 24, 1416-1421.
19. Lohr, H. F., Weber, W., Schlaak, J., Goergen, B., Meyer, Z. B. K., Gerken, G. (1995) Proliferative response of CD4+ T cells and hepatitis B virus clearance in chronic hepatitis with or without hepatitis B e-minus hepatitis B virus mutants. *Hepatology* 22, 61-68.
20. Napoli, J., Bishop, G. A., McGuinness, P. H., Painter, D. M., McCaughan, G. W. (1996) Progressive liver injury in chronic hepatitis C infection correlates with increased intrahepatic expression of Th1-associated cytokines. *Hepatology* 24, 759-765.
21. Tiegs, G., Hentschel, J., Wendel, A. (1992) A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A. *J. Clin. Investig.* 90, 196-203.
22. Gantner, F., Leist, M., Lohse, A. W., Germann, P. G., Tiegs, G. (1995) Concanavalin A-induced T-cell-mediated hepatic injury in mice: the role of tumor necrosis factor. *Hepatology* 21, 190-198.
23. Mizuhara, H., Uno, M., Seki, N., Yamashita, M., Yamaoka, M., Ogawa, T., Kaneda, K., Fujii, T., Senoh, H., Fujiwara, H. (1996) Critical involvement of interferon gamma in the pathogenesis of T-cell activation-associated hepatitis and regulatory mechanisms of interleukin-6 for the manifestations of hepatitis. *Hepatology* 23, 1608-1615.
24. Nicoletti, F., Di Marco, R., Zacone, P., Salvaggio, A., Magro, G., Bendtzen, K., Meroni, P. (2000) Murine concanavalin A-induced hepatitis is prevented by interleukin 12 (IL-12) antibody and exacerbated by exogenous IL-12 through an interferon-gamma-dependent mechanism. *Hepatology* 32, 728-733.
25. Miyazawa, Y., Tsutsui, H., Mizuhara, H., Fujiwara, H., Kaneda, K. (1998) Involvement of intrasinusoidal hemostasis in the development of concanavalin A-induced hepatic injury in mice. *Hepatology* 27, 497-506.
26. Springer, T. A. (1994) Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76, 301-314.
27. Morikawa, H., Hachiya, K., Mizuhara, H., Fujiwara, H., Nishiguchi, S., Shiomi, S., Kuroki, T., Kaneda, K. (2000) Sublobular veins as the main site of lymphocyte adhesion/transmigration and adhesion molecule expression in the porto-sinusoidal-hepatic venous system during concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology* 31, 83-94.
28. Wolf, D., Hallmann, R., Sass, C., Sixt, M., Kusters, S., Fregien, B., Trautwein, C., Tiegs, G. (2001) TNF-alpha-induced expression of adhesion molecules in the liver is under the control of TNFR1-relevance for concanavalin A-induced hepatitis. *J. Immunol.* 166, 1300-1307.
29. Mayadas, T. N., Johnson, R. C., Rayburn, H., Hynes, R. O., Wagner, D. D. (1993) Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P-selectin-deficient mice. *Cell* 74, 541-554.
30. Massaguer, A., Engel, P., Perez-del-Pulgar, S., Bosch, J., Pizcueta, P. (2000) Production and characterization of monoclonal antibodies against conserved epitopes of P-selectin (CD62P). *Tissue Antigens* 56, 117-128.
31. Bergmeyer, H. U., Scheibe, P., Wahlefeld, A. W. (1978) Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. *Clin. Chem.* 24, 58-73.
32. Mizuhara, H., O'Neill, E., Seki, N., Ogawa, T., Kusunoki, C., Otsuka, K., Satoh, S., Niwa, M., Senoh, H., Fujiwara, H. (1994) T cell activation-associated hepatic injury: mediation by tumor necrosis factors and protection by interleukin 6. *J. Exp. Med.* 179, 1529-1537.
33. Lusinskas, F. W., Ding, H., Lichtman, A. H. (1995) P-selectin and vascular cell adhesion molecule 1 mediate rolling and arrest, respectively, of CD4+ T lymphocytes on tumor necrosis factor alpha-activated vascular endothelium under flow. *J. Exp. Med.* 181, 1179-1186.
34. Hirata, T., Merrill-Skoloff, G., Aab, M., Yang, J., Furie, B. C., Furie, B. (2000) P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is a physiological ligand for E-selectin in mediating T helper 1 lymphocyte migration. *J. Exp. Med.* 192, 1669-1676.
35. Subramaniam, M., Saffari-pour, S., Watson, S. R., Mayadas, T. N., Hynes, R. O., Wagner, D. D. (1995) Reduced recruitment of inflammatory cells in a contact hypersensitivity response in P-selectin-deficient mice. *J. Exp. Med.* 181, 2277-2282.
36. Staitte, N. D., Justen, J. M., Sly, L. M., Beaudet, A. L., Bullard, D. C. (1996) Inhibition of delayed-type contact hypersensitivity in mice deficient in both E-selectin and P-selectin. *Blood* 88, 2973-2979.
37. Austrup, F., Vestweber, D., Borges, E., Lohning, M., Brauer, R., Herz, U., Renz, H., Hallmann, R., Scheffold, A., Radbruch, A., Hamann, A. (1997) P- and E-selectin mediate recruitment of T-helper-1 but not T-helper-2 cells into inflamed tissues. *Nature* 385, 81-83.
38. Chu, A., Hong, K., Berg, E. L., Ehrhardt, R. O. (1999) Tissue specificity of E- and P-selectin ligands in Th1-mediated chronic inflammation. *J. Immunol.* 163, 5086-5093.
39. Steinhoff, G., Behrend, M., Schrader, B., Duijvestijn, A. M., Wonigeit, K. (1993) Expression patterns of leukocyte adhesion ligand molecules on human liver endothelia. Lack of ELAM-1 and CD62 inducibility on sinusoidal endothelia and distinct distribution of VCAM-1, ICAM-1, ICAM-2, and LFA-3. *Am. J. Pathol.* 142, 481-488.
40. Fox-Robichaud, A., Kubes, P. (2000) Molecular mechanisms of tumor necrosis factor alpha-stimulated leukocyte recruitment into the murine hepatic circulation. *Hepatology* 31, 1123-1127.
41. Piccardoni, P., Sideri, R., Manarini, S., Piccoli, A., Martelli, N., de Gaetano, G., Cerletti, C., Evangelista, V. (2001) Platelet/polymorphonuclear leukocyte adhesion: a new role for SRC kinases in Mac-1 adhesive function triggered by P-selectin. *Blood* 98, 108-116.
42. Palabrica, T., Lobb, R., Furie, B. C., Aronovitz, M., Benjamin, C., Hsu, Y. M., Sajer, S. A., Furie, B. (1992) Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by P-selectin on adherent platelets. *Nature* 359, 848-851.
43. Merten, M., Thiagarajan, P. (2000) P-selectin expression on platelets determines size and stability of platelet aggregates. *Circulation* 102, 1931-1936.
44. Subramaniam, M., Frenette, P. S., Saffari-pour, S., Johnson, R. C., Hynes, R. O., Wagner, D. D. (1996) Defects in hemostasis in P-selectin-deficient mice. *Blood* 87, 1238-1242.

## 5. DISCUSSIÓ

### 5.1. Producció d'anticossos monoclonals contra epítops conservats de la P-selectina.

El desenvolupament per Georges Kohler i Cesar Milstein al 1975 d'una tècnica per a produir anticossos monoclonals específics per un determinat antigen va revolucionar la immunologia i va tenir un elevat impacte tant en la recerca científica com en la medicina clínica. L'enginyeria proteica ha permès humanitzar els anticossos, el que ha fet possible millorar la seva seguretat, prologar la seva vida mitja i disminuir la seva immunogenicitat, fent que aquest esdevinguin valuosos agents terapèutics<sup>183</sup>. En l'actualitat hi ha més de 10 anticossos monoclonals que estan sent utilitzats a nivell clínic en immunoteràpies aplicades majoritàriament al tractament del càncer i de patologies inflamatòries com l'artritis reumatoide, la malaltia de Crohn i la colitis ulcerosa. També s'estan utilitzant per a prevenir el rebuig agut d'òrgans, en infeccions víriques de les vies respiratòries i com anti-agregants plaquetaris<sup>184</sup>. En el cas dels anticossos contra la P-selectina, a més de la seva aplicació en nombrosos estudis experimentals per a definir el paper de la P-selectina en processos inflamatoris i trombòtics, s'està avaluant la possibilitat de que puguin funcionar com a agents terapèutics en humans<sup>185</sup>.

L'objectiu d'aquest treball va ser la producció d'anticossos monoclonals reactius amb epítops conservats de la P-selectina, que poguessin reconèixer la proteïna en humans i diferents espècies animals. El problema per obtenir aquests anticossos és l'elevada homologia de la P-selectina entre els mamífers, ja que el fenomen de la tolerància immunològica fa que l'animal utilitzat com a hoste només produeixi anticossos contra epítops de la proteïna diferents dels propis i que per tant són epítops no conservats entre espècies. La producció de ratolins genèticament deficients en determinades proteïnes, en els quals el gen que codifica per la proteïna és eliminat en la línia germinals de l'animal, va permetre dissenyar una estratègia per resoldre aquest problema<sup>186</sup>.



Aquesta es basa en la utilització d'aquests animals deficients com a hostes per a produir els anticossos monoclonals. L'absència de la proteïna fa que no puguin establir tolerància per cap dels seus determinants, de manera que al immunitzar l'animal amb la proteïna d'interès, aquest reconeixerà la totalitat de la proteïna com a estranya i generarà una resposta immunològica molt eficient, produint una ampla diversitat d'anticossos monoclonals específics per a un elevat nombre de determinants de la proteïna. Aquests anticossos poden reconèixer epítops de la proteïna conservats en diferents espècies, inclòs el ratolí, que sol ser l'espècie utilitzada com a hoste per a produir anticossos monoclonals.

Seguint aquesta estratègia, es va immunitzar ratolins genèticament deficients en P-selectina amb una línia murina de cèl·lules pre-B (300.19) transfectades de forma estable amb el cDNA de la P-selectina humana. D'aquesta manera la P-selectina humana va ser la única proteïna estranya pel ratolí i contra la es van generar anticossos monoclonals. L'avantatge d'utilitzar la proteïna expressada a la superfície d'una cèl·lula és que aquesta es troba en la seva conformació nativa i els anticossos generats podran posteriorment detectar epítops presents en la forma natural de la proteïna.

