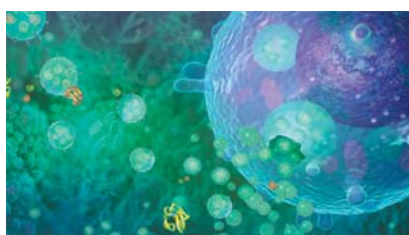


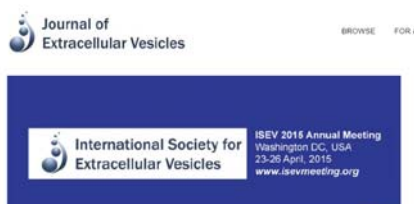
## MICROVESCICOLE EXTRACELLULARI

### Un nuovo processo di trasmissione dell'informazione

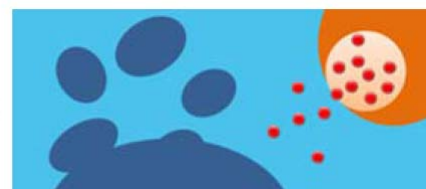


### Riviste & siti dedicati

- <http://www.journalofextracellularvesicles.net/index.php/jev>



Vesiclepedia  
A B I C I T E D E C I S I



Sito dedicato alla composizione dei diversi tipi di vescicole, aggiornato: **VESICLEPEDIA:**  
<http://microvesicles.org/>

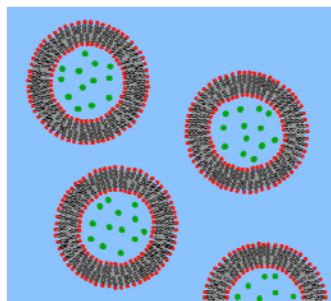
## A community compendium for extracellular vesicles

Extracellular vesicles (EVs) are membranous vesicles released by a variety of cells into the extracellular microenvironment. Based on the mode of biogenesis, EVs can be classified into three broad classes (i), ectosomes or shedding microvesicles (ii), exosomes and (iii), apoptotic bodies. Recent studies have ignited significant interest on EVs by elucidating their role in intercellular communication, pathogenesis, drug, vaccine and gene-vector delivery and as possible reservoirs of biomarkers. With such immense interest, the amount of data generated has increased exponentially. Here, we describe Vesiclepedia, a manually curated compendium of molecular data (lipid, RNA and protein) identified in different classes of EVs. Currently, Vesiclepedia comprises 35,264 protein, 18,718 mRNA, 1,772 miRNA and 342 lipid entries encompassed from 341 independent studies that were published over the past several years. Even though databases are indispensable resources for the scientific community, recent studies have shown that more than 50% of the databases are not updated for a long time. In addition, more than 20% of the database

<http://microvesicles.org/>

## Vescicole di membrana

- Strutture approssimativamente sferiche delimitate da un **doppio strato lipidico** (di struttura simile a quella delle membrane cellulari) che contengono nel loro lume **componenti idrofilici solubili**.



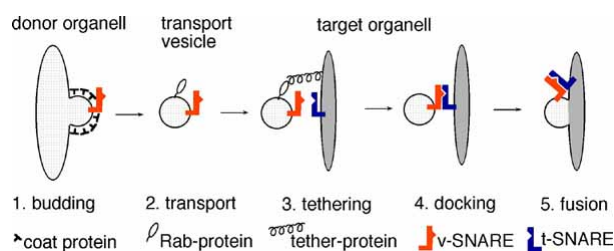
Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. Nat Rev Immunol. 2009 Aug;9(8):581-93.  
[http://en.wikipedia.org/wiki/Model\\_lipid\\_bilayer](http://en.wikipedia.org/wiki/Model_lipid_bilayer)

## VESCICOLE INTRACELLULARI

### Trasferimento di componenti tra compartimenti intracellulari - 1

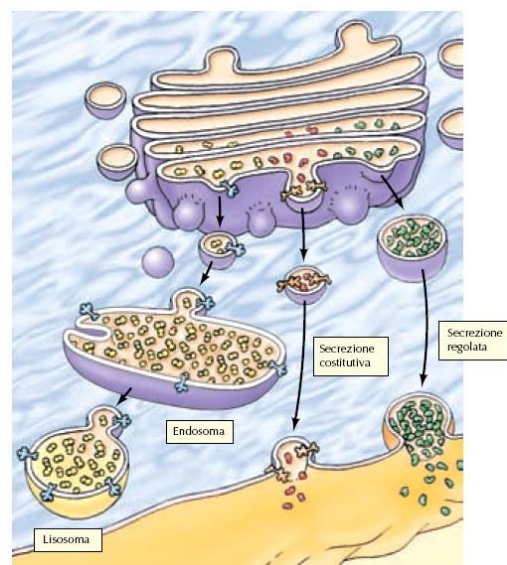
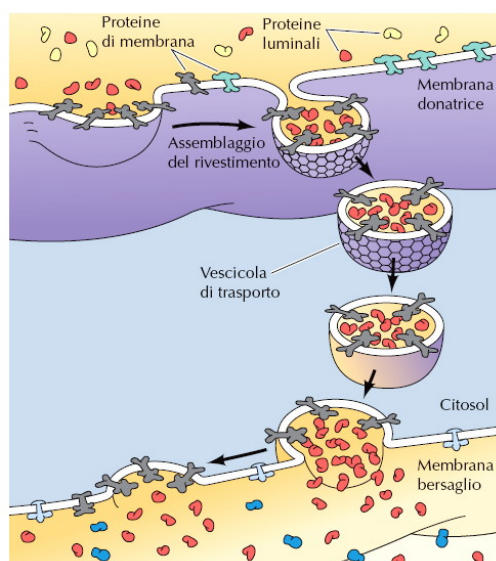
- Nelle cellule eucariotiche, il **trasporto di componenti fra compartimenti intracellulari** (reticolo endoplasmatico, apparato di Golgi, endosomi) coinvolge **vescicole di trasporto** che **gemmano dalla membrana di un compartimento donatore e viaggiano nel citoplasma prima di fondersi con la membrana di un compartimento accettore**.
- Le vescicole di trasporto contengono materiale proveniente dal **lume** del compartimento donatore ed espongono componenti del versante citoplasmatico della membrana di questo compartimento sulla loro superficie esterna.
- Tutte queste vescicole rimangono strettamente intracellulari.

Seminario



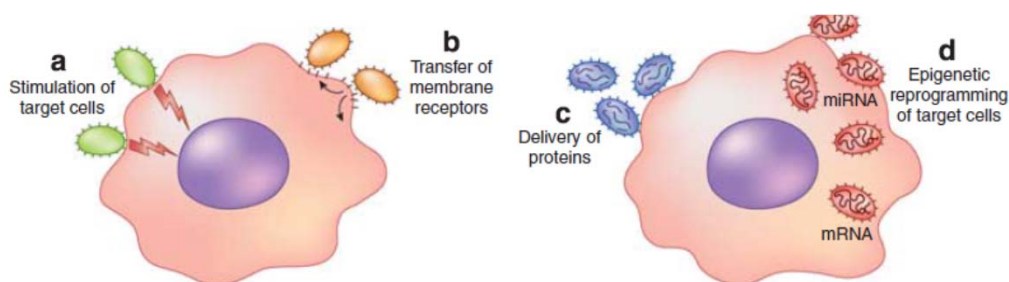
Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. Nat Rev Immunol. 2009 Aug;9(8):581-93.  
<http://homepage.ruhr-uni-bochum.de/Gabriele.Mollard/EvMSNARE.htm>

### Trasferimento di componenti tra compartimenti intracellulari - 2





## Tipi di vescicole extracellulari

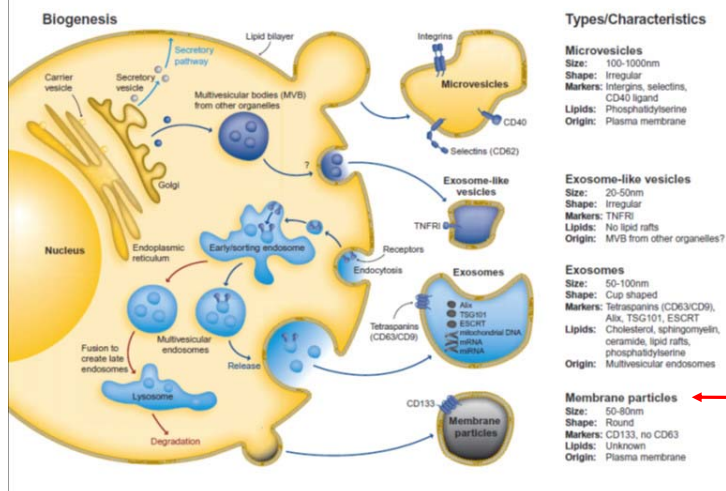


**Rappresentazione schematica dei meccanismi coinvolti nella comunicazione cellula-cellula mediata da microvescicole (MVs).**

- (a) Le MVs possono agire come “**complessi di segnalamento**” mediante ligandi espressi dalla superficie cellulare che stimolano direttamente le cellule bersaglio.
- (b) Le MVs possono **trasferire recettori** fra le cellule.
- (c) Le MVs possono **consegnare proteine funzionali** o **particelle infettive** alle cellule bersaglio.
- (d) Le MVs possono **trasferire informazione genetica** mediante mRNA, microRNA (miRNA), fattori di trascrizione, DNA, geni, da una cellula all'altra.

Camussi G, Deregibus MC, Bruno S, Cantaluppi V, Biancone L. Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. *Kidney Int.* 2010 Nov;78(9):838-48.

## Secreted Extracellular Vesicles

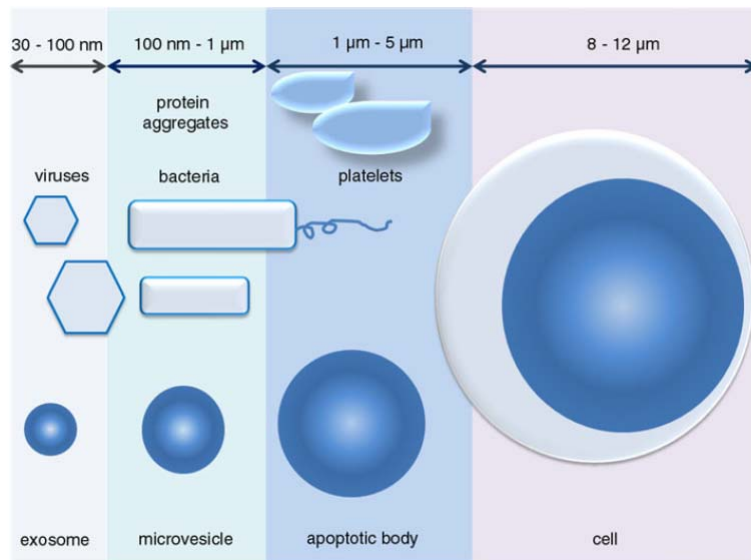


[http://docs.abcam.com/pdf/general/secreted\\_extracellular\\_vesicles\\_web.pdf](http://docs.abcam.com/pdf/general/secreted_extracellular_vesicles_web.pdf)

## Nomenclatura delle vescicole extracellulari in base all'origine cellulare e alla funzione biologica

- ✦ **Ectosomi**: vescicole secrete da neutrofili o monociti.
- ✦ **Microparticelle**: vescicole esfoliate dalle piastrine del sangue o dalle cellule endoteliali.
- ✦ **Tolerosomi**: vescicole purificate dal siero di topi nutriti con antigeni.
- ✦ **Prostasomi**: vescicole estratte dal fluido seminale.
- ✦ **Cardiosomi**: vescicole secrete dai cardiomiociti.
- ✦ **Vexosomi**: vescicole legate a vettori associati ad adenovirus.

EL Andaloussi S, Mäger I, Breakefield XO, Wood MJ. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. Nat Rev Drug Discov. 2013 May;12(5):347-57.



### Gamma di dimensioni dei principali tipi di vescicole di membrana.

- ✚ Mentre gli **exosomi** condividono la distribuzione delle dimensioni con i **virus**, le **microvescicole** si sovrappongono in dimensioni con i **batteri** e con aggregati proteici (ad es. immunocomplessi).
- ✚ Sia i **corpi apoptotici** che le piastrine cadono nella gamma di dimensioni 1–5 µm.

György B, Szabó TG, Pásztói M, Pál Z, Misják P, Aradi B, László V, Pállinger E, Pap E, Kittel A, Nagy G, Falus A, Buzás EI. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. Cell Mol Life Sci. 2011 Aug;68(16):2667-88.

## Categorie di Vescicole extracellulari (EVs) in base alla loro biogenesi:

### 1. Ectosomi (microparticelle o vescicole esfoliate)

- ✚ Gli ectosomi sono vescicole extracellulari di **grandi dimensioni** che hanno un diametro che va dai 50-1000 nm.
- ✚ Sono **esfoliati** da cellule mediante protrusione verso l'esterno (gemmazione; «blebbing») **della membrana plasmatica (PM)** seguita da **fissione** del loro peduncolo di membrana.
- ✚ Gli ectosomi sono rilasciati da un gran numero di cellule, incluso cellule tumorali, leucociti polimorfonucleati ed eritrociti invecchiati.
- ✚ **L'espressione di fosfatidilserina (PS) sulla superficie cellulare** è una delle caratteristiche degli ectosomi.

Kalra H et al. Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. PLoS Biol. 2012;10(12):e1001450.

## Categorie of Vescicole Extracellulari (EVs) in base alla loro biogenesi:

### 2. Exosomi

- ✚ Gli **exosomi** sono piccole vescicole membranose di **origine endocitica**, con un diametro che va dai 40-100 nm.
- ✚ La densità degli exosomi varia dai 1.10-1.21 g/ml e i marcatori più comuni riscontrati sono AIX, TSG101, tetraspanine e proteine di shock termico (HSPs).
- ✚ La biogenesi degli exosomi inizia con **l'internalizzazione di molecole mediante endocitosi**.
- ✚ Una volta internalizzate, le molecole endocitate sono riciclate verso la membrana plasmatica oppure **indirizzate verso corpi multivescicolari** ("multivesicular bodies", MVBs).
- ✚ Il destino "exocitico" dei MVBs deriva dalla loro **fusione** exocitica **con la PM**, che provoca il rilascio di vescicole intraluminali verso l'ambiente extracellulare, sotto forma di exosomi.

Kalra H et al. Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. PLoS Biol. 2012;10(12):e1001450.