D'aquesta manera es va obtenir 12 anticossos monoclonals (P-sel.KO.2.1-12) que van ser posteriorment caracteritzats. Tots els anticossos van immunoprecipitar P-selectina a partir de plaquetes humanes activades i van funcionar en tècniques d'immunohistoquímica i citometria de flux. Tres dels anticossos van bloquejar en un 80-100% la unió de P-selectina al seu lligant i es va veure que reconeixien epítops molt pròxims dins dels dominis d'unió al lligant. Utilitzant dos anticossos reactius contra epítops diferents de la proteïna, es va posar a punt un assaig ELISA per a detectar la forma soluble de la P-selectina en humans, rata i ratolí. Per tant, els nous anticossos anti-P-selectina van demostrar la seva aplicabilitat en diferents tècniques molt utilitzades en recerca.

La reactivitat dels anticossos P-sel.KO.2 amb diferents espècies animals, es va analitzar amb plaquetes activades de ratolí, rata, conill i porc i es va establir que 8 dels 12 anticossos produïts eren reactius amb alguna d'aquestes espècies. Dos dels anticossos bloquejants van ser reactius amb almenys dues espècies diferents, humans i rata en el cas de P-sel.KO.2.11 i humans, rata i ratolí en el cas de P-sel.KO.2.12.

A més de les espècies descrites en l'article, en un posterior estudi vam ampliar el nombre d'espècies amb què es va analitzar la reactivitat dels anticossos: ovella, gos, gat, cavall, vaca i cabra. A partir de sang total, es va aïllar i activar les plaquetes i es va determinar la reactivitat dels anticossos amb les plaquetes actives per immunofluorescència. Els resultats d'aquest treball van ser presentats com a comunicació oral i pòster al congrés: The 7<sup>th</sup> Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens, celebrat a Harrogate, Gran Bretanya el Juny de 2000. i van ser publicats com a un capítol de llibre: Reactivity of CD62P Workshop mAbs with resting and activated platelets from different animal species, Anna Massaguer, Pablo Engel, Sofía Pérez del Pulgar, Jaume Bosch, Pilar Pizcueta. Leucocyte typing VII, pàg. 342, Oxford University Press, D.Mason et al, Oxford 2002.

En la següent taula, es recullen els resultats obtinguts:

Taula 1: Reactivitat dels anticossos P-sel.KO.2 amb plaquetes activades de diferents espècies.

Anticòs	Reactivitat amb plaquetes activades										
	Humans	Ratolí	Rata	Porc	Conill	Ovella	Gos	Gat	Cavall	Vaca	Cabra
P-sel.KO.2.1	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-
P-sel.KO.2.2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P-sel.KO.2.3	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+
P-sel.KO.2.4	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+
P-sel.KO.2.5	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+
P-sel.KO.2.6	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P-sel.KO.2.7	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+
P-sel.KO.2.8	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
P-sel.KO.2.9	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+
P-sel.KO.2.10	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+
P-sel.KO.2.11	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+
P-sel.KO.2.12	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+

A l'ampliar l'estudi a un major nombre d'espècies es va comprovar que dels 12 anticossos monoclonals generats, només 2 reconeixien un epítop de la proteïna exclusiu de la P-selectina humana, mentre que la resta d'anticossos estaven dirigits contra epítops conservats present en diferents espècies animals, i que en alguns casos (P-sel.KO.2.3, P-sel.KO.2.4 i P-sel.KO.2.7) els anticossos reconeixien un determinant de la proteïna present en de 8 de les 11 espècies estudiades.

El conjunt d'aquests resultats posa de manifest l'eficàcia de la utilització de ratolins genèticament deficients en P-selectina per a produir anticossos monoclonals reactius amb diferents espècies animals. A més, aquesta tècnica ha permès obtenir anticossos contra espècies per les quals anteriorment no es disposava d'anticossos específics per a la P-selectina.

La importància d'aquest nous anticossos ve reflectida en el nombre d'investigadors, tant nacionals com internacionals als que hem proporcionat anticossos P-sel.ko.2 per als seus estudis: Dr. Juliá Panés (Departament de Gastroenterologia, Hospital Clínic de Barcelona), Dra. Montserrat Rigol (Institut Cardiovascular, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi Sunyer (IDIBAPS)), Dr. García-Dorado (Servei de Cardiologia, Hospital Universitari Vall d'Hebron), Dra. Ruth Maria Nickels (Institute for Clinical & Experimental Surgery, University of Saarland); Dr. Garin Gwenaele i Croset Martine (Universitat Laennec, Lyon); Dr. Marc Hoylaerts (Center for Molecular and Vascular Biology, University of Leuven); Dr. Nikolaos E. Bonaros (University Clinic of Surgery; Department of Cardiothoracic Surgery; General Hospital of Viena); Dr. A.E. Goetz i Dr. R. Kiefmann (Institute for Anaesthesiology and Surgical Research, Munich). Fins al moment, aquests estudis han donat lloc a les següents publicacions:

Sans M, Salas A, Soriano A, Prats N, Gironella M, Pizcueta P, Elena M, Anderson DC, Pique JM, Panes J. Differential role of selectins in experimental colitis. *Gastroenterology*. 2001 Apr;120(5):1162-72.

Mirabet M, Garcia-Dorado D, Inserte J, Barrabes JA, Lidon RM, Soriano B, Azevedo M, Padilla F, Agullo L, Ruiz-Meana M, Massaguer A, Pizcueta P, Soler-Soler J. Platelets activated by transient coronary occlusion exacerbate ischemia-reperfusion injury in rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283:H1134-41.

Barrabes JA, Garcia-Dorado D, Mirabet M, Lidon RM, Soriano B, Ruiz-Meana M, Pizcueta P, Blanco J, Puigfel Y, Soler-Soler J. Lack of effect of glycoprotein IIb/IIIa blockade on myocardial platelet or polymorphonuclear leukocyte accumulation and on infarct size after transient coronary occlusion in pigs. *J Am Coll Cardiol*. 2002 Jan 2;39:157-65.

## *Discussió*

Per tant, aquests anticossos són uns reactius únics i molt útils per a l'estudi del paper de la P-selectina en diferents models experimentals d'inflamació i per a la detecció de l'activació plaquetària. Addicionalment, podrien ser utilitzats com a agents terapèutics en humans.

## 5.2. Caracterització de l'expressió de P-selectina porcina en plaquetes i de la seva forma soluble.

L'obtenció d'un nou anticòs específic per a la P-selectina porcina (SwPsel.1.9) que reconeix un epítop de la proteïna diferent del reconegut per anticossos preexistents, ha permès desenvolupar un ELISA per a quantificar la P-selectina en porc. Mitjançant aquest ELISA s'ha pogut detectar per primer cop una forma circulant de la P-selectina en porc i mesurar la quantitat total de P-selectina continguda en les plaquetes.

La mesura dels nivells de P-selectina soluble en mostres de plasma obtingudes de porcs sans (pre-cirurgia) i porcs sotmesos a un allotrasplantament de l'artèria femoral (post-cirurgia) va posar de manifest que en condicions basals els nivells de P-selectina circulant eren inapreciables i que, per contra, després de la implantació de l'empelt es podia detectar P-selectina soluble i la concentració mitja era de 10,4 ng/mL. Aquests resultats contrasten amb valors de P-selectina soluble prèviament descrits en humans i ratolins, que en condicions basals es troben al voltant de 0,1-0,2 µg/mL i 0,3 µg/mL respectivament<sup>52;122;134;140</sup> i que en patologies humanes són unes 25 vegades superiors als valors determinats en porc<sup>137;187;188</sup>. Encara no hi ha una explicació per aquestes diferències entre espècies, però aquestes no poden ser atribuïdes a una diferent sensibilitat dels sistemes ELISA utilitzats en les determinacions, ja que mitjançant el nou ELISA es va detectar una concentració mitja de P-selectina continguda en plaquetes de porc (16,8 ng/mL per  $1 \times 10^7$  plaquetes) similar a la concentració descrita en humans<sup>189</sup>. Tampoc es poden relacionar amb un menor nombre de plaquetes circulants en sang de porc, ja que el nombre de plaquetes en sang és similar en humans i porcs<sup>190</sup>. Les baixes concentracions de P-selectina soluble detectada al plasma dels porcs fa difícil que aquesta pugui ser fisiològicament activa, doncs s'ha descrit que en ratolins calen concentracions de 1

$\mu\text{g/ml}$  perquè la forma circulant de P-selectina tingui un paper fisiològic<sup>140</sup>. De la mateixa manera, en ratolins també s'ha establert que la concentració de L-selectina soluble ha de ser superior a  $2 \mu\text{g/ml}$  per inhibir la funció de L-selectina<sup>18</sup>.

La rellevància clínica de la determinació del contingut de P-selectina per plaqueta encara ha de ser acuradament establerta, però podria ser un marcador de l'activació plaquetària, especialment en els trastorns on la de P-selectina alliberada al plasma des de les plaquetes activades no és suficient per a originar una diferència en els nivells plasmàtics de P-selectina soluble, però genera diferències en la quantitat total de P-selectina per plaqueta. De fet en humans s'ha descrit que la concentració de P-selectina en les plaquetes varia entre individus sans i individus amb patologia i que també és sensible a la teràpia antiinflamatòria<sup>189</sup>. El nou ELISA permetria estudiar el valor clínic de les variacions en el contingut de P-selectina per plaqueta en models experimentals desenvolupats en porcs.

La P-selectina soluble s'origina principalment a partir de les plaquetes activades<sup>128;136</sup> per això es va caracteritzar l'expressió de P-selectina en plaquetes de porc i es va avaluar la generació de la forma soluble a partir de les plaquetes. Es va tractar *in vitro* plaquetes porcines amb dos coneguts activadors plaquetaris, trombina i PMA<sup>191</sup>. Aquests activadors van induir una ràpida expressió de P-selectina a la membrana, però l'activació no va anar acompanyada de la presència de P-selectina soluble al sobrenadant de les plaquetes. Al llisar les plaquetes es va mesurar un elevat contingut de P-selectina, el que descarta l'absència de P-selectina al sobrenadant fos deguda a un baix nombre de plaquetes a les mostres. No es va apreciar diferències significatives en el contingut de P-selectina en plaquetes en repòs i plaquetes activades, el que és consistent amb l'absència de P-selectina soluble al sobrenadant després de la activació de les plaquetes.

La P-selectina soluble s'origina majoritàriament per la secreció al plasma d'una isoforma soluble generada per un processament alternatiu del mRNA que elimina un exò que codifica el domini transmembrana<sup>132</sup>. També s'ha descrit que la P-selectina soluble podria originar-se per un procés proteolític que alliberaria la P-selectina expressada a la membrana<sup>134;135</sup>. Però al tractar cèl·lules COS transfectades amb P-selectina porcina amb PMA, que és un potent inductor de l'alliberament proteolític, no es va originar nivells detectables de P-selectina soluble al sobrenadant, al igual que s'havia observat amb les plaquetes. Aquests resultats coincideixen amb les observacions d'un treball anterior en el que s'analitzaven els requeriments per l'alliberació proteolítica dels receptors de membrana on es va observar que receptors quimèrics constituïts pel domini extracel·lular de L-selectina unit als dominis citoplasmàtics i transmembrana de P-selectina eren resistents a l'alliberació proteolítica induïda per PMA, mentre que mutant inversos, amb el domini transmembrana de L-selectina, eren eliminats de la membrana després de ser tractats amb PMA<sup>53</sup>. Per tant, tot i que són necessaris més estudis per acabar d'establir l'origen de la forma soluble de la P-selectina en porc, els primers resultats obtinguts apunten a que aquesta, al igual que en humans, es genera pel la secreció de la isoforma de la proteïna amb el processament alternatiu.

En resum, el nou anticòs Swpsel.1.9 i l'ELISA desenvolupats en aquest treball han permès estudiar la P-selectina en plaquetes de porc i detectar per primera vegada la seva forma soluble. La determinació de P-selectina circulant pot tenir un valor predictiu, ja que s'ha establert que és un indicador d'un risc elevat de problemes cardiovasculars en pacients amb trastorns isquèmics cardíacs<sup>192</sup> i un indicador de risc de patologia cardiovascular en persones sanes<sup>193</sup>. A més nivells elevats de P-selectina soluble s'han associat a diferents patologies en humans<sup>123-126;129;129</sup>. Per tant, tant el nou anticòs com l'ELISA poden esdevenir valuoses eines per establir la rellevància clínica de la P-selectina soluble en diferents models experimentals d'inflamació o trombosi en porcs.



### 5.3. El dany hepàtic induït per Concanavalina A està severament disminuït en ratolins deficientes en P-selectina.

La patologia de les hepatitis humanes tant agudes com cròniques es caracteritza per una gran infiltració leucocitària, principalment per limfòcits, al teixit perivascular i al parènquima hepàtic<sup>194;195</sup>. L'adhesió dels limfòcits a l'endoteli de les venes centrals i portals i la seva posterior migració a l'interior del teixit és clau per al desenvolupament de les malalties inflamatòries del fetge. Aquest procés està controlat per l'expressió i activació de les molècules d'adhesió.

L'administració intravenosa de Concanavalina A (Con A) a ratolins genera un dany hepàtic associat a limfòcits T que està considerat un model experimental d'hepatitis autoimmune humana. La Con A és una lectina que indueix l'activació mitogènica de limfòcits T, la citotoxicitat de limfòcits i macròfags i l'aglutinació de cèl·lules. Un cop injectada al ratolí, la Con A s'acumula específicament al fetge i promou l'influx de limfòcits T circulants, preferentment limfòcits T CD4+, i la seva posterior activació al fetge<sup>176</sup>. Els limfòcits activats produeixen citoquines com el factor de necrosi tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interferó  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), factor estimulant de la colònia de macròfags i granulòcits (GM-CSF) i les interleuquines 1, 2 i 4 (IL-1, IL-2 i IL-4)<sup>177;178;196</sup> que estimulen els processos inflamatoris del fetge, conduint a una degeneració hepatocel·lular massiva, nivells elevats de transaminases plasmàtiques i l'aparició de lesions necròtiques al parènquima hepàtic.

La Con A indueix una hemostàsia prominent al fetge deguda a l'aglutinació d'eritròcits, la deposició de plaquetes i la seva activació i a l'adhesió de limfòcits i neutròfils als sinusoides, que contribueix al desenvolupament del dany hepàtic<sup>197</sup>. La Con A també potencia l'acumulació de plaquetes al fetge, el que genera un increment dels

nivells hepàtics de serotonina, que és un potent vasoconstrictor. Tot això produeix una marcada disminució del flux sanguini intrahepàtic i un increment de la pressió de perfusió portal. Després de l'hemostàsia, s'observa l'aparició de lesions necròtiques a l'àrea parenquimal afectada. El tractament amb agents anticoagulants (heparina) o antiserotonina (cyproheptadina) redueixen l'hemostàsia i el dany hepàtic<sup>197</sup>.

S'ha descrit que la P-selectina interacciona eficientment amb els limfòcits T CD4+ a través del seu lligant PSGL-1<sup>59</sup> i que participa en la migració de limfòcits T a través de l'endoteli inflammat en diferents models d'inflamació<sup>145 198;199</sup>. En el present estudi s'estableix que la P-selectina juga un paper important en el desenvolupament de la hepatitis induïda per Con A.

Els resultats del treball van demostrar que la injecció de Con A indueix una ràpida adhesió de limfòcits T a les vènules i sinusoides del fetge, seguida de la infiltració dels teixits perivasculars. També genera una elevada hemostàsia intrasinusoïdal, per agregats d'hematies, plaquetes i leucòcits, que va seguida de la necrosi del teixit, i un increment dels nivells de transaminases plasmàtiques. Per contra, el mateix tractament en ratolins genèticament deficients en P-selectina va provocar una menor adhesió i infiltració limfocitària, menor hemostàsia, una lesió necròtica molt reduïda i nivells de transaminases més baixos. Conseqüentment, el pre-tractament dels ratolins amb un anticòs bloquejant de la P-selectina va reduir les lesions al fetge induïdes per la Con A.

Es va establir que la P-selectina s'expressa de forma transitòria a l'endoteli de les vènules hepàtiques i portals, en un estret marge de temps comprès entre les 2 i 6 hores després del tractament amb Con A. En canvi, no es va observar P-selectina a l'endoteli dels sinusoides. Les dades immunohistoquímiques es van corroborar amb la detecció d'elevats nivells de mRNA per P-selectina a les 6h del tractament amb

Con A. Aquests resultats contrasten amb dos articles anteriors, on es va descriure que no hi havia expressió de P-selectina en l'endoteli hepàtic després de la injecció de Con A <sup>179</sup> <sup>180</sup>. Aquests dos articles també tenien resultats contradictoris entre ells en l'expressió d'altres molècules d'adhesió. La cinètica d'expressió de P-selectina observada després del tractament amb Con A, coincideix amb la establerta en altres models experimentals en ratolí com isquèmia i reperfusió i endotoxèmia <sup>181:182</sup>. Cal senyalar que el marcatge de P-selectina a l'endoteli hepàtic va ser menys intens que el que es va observar en fetges després del tractament amb la endotoxina LPS, utilitzant el mateix anticòs monoclonal<sup>200</sup>. De forma consistent amb aquesta dada, el tractament amb LPS també va induir nivells més elevats de mRNA per a la P-selectina que la Con A. A més de l'expressió a l'endoteli, es va examinar si la injecció de Con A induïa P-selectina a la membrana plaquetes, observant-se la seva expressió transitòria 2 hores després del tractament, que va desaparèixer a les 6 hores.

L'adhesió i posterior transmigració de limfòcits durant la hepatitis induïda per Con A es produeix bàsicament a través de les venes hepàtiques i venes portals, encara que en aquestes darreres intervenen en menor proporció <sup>179</sup>. Es va observar que els limfòcits comencen a unir-se a l'endoteli hepàtic 2 hores després de la injecció amb Con A, i que el nombre de limfòcits adherits incrementa marcadament a les 6 hores, disminuint de forma ràpida a les 12 hores i observant-se pràcticament absència d'adhesió a les 24 h. Aquesta cinètica d'adhesió coincideix amb observacions prèviament descrites <sup>179</sup>. A més, té una elevada correlació amb l'expressió de P-selectina als vasos hepàtics. Al quantificar el nombre de limfòcits adherits, tant en venes portals com hepàtiques es va posar de manifest que estava significativament reduïda en els ratolins P-selectina deficientes. Aquest resultat posen de manifest que la P-selectina té un paper important en l'adhesió inicial dels limfòcits a l'endoteli en aquest model d'hepatitis. Per tant, el bloqueig de la P-selectina permetria inhibir la interacció dels limfòcits amb les vènules hepàtiques, i això generaria una menor infiltració al

fetge i una disminució de la producció de citoquines proinflamatòries, el que reduiria les posteriors lesions al parènquima hepàtic.

Després del tractament amb Con A també es va observar una adhesió de limfòcits als sinusoides hepàtics, que va ser màxima a les 2 hores i molt reduïda en punts més tardans. A les 2 hores, el nombre de limfòcits adherits al sinusoides era significativament menor en ratolins deficients en P-selectina. Les diferències d'adhesió no poden ser explicades per una manca de P-selectina a l'endoteli dels ratolins deficients, ja que no es produeix expressió de P-selectina als sinusoides hepàtics després del tractament amb Con A. De fet, s'ha descrit que la interacció de leucòcits amb els sinusoides hepàtics és poc dependent de selectines <sup>96</sup>. La P-selectina expressada a les plaquetes activades després del tractament amb Con A podria participar en la localització dels limfòcits als sinusoides. Les diferències significatives en el nombre de limfòcits adherits als sinusoides en ratolins P-selectina deficients es correlacionen en el temps (2 h) amb l'expressió de P-selectina en les plaquetes. En canvi en temps posteriors (6 h), quan les plaquetes no expressen P-selectina no hi ha diferències en el nombre de limfòcits als sinusoides entre els dos tipus d'animals. Per tant, la presència o absència d'expressió de P-selectina a les plaquetes podria determinar l'adhesió de limfòcits als sinusoides. Diferents articles descriuen que la interacció entre la P-selectina de les plaquetes activades i els seus lligants en els leucòcits potencia la interacció dels leucòcits amb les cèl·lules endotelials <sup>104:201 202</sup>. Per tant l'absència de P-selectina plaquetària pot ser la responsable de la menor adhesió dels limfòcits als sinusoides.

La P-selectina també participa en el desenvolupament de l'hemostàsia intrasinusoïdal generada per la Con A. Per avaluar el paper de la P-selectina en aquest procés, es va quantificar el percentatge de l'àrea intrasinusoïdal ocupada per agregats d'hematies, plaquetes i leucòcits en els dos tipus de ratolins i es va establir que la oclusió dels sinusoides era menor en ratolins deficients en P-selectina. Aquesta

diferència era significativa a les 6h del tractament amb Con A, i el resultat es reproduïa al pretractar ratolins control amb un anticòs monoclonal bloquejant de la P-selectina. Per immunofluorescència es va determinar que els ratolins control i el ratolins deficients en P-selectina presentaven un nombre equivalent d'agregats de plaquetes en els sinusoides del fetge. Per tant les diferències en la congestió dels sinusoides no eren degudes a una menor agregació plaquetària. Aquest resultat va ser inesperat, ja que estava descrit que la P-selectina participa en l'agregació de plaquetes <sup>203</sup>. A més, els ratolins deficients en P-selectina tenen alteracions en l'hemostàsia <sup>105</sup> i en un model d'isquèmia i reperfusió es va veure que l'acumulació de plaquetes al fetge estava significativament reduïda <sup>182</sup>. La P-selectina expressada en plaquetes participa en el reclutament de leucòcits als trombes en formació, i aquests leucòcits promouen la deposició de fibrina al trombe. <sup>104</sup>. Per tant, aquesta i altres funcions de la P-selectina plaquetària, diferents de l'agregació, podrien participar a l'oclusió dels sinusoides i contribuir a l'hemostàsia.