## Categorie of Vescicole extracellulari (EVs) in base alla loro biogenesi:

### 3. Corpi apoptotici

- ✚ I "corpi apoptotici" ("apoptotic bodies", ABs) sono rilasciati da cellule apoptotiche frammentate e hanno un diametro di circa 50-5000 nm.
- ✚ Gli ABs si formano durante il processo di morte cellulare programmata, o apoptosi, e rappresentano i frammenti delle cellule morenti.
- ✚ Come per gli ectosomi, **l'espressione di PS sulla superficie cellulare** è caratteristica degli ABs.

Kalra H et al. Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. PLoS Biol. 2012;10(12):e1001450.

**Table 1** Key features of membrane vesicle populations

	Exosomes	Microvesicles	Apoptotic bodies
Size range	Approximately 50–100 nm	100–1,000 nm (~ 100–400 nm in blood plasma) [2, 22, 38]	1–5 µm [61]
Mechanism of generation	By exocytosis of MVBs	By budding/blebbing of the plasma membrane	By release from blebs of cells undergoing apoptosis
Isolation	Differential centrifugation and sucrose gradient ultracentrifugation [25], 100,000–200,000g, vesicle density is 1.13–1.19 g/mL	Differential centrifugation [39] 18,000–20,000g	Established protocols are essentially lacking; most studies use co-culture with apoptotic cells instead of isolating apoptotic bodies
Detection	TEM, western blotting, mass spectrometry, flow cytometry (bead coupled)	Flow cytometry, capture based assays [38, 52]	Flow cytometry
Best characterized cellular sources	Immune cells and tumors	Platelets, red blood cells and endothelial cells	Cell lines
Markers	Annexin V binding, CD63, CD81, CD9, LAMP1 and TSG101 [23, 24]	Annexin V binding, tissue factor and cell-specific markers	Annexin V binding, DNA content

György B, Szabó TG, Pásztói M, Pál Z, Misják P, Aradi B, László V, Pállinger E, Pap E, Kittel A, Nagy G, Falus A, Buzás EI. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci.* 2011 Aug;68(16):2667-88.

**Table 1. Exosomes and ectosomes: major similarities and differences**

Characteristic	Exosomes <sup>a</sup>	Ectosomes
<i>Assembly and release</i>		
Membrane of assembly	MVB	Plasma membrane
Diameter	50–100 nm	100–350 nm <sup>b</sup>
Ceramide	Large	+
ESCRT machinery	+ <sup>c</sup>	+
Protein/membrane anchorage	Small	Large
Piggyback of luminal proteins/RNAs	Small	+
ESCRT-III/Vps4 in pinch off	+	+
MVB exocytosis	Large	
Timing of release	Delayed	Seconds
<i>Interaction in extracellular space and with target cells</i>		
Rapid dissolution	+	+
Rolling and membrane fusion	+	+
Rolling and endocytosis	+	+
Navigation of EV mixtures	+	+
Markers <sup>d</sup>	CD63, CD61	TyA, C1q
Diagnosis and therapy	+	+

Cocucci E, Meldolesi J. Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends Cell Biol.* 2015 Feb 12. pii: S0962-8924(15)00015-X. doi: 10.1016/j.tcb.2015.01.004. [Epub ahead of print]



«Vescicole secrete note come **exosomi** sono state scoperte già circa 10 anni fa. Tuttavia, essendo considerati poco più di pattumiere di rifiuti cellulari, utili per scartare componenti molecolari non necessari, gli exosomi sono rimasti poco studiati nei successivi 10 anni.»

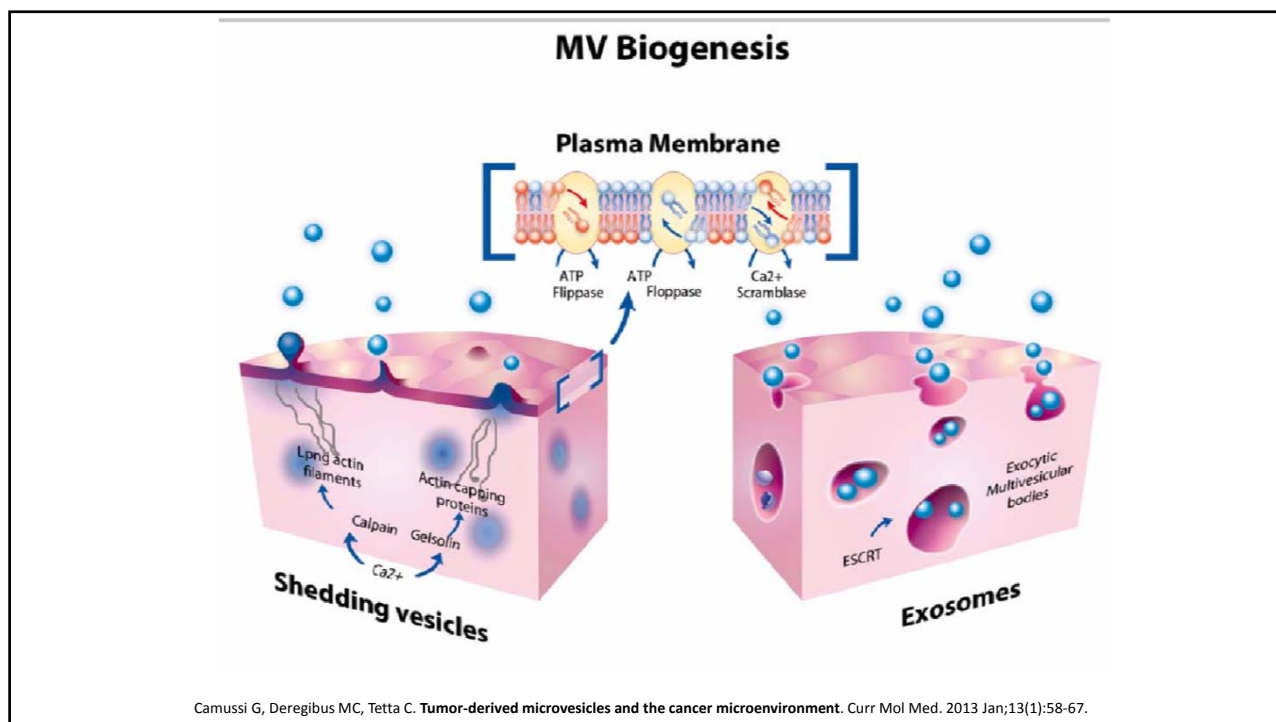


Théry C. Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications. F1000 Biol Rep. 2011;3:15. doi: 10.3410/B3-15.

- Negli ultimi anni, tuttavia, si è accumulato un gran numero di prove sperimentali che dimostrano come queste vescicole siano significativi **vettori** che contengono **insiemi**, cellula-specifici, **di proteine, lipidi e materiale genetico** che vengono **trasportati ad altre cellule dove alterano la funzione e la fisiologia**.
- Queste scoperte hanno riaperto l'interesse sugli exosomi, ma anche, più generalmente, su tutte le vescicole di secrezione, siano esse exosomi o no, e l'argomento è adesso fiorito diventando un campo di ricerca ad ampio respiro: quello della **comunicazione cellula-cellula mediata da vescicole**.



Théry C. Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications. F1000 Biol Rep. 2011;3:15. doi: 10.3410/B3-15.



## Vescicole extracellulari: Glossario - 1

- ✚ **Endocitosi**: processo mediante il quale le cellule internalizzano endosomi che contengono nutrienti e particelle e riciclano parte della membrana verso la superficie cellulare.
- ✚ **Endosoma**: organello intracellulare circondato da una membrana generato mediante endocitosi e classificato come **precoce** («early») o **tardivo** («late») a seconda del tempo passato nel citoplasma dopo la loro generazione.
- ✚ **ESCRT** («**E**ndosomal **S**orting **C**omplex **R**equired for **T**ransport»): macchinario proteico che include 4 complessi principali (ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III) che comprendono diverse subunità. Le ESCRTs sono coinvolte nello smistamento di proteine e rimodellamento delle membrane. Inoltre, le ESCRTs che mediano i processi di gemmazione sono coinvolte nel distacco delle vescicole intraluminali (ILVs) e degli ectosomi.
- ✚ **Esocitosi**: Fusione di vescicole intracellulari e altri organelli con la membrana plasmatica, mediata dall'organizzazione di complessi SNARE specifici che comprendono una proteina vescicolare (vSNARE, quale VAMP7) e due proteine della membrana plasmatica (SNAREs). La fusione può essere seguita dal rilascio dei contenuti dell'organello nello spazio extracellulare.

Cocucci E, Meldolesi J. Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends Cell Biol*. 2015 Feb 12. pii:S0962-8924(15)00015-X. doi:10.1016/j.tcb.2015.01.004. [Epub ahead of print]

## Vescicole extracellulari: Glossario - 2

- ✚ **Exosoma**: vescicola extracellulare rilasciata mediante exocitosi di corpi multivescicolari («Multivesicular Bodies», MVBs) riempiti di vescicole intraluminali («Intraluminal Vesicles», ILVs).
- ✚ **Vescicole extracellulari (EVs)**: **miscele di ectosomi ed exosomi** rilasciati nello spazio extracellulare.
- ✚ **Proteine G**: Enzimi GTPasi che idrolizzano GTP a GMP per rilasciare energia e partecipare a processi specifici.
- ✚ **Vescicola intraluminale (ILV)**: vescicola formata mediante gemmazione verso l'interno della membrana degli endosomi tardivi che diventano MVBs. Quando i MVBs sono esocitati le ILVs sono rilasciate come exosomi.
- ✚ **Corpo multivescicolare (MVB)**: endosoma tardivo riempito di ILVs.
- ✚ **Navigazione delle EVs**: trasporto, rilascio ed accumulo di EVs nei principali fluidi corporei.

Cocucci E, Meldolesi J. Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles. Trends Cell Biol. 2015 Feb 12. pii:S0962-8924(15)00015-X. doi: 10.1016/j.tcb.2015.01.004. [Epub ahead of print]

## Vescicole extracellulari: Glossario - 3

- **Fagocitosi**: processo mediante il quale le cellule inghiottono una o più particelle di grandi dimensioni (ad es. batteri, corpi apoptotici, o ectosomi di grandi dimensioni). La membrana plasmatica si avvolge strettamente attorno alla particella e quindi la internalizza nel vacuolo di fagocitosi nel citoplasma.
  - **Rabs**: piccole proteine G della superfamiglia Ras coinvolte nella regolazione di diversi processi cellulari, dall'architettura cellulare ai processi di gemmazione e fusione delle membrane.
  - **SNARE**: “Soluble NSF Attachment Protein Receptor”: famiglia di proteine associate alla faccia citoplasmatica delle membrane. I loro complessi mediano la fusione dei vari organelli con la membrana plasmatica o con altri organelli.
- (NSF: “N-ethylmaleimide Sensitive Fusion Protein” è una AAA-ATPasi omoesimerica coinvolta nei processi di fusione di membrane).

Cocucci E, Meldolesi J. Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles. Trends Cell Biol. 2015 Feb 12. pii:S0962-8924(15)00015-X. doi: 10.1016/j.tcb.2015.01.004. [Epub ahead of print]

## Genesi delle microvescicole

✚ Si presume che le microvescicole si formino mediante due meccanismi distinti:

1. **Vescicolazione** (“blebbing”) delle **membrane plasmatiche** con successiva produzione di vescicole esfoliate (**ECTOSOMI / MICROPARTICELLE**)
2. **Processamento a livello di endosomi e rilascio di materiale derivato dalla membrana plasmatica contenente citosol**, sotto forma di **EXOSOMI**.

✚ I **corpi apoptotici** rilasciati dalle cellule morenti sono un ulteriore tipo di vescicole esfoliate, spesso contenenti DNA come rimanenza nucleare.

Camussi G, Deregibus MC, Tetta C. **Tumor-derived microvesicles and the cancer microenvironment**. *Curr Mol Med*. 2013 Jan;13(1):58-67.

## Biogenesi

Vesicle types	Characteristics			
	Origin	Size	Markers	Contents
Exosomes	Endolysosomal pathway; intraluminal budding of multivesicular bodies and fusion of multivesicular body with cell membrane	40–120 nm	Tetraspanins (such as TSPAN29 and TSPAN30), ESCRT components, PDCD6IP, TSG101, flotillin, MFGE8	mRNA, microRNA (miRNA) and other non-coding RNAs; cytoplasmic and membrane proteins including receptors and major histocompatibility complex (MHC) molecules
Microvesicles	Cell surface; outward budding of cell membrane	50–1,000 nm	Integrins, selectins, CD40 ligand	mRNA, miRNA, non-coding RNAs, cytoplasmic proteins and membrane proteins, including receptors
Apoptotic bodies	Cell surface; outward blebbing of apoptotic cell membrane	500–2,000 nm	Extensive amounts of phosphatidylserine	Nuclear fractions, cell organelles

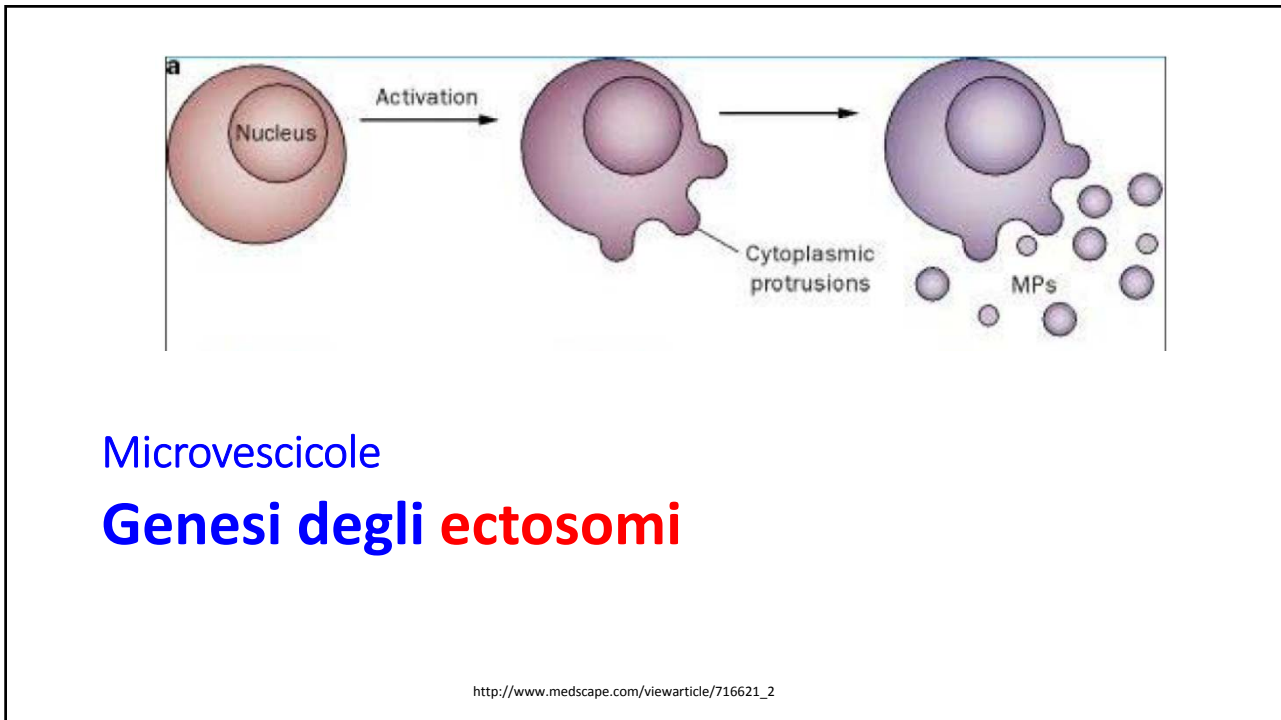
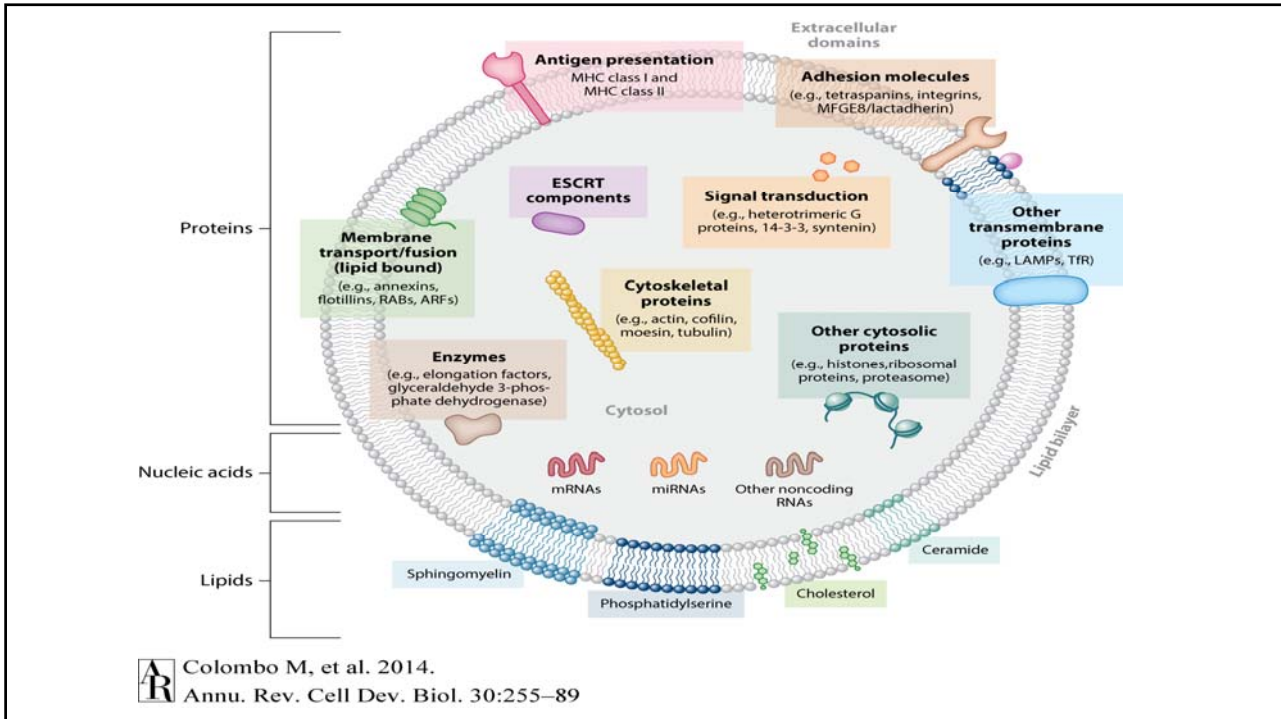
ESCRT, endosomal sorting complex required for transport, MFGE8, milk fat globule-EGF factor 8 protein; PDCD6IP, programmed cell death 6 interacting protein (also known as ALIX); TSG101, tumour susceptibility gene 101 protein; TSPAN29, tetraspanin 29.

Nella tabella sono illustrate **diverse vie di biogenesi** che portano alla formazione dei diversi tipi di vescicole extracellulari.

Tuttavia, **i marcatori delle vescicole extracellulari non sono specifici esclusivamente di un certo tipo**, e gli stessi marcatori possono essere anche presenti in altri tipi di vescicole.

A causa di questa sovrapposizione, i marcatori qui presentati descrivono quali proteine sono arricchite in un tipo particolare rispetto agli altri tipi di vescicola.

EL Andaloussi S, Mäger I, Breakefield XO, Wood MJ. **Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities**. *Nat Rev Drug Discov*. 2013 May;12(5):347-57.



## Ectosomi (1)

- ✦ Gli exosomi sono molto eterogenei, sia in dimensioni che in composizione.
- ✦ Hanno **componenti** che sono **tipici della loro cellula di origine** e sono quindi diversi da quelli provenienti da altri tipi cellulari.
- ✦ Possono variare a seconda dello **stato cellulare** (ad es., a riposo, sotto stimolo) e a seconda **dell'agente utilizzato per la stimolazione**.
- ✦ Questa variabilità nasce dal fatto che le membrane e i contenuti degli ectosomi **non** sono identici alla PM e al citosol della cellula di origine.

Cocucci E, Meldolesi J. *Ectosomes*. *Curr Biol*. 2011 Dec 6;21(23):R940-1.

## Ectosomi (2)

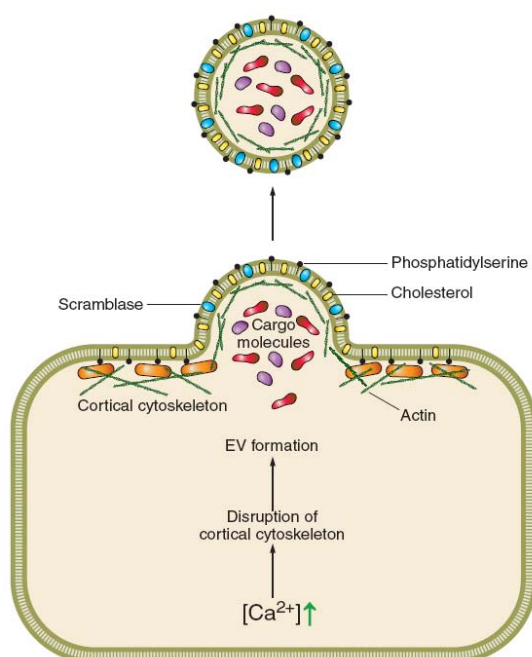
- ✦ La generazione degli ectosomi è un processo complesso ma estremamente efficace.
- ✦ Alcuni **domini** si assemblano nel piano della membrana plasmatica; **le proteine destinate a comparire negli ectosomi vengono smistate a questi domini** mentre **le proteine destinate a rimanere nella cellula sono escluse**.
- ✦ Concomitantemente, specifiche proteine e acidi nucleici del citosol (mRNAs e miRNAs) si accumulano in contatto con domini della membrana plasmatica.
- ✦ Questo meccanismo somiglia a quello della gemmazione dei retrovirus

Cocucci E, Meldolesi J. *Ectosomes*. *Curr Biol*. 2011 Dec 6;21(23):R940-1.

## Ectosomi (3)

- ✚ La gemmazione dei domini della membrana plasmatica associati ai loro pacchetti di proteine/RNA richiede il disassemblaggio localizzato del citoscheletro.
- ✚ Infine, la scarica degli ectosomi ha luogo mediante un processo di estrusione dipendente da actina/miosina.

Cocucci E, Meldolesi J. Ectosomes. Curr Biol. 2011 Dec 6;21(23):R940-1.

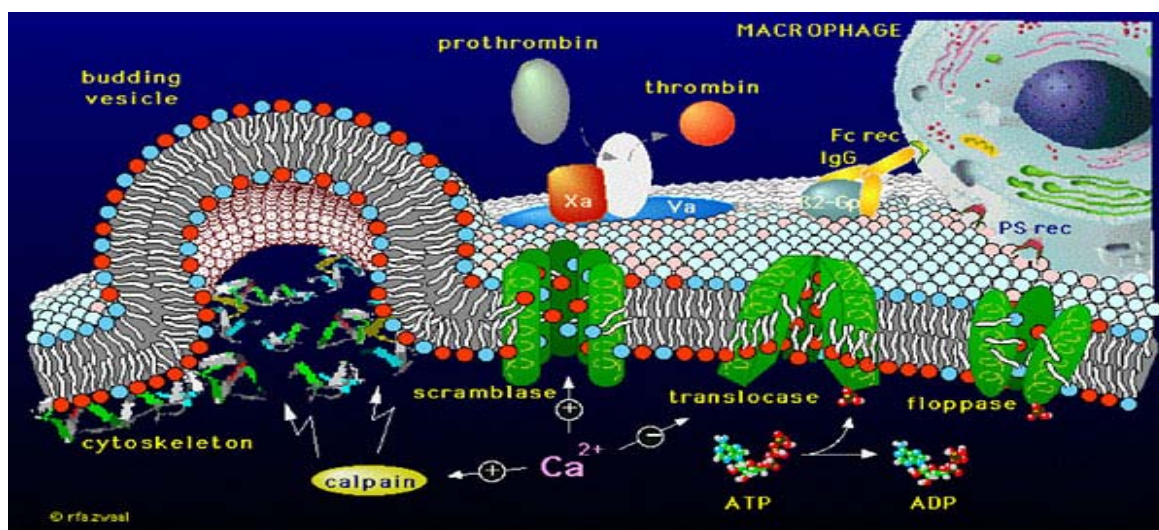


### Meccanismi proposti per la formazione di vescicole derivate dalle membrane (EV /ectosomi).

La formazione di EV è accompagnata **da un aumento dei livelli intracellulari di Calcio** responsabili, per l'attivazione delle scramblasi, dello **spostamento della fosfatidilserina dal foglietto interno a quello esterno.**

E' stata osservata anche la degradazione del citoscheletro corticale

Turturici G, Tinnirello R, Sconzo G, Geraci F. Extracellular membrane vesicles as a mechanism of cell-to-cell communication: advantages and disadvantages. Am J Physiol Cell Physiol. 2014 Apr 1;306(7):C621-33.



<http://www.nvas.org/image.axd?id=11c3573e-8c4e-4993-9d0a-68c1f5bf44e0&t=634780304361970000>  
<http://www.nvas.org/publications/EBriefings/Detail.aspx?cid=8f6e304e-f219-4238-b555-bd2e4212f94a>

TROVARE AUTORE TALK

## Genesi degli ectosomi - 1

- Le vescicole esfoliate [**ectosomi**] sono una popolazione eterogenea di vescicole con dimensioni che vanno dai 100 ai 1000 nm, che derivano **dall'estrusione della membrana cellulare** in un processo che richiede **un flusso di Calcio**, **riorganizzazione del citoscheletro** e **ridistribuzione dei componenti di membrana con formazione di nanodomini di membrana**.
- Le vescicole di membrana esfoliate contengono **elevate concentrazioni di colesterolo e altre molecole normalmente associate ai rafts lipidici**, incluso "Tissue Factor" e flotillina, e presentano **abbondante fosfatidilserina** e altri marcatori.
- La formazione delle microvescicole esfoliate segue l'esposizione dei residui di fosfatidilserina sulla superficie esterna delle cellule che porta alla **gemmazione** delle membrane plasmatiche che raccolgono proteine transmembrana e citosoliche specifiche.

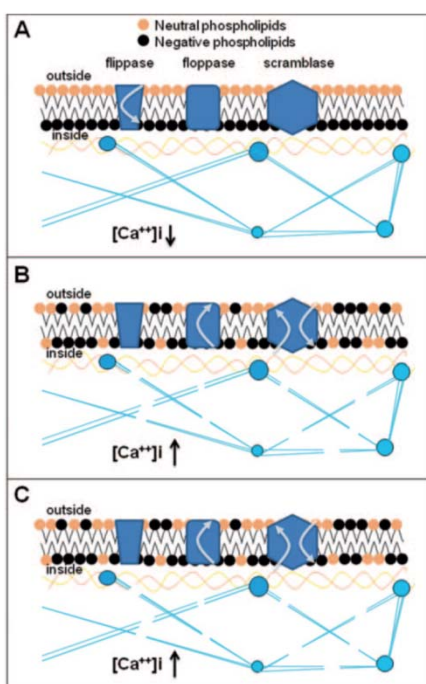
Camussi G, Deregibus MC, Tetta C. Tumor-derived microvesicles and the cancer microenvironment. Curr Mol Med. 2013 Jan;13(1):58-67.



## Genesi degli ectosomi - 2

- ✚ La **gemmazione** della membrana plasmatica è associata ad **alterazioni dell'asimmetria della membrana**. Questo processo è controllato da diversi enzimi quali la calpaina, la flippasi, la floppasi, la scramblasi e la gelsolina.
- ✚ L'aumento della concentrazione di  $\text{Ca}^{2+}$  nel citosol in seguito alla stimolazione cellulare porta ad alterazioni dell'equilibrio enzimatico transmembrana che provoca l'esposizione in superficie della fosfatidilserina.
- ✚ La proteolisi,  $\text{Ca}^{2+}$  dipendente, del citoscheletro induce l'efoliazione di microvescicole dalla superficie cellulare.

Camussi G, Deregiibus MC, Tetta C. Tumor-derived microvesicles and the cancer microenvironment. Curr Mol Med. 2013 Jan;13(1):58-67.



## Modello di formazione di microparticelle

- L'organizzazione dei fosfolipidi è sotto il controllo di 3 enzimi: **flippasi**, **floppasi** e **scramblasi**. **Nelle cellule a riposo la flippasi internalizza i fosfolipidi con carica negativa e mantiene l'asimmetria del bilayer fosfolipidico**. La floppasi e la "scramblasi" sono inattive e la concentrazione intracellulare di calcio è bassa.
- Dopo **attivazione**, la concentrazione intracellulare di calcio aumenta, la flippasi viene inibita, mentre la floppasi e la scramblasi sono attivate. **La floppasi esternalizza la fosfatidilserina**, un fosfolipide negativo, e la scramblasi trasloca i fosfolipidi in modo non-specifico attraverso la membrana, provocando una perdita dell'asimmetria dei fosfolipidi.
- L'aumento del Calcio intracellulare attiva inoltre delle proteasi che **degradano il citoscheletro**; la membrana è meno rigida e può formare delle bolle fino alla formazione e al rilascio di vescicole.