A les 24 i 48 hores després del tractament amb Con A, es va observar una infiltració massiva de leucòcits a les àrees perivasculars, que va ser significativament menor en absència de P-selectina. Les diferències en el nombre de leucòcits infiltrant el parènquima a les 48 hores eren menors, especialment a les venes hepàtiques. Això podria ser degut a que, a aquest temps, altres molècules d'adhesió estarien compensant la manca de P-selectina. Les cèl·lules infiltrant el parènquima eren majoritàriament mononuclears, ja que el percentatge de neutròfils va ser menor del 7% en tots els casos. Dins de les cèl·lules mononuclears, un percentatge significatiu, del 23 al 28%, va correspondre a monòcits CD11b+. No es van observar diferències entre diferents poblacions de cèl·lules mononuclears, inclosa la relació entre limfòcits CD4 i CD8, entre els ratolins normals i deficients en P-selectina.

Es va analitzar l'expressió d'E-selectina després del tractament amb Con A en ratolins normals i ratolins P-selectina deficients per establir si

l'absència de P-selectina era compensada per una sobreexpressió d'E-selectina a l'endoteli hepàtic, i es va observar nivells equivalents d'expressió en ambdós grups d'animals. A més, es va comprovar que la E-selectina apareix a l'endoteli hepàtic més tard ( a les 6 i 12 hores) després de la injecció de ConA. Això descarta que la E-selectina pugui suplir el paper de la P-selectina en l'adhesió inicial del limfòcits. Tot i això, tal com s'ha descrit, altres molècules d'adhesió com la E-selectina, VCAM i ICAM-1, també participen en l'adhesió dels leucòcits al fetge en aquest model experimental<sup>179</sup>. Això és consistent amb el fet de que en l'animal P-selectina deficient s'observa adhesió leucocitària, encara que reduïda. La inducció de l'expressió d'aquestes molècules pot ser un efecte secundari causat per les citoquines alliberades pel limfòcits T activats <sup>180</sup>. Per tant, la menor adhesió de limfòcits en absència de P-selectina en els primers moments de la hepatitis pot afectar la posterior migració limfocitària en temps més tardans.

La infiltració de limfòcits a través de la l'endoteli vascular i la isquèmia produïda per la obstrucció dels sinusoides s'han establert com a principals causes de la necrosi del fetge <sup>176 177 197</sup>. En el nostre estudi es confirma que la reducció de la migració de limfòcits i l'hemostàsia intrasinusoïdal evita la necrosi hepàtica. Els animals deficientes en P-selectina van desenvolupar molt pocs focus necròtics, i els nivells de transaminases van incrementar-se menys que en els animals control, demostrant que el dany hepàtic després del tractament amb Con A era menor en aquests animals. El tractament amb un anticòs bloquejant de la P-selectina també va reduir el dany hepàtic, tal com es va establir determinant els nivells de transaminases.

El conjunt d'aquests resultats demostren que la P-selectina, tant endotelial com plaquetària, té un paper molt important en aquest model experimental d'hepatitis autoimmune i posen de manifest que aquesta molècula d'adhesió és una diana terapèutica potencial en les patologies inflamatòries en les que la infiltració de limfòcits T origina el dany hepàtic.

## 6. CONCLUSIONS

- La utilització d'animals genèticament deficients en P-selectina ha permès produir 12 anticossos monoclonals (P-sel.ko.2.1-12) contra epítops conservats de la P-selectina humana. 10 dels anticossos són reactius amb altres espècies animals i 3 bloquegen la funció de la P-selectina.
- Aquesta estratègia ha fet possible obtenir nous anticossos monoclonals per a espècies per a les quals no es disposava de reactius específics per a la P-selectina.
- Els nous anticossos P-sel.ko.2 han demostrat ser aplicables en tècniques àmpliament utilitzades en recerca, com citometria de flux, immunoprecipitació, immunohistoquímica o ELISA.
- S'ha generat un nou anticòs monoclonal contra la P-selectina porcina (SwPsel.1.9) i s'ha desenvolupat un ELISA per quantificar la P-selectina soluble i el contingut total de P-selectina per plaqueta en porc.
- Els activadors plaquetaris PMA i trombina indueixen "*in vitro*" l'expressió de P-selectina a la membrana de les plaquetes, però no la producció de la forma soluble de P-selectina.
- La P-selectina es troba com a proteïna circulant en porcs, amb una concentració plasmàtica marcadament inferior que en humans. Aquesta forma soluble de P-selectina es generaria per mecanismes diferents que la seva alliberació per proteolisi de la membrana cel·lular.
- La P-selectina mitjança el dany hepàtic induït per Concanavalina A:
  - La P-selectina s'expressa a l'endoteli de les venes portals i hepàtiques, però no dels sinusoides, entre les 2 i 6 hores després del tractament amb Con A. A les 2 hores també s'indueix l'expressió transitòria de P-selectina a les plaquetes.



## Conclusions

- L'adhesió de limfòcits a les venes portals i hepàtiques coincideix amb la cinètica d'expressió de P-selectina i és significativament menor en ratolins deficients en P-selectina.
- El nombre de limfòcits adherits als sinusoides és màxim a les 2 hores i està significativament reduït en els ratolins deficients en P-selectina. La P-selectina expressada a les plaquetes activades podria participar en la localització dels limfòcits als sinusoides.
- La P-selectina participa en el desenvolupament de l'hemostàsia intrasinusoidal que precedeix a la aparició de necrosi, ja que tant el dèficit genètic de P-selectina com el seu bloqueig mitjançant anticossos redueixen significativament l'oclusió dels sinusoides per agregats cel·lulars.
- La infiltració leucocitària a les 24 i 48 hores després del tractament amb ConA és significativament menor en absència de P-selectina. No s'observen diferències en les poblacions de leucòcits infiltrats entre ratolins normals i ratolins deficients en P-selectina.
- Les lesions necròtiques són mínimes en els animals deficients en P-selectina i presenten un dany hepàtic significativament menor. El tractament amb un anticòs bloquejant de P-selectina també disminueix significativament el dany hepàtic.
- Per tant, el bloqueig de la P-selectina té un efecte protector en el model d'hepatitis induït per Con A.
- La P-selectina podria ser una diana terapèutica en les patologies inflamatòries on la infiltració de limfòcits T origina el dany hepàtic.

## 7. BIBLIOGRAFIA

1. Crockett-Torabi E. Selectins and mechanisms of signal transduction. *J.Leukoc.Biol.* 1998;63:1-14.
2. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994;76:301-14.
3. Tedder TF, Steeber DA, Chen A, Engel P. The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J.* 1995;9:866-73.
4. Kubes P. The complexities of leukocyte recruitment. *Semin.Immunol.* 2002;14:65-72.
5. Patel KD, Cuvelier SL, Wiehler S. Selectins: critical mediators of leukocyte recruitment. *Semin.Immunol.* 2002;14:73-81.
6. Alon R, Feigelson S. From rolling to arrest on blood vessels: leukocyte tap dancing on endothelial integrin ligands and chemokines at sub-second contacts. *Semin.Immunol.* 2002;14:93-104.
7. Lusciuskas FW, Ma S, Nusrat A, Parkos CA, Shaw SK. The role of endothelial cell lateral junctions during leukocyte trafficking. *Immunol.Rev.* 2002;186:57-67.:57-67.
8. Kansas GS. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood* 1996;88:3259-87.
9. Rosen SD, Bertozzi CR. The selectins and their ligands. *Curr.Opin.Cell Biol.* 1994;6:663-73.
10. McEver RP. GMP-140: a receptor for neutrophils and monocytes on activated platelets and endothelium. *J.Cell Biochem.* 1991;45:156-61.

## *Bibliografia*

11. Yao L, Pan J, Setiadi H, Patel KD, McEver RP. Interleukin 4 or oncostatin M induces a prolonged increase in P-selectin mRNA and protein in human endothelial cells. *J.Exp.Med.* 1996;184:81-92.
12. Moore KL, Patel KD, Bruehl RE, Li F, Johnson DA, Lichenstein HS *et al.* P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-selectin. *J.Cell Biol.* 1995;128:661-71.
13. Gallatin WM, Weissman IL, Butcher EC. A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. *Nature* 1983;304:30-34.
14. Lasky LA, Singer MS, Dowbenko D, Imai Y, Henzel WJ, Grimley C *et al.* An endothelial ligand for L-selectin is a novel mucin-like molecule. *Cell* 1992;69:927-38.
15. Baumhueter S, Dybdal N, Kyle C, Lasky LA. Global vascular expression of murine CD34, a sialomucin-like endothelial ligand for L-selectin. *Blood* 1994;84:2554-65.
16. Berg EL, McEvoy LM, Berlin C, Bargatze RF, Butcher EC. L-selectin-mediated lymphocyte rolling on MAdCAM-1. *Nature* 1993;366:695-98.
17. Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 1994;84:2068-101.
18. Tu L, Poe JC, Kadono T, Venturi GM, Bullard DC, Tedder TF *et al.* A functional role for circulating mouse L-selectin in regulating leukocyte/endothelial cell interactions in vivo. *J.Immunol.* 2002;169:2034-43.
19. Fries JW, Williams AJ, Atkins RC, Newman W, Lipscomb MF, Collins T. Expression of VCAM-1 and E-selectin in an in vivo model of endothelial activation. *Am.J.Pathol.* 1993;143:725-37.