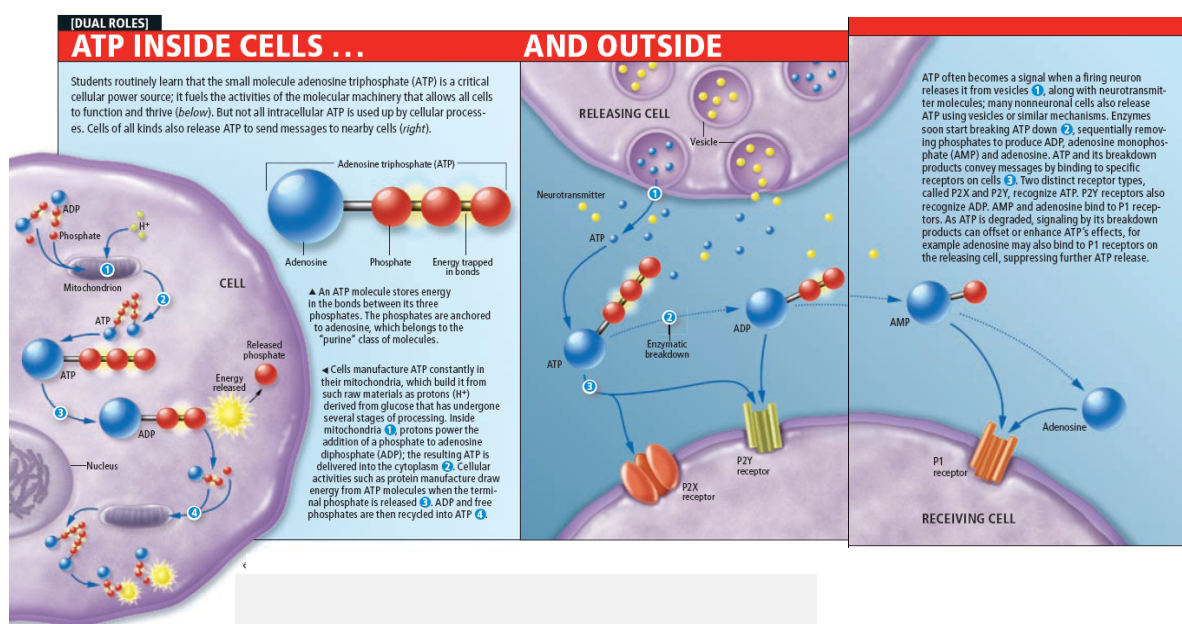
Tissota et al. Blood microvesicles: From proteomics to physiology. Translational proteomics 1:38-52, 2013.

## Genesi degli ectosomi - 3

- Perciò, si ritiene che siano **coinvolti nel rilascio di MVs** tutti gli **stimoli che portano ad un aumento della concentrazione intracellulare di  $Ca^{2+}$** , quali ad esempio lipopolisaccaridi batterici, citochine infiammatorie (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , Interleuchina 1, ecc.), aggregati di lipoproteine a bassa densità, sfingomielinasi acida (aSMasi) e il **recettore purinergico P2X7**, o specie reattive derivate dall'ossigeno (ROS).
- Si ritiene che nelle cellule gliali, la sfingomielinasi acida (aSMasi) e il recettore P2X7 siano coinvolti nel rilascio di MVs mediante un meccanismo dipendente dall'ATP **EXTRACELLULARE** (le cellule morte rilasciano ATP); l'attivazione del recettore P2X7 porta all'attivazione della aSMasi e a rapida idrolisi della sfingomielina. L'idrolisi della sfingomielina provoca un aumento della fluidità della membrana che porta alla vescicolazione della membrana e rilascio di MVs.

Camussi G, Deregibus MC, Tetta C. Tumor-derived microvesicles and the cancer microenvironment. Curr Mol Med. 2013 Jan;13(1):58-67.

«... cellule di tutti i tipi rilasciano ATP che viene utilizzato per spedire messaggi alle cellule circostanti»



Khakh BS, Burnstock G. The double life of ATP. Sci Am. 2009 Dec;301(6):84-90, 92.

# THE DOUBLE LIFE OF ATP

The molecule ATP, famous as an essential energy source inside cells, also carries critical messages between cells. That dual role is suggesting fresh ideas for fighting human diseases

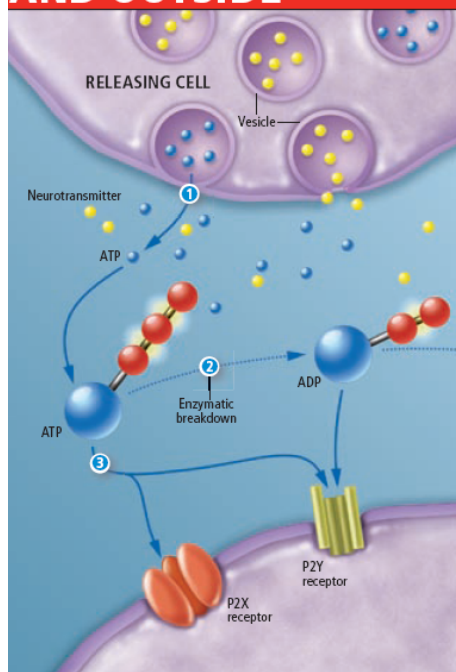
BY BALJIT S. KHAKH AND GEOFFREY BURNSTOCK

## KEY CONCEPTS

- ATP, best known as a universal fuel inside living cells, also serves as a molecular signal that affects cell behavior.
- A leading investigator and the discoverer of ATP's messenger role describe how ATP signals work and why they are essential to basic bodily functions and development.
- Because ATP is so ubiquitous, the molecule's influences can vary from tissue to tissue, offering new insights into a wide range of disorders and diverse ways to treat them.

—The Editors

## AND OUTSIDE



ATP often becomes a signal when a firing neuron releases it from vesicles **1**, along with neurotransmitter molecules; many nonneuronal cells also release ATP using vesicles or similar mechanisms. Enzymes soon start breaking ATP down **2**, sequentially removing phosphates to produce ADP, adenosine monophosphate (AMP) and adenosine. ATP and its breakdown products convey messages by binding to specific receptors on cells **3**. Two distinct receptor types, called P2X and P2Y, recognize ATP. P2Y receptors also recognize ADP. AMP and adenosine bind to P1 receptors. As ATP is degraded, signaling by its breakdown products can offset or enhance ATP's effects, for example adenosine may also bind to P1 receptors on the releasing cell, suppressing further ATP release.

## Genesi degli ectosomi - 4

- ✚ Le cellule tumorali [o di altri tessuti danneggiati], rilasciando ATP, possono stimolare le altre cellule a generare MVs contenenti citochine pro-infiammatorie.
- ✚ Le MVs esfoliate possono trasportare specifiche molecole della cellula di origine, ad esempio le MVs derivate dai gliomi trasportano recettori per fattori di crescita oncogenici (ad es. EGFRvIII). Inoltre, le MVs esfoliate possono anche contenere citochine e chemochine (ad es. IL-1 $\beta$  e IL-8), VEGF e Fibroblast Growth Factor-2 derivati dalla cellula di origine.

Camussi G, Deregiibus MC, Tetta C. Tumor-derived microvesicles and the cancer microenvironment. Curr Mol Med. 2013 Jan;13(1):58-67.

## Foglietti della membrana plasmatica normale -1

- ✚ Ciascuno dei due foglietti del bilayer della membrana ha una composizione lipidica specifica.
- ✚ Gli **aminofosfolipidi** [**fosfatidilserina (PS)** e fosfatidiletanolamina] sono specificamente **segregati nel foglietto interno**, mentre la fosfatidilcolina e la sfingomielina sono più concentrate nel foglietto esterno.
- ✚ La distribuzione dei lipidi nel bilayer è sotto il controllo di tre fondamentali fattori:
  - Una pompa diretta verso l'interno, una **flippasi** specifica per la fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina: aminofosfolipidi translocasi
  - Una pompa diretta verso l'esterno, detta **floppasi**
  - Una "lipid **scramblase**" che promuove la ridistribuzione aspecifica, bidirezionale del bilayer.

Hugel B, Martínez MC, Kunzelmann C, Freyssinet JM. Membrane microparticles: two sides of the coin. Physiology (Bethesda). 2005 Feb;20:22-7.

## Foglietti della membrana plasmatica normale -2

- ✚ Un aumento significativo e prolungato di concentrazione di  $\text{Ca}^{2+}$  nel citosol che accompagna la stimolazione cellulare può portare al collassamento dell'asimmetria di membrana stimolando l'attività delle scramblasi e delle floppasi e concomitante inibizione delle flippasi.
- ✚ La principale alterazione della distribuzione lipidica è l'esposizione sulla superficie cellulare di fosfatidilserina, seguita dal rilascio di microparticelle, permesso dalla degradazione del citoscheletro mediante proteolisi dipendente dal  $\text{Ca}^{2+}$ .

Hugel B, Martínez MC, Kunzelmann C, Freyssinet JM. Membrane microparticles: two sides of the coin. Physiology (Bethesda). 2005 Feb;20:22-7.

## Foglietti della membrana plasmatica dopo attivazione -1

- ✚ Una volta accessibile sulla superficie cellulare nonché sulla superficie delle microparticelle, la **fosfatidilserina** (PS) può svolgere almeno due importanti funzioni fisiologiche:
  - Promuove la **coagulazione del sangue**.
  - Costituisce un segnale di riconoscimento per la **rimozione di cellule senescenti** da parte del sistema del reticolo endoteliale.
- ✚ **Nuove funzioni** per la fosfatidilserina e per le microvescicole possono essere prese in considerazione in un contesto in cui il **recettore (Ptdsr)** è stato recentemente segnalato per avere un' importante funzione nello sviluppo embrionale come un importante gene promuovente il differenziamento.

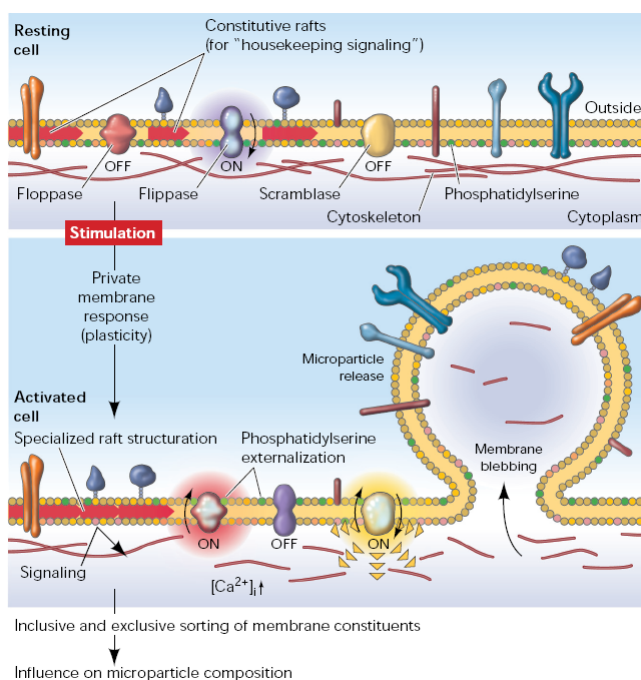
Hugel B, Martínez MC, Kunzelmann C, Freyssinet JM. Membrane microparticles: two sides of the coin. Physiology (Bethesda). 2005 Feb;20:22-7.

## Il rilascio degli ectosomi è regolato?

- ✚ Gli ectosomi sono scaricati anche da cellule a riposo ma la velocità di rilascio aumenta considerevolmente in seguito ad un' adeguata stimolazione.
- ✚ Il rilascio impressionante di ectosomi da parte di macrofagi e di cellule della microglia è stato paragonato alla potenza di fuoco dei cannoni delle navi del 19° secolo.
- ✚ Il segnale localizzato che scatena la risposta è l'aumento della concentrazione libera di  $Ca^{2+}$  che induce il disassemblaggio del citoscheletro e la vescicolazione della membrana.



Cocucci E, Meldolesi J. Ectosomes. Curr Biol. 2011 Dec 6;21(23):R940-1.  
[http://en.wikipedia.org/wiki/Naval\\_artillery\\_in\\_the\\_Age\\_of\\_Sail](http://en.wikipedia.org/wiki/Naval_artillery_in_the_Age_of_Sail)



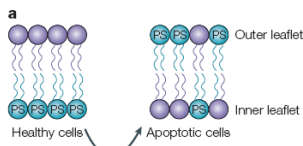
### Risposta della membrana plasmatica alla stimolazione cellulare

La membrana plasmatica è un'entità ben strutturata caratterizzata da una distribuzione trasversale di lipidi e di proteine fra i due foglietti, ma anche da organizzazione laterale in domini designati "rafts". In seguito a stimolazione, ha luogo una ridistribuzione generale che porta alla **strutturazione dei rafts**, **esternalizzazione della fosfatidilserina** e **rilascio di microparticelle** [ectosomi]. La risposta di ogni tipo cellulare, caratterizzata dall'inclusione o esclusione controllata di costituenti specifici nei rafts, porta al rilascio di microparticelle [microvescicole, ectosomi] di composizione particolare.

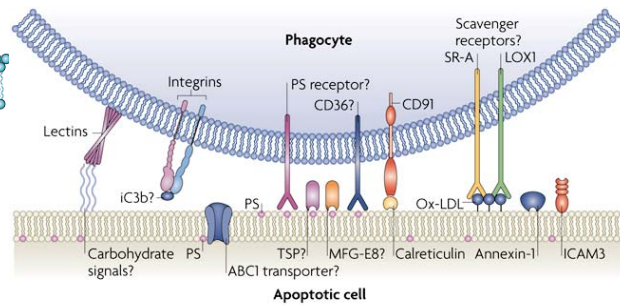
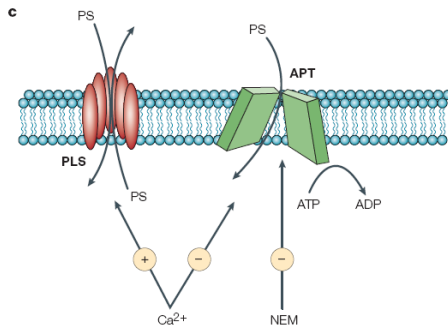
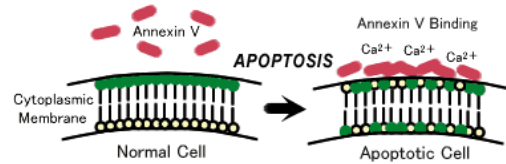
Hugel B, Martínez MC, Kunzelmann C, Freyssinet JM. Membrane microparticles: two sides of the coin. Physiology (Bethesda). 2005 Feb;20:22-7.