20. Steegmaier M, Borges E, Berger J, Schwarz H, Vestweber D. The E-selectin-ligand ESL-1 is located in the Golgi as well as on microvilli on the cell surface. *J.Cell Sci.* 1997;110:687-94.
21. Steegmaier M, Levinovitz A, Isenmann S, Borges E, Lenter M, Kocher HP *et al.* The E-selectin-ligand ESL-1 is a variant of a receptor for fibroblast growth factor. *Nature* 1995;373:615-20.
22. Lawrence MB, Bainton DF, Springer TA. Neutrophil tethering to and rolling on E-selectin are separable by requirement for L-selectin. *Immunity.* 1994;1:137-45.
23. Asa D, Raycroft L, Ma L, Aeed PA, Kaytes PS, Elhammer AP *et al.* The P-selectin glycoprotein ligand functions as a common human leukocyte ligand for P- and E-selectins. *J.Biol.Chem.* 1995;270:11662-70.
24. Picker LJ, Treer JR, Ferguson-Darnell B, Collins PA, Bergstresser PR, Terstappen LW. Control of lymphocyte recirculation in man. II. Differential regulation of the cutaneous lymphocyte-associated antigen, a tissue-selective homing receptor for skin-homing T cells. *J.Immunol.* 1993;150:1122-36.
25. Rossiter H, Alon R, Kupper TS. Selectins, T-cell rolling and inflammation. *Mol.Med.Today* 1997;3:214-22.
26. Luscinskas FW, Ding H, Tan P, Cumming D, Tedder TF, Gerritsen ME. L- and P-selectins, but not CD49d (VLA-4) integrins, mediate monocyte initial attachment to TNF-alpha-activated vascular endothelium under flow in vitro. *J.Immunol.* 1996;157:326-35.
27. Henriques GM, Miotla JM, Cordeiro SB, Wolitzky BA, Woolley ST, Hellewell PG. Selectins mediate eosinophil recruitment in vivo: a comparison with their role in neutrophil influx. *Blood* 1996;87:5297-304.

## *Bibliografia*

28. Arbones ML, Ord DC, Ley K, Ratech H, Maynard-Curry C, Otten G *et al.* Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L- selectin-deficient mice. *Immunity*. 1994;1:247-60.
29. de Chateau M, Chen S, Salas A, Springer TA. Kinetic and mechanical basis of rolling through an integrin and novel Ca<sup>2+</sup>-dependent rolling and Mg<sup>2+</sup>-dependent firm adhesion modalities for the alpha 4 beta 7-MAdCAM-1 interaction. *Biochemistry* 2001;%20;40:13972-79.
30. Ley K, Bullard DC, Arbones ML, Bosse R, Vestweber D, Tedder TF *et al.* Sequential contribution of L- and P-selectin to leukocyte rolling in vivo. *J.Exp.Med.* 1995;181:669-75.
31. Alon R, Rossiter H, Wang X, Springer TA, Kupper TS. Distinct cell surface ligands mediate T lymphocyte attachment and rolling on P and E selectin under physiological flow. *J.Cell Biol.* 1994;127:1485-95.
32. Tamkun JW, DeSimone DW, Fonda D, Patel RS, Buck C, Horwitz AF *et al.* Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. *Cell* 1986;46:271-82.
33. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992;69:11-25.
34. Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 1990;346:425-34.
35. van de SA, van der Saag PT. Intercellular adhesion molecule-1. *J.Mol.Med.* 1996;74:13-33.
36. Komatsu S, Flores S, Gerritsen ME, Anderson DC, Granger DN. Differential up-regulation of circulating soluble and endothelial cell intercellular adhesion molecule-1 in mice. *Am.J.Pathol.* 1997;151:205-14.

37. Panes J, Granger DN. Leukocyte-endothelial cell interactions: molecular mechanisms and implications in gastrointestinal disease. *Gastroenterology* 1998;114:1066-90.
38. Henninger DD, Panes J, Eppihimer M, Russell J, Gerritsen M, Anderson DC *et al.* Cytokine-induced VCAM-1 and ICAM-1 expression in different organs of the mouse. *J.Immunol.* 1997;158:1825-32.
39. Muller WA, Weigl SA, Deng X, Phillips DM. PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J.Exp.Med.* 1993;178:449-60.
40. Ley K. Integration of inflammatory signals by rolling neutrophils. *Immunol.Rev.* 2002;186:8-18.:8-18.
41. Vestweber D, Blanks JE. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol Rev.* 1999;79:181-213.
42. Kansas GS, Saunders KB, Ley K, Zakrzewicz A, Gibson RM, Furie BC *et al.* A role for the epidermal growth factor-like domain of P-selectin in ligand recognition and cell adhesion. *J.Cell Biol.* 1994;124:609-18.
43. Watson ML, Kingsmore SF, Johnston GI, Siegelman MH, Le Beau MM, Lemons RS *et al.* Genomic organization of the selectin family of leukocyte adhesion molecules on human and mouse chromosome 1. *J.Exp.Med.* 1990;172:263-72.
44. Johnston GI, Bliss GA, Newman PJ, McEver RP. Structure of the human gene encoding granule membrane protein-140, a member of the selectin family of adhesion receptors for leukocytes. *J.Biol.Chem.* 1990;265:21381-85.
45. Collins T, Williams A, Johnston GI, Kim J, Eddy R, Shows T *et al.* Structure and chromosomal location of the gene for endothelial-leukocyte adhesion molecule 1. *J.Biol.Chem.* 1991;266:2466-73.

46. McEver RP, Beckstead JH, Moore KL, Marshall-Carlson L, Bainton DF. GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J.Clin.Invest* 1989;84:92-99.
47. Berman CL, Yeo EL, Wencel-Drake JD, Furie BC, Ginsberg MH, Furie B. A platelet alpha granule membrane protein that is associated with the plasma membrane after activation. Characterization and subcellular localization of platelet activation-dependent granule-external membrane protein. *J.Clin.Invest.* 1986;78:130-37.
48. Furie B, Furie BC, Flaumenhaft R. A journey with platelet P-selectin: the molecular basis of granule secretion, signalling and cell adhesion. *Thromb.Haemost.* 2001;86:214-21.
49. Owen DJ, Setiadi H, Evans PR, McEver RP, Green SA. A third specificity-determining site in mu 2 adaptin for sequences upstream of Yxx phi sorting motifs. *Traffic.* 2001;2:105-10.
50. Straley KS, Green SA. Rapid transport of internalized P-selectin to late endosomes and the TGN: roles in regulating cell surface expression and recycling to secretory granules. *J.Cell Biol.* 2000;151:107-16.
51. Setiadi H, Disdier M, Green SA, Canfield WM, McEver RP. Residues throughout the cytoplasmic domain affect the internalization efficiency of P-selectin. *J.Biol.Chem.* 1995;270:26818-26.
52. Dunlop LC, Skinner MP, Bendall LJ, Favalaro EJ, Castaldi PA, Gorman JJ *et al.* Characterization of GMP-140 (P-selectin) as a circulating plasma protein. *J.Exp.Med.* 1992;175:1147-50.
53. Chen A, Engel P, Tedder TF. Structural requirements regulate endoproteolytic release of the L-selectin (CD62L) adhesion receptor from the cell surface of leukocytes. *J.Exp.Med.* 1995;182:519-30.



54. Modderman PW, Beuling EA, Govers LA, Calafat J, Janssen H, dem Borne AE *et al.* Determinants in the cytoplasmic domain of P-selectin required for sorting to secretory granules. *Biochem.J.* 1998;336:153-61.
55. Norcott JP, Solari R, Cutler DF. Targeting of P-selectin to two regulated secretory organelles in PC12 cells. *J.Cell Biol.* 1996;134:1229-40.
56. Handagama P, Scarborough RM, Shuman MA, Bainton DF. Endocytosis of fibrinogen into megakaryocyte and platelet alpha-granules is mediated by alpha IIb beta 3 (glycoprotein IIb-IIIa). *Blood* 1993;82:135-38.
57. Blagoveshchenskaya AD, Norcott JP, Cutler DF. Lysosomal targeting of P-selectin is mediated by a novel sequence within its cytoplasmic tail. *J.Biol.Chem.* 1998;273:2729-37.
58. Sanders WE, Wilson RW, Ballantyne CM, Beaudet AL. Molecular cloning and analysis of *in vivo* expression of murine P-selectin. *Blood* 1992;80:795-800.
59. Luscinskas FW, Ding H, Lichtman AH. P-selectin and vascular cell adhesion molecule 1 mediate rolling and arrest, respectively, of CD4+ T lymphocytes on tumor necrosis factor alpha-activated vascular endothelium under flow. *J.Exp.Med.* 1995;181:1179-86.
60. Pan J, Xia L, McEver RP. Comparison of promoters for the murine and human P-selectin genes suggests species-specific and conserved mechanisms for transcriptional regulation in endothelial cells. *J.Biol.Chem.* 1998;273:10058-67.
61. Yao L, Setiadi H, Xia L, Laszik Z, Taylor FB, McEver RP. Divergent inducible expression of P-selectin and E-selectin in mice and primates. *Blood* 1999;94:3820-28.

62. Stocker CJ, Sugars KL, Harari OA, Landis RC, Morley BJ, Haskard DO. TNF-alpha, IL-4, and IFN-gamma regulate differential expression of P- and E-selectin expression by porcine aortic endothelial cells. *J.Immunol.* 2000;164:3309-15.
63. Grober JS, Bowen BL, Ebling H, Athey B, Thompson CB, Fox DA *et al.* Monocyte-endothelial adhesion in chronic rheumatoid arthritis. In situ detection of selectin and integrin-dependent interactions. *J.Clin.Invest* 1993;91:2609-19.
64. Symon FA, Walsh GM, Watson SR, Wardlaw AJ. Eosinophil adhesion to nasal polyp endothelium is P-selectin-dependent. *J.Exp.Med.* 1994;180:371-76.
65. Johnson-Tidey RR, McGregor JL, Taylor PR, Poston RN. Increase in the adhesion molecule P-selectin in endothelium overlying atherosclerotic plaques. Coexpression with intercellular adhesion molecule-1. *Am.J.Pathol.* 1994;144:952-61.
66. Khew-Goodall Y, Wadham C, Stein BN, Gamble JR, Vadas MA. Stat6 activation is essential for interleukin-4 induction of P-selectin transcription in human umbilical vein endothelial cells. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 1999;19:1421-29.
67. Khew-Goodall Y, Butcher CM, Litwin MS, Newlands S, Korpelainen EI, Noack LM *et al.* Chronic expression of P-selectin on endothelial cells stimulated by the T-cell cytokine, interleukin-3. *Blood* 1996;87:1432-38.
68. Foxall C, Watson SR, Dowbenko D, Fennie C, Lasky LA, Kiso M *et al.* The three members of the selectin receptor family recognize a common carbohydrate epitope, the sialyl Lewis(x) oligosaccharide. *J.Cell Biol.* 1992;117:895-902.
69. Varki A. Selectin ligands: will the real ones please stand up? *J.Clin.Invest* 1997;99:158-62.

70. Kanamori A, Kojima N, Uchimura K, Muramatsu T, Tamatani T, Berndt MC *et al.* Distinct sulfation requirements of selectins disclosed using cells that support rolling mediated by all three selectins under shear flow. L-selectin prefers carbohydrate 6-sulfation to tyrosine sulfation, whereas p-selectin does not. *J.Biol.Chem.* 2002;277:32578-86.
71. Harlan JM. Leukocyte adhesion deficiency syndrome: insights into the molecular basis of leukocyte emigration. *Clin.Immunol.Immunopathol.* 1993;67:S16-S24.
72. Knibbs RN, Craig RA, Maly P, Smith PL, Wolber FM, Faulkner NE *et al.* Alpha(1,3)-fucosyltransferase VII-dependent synthesis of P- and E-selectin ligands on cultured T lymphoblasts. *J.Immunol.* 1998;161:6305-15.
73. Maly P, Thall A, Petryniak B, Rogers CE, Smith PL, Marks RM *et al.* The alpha(1,3)fucosyltransferase Fuc-TVII controls leukocyte trafficking through an essential role in L-, E-, and P-selectin ligand biosynthesis. *Cell* 1996;86:643-53.
74. Homeister JW, Thall AD, Petryniak B, Maly P, Rogers CE, Smith PL *et al.* The alpha(1,3)fucosyltransferases FucT-IV and FucT-VII exert collaborative control over selectin-dependent leukocyte recruitment and lymphocyte homing. *Immunity.* 2001;15:115-26.
75. Ellies LG, Tsuboi S, Petryniak B, Lowe JB, Fukuda M, Marth JD. Core 2 oligosaccharide biosynthesis distinguishes between selectin ligands essential for leukocyte homing and inflammation. *Immunity.* 1998;9:881-90.
76. Laszik Z, Jansen PJ, Cummings RD, Tedder TF, McEver RP, Moore KL. P-selectin glycoprotein ligand-1 is broadly expressed in cells of myeloid, lymphoid, and dendritic lineage and in some nonhematopoietic cells. *Blood* 1996;88:3010-21.

## Bibliografia

77. Norgard KE, Moore KL, Diaz S, Stults NL, Ushiyama S, McEver RP *et al.* Characterization of a specific ligand for P-selection on myeloid cells. A minor glycoprotein with sialylated O-linked oligosaccharides. *J.Biol.Chem.* 1993;268:12764-74.
78. Borges E, Eytner R, Moll T, Steegmaier M, Campbell MA, Ley K *et al.* The P-selectin glycoprotein ligand-1 is important for recruitment of neutrophils into inflamed mouse peritoneum. *Blood* 1997;90:1934-42.
79. Norman KE, Moore KL, McEver RP, Ley K. Leukocyte rolling in vivo is mediated by P-selectin glycoprotein ligand-1. *Blood* 1995;86:4417-21.
80. Frenette PS, Denis CV, Weiss L, Jurk K, Subbarao S, Kehrel B *et al.* P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo. *J.Exp.Med.* 2000.Apr.17.;191.(8.):1413.-22.191:1413-22.
81. Uchimura K, El Fasakhany FM, Hori M, Hemmerich S, Blink SE, Kansas GS *et al.* Specificities of N-acetylglucosamine-6-O-sulfotransferases in relation to L-selectin ligand synthesis and tumor-associated enzyme expression. *J.Biol.Chem.* 2002;277:3979-84.
82. Liu W, Ramachandran V, Kang J, Kishimoto TK, Cummings RD, McEver RP. Identification of N-terminal residues on P-selectin glycoprotein ligand- 1 required for binding to P-selectin. *J.Biol.Chem.* 1998;273:7078-87.
83. Bruehl RE, Moore KL, Lorant DE, Borregaard N, Zimmerman GA, McEver RP *et al.* Leukocyte activation induces surface redistribution of P-selectin glycoprotein ligand-1. *J.Leukoc.Biol.* 1997;61:489-99.
84. Walcheck B, Moore KL, McEver RP, Kishimoto TK. Neutrophil-neutrophil interactions under hydrodynamic shear stress involve L-

- selectin and PSGL-1. A mechanism that amplifies initial leukocyte accumulation of P-selectin in vitro. *J.Clin.Invest.* 1996;98:1081-87.
85. Guyer DA, Moore KL, Lynam EB, Schammel CM, Rogelj S, McEver RP *et al.* P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) is a ligand for L-selectin in neutrophil aggregation. *Blood* 1996;88:2415-21.
86. Spertini O, Cordey AS, Monai N, Giuffre L, Schapira M. P-selectin glycoprotein ligand 1 is a ligand for L-selectin on neutrophils, monocytes, and CD34+ hematopoietic progenitor cells. *J.Cell Biol.* 1996;135:523-31.
87. Bargatze RF, Kurk S, Butcher EC, Jutila MA. Neutrophils roll on adherent neutrophils bound to cytokine-induced endothelial cells via L-selectin on the rolling cells. *J.Exp.Med.* 1994;180:1785-92.
88. Jutila MA, Kurk S. Analysis of bovine gamma delta T cell interactions with E-, P-, and L-selectin. Characterization of lymphocyte on lymphocyte rolling and the effects of O-glycoprotease. *J.Immunol.* 1996;156:289-96.
89. Sako D, Chang XJ, Barone KM, Vachino G, White HM, Shaw G *et al.* Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P-selectin. *Cell* 1993;75:1179-86.
90. Aigner S, Sthoeger ZM, Fogel M, Weber E, Zarn J, Ruppert M *et al.* CD24, a mucin-type glycoprotein, is a ligand for P-selectin on human tumor cells. *Blood* 1997;89:3385-95.
91. Romo GM, Dong JF, Schade AJ, Gardiner EE, Kansas GS, Li CQ *et al.* The glycoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin. *J.Exp.Med.* 1999;190:803-14.
92. Berndt MC, Shen Y, Dopheide SM, Gardiner EE, Andrews RK. The vascular biology of the glycoprotein Ib-IX-V complex. *Thromb.Haemost.* 2001;86:178-88.

## *Bibliografia*

93. Katayama T, Ikeda Y, Handa M, Tamatani T, Sakamoto S, Ito M *et al.* Immunoneutralization of glycoprotein Ibalpha attenuates endotoxin-induced interactions of platelets and leukocytes with rat venular endothelium in vivo. *Circ.Res.* 2000;86:1031-37.
94. Mayrovitz HN. Leukocyte rolling: a prominent feature of venules in intact skin of anesthetized hairless mice. *Am.J.Physiol* 1992;262:H157-H161.
95. Doerschuk CM. Mechanisms of leukocyte sequestration in inflamed lungs. *Microcirculation.* 2001;8:71-88.
96. Fox-Robichaud A, Kubes P. Molecular mechanisms of tumor necrosis factor alpha-stimulated leukocyte recruitment into the murine hepatic circulation. *Hepatology* 2000.May.;31.(5.):1123.-7.31:1123-27.
97. Mayadas TN, Johnson RC, Rayburn H, Hynes RO, Wagner DD. Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin-deficient mice. *Cell* 1993;74:541-54.
98. Bullard DC, Kunkel EJ, Kubo H, Hicks MJ, Lorenzo I, Doyle NA *et al.* Infectious susceptibility and severe deficiency of leukocyte rolling and recruitment in E-selectin and P-selectin double mutant mice. *J.Exp.Med.* 1996;183:2329-36.
99. Hartwell DW, Wagner DD. New discoveries with mice mutant in endothelial and platelet selectins. *Thromb.Haemost.* 1999;82:850-57.
100. Jung U, Ley K. Mice lacking two or all three selectins demonstrate overlapping and distinct functions for each selectin. *J.Immunol.* 1999;162:6755-62.
101. Robinson SD, Frenette PS, Rayburn H, Cummiskey M, Ullman-Cullere M, Wagner DD *et al.* Multiple, targeted deficiencies in

- selectins reveal a predominant role for P-selectin in leukocyte recruitment. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1999;96:11452-57.
102. Klinger MH. Platelets and inflammation. *Anat.Embryol.(Berl.)* 1997;196:1-11.
103. McEver RP. Adhesive interactions of leukocytes, platelets, and the vessel wall during hemostasis and inflammation. *Thromb.Haemost.* 2001;86:746-56.
104. Palabrica T, Lobb R, Furie BC, Aronovitz M, Benjamin C, Hsu YM *et al.* Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by P-selectin on adherent platelets. *Nature* 1992;359:848-51.
105. Subramaniam M, Frenette PS, Saffaripour S, Johnson RC, Hynes RO, Wagner DD. Defects in hemostasis in P-selectin-deficient mice. *Blood* 1996;87:1238-42.
106. Johnson RC, Mayadas TN, Frenette PS, Mebius RE, Subramaniam M, Lacasce A *et al.* Blood cell dynamics in P-selectin-deficient mice. *Blood* 1995;86:1106-14.
107. Buttrum SM, Hatton R, Nash GB. Selectin-mediated rolling of neutrophils on immobilized platelets. *Blood* 1993;82:1165-74.
108. Frenette PS, Johnson RC, Hynes RO, Wagner DD. Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1995;92:7450-54.
109. Massberg S, Enders G, Leiderer R, Eisenmenger S, Vestweber D, Krombach F *et al.* Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin. *Blood* 1998;92:507-15.
110. Lorenzon P, Vecile E, Nardon E, Ferrero E, Harlan JM, Tedesco F *et al.* Endothelial cell E- and P-selectin and vascular cell adhesion

- molecule-1 function as signaling receptors. *J.Cell Biol.* 1998;142:1381-91.
111. Kaplanski G, Farnarier C, Benoliel AM, Foa C, Kaplanski S, Bongrand P. A novel role for E- and P-selectins: shape control of endothelial cell monolayers. *J.Cell Sci.* 1994;107:2449-57.
112. Evangelista V, Manarini S, Rotondo S, Martelli N, Polischuk R, McGregor JL *et al.* Platelet/polymorphonuclear leukocyte interaction in dynamic conditions: evidence of adhesion cascade and cross talk between P-selectin and the beta 2 integrin CD11b/CD18. *Blood* 1996;88:4183-94.
113. Nagata K, Tsuji T, Todoroki N, Katagiri Y, Tanoue K, Yamazaki H *et al.* Activated platelets induce superoxide anion release by monocytes and neutrophils through P-selectin (CD62). *J.Immunol.* 1993;151:3267-73.
114. Blanks JE, Moll T, Eytner R, Vestweber D. Stimulation of P-selectin glycoprotein ligand-1 on mouse neutrophils activates beta 2-integrin mediated cell attachment to ICAM-1. *Eur.J.Immunol.* 1998;28:433-43.
115. Elstad MR, La Pine TR, Cowley FS, McEver RP, McIntyre TM, Prescott SM *et al.* P-selectin regulates platelet-activating factor synthesis and phagocytosis by monocytes. *J.Immunol.* 1995;155:2109-22.
116. Koike J, Nagata K, Kudo S, Tsuji T, Irimura T. Density-dependent induction of TNF-alpha release from human monocytes by immobilized P-selectin. *FEBS Lett.* 2000;477:84-88.
117. Weyrich AS, McIntyre TM, McEver RP, Prescott SM, Zimmerman GA. Monocyte tethering by P-selectin regulates monocyte chemotactic protein-1 and tumor necrosis factor-alpha secretion. Signal integration and NF-kappa B translocation. *J.Clin.Invest* 1995;95:2297-303.