## Esposizione di fosfatidilserina nel foglietto extracellulare

### 1: Apoptosi



[http://www.biocat.com/bc/img/info\\_pix/PSAnnexin.gif](http://www.biocat.com/bc/img/info_pix/PSAnnexin.gif)



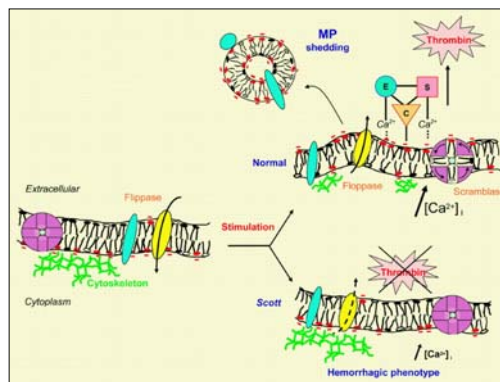
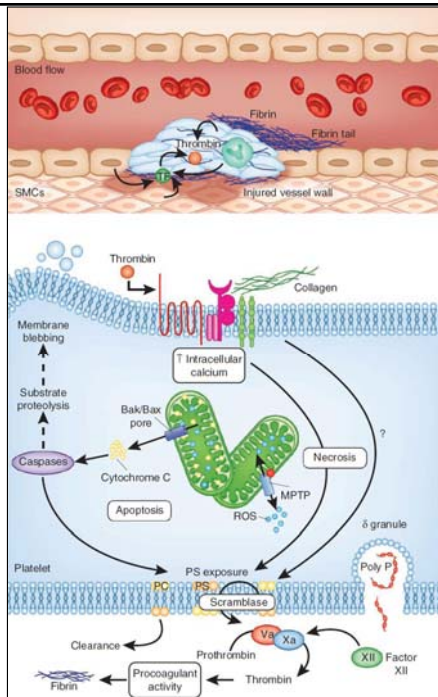
Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. **Apoptosis: controlled demolition at the cellular level.** Nat Rev Mol Cell Biol. 2008 Mar;9(3):231-41.

Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. **Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link.** Nat Rev Mol Cell Biol. 2003 Jul;4(7):552-65.

Nature Reviews | Molecular Cell Biology

## Esposizione di fosfatidilserina nel foglietto extracellulare

### 2: Aggregazione piastrinica



<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/106/2/396.2/F1.large.jpg>

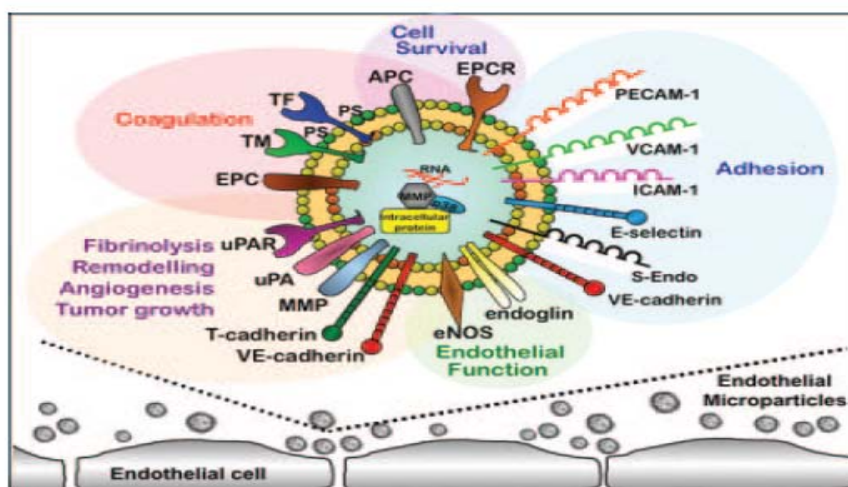
Jackson SP. **Arterial thrombosis--insidious, unpredictable and deadly.** Nat Med. 2011 Nov 7;17(11):1423-36.

## Seminario

Microvescicole

### FATTORI PRO-COAGULANTI

Rappresentazione schematica dell'insieme di molecole convogliate dalle microparticelle di origine endoteliale (EMPs) e degli effetti biologici associati.



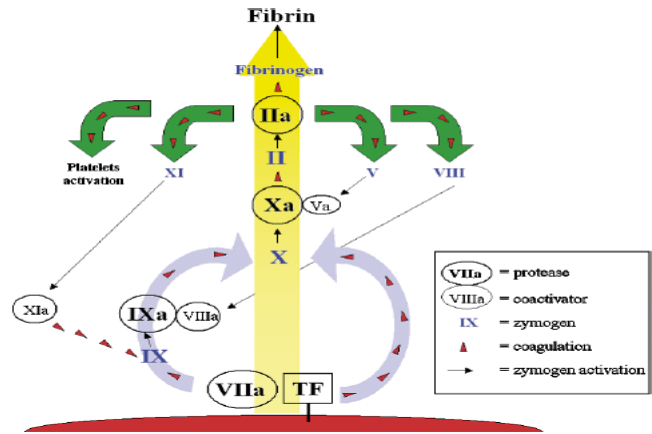
Dignat-George F, Boulanger CM. The many faces of endothelial microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011 Jan;31(1):27-33.



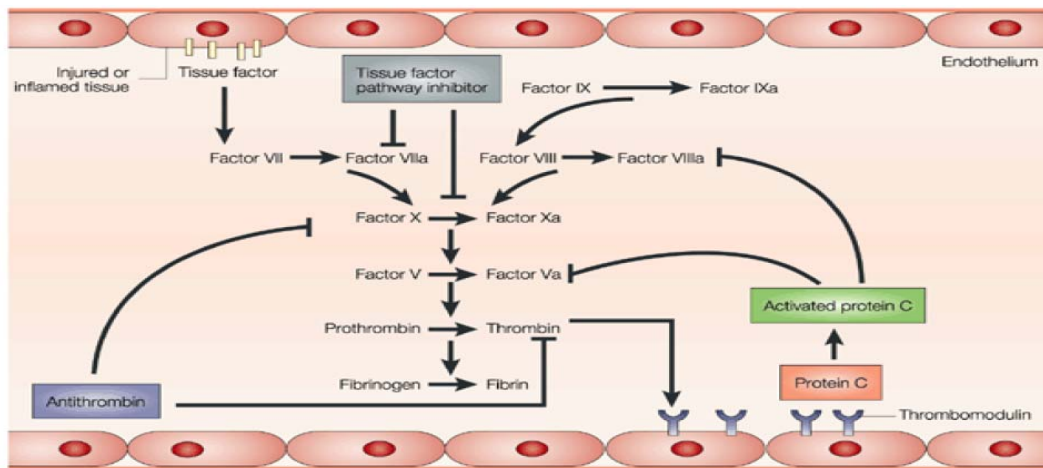
## «Tissue Factor» - 1

(Tromboplastina, Fattore III della coagulazione)

- ✦ Principale agente di **inizio della coagulazione**.
- ✦ Forma un complesso ternario con il fattore VVa (FVIIa) della coagulazione e con il fattore zimogeno (FX), che è attivato a fattore Xa (FXa). Quest'ultimo scinde la protrombina a trombina (FIIa), che a sua volta attiva il fibrinogeno con formazione di monomeri di fibrina.



Daubie V, Pochet R, Houard S, Philippart P. Tissue factor: a mini-review. J Tissue Eng Regen Med. 2007 May-Jun;1(3):161-9.



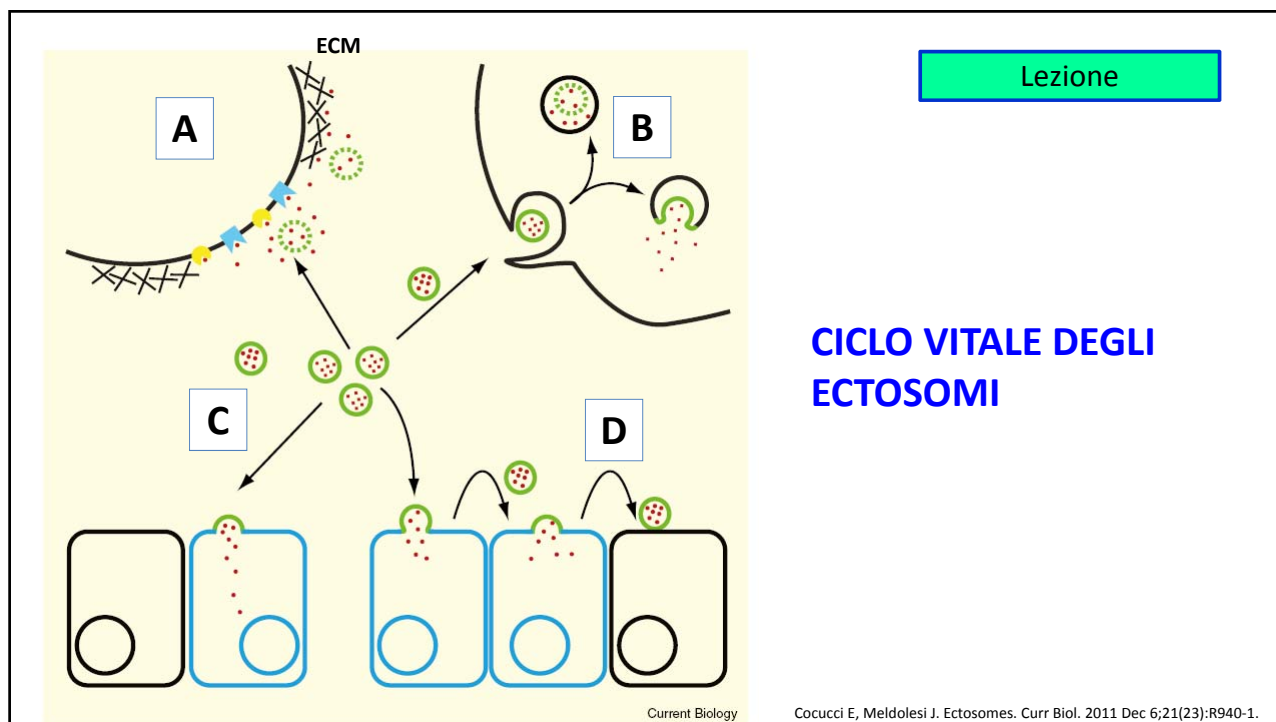
Nature Reviews | Drug Discovery

[http://www.nature.com/nrd/journal/v2/n5/fig\\_tab/nrd1084\\_F5.html](http://www.nature.com/nrd/journal/v2/n5/fig_tab/nrd1084_F5.html)

## «Tissue Factor» nelle microparticelle

- Il “tissue factor” presente nel sangue, associato a **microparticelle** (MPs) [**ectosomi**] derivate da cellule emopoietiche, **contribuisce alla propagazione dei trombi nel sistema microvascolare**.
- Queste MVs sono prodotte dalla vescicolazione della membrana cellulare di cellule endoteliali e di cellule del sangue circolanti (**piastrine, monociti, eritrociti**).
- Queste MPs sono arricchite di **fosfatidilserina** nel foglietto esterno e possono quindi sostenere la via della coagulazione indotta del “**Tissue Factor**”, che richiede una superficie di tale fosfolipide.
- Anche le **cellule muscolari lisce** possono produrre tali MVs.

Daubie V, Pochet R, Houard S, Philippart P. **Tissue factor: a mini-review**. J Tissue Eng Regen Med. 2007 May-Jun;1(3):161-9.



## Ciclo vitale degli ectosomi (didascalia - 1)

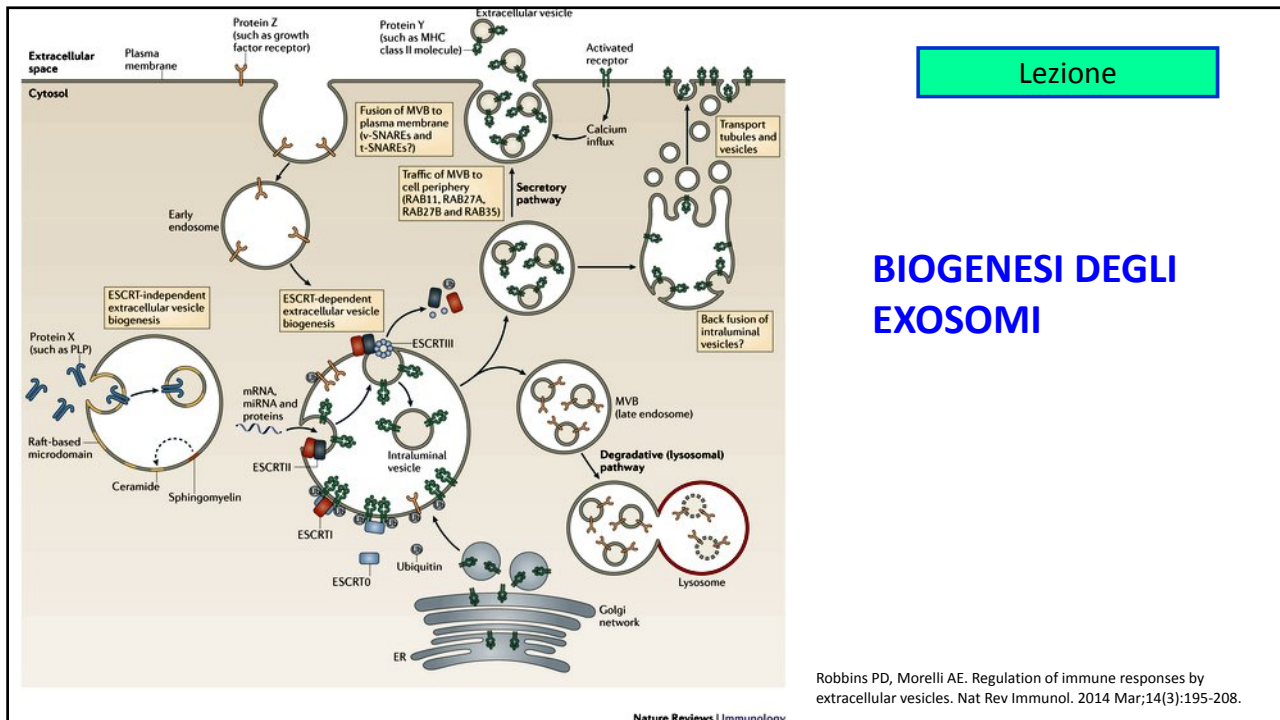
- ✚ La genesi degli ectosomi richiede la **segregazione di domini di membrana con associati pacchetti di proteine e di RNAs**.
- ✚ Dopo il loro rilascio gli ectosomi possono:
  - A. **Diffondere nello spazio extracellulare** dove possono rilasciare i loro contenuti (le molecole rilasciate possono interagire con recettori/enzimi nelle cellule circostanti e **digerire la matrice extracellulare**;
  - B. Essere **endocitati** dalle cellule, finendo nei lisosomi o rilasciando i loro contenuti nel citoplasma;
  - C. **Fondersi con una cellula bersaglio**, con la successiva incorporazione della loro membrana e rilascio delle proteine/RNAs segregati nel citosol.

Cocucci E, Meldolesi J. Ectosomes. Curr Biol. 2011 Dec 6;21(23):R940-1.

## Ciclo vitale degli ectosomi (didascalia - 2)

- ✚ Questi processi possono portare ad alterazioni nel fenotipo delle cellule bersaglio, con generazione di nuove vescicole che stabiliscono un **trasferimento orizzontale delle loro proteine/RNAs alle cellule vicine (D)**.
- ✚ Questo trasferimento può giocare un ruolo critico in funzioni importanti quali la proliferazione.

Cocucci E, Meldolesi J. Ectosomes. Curr Biol. 2011 Dec 6;21(23):R940-1.



Lezione

## BIOGENESI DEGLI EXOSOMI

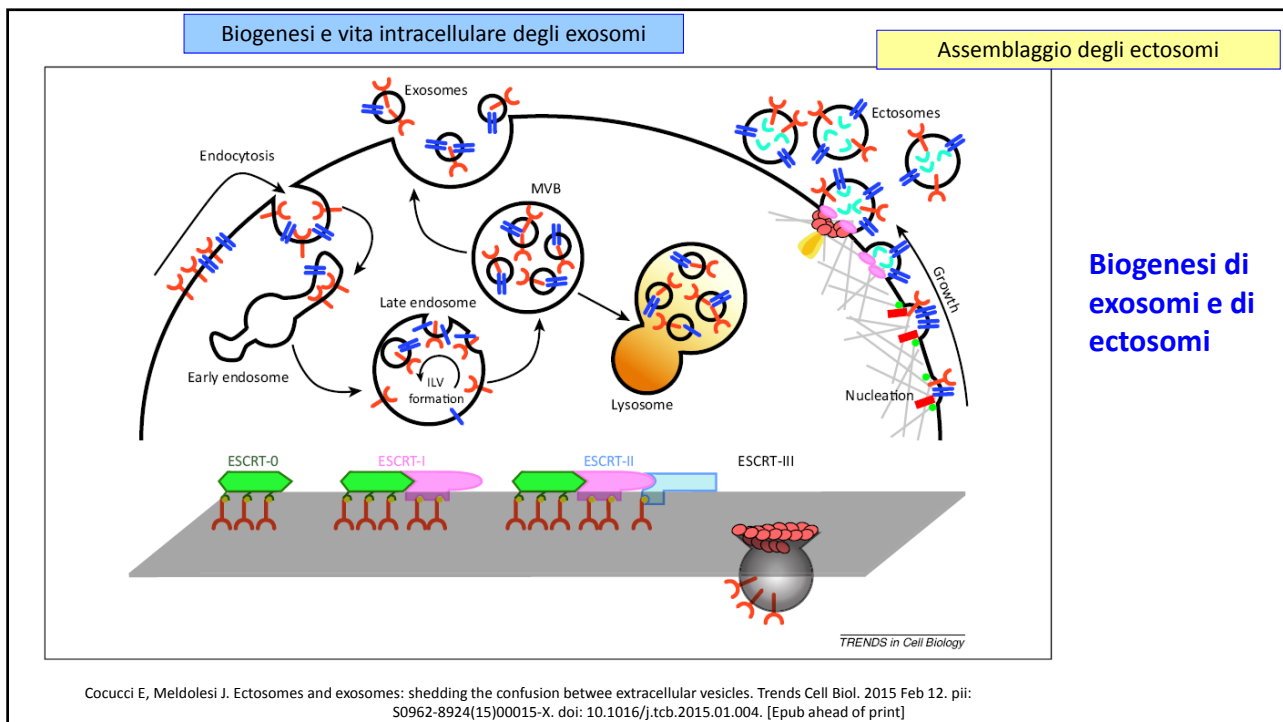
### Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles

Emanuele Cocucci<sup>1,2</sup> and Jacopo Meldolesi<sup>1</sup>

Harvard Medical School,  
San Raffaele Scientific Institute, 20132 Milan, Italy

**Long- and short-distance communication** can take multiple forms. Among them are **exosomes** and **ectosomes**, **extracellular vesicles (EVs) released from the cell to deliver signals to target cells**. While most of our understanding of how these vesicles are assembled and work comes from mechanistic studies performed on exosomes, recent studies have begun to shift their focus to ectosomes. **Unlike exosomes, which are released on the exocytosis of multivesicular bodies (MVBs), ectosomes are ubiquitous vesicles assembled at and released from the plasma membrane**. Here we review the **similarities and differences** between these two classes of vesicle, suggesting that, **despite their considerable differences, the functions of ectosomes may be largely analogous to those of exosomes**. Both vesicles appear to be promising targets in the diagnosis and therapy of diseases, especially cancer.

Trends in Cell Biology xx (2015) 1–9



## Didascalia figura Genesi di exosomi ed ectosomi - 1

- ✚ **La biogenesi e la vita intracellulare degli exosomi** è illustrata a sinistra. Proteine transmembrane (rosso) vengono endocitate e fatte transitare fino agli endosomi precoci. Una volta smistate agli endosomi tardivi, il complesso di smistamento endosomiale richiesto per il trasporto (ESCRT)-0 recluta proteine ubiquitinate mentre i complessi ESCRT-I e -II mediano la gemmazione delle vescicole intraluminari (ILVs).
- ✚ Il corpo multivescicolare (MVB) può seguire una **via di degradazione** mediante fusione con lisosomi (arancione) oppure **procedere al rilascio delle ILVs sotto forma di exosomi nello spazio extracellulare mediante esocitosi**.
- ✚ In basso è illustrato un riassunto del ciclo delle ESCRT ottenuto da studi su exosomi.

## Didascalia figura Genesi di esosomi ed ectosomi - 2

- ✚ Alla destra è illustrato **l'assemblaggio degli ectosomi**. Durante la fase di nucleazione sulla membrana plasmatica, **proteine transmembrana** (blu) **si associano in domini discreti di membrana** che promuovono la gemmazione verso l'esterno.
- ✚ Tetraspanine e altre proteine abbondanti in quei domini possono giocare un ruolo promuovendo lo smistamento di altri componenti.
- ✚ **Ancore lipidiche** (miristoilazione, palmitoilazione; SATURE) di proteine (verde) **accumulano proteine nel lume** e inoltre contribuiscono alla curvatura della membrana.
- ✚ Meccanismi aggiuntivi di formazione degli ectosomi includono le **scramblasi attivate dal Ca<sup>2+</sup>** (rettangoli rossi) che permettono una distribuzione casuale di lipidi fra i due foglietti della membrana plasmatica.

Cocucci E, Meldolesi J. Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles. Trends Cell Biol. 2015 Feb 12. pii: S0962-8924(15)00015-X. doi: 10.1016/j.tcb.2015.01.004. [Epub ahead of print]

## Didascalia figura Genesi di esosomi ed ectosomi - 3

- ✚ Il citoscheletro (grigio chiaro) si dirada, mentre **proteine citosoliche** e molecole di **RNA** (blu aquamarina) sono smistate negli ectosomi.
- ✚ Il reclutamento di SG101 (un componente del complesso ESCRT-1) media la mobilizzazione verso la membrana plasmatica di ESCRT-III (subunità colore salmone) che promuove l'assemblaggio di una spirale.
- ✚ L'ATPasi specifica VPS4 (arancione) media il disassemblaggio della spirale tirando sulla sua estremità.

Cocucci E, Meldolesi J. Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles. Trends Cell Biol. 2015 Feb 12. pii: S0962-8924(15)00015-X. doi: 10.1016/j.tcb.2015.01.004. [Epub ahead of print]

**Biogenesi e rilascio di exosomi dai corpi multivescicolari (MVBs).**

Gli **endosomi** derivano dall'**invaginazione** verso l'interno della **membrana plasmatica** ed hanno una membrana plasmatica invertita.

Nel momento della formazione degli **exosomi**, la **membrana degli endosomi si invagina di nuovo verso il suo lume**, formando exosomi con lo stesso orientamento di membrane che si trova nella membrana plasmatica.

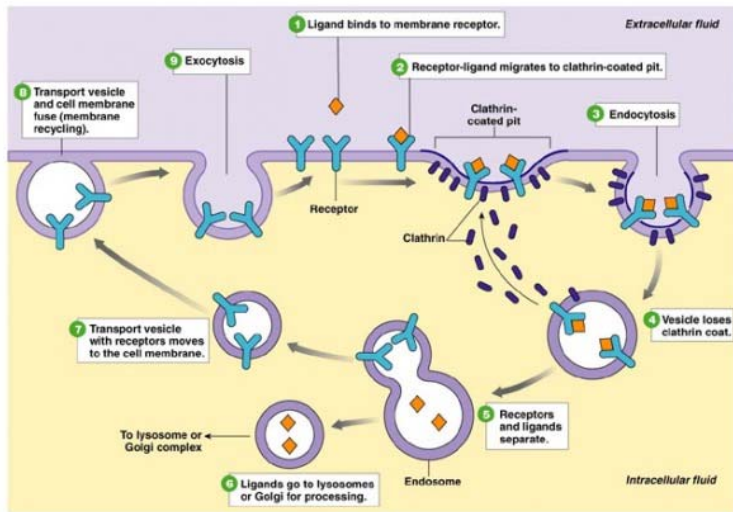
Le membrane esterna ed interna sono illustrate in verde e rosso rispettivamente.

Sahoo S, Losordo DW. **Exosomes and cardiac repair after myocardial infarction.** Circ Res. 2014 Jan 17;114(2):333-44. <http://circresearch.com/gallery/tag/exosomes/>

### Endocitosi mediata da recettori (Descrizioni classiche – 1)

**Ripasso argomenti triennale**

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21639/figure/A4869/>



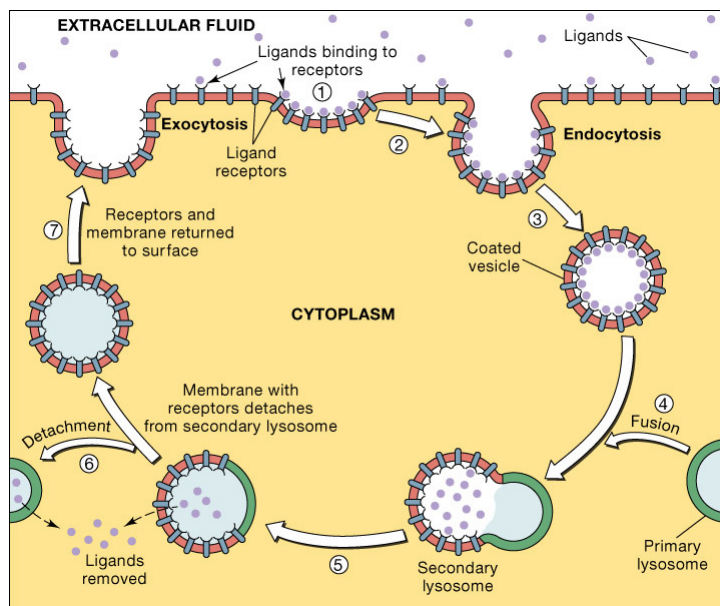
Copyright © 2007 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Fig. 5-24

## Endocitosi mediata da recettori (Descrizioni classiche – 2)

**L'endocitosi mediata da recettori** (RME), nota anche come endocitosi mediata dalla clatrina, è un processo tramite il quale le cellule internalizzano molecole mediante l'invaginazione verso l'interno di vescicole della membrana plasmatica contenenti proteine con siti recettori specifici per le molecole che sono internalizzate.

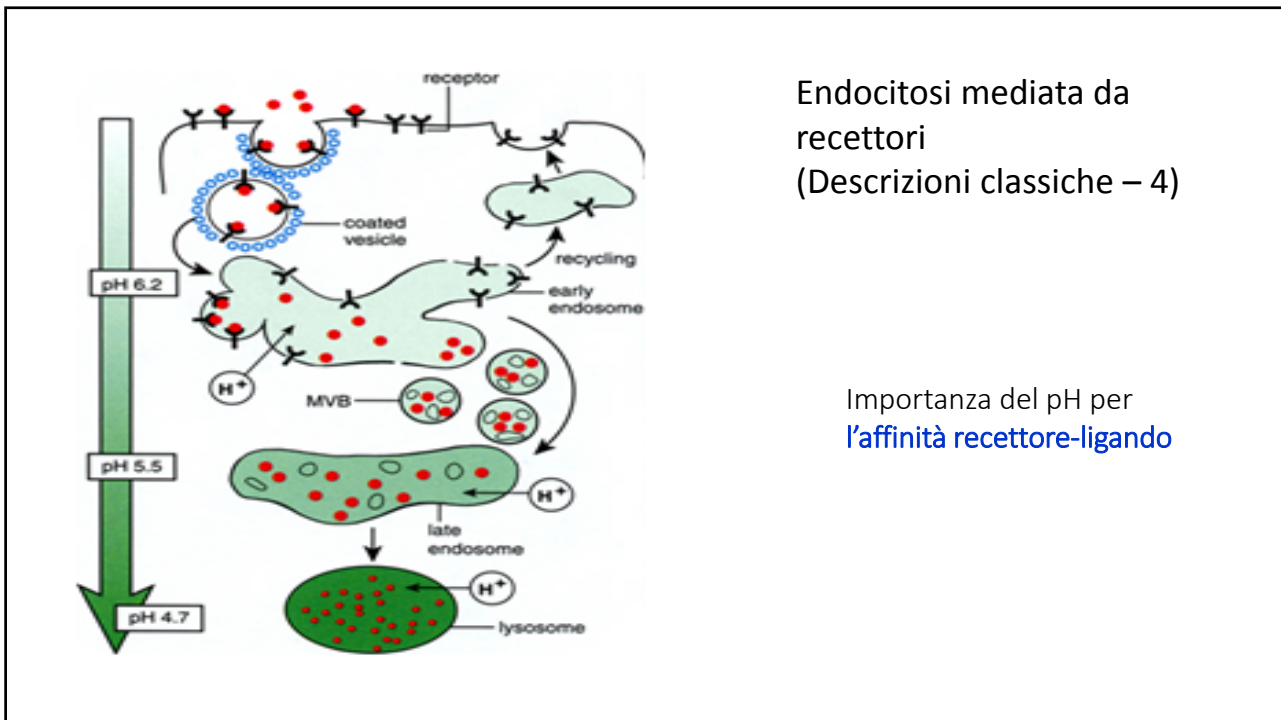
<http://virusabc.weebly.com/part-i.html>



<http://droualb.faculty.mjc.edu/Lecture%20Notes/Unit%201/Cytology%20with%20figures.htm>

## Endocitosi mediata da recettori (Descrizioni classiche – 3)





## Genesi degli exosomi - 1

- ✚ Gli exosomi sono una popolazione eterogenea di vescicole che hanno dimensioni ridotte (da 30 a 120 nm ) e la loro biogenesi è per la maggior parte sconosciuta.
- ✚ Non è stato identificato un segnale di smistamento comune a tutti i tipi cellulari e l'esocitosi degli exosomi è regolata da vie cellulari distinte in tipi cellulari diversi .
- ✚ Si ritiene che il rilascio costitutivo degli exosomi sia scatenato da meccanismi indipendenti dal  $\text{Ca}^{2+}$ , mentre il **rilascio che consegue a una stimolazione (esocitosi regolata) è regolato dal  $\text{Ca}^{2+}$** . [da controllare]

## Genesi degli exosomi - 2

- ✚ Gli **exosomi** hanno origine nel **compartimento endosomiale**. Dopo formazione degli **endosomi precoci** intracellulari, in seguito all'invaginazione verso l'interno della membrana cellulare sotto il controllo del complesso di smistamento richiesto per il trasporto ("endosomal sorting complex required for transport") (ESCRT), vi è un'evoluzione verso gli **endosomi tardivi («corpi multivescicolari»)** che possono essere rilasciati dalla cellula mediante fusione con la membrana cellulare.
- ✚ Nonostante non ci siano dimostrazioni chiare sul coinvolgimento degli ESCRT nella composizione molecolare degli exosomi, alcune componenti degli ESCRT quali Alix, nota per essere richiesta per lo smistamento del recettore per la transferrina, sono evidenziabili negli exosomi.
- ✚ E' stato inoltre dimostrato il coinvolgimento di piccole GTPasi, RAB27a e RAB27b nel rilascio di exosomi da cellule tumorali umane.