118. Hidari KI, Weyrich AS, Zimmerman GA, McEver RP. Engagement of P-selectin glycoprotein ligand-1 enhances tyrosine phosphorylation and activates mitogen-activated protein kinases in human neutrophils. *J.Biol.Chem.* 1997;272:28750-56.
119. Piccardoni P, Sideri R, Manarini S, Piccoli A, Martelli N, de Gaetano G *et al.* Platelet/polymorphonuclear leukocyte adhesion: a new role for SRC kinases in Mac-1 adhesive function triggered by P-selectin. *Blood* 2001;98:108-16.
120. Haller H, Kunzendorf U, Sacherer K, Lindschau C, Walz G, Distler A *et al.* T cell adhesion to P-selectin induces tyrosine phosphorylation of pp125 focal adhesion kinase and other substrates. *J.Immunol.* 1997;158:1061-67.
121. Katayama M, Handa M, Ambo H, Araki Y, Hirai S, Kato I *et al.* A monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for human GMP-140/P-selectin. *J.Immunol.Methods* 1992;153:41-48.
122. Ushiyama S, Laue TM, Moore KL, Erickson HP, McEver RP. Structural and functional characterization of monomeric soluble P-selectin and comparison with membrane P-selectin. *J.Biol.Chem.* 1993;268:15229-37.
123. Jilma B, Fasching P, Ruthner C, Rumpfmayr A, Ruzicka S, Kapiotis S *et al.* Elevated circulating P-selectin in insulin dependent diabetes mellitus. *Thromb.Haemost.* 1996;76:328-32.
124. Facer CA, Theodoridou A. Elevated plasma levels of P-selectin (GMP-140/CD62P) in patients with *Plasmodium falciparum* malaria. *Microbiol.Immunol.* 1994;38:727-31.
125. Ferroni P, Mammarella A, Martini F, Paoletti V, Cardarello CM, Labbadia G *et al.* Increased soluble P-selectin levels in hepatitis C virus-related chronic hepatitis: correlation with viral load. *J.Investig.Med.* 2001;49:407-12.

126. Blann AD, McCollum CN. Increased soluble P-selectin in peripheral artery disease: a new marker for the progression of atherosclerosis. *Thromb.Haemost.* 1998;80:1031-32.
127. Blann AD, Faragher EB, McCollum CN. Increased soluble P-selectin following myocardial infarction: a new marker for the progression of atherosclerosis. *Blood Coagul.Fibrinolysis* 1997;8:383-90.
128. Chong BH, Murray B, Berndt MC, Dunlop LC, Brighton T, Chesterman CN. Plasma P-selectin is increased in thrombotic consumptive platelet disorders. *Blood* 1994;83:1535-41.
129. Blann AD, Lip GY, Islim IF, Beevers DG. Evidence of platelet activation in hypertension. *J.Hum.Hypertens.* 1997;11:607-09.
130. Ehlers MR, Riordan JF. Membrane proteins with soluble counterparts: role of proteolysis in the release of transmembrane proteins. *Biochemistry* 1991;30:10065-74.
131. Fernandez-Botran R. Soluble cytokine receptors: their role in immunoregulation. *FASEB J.* 1991;5:2567-74.
132. Ishiwata N, Takio K, Katayama M, Watanabe K, Titani K, Ikeda Y *et al.* Alternatively spliced isoform of P-selectin is present in vivo as a soluble molecule. *J.Biol.Chem.* 1994;269:23708-15.
133. Disdier M, Morrissey JH, Fugate RD, Bainton DF, McEver RP. Cytoplasmic domain of P-selectin (CD62) contains the signal for sorting into the regulated secretory pathway. *Mol.Biol.Cell* 1992;3:309-21.
134. Berger G, Hartwell DW, Wagner DD. P-Selectin and platelet clearance. *Blood* 1998;92:4446-52.

135. Fijnheer R, Frijns CJ, Korteweg J, Rommes H, Peters JH, Sixma JJ *et al.* The origin of P-selectin as a circulating plasma protein. *Thromb.Haemost.* 1997;77:1081-85.
136. Blann AD, Lip GY, Beevers DG, McCollum CN. Soluble P-selectin in atherosclerosis: a comparison with endothelial cell and platelet markers. *Thromb.Haemost.* 1997;77:1077-80.
137. Frijns CJ, Kappelle LJ, van Gijn J, Nieuwenhuis HK, Sixma JJ, Fijnheer R. Soluble adhesion molecules reflect endothelial cell activation in ischemic stroke and in carotid atherosclerosis. *Stroke* 1997;28:2214-18.
138. Gamble JR, Skinner MP, Berndt MC, Vadas MA. Prevention of activated neutrophil adhesion to endothelium by soluble adhesion protein GMP140. *Science* 1990;249:414-17.
139. Wong CS, Gamble JR, Skinner MP, Lucas CM, Berndt MC, Vadas MA. Adhesion protein GMP140 inhibits superoxide anion release by human neutrophils. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1991;88:2397-401.
140. Andre P, Hartwell D, Hrachovinova I, Saffaripour S, Wagner DD. Pro-coagulant state resulting from high levels of soluble P-selectin in blood. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2000;97:13835-40.
141. Naka Y, Toda K, Kayano K, Oz MC, Pinsky DJ. Failure to express the P-selectin gene or P-selectin blockade confers early pulmonary protection after lung ischemia or transplantation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1997;94:757-61.
142. Johnson RC, Chapman SM, Dong ZM, Ordovas JM, Mayadas TN, Herz J *et al.* Absence of P-selectin delays fatty streak formation in mice. *J.Clin.Invest* 1997;99:1037-43.
143. Connolly ESJ, Winfree CJ, Prestigiacomo CJ, Kim SC, Choudhri TF, Hoh BL *et al.* Exacerbation of cerebral injury in mice that

express the P-selectin gene: identification of P-selectin blockade as a new target for the treatment of stroke. *Circ.Res.* 1997;81:304-10.

144. Gironella M, Molla M, Salas A, Soriano A, Sans M, Closa D *et al.* The role of P-selectin in experimental colitis as determined by antibody immunoblockade and genetically deficient mice. *J.Leukoc.Biol.* 2002;72:56-64.
145. Subramaniam M, Saffaripour S, Watson SR, Mayadas TN, Hynes RO, Wagner DD. Reduced recruitment of inflammatory cells in a contact hypersensitivity response in P-selectin-deficient mice. *J.Exp.Med.* 1995;181:2277-82.
146. Shreeniwas R, Koga S, Karakurum M, Pinsky D, Kaiser E, Brett J *et al.* Hypoxia-mediated induction of endothelial cell interleukin-1 alpha. An autocrine mechanism promoting expression of leukocyte adhesion molecules on the vessel surface. *J.Clin.Invest* 1992;90:2333-39.
147. Nagashima M, Shin'oka T, Nollert G, Shum-Tim D, Hickey PR, Roth SJ *et al.* Effects of a monoclonal antibody to P-selectin on recovery of neonatal lamb hearts after cold cardioplegic ischemia. *Circulation* 1998;98:II391-II397.
148. Suzuki H, Hayashi T, Tojo SJ, Kitagawa H, Kimura K, Mizugaki M *et al.* Anti-P-selectin antibody attenuates rat brain ischemic injury. *Neurosci.Lett.* 1999;265:163-66.
149. Weyrich AS, Ma XY, Lefer DJ, Albertine KH, Lefer AM. In vivo neutralization of P-selectin protects feline heart and endothelium in myocardial ischemia and reperfusion injury [see comments]. *J.Clin.Invest.* 1993;91:2620-29.
150. Singbartl K, Green SA, Ley K. Blocking P-selectin protects from ischemia/reperfusion-induced acute renal failure. *FASEB J.* 2000.Jan.;14.(1.):48.-54.14:48-54.

151. Merten M, Chow T, Hellums JD, Thiagarajan P. A new role for P-selectin in shear-induced platelet aggregation. *Circulation* 2000.Oct.24.;102.(17.):2045-50.102:2045-50.
152. Ikeda H, Ueyama T, Murohara T, Yasukawa H, Haramaki N, Eguchi H *et al.* Adhesive interaction between P-selectin and sialyl Lewis(x) plays an important role in recurrent coronary arterial thrombosis in dogs. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 1999;19:1083-90.
153. Kirchhofer D, Riederer MA, Baumgartner HR. Specific accumulation of circulating monocytes and polymorphonuclear leukocytes on platelet thrombi in a vascular injury model. *Blood* 1997;89:1270-78.
154. Yamazaki S, Isobe M, Suzuki J, Tojo S, Horie S, Okubo Y *et al.* Role of selectin-dependent adhesion in cardiac allograft rejection. *J.Heart Lung Transplant.* 1998;17:1007-16.
155. Raisanen-Sokolowski A, Glysing-Jensen T, Russell ME. Donor and recipient contributions of ICAM-1 and P-selectin in parenchymal rejection and graft arteriosclerosis: insights from double knockout mice. *J.Heart Lung Transplant.* 1999;18:735-43.
156. Raisky O, Morrison KJ, Obadia JF, McGregor J, Yacoub MH, Rose ML. Acute rejection and cardiac graft vasculopathy in the absence of donor-derived ICAM-1 or P-selectin. *J.Heart Lung Transplant.* 2001;20:340-49.
157. Johnson BA, Haines GK, Harlow LA, Koch AE. Adhesion molecule expression in human synovial tissue. *Arthritis Rheum.* 1993;36:137-46.
158. Verdrengh M, Erlandsson-Harris H, Tarkowski A. Role of selectins in experimental *Staphylococcus aureus*-induced arthritis. *Eur.J.Immunol.* 2000;30:1606-13.