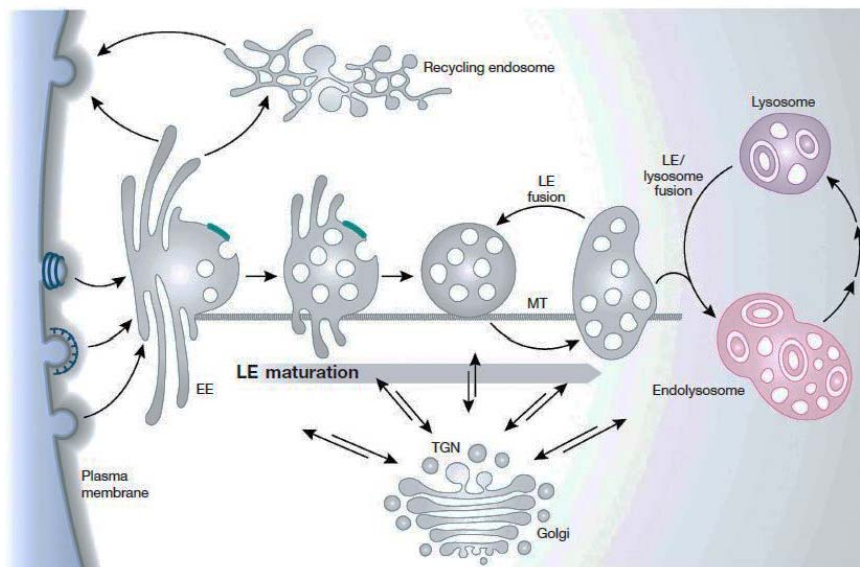
## Genesi degli exosomi - 3

- ✚ Altri studi indicano il coinvolgimento del **ceramide** che promuove l'invaginazione di membrana nel meccanismo di rilascio degli exosomi. Rispetto al rilascio delle MVs [ectosomi], **gli exosomi contengono un insieme diverso di molecole** quali ad es. Alix, TSG101, HSC70, CD63, CD81 e CD9.
- ✚ Inoltre, la composizione lipidica degli exosomi, che hanno un basso contenuto in fosfatidilserina, differisce da quella delle MVs esfoliate (ectosomi), mentre sono presenti degli acidi nucleici in entrambi i tipi di MVs.
- ✚ I fluidi biologici, insieme alle MV rilasciate in vitro dalle cellule, contengono una **miscela di exosomi e di ectosomi**.

Lezione

## Ruolo dei corpi multivescicolari nella formazione di exosomi

### Il sistema endosomi/lisosomi



**EE:** Early endosomes (endosomi precoci)

**LE:** Late endosomes (endosomi tardivi)

**TGN:** Trans Golgi network

**ATTENZIONE:** sono illustrati solo i corpi multivescicolari che si fonderanno con i lisosomi; altri invece verranno esocitati e le loro vescicole interne diventeranno **EXOSOMI**

Huotari J, Helenius A. Endosome maturation. EMBO J. 2011 Aug 31;30(17):3481-500.

## Didascalia figura Huotari & Helenius (Sistema Endosomi/Lisosomi) - 1

- ✚ Le vescicole endocitiche primarie consegnano il loro contenuto e le loro membrane agli **endosomi precoci** («Early Endosomes», EEs) nel citoplasma periferico.
- ✚ Dopo un periodo di circa 8-15 min durante il quale gli EEs accumulano carico e sostengono il riciclo della membrana plasmatica (direttamente o mediante endosomi di riciclaggio situati nella regione perinucleare), ha luogo la **conversione di endosomi precoci in endosomi tardivi** («Late endosomes», LEs).
- ✚ Perciò, mentre gli endosomi si muovono verso lo spazio perinucleare lungo i microtubuli (MT), si formano gli endosomi tardivi (LE) nascenti che ereditano i domini vacuolari della rete degli EEs.
- ✚ Gli LEs trasportano un **sotto-insieme selezionato di carico endocitato dagli EEs**, che combinano strada facendo con idrolasi lisosomiali di nuova sintesi e componenti membranose provenienti dalla via di secrezione.

Huotari J, Helenius A. **Endosome maturation**. EMBO J. 2011 Aug 31;30(17):3481-500.

## Didascalia figura Huotari & Helenius (Sistema Endosomi/Lisosomi) - 2

- ✚ Gli endosomi tardivi (LE) subiscono reazioni di **fusione omotipica**, crescono di dimensione, e formano **corpi multivescicolari con un numero crescente di** vescicole intraluminari eterogenee (**ILVs**).
- ✚ Il ruolo «alimentatore» (feeder) degli endosomi tardivi è quello di consegnare questa miscela di componenti endocitici e secretori ai lisosomi.
- ✚ Per essere in grado di farlo, essi continuano a subire un processo di maturazione che li prepara ad incontrare i lisosomi.
- ✚ La fusione di un endosoma con un lisosoma genera un organello ibrido transitorio, l'**endolisosoma**, in cui ha luogo attiva degradazione. Quello che segue è un ulteriore processo di maturazione; l'endolisosoma si converte nel classico lisosoma denso, che costituisce un organello di accumulo per le idrolasi lisosomiali e componenti di membrana.

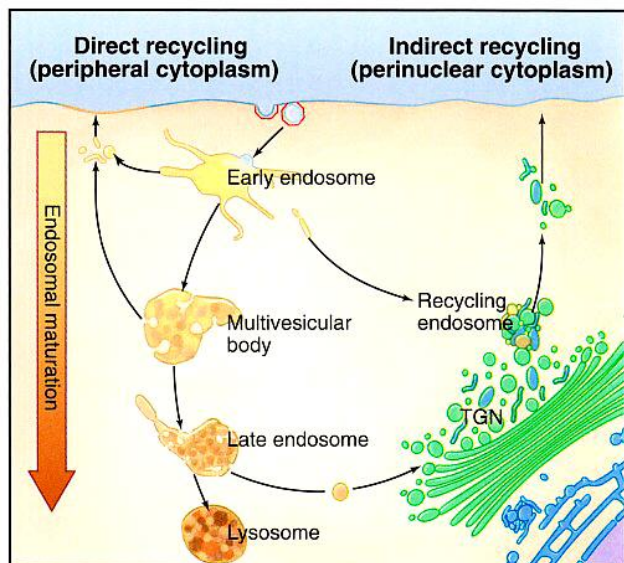
Huotari J, Helenius A. **Endosome maturation**. EMBO J. 2011 Aug 31;30(17):3481-500.

## Seminario

Endocitosi

## Formazione di corpi multivescicolari

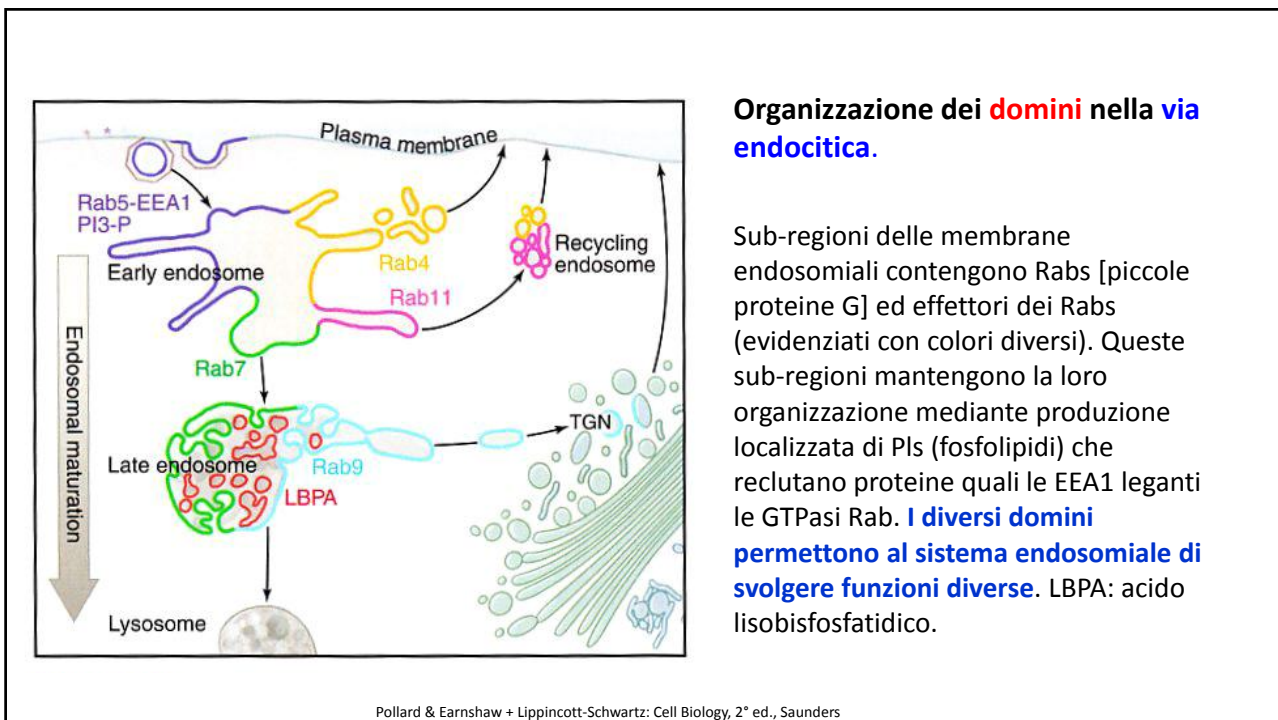
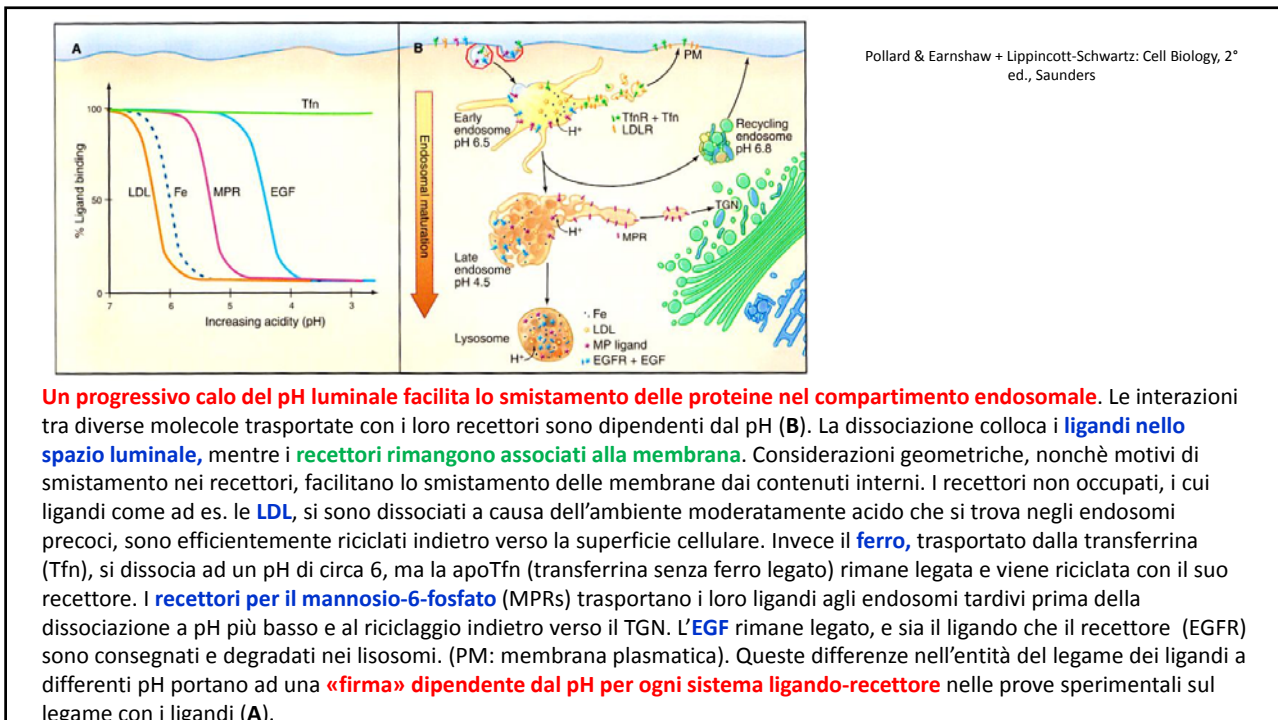
### Endocitosi: descrizione più moderna già con indicazione dei corpi multivescicolari

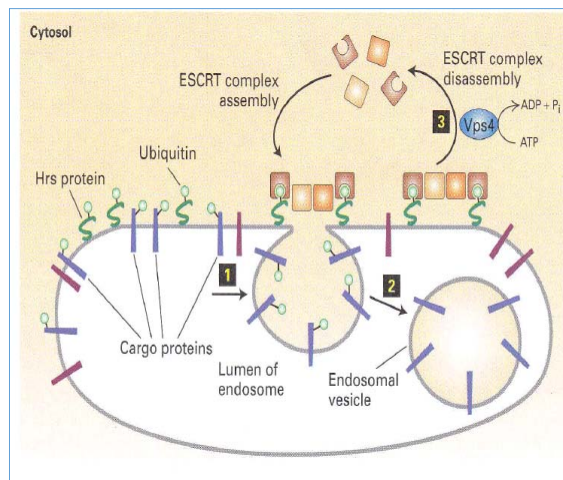


Pollard &amp; Earnshaw + Lippincott-Schwartz: Cell Biology, 2° ed., Saunders, 2007

### Traffico di membrane lungo la via endocitica

- ✦ I carichi e le membrane, catturati mediante endocitosi mediata da clatrina, sono consegnati agli **endosomi precoci tubulo-vescicolari**, che sono **moderatamente acidi**.
- ✦ La maggior parte delle **membrane**, insieme ai **recettori**, viene **riciclata**, sia mediante una via rapida, diretta, che mediante una via indiretta, più lenta, attraverso endosomi di riciclaggio perinucleari.
- ✦ I **ligandi rilasciati dai loro recettori nell'ambiente a basso pH si accumulano nella porzione vescicolare degli endosomi precoci**.
- ✦ Durante la **maturazione degli endosomi**, che coinvolge: (a) accumulo di membrane interne; (b) riciclaggio continuo dei recettori fino alla membrana plasmatica e al trans Golgi network (TGN); (c) consegna di idrolasi di nuova sintesi provenienti dal TGN; (d) acquisizione del macchinario per l'indirizzamento e la fusione, gli **endosomi tardivi** si preparano per la fusione con i lisosomi.