## Bibliografia

159. Ogawa JI, Inoue H, Koide S. alpha-2,3-Sialyltransferase type 3N and alpha-1,3-fucosyltransferase type VII are related to sialyl Lewis(x) synthesis and patient survival from lung carcinoma. *Cancer* 1997;79:1678-85.
160. Borsig L, Wong R, Feramisco J, Nadeau DR, Varki NM, Varki A. Heparin and cancer revisited: mechanistic connections involving platelets, P-selectin, carcinoma mucins, and tumor metastasis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2001;98:3352-57.
161. Kim YJ, Borsig L, Varki NM, Varki A. P-selectin deficiency attenuates tumor growth and metastasis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1998;95:9325-30.
162. Elliott MJ, Maini RN, Feldmann M, Kalden JR, Antoni C, Smolen JS *et al.* Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis. *Lancet* 1994;344:1105-10.
163. Kavanaugh AF, Schulze-Koops H, Davis LS, Lipsky PE. Repeat treatment of rheumatoid arthritis patients with a murine anti-intercellular adhesion molecule 1 monoclonal antibody. *Arthritis Rheum.* 1997;40:849-53.
164. Abraham E, Wunderink R, Silverman H, Perl TM, Nasraway S, Levy H *et al.* Efficacy and safety of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor alpha in patients with sepsis syndrome. A randomized, controlled, double-blind, multicenter clinical trial. TNF-alpha MAb Sepsis Study Group. *JAMA* 1995;273:934-41.
165. Dore M, Korthuis RJ, Granger DN, Entman ML, Smith CW. P-selectin mediates spontaneous leukocyte rolling in vivo. *Blood* 1993;82:1308-16.
166. Downing LJ, Wakefield TW, Strieter RM, Prince MR, Londy FJ, Fowlkes JB *et al.* Anti-P-selectin antibody decreases inflammation

- and thrombus formation in venous thrombosis. *J.Vasc.Surg.* 1997;25:816-27.
167. Nolte D, Schmid P, Jager U, Botzlar A, Roesken F, Hecht R *et al.* Leukocyte rolling in venules of striated muscle and skin is mediated by P-selectin, not by L-selectin. *Am.J.Physiol.* 1994;267:H1637-H1642.
168. Coughlan AF, Hau H, Dunlop LC, Berndt MC, Hancock WW. P-selectin and platelet-activating factor mediate initial endotoxin-induced neutropenia. *J.Exp.Med.* 1994;179:329-34.
169. Coughlan AF, Berndt MC, Dunlop LC, Hancock WW. In vivo studies of P-selectin and platelet activating factor during endotoxemia, accelerated allograft rejection, and discordant xenograft rejection. *Transplant.Proc.* 1993;25:2930-31.
170. Eguchi H, Ikeda H, Murohara T, Yasukawa H, Haramaki N, Sakisaka S *et al.* Endothelial injuries of coronary arteries distal to thrombotic sites: role of adhesive interaction between endothelial P-selectin and leukocyte sialyl LewisX. *Circ.Res.* 1999;84:525-35.
171. Chen LY, Nichols WW, Hendricks JB, Yang BC, Mehta JL. Monoclonal antibody to P-selectin (PB1.3) protects against myocardial reperfusion injury in the dog. *Cardiovasc.Res.* 1994;28:1414-22.
172. Winn RK, Liggitt D, Vedder NB, Paulson JC, Harlan JM. Anti-P-selectin monoclonal antibody attenuates reperfusion injury to the rabbit ear. *J.Clin.Invest.* 1993;92:2042-47.
173. Davenpeck KL, Gauthier TW, Albertine KH, Lefer AM. Role of P-selectin in microvascular leukocyte-endothelial interaction in splanchnic ischemia-reperfusion. *Am.J.Physiol.* 1994;267:H622-H630.

174. Ferroni P, Pulcinelli FM, Lenti L, Gazzaniga PP. Is soluble P-selectin determination a more reliable marker of in vivo platelet activation than CD62P flow cytometric analysis? *Thromb.Haemost.* 1999;81:472-73.
175. Blann AD, Lip GY, Beevers DG, McCollum CN. Soluble P-selectin in atherosclerosis: a comparison with endothelial cell and platelet markers. *Thromb.Haemost.* 1997;77:1077-80.
176. Tiegs G, Hentschel J, Wendel A. A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A. *J.Clin.Invest.* 1992;90:196-203.
177. Gantner F, Leist M, Lohse AW, Germann PG, Tiegs G. Concanavalin A-induced T-cell-mediated hepatic injury in mice: the role of tumor necrosis factor. *Hepatology* 1995;21:190-98.
178. Mizuhara H, Uno M, Seki N, Yamashita M, Yamaoka M, Ogawa T *et al.* Critical involvement of interferon gamma in the pathogenesis of T-cell activation-associated hepatitis and regulatory mechanisms of interleukin-6 for the manifestations of hepatitis. *Hepatology* 1996;23:1608-15.
179. Morikawa H, Hachiya K, Mizuhara H, Fujiwara H, Nishiguchi S, Shiomi S *et al.* Sublobular veins as the main site of lymphocyte adhesion/transmigration and adhesion molecule expression in the porto-sinusoidal-hepatic venous system during concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology* 2000.Jan.;31.(1.):83.-94.31:83-94.
180. Wolf D, Hallmann R, Sass G, Sixt M, Kusters S, Fregien B *et al.* TNF-alpha-induced expression of adhesion molecules in the liver is under the control of TNFR1--relevance for concanavalin A-induced hepatitis. *J.Immunol.*2001.Jan.15.;166.(2.):1300.-7.166:1300-07.
181. Essani NA, Fisher MA, Simmons CA, Hoover JL, Farhood A, Jaeschke H. Increased P-selectin gene expression in the liver



- vasculature and its role in the pathophysiology of neutrophil-induced liver injury in murine endotoxin shock. *J.Leukoc.Biol.* 1998;63:288-96.
182. Yadav SS, Howell DN, Steeber DA, Harland RC, Tedder TF, Clavien PA. P-Selectin mediates reperfusion injury through neutrophil and platelet sequestration in the warm ischemic mouse liver. *Hepatology* 1999;29:1494-502.
183. Klingbeil C, Hsu DH. Pharmacology and safety assessment of humanized monoclonal antibodies for therapeutic use. *Toxicol.Pathol.* 1999;27:1-3.
184. Huston JS, George AJ. Engineered antibodies take center stage. *Hum.Antibodies* 2001;10:127-42.
185. Mocco J, Choudhri T, Huang J, Harfeldt E, Efros L, Klingbeil C *et al.* HuEP5C7 as a humanized monoclonal anti-E/P-selectin neurovascular protective strategy in a blinded placebo-controlled trial of nonhuman primate stroke. *Circ.Res.* 2002;91:907-14.
186. Roes J, Muller W, Rajewsky K. Mouse anti-mouse IgD monoclonal antibodies generated in IgD-deficient mice. *J.Immunol.Methods* 1995;183:231-37.
187. Blann A, Morris J, McCollum C. Soluble L-selectin in peripheral arterial disease: relationship with soluble E-selectin and soluble P-selectin. *Atherosclerosis* 1996;126:227-31.
188. Katayama M, Handa M, Araki Y, Ambo H, Kawai Y, Watanabe K *et al.* Soluble P-selectin is present in normal circulation and its plasma level is elevated in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura and haemolytic uraemic syndrome. *Br.J.Haematol.* 1993;84:702-10.
189. Kamath S, Blann AD, Caine GJ, Gurney D, Chin BS, Lip GY. Platelet P-selectin levels in relation to plasma soluble P-selectin and

- beta-thromboglobulin levels in atrial fibrillation. *Stroke* 2002;33:1237-42.
190. Merhi Y, Provost P, Chauvet P, Theoret JF, Phillips ML, Latour JG. Selectin blockade reduces neutrophil interaction with platelets at the site of deep arterial injury by angioplasty in pigs. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 1999;19:372-77.
191. Whiss PA, Andersson RG, Srinivas U. Kinetics of platelet P-selectin mobilization: concurrent surface expression and release induced by thrombin or PMA, and inhibition by the NO donor SNAP. *Cell Adhes.Commun.* 1998;6:289-300.
192. Hillis GS, Terregino C, Taggart P, Killian A, Zhao N, Dalsey WC *et al.* Elevated soluble P-selectin levels are associated with an increased risk of early adverse events in patients with presumed myocardial ischemia. *Am.Heart J.* 2002;143:235-41.
193. Ridker PM, Buring JE, Rifai N. Soluble P-selectin and the risk of future cardiovascular events. *Circulation* 2001;103:491-95.
194. Lohr HF, Schlaak JF, Lohse AW, Bocher WO, Arenz M, Gerken G *et al.* Autoreactive CD4+ LKM-specific and anticonotypic T-cell responses in LKM-1 antibody-positive autoimmune hepatitis. *Hepatology* 1996;24:1416-21.
195. Lohr HF, Weber W, Schlaak J, Goergen B, Meyer ZBK, Gerken G. Proliferative response of CD4+ T cells and hepatitis B virus clearance in chronic hepatitis with or without hepatitis B e-minus hepatitis B virus mutants. *Hepatology* 1995;22:61-68.
196. Toyabe S, Seki S, Iiai T, Takeda K, Shirai K, Watanabe H *et al.* Requirement of IL-4 and liver NK1+ T cells for concanavalin A-induced hepatic injury in mice. *J.Immunol.* 1997;159:1537-42.
197. Miyazawa Y, Tsutsui H, Mizuhara H, Fujiwara H, Kaneda K. Involvement of intrasinusoidal hemostasis in the development of

- concanavalin A-induced hepatic injury in mice. *Hepatology* 1998;27:497-506.
198. Chu A, Hong K, Berg EL, Ehrhardt RO. Tissue specificity of E- and P-selectin ligands in Th1-mediated chronic inflammation. *J.Immunol.* 1999;163:5086-93.
199. Staite ND, Justen JM, Sly LM, Beaudet AL, Bullard DC. Inhibition of delayed-type contact hypersensitivity in mice deficient in both E-selectin and P-selectin. *Blood* 1996;88:2973-79.
200. Massaguer A, Engel P, Perez-del-Pulgar S, Bosch J, Pizcueta P. Production and characterization of monoclonal antibodies against conserved epitopes of P-selectin (CD62P) [In Process Citation]. *Tissue Antigens.*2000.Aug.;56.(2.):117.-28.56:117-28.
201. Piccardoni P, Sideri R, Manarini S, Piccoli A, Martelli N, de Gaetano G *et al.* Platelet/polymorphonuclear leukocyte adhesion: a new role for SRC kinases in Mac-1 adhesive function triggered by P-selectin. *Blood* 2001.Jul.1.;98.(1.):108.-16.98:108-16.
202. Diacovo TG, Roth SJ, Morita CT, Rosat JP, Brenner MB, Springer TA. Interactions of human alpha/beta and gamma/delta T lymphocyte subsets in shear flow with E-selectin and P-selectin. *J.Exp.Med.* 1996;183:1193-203.
203. Merten M, Thiagarajan P. P-selectin expression on platelets determines size and stability of platelet aggregates. *Circulation* 2000.Oct.17.;102.(16.):1931.-6.102:1931-36.