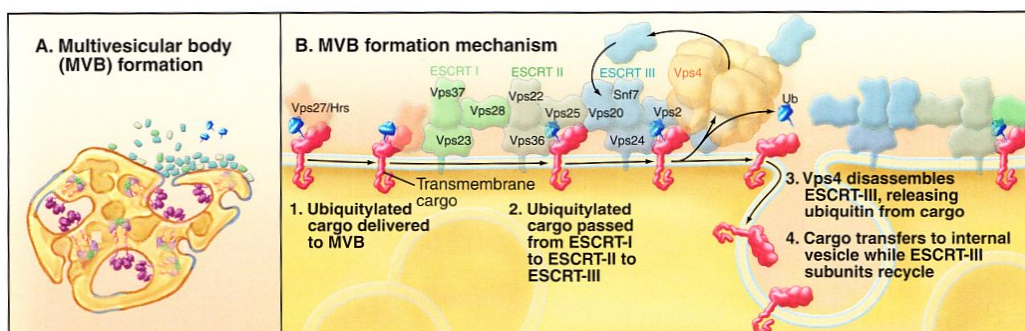




### Modello dei meccanismi per la formazione degli endosomi multivescicolari

- ✦ Nel processo di **gemmazione negli endosomi**, l'**ubiquitinazione della Hrs sulla membrana endosomiale indirizza il carico di specifiche proteine da trasportare (blu) verso le gemme delle vescicole**, e quindi **recluta proteine citosoliche ESCRT verso la membrana**: passo **1**. Notare che sia le Hrs che le proteine da caricare reclutate sono marcate con ubiquitina.
- ✦ Dopo che l'insieme di complessi ESCRT media il completamento e il distacco delle vescicole verso l'interno (passo **2**), esse sono disassemblate dalla ATPasi Vps4 e ritornano al citosol: passo **3**.

Lodish et al., 7<sup>a</sup> ed. 2013



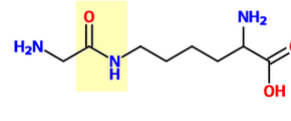
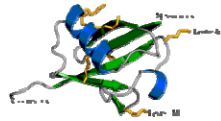
**A: Smistamento delle proteine nei corpi multivescicolari.** L'**ubiquitinazione delle proteine cargo** delle membrane internalizzate provoca la loro **internalizzazione** in domini della membrana endosomiale contenenti Hrs e clatrina. Mediante l'azione di ESCRT-I, -II e III, le proteine di membrana vengono **smistate nelle vescicole intraluminali** e indirizzate mediante i corpi multivescicolari (MVBs) per la degradazione nei lisosomi.

**B: Complessi proteici coinvolti nello smistamento e formazione dei MVBs.** E' coinvolto un gruppo di almeno sette proteine: Il lipide PI(3)P media la localizzazione di Hrs/Vps27 e le sue proteine associate, Eps15, STAM, e clatrina verso le membrane endosomali. Il recettore ubiquinato viene consegnato ad ESCRT-I mediante un'interazione fra Hrs e la subunità VPS23 di ESCRT-I. Il recettore viene allora trasmesso a ESCRT-II e in seguito a ESCRT-III. L'invaginazione di una vescicola intraluminale contenente il recettore è mediata dalla polimerizzazione di complessi ESCRT-III, che sono piccole proteine «coiled-coil» con elevata carica. Una ATPasi, omomultimerica Vps-4, disassembla le subunità multimeriche ESCRTs, permettendo ad esse di essere riutilizzate.

Pollard & Earnshaw + Lippincott-Schwartz: Cell Biology, 2<sup>a</sup> ed., Saunders

Seminario

## Ubiquitinazione

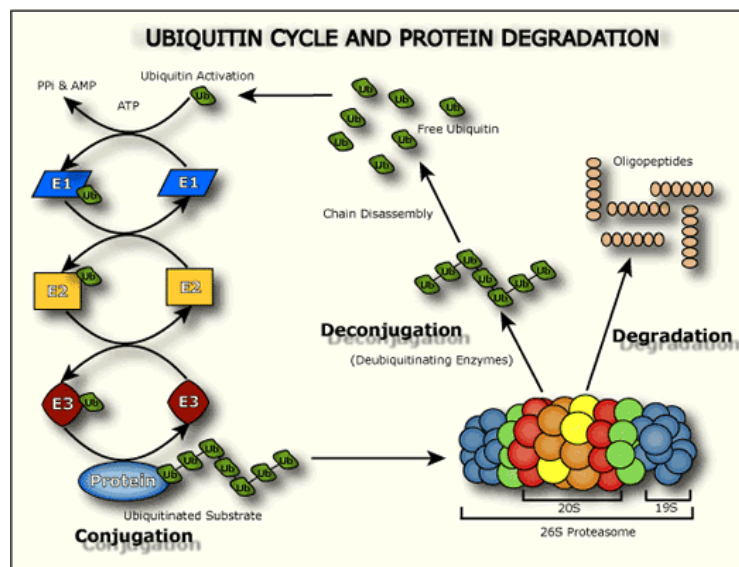


Glicina e lisina collegate da **legame isopeptidico** (evidenziato in giallo).

- L'ubiquitina è una piccola proteina regolatoria (8.5 kDa) presente in quasi tutti i tessuti (ubiquitariamente) degli organismi eucariotici.
- L'ubiquitinazione è una modificazione post-traduzionale in cui l'ubiquitina viene collegata ad una proteina substrato.
- L'aggiunta dell'ubiquitina può influenzare le proteine in diversi modi:
  - Può segnalarle per la degradazione mediante il proteasoma
  - Può alterare la loro attività
  - Può promuovere o impedire le interazioni tra proteine.
- L'ubiquitinazione viene svolta in tre passi principali: attivazione, coniugazione e collegamento ("ligation") svolta da enzimi di attivazione dell'ubiquitina (E1s), enzimi di coniugazione con l'ubiquitina (E2s) e "ubiquitin ligases" (E3s).
- Il risultato di questa cascata sequenziale collega l'ubiquitina a residui di lisina di un substrato proteico mediante un legame isopeptidico o ad un gruppo aminico del N-terminale di una proteina mediante un legame peptidico.

<http://en.wikipedia.org/wiki/Ubiquitin>

Seminario



[http://www.biomol.de/images\\_lp/UPP\\_525.gif](http://www.biomol.de/images_lp/UPP_525.gif)



## Variety of ubiquitin modifications

Ubiquitination affects cellular process by regulating the degradation of proteins (via the proteasome and lysosome), coordinating the cellular localisation of proteins, activating and inactivating proteins, and modulating protein-protein interactions.<sup>[4][5][6]</sup> These effects are mediated by different types of substrate ubiquitination, for example the addition of a single ubiquitin molecule (monoubiquitination) or different types of ubiquitin chains (polyubiquitination).<sup>[31]</sup>

Monoubiquitination is the addition of one ubiquitin molecule to one substrate protein residue. Multi-monoubiquitination is the addition of one ubiquitin molecule to multiple substrate residues. The monoubiquitination of a protein can have different effects to the polyubiquitination of the same protein. The addition of a single ubiquitin molecule is thought to be required prior to the formation of polyubiquitin chains.<sup>[31]</sup> Monoubiquitination affects cellular processes such as membrane trafficking, endocytosis and viral budding.<sup>[9][32]</sup>

Polyubiquitination is the formation of a ubiquitin chain on a single lysine residue on the substrate protein. Following addition of a single ubiquitin moiety to a protein substrate, further ubiquitin molecules can be added to the first, yielding a polyubiquitin chain.<sup>[31]</sup> These chains are made by linking the glycine residue of a ubiquitin molecule to a lysine of ubiquitin bound to a substrate. Ubiquitin has seven lysine residues and an N-terminus that may serve as points of ubiquitination; they

<http://en.wikipedia.org/wiki/Ubiquitin>

### 6.2 Polyubiquitin chains

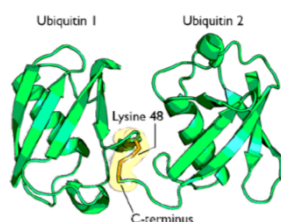


Diagram of lysine 48-linked diubiquitin. The linkage between the two ubiquitin chains is shown in orange.

Lysine 48-linked polyubiquitin chains target proteins for destruction, by a process known as proteolysis. At least

<http://en.wikipedia.org/wiki/Ubiquitin>

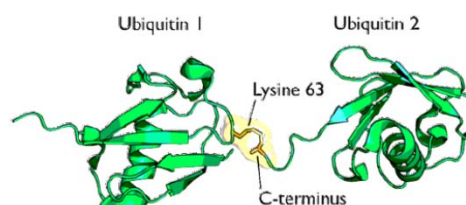


Diagram of lysine 63-linked diubiquitin. The linkage between the two ubiquitin chains is shown in orange.

Lysine 63-linked chains are not associated with proteasomal degradation of the substrate protein. Instead, they allow the coordination of other processes such as endocytic trafficking, inflammation, translation, and DNA repair.<sup>[9]</sup> In cells, lysine 63-linked chains are bound by the ESCRT-0 complex, which prevents their binding to the proteasome. This complex contains two proteins, Hrs and STAM1, that contain a UIM, which allows it to bind to lysine 63-linked chains.<sup>[38][39]</sup>

Lezione

## Espressione molecolare differenziale - 1

### ECTOSOMI:

- ✚ Alte concentrazioni di **colesterolo** e **fosfatidilserina**, e di **molecole** solitamente note per essere **incorporate nei «rafts lipidici»** (flotillina-1, ecc.)
- ✚ La loro composizione molecolare è altamente eterogenea e dipende dalla cellula di origine.
- ✚ Cellule tumorali e neutrofili producono vescicole arricchite di enzimi proteolitici e metalloproteasi per degradare la matrice extracellulare.
- ✚ Le piastrine generano vescicole che trasportano molecole critiche per la coagulazione: P- selettina, integrine e glicoproteine GPIb e GPIIIa.

Tetta C., Ghigo E., Silengo L., Deregibus M.C., Camussi G.: *Extracellular vesicles as an emerging mechanism of cell-to-cell communication*, Endocrine 44: 11-19, 2013.

Lezione

## Espressione molecolare differenziale - 2

### EXOSOMI:

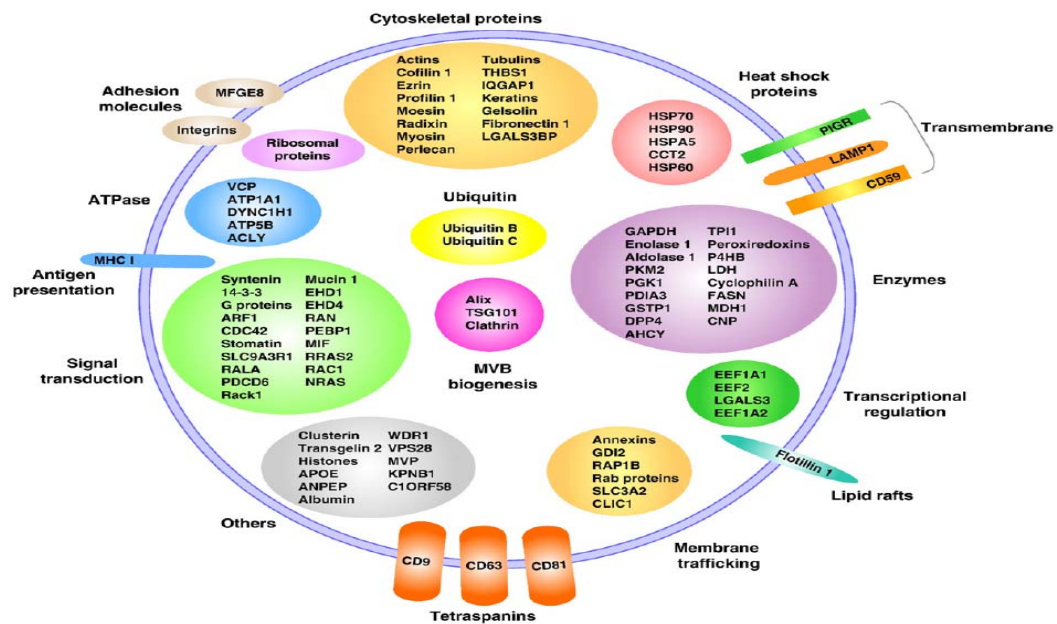
- ✚ Viceversa, gli exosomi espongono in superficie molecole come Alix, Tsg101, Hsc70, CD63, CD81 e CD9, che si ritengono essere caratteristiche degli exosomi.
- ✚ Basse concentrazioni di fosfatidilserina.

Tetta C., Ghigo E., Silengo L., Deregibus M.C., Camussi G.: *Extracellular vesicles as an emerging mechanism of cell-to-cell communication*, Endocrine 44: 11-19, 2013.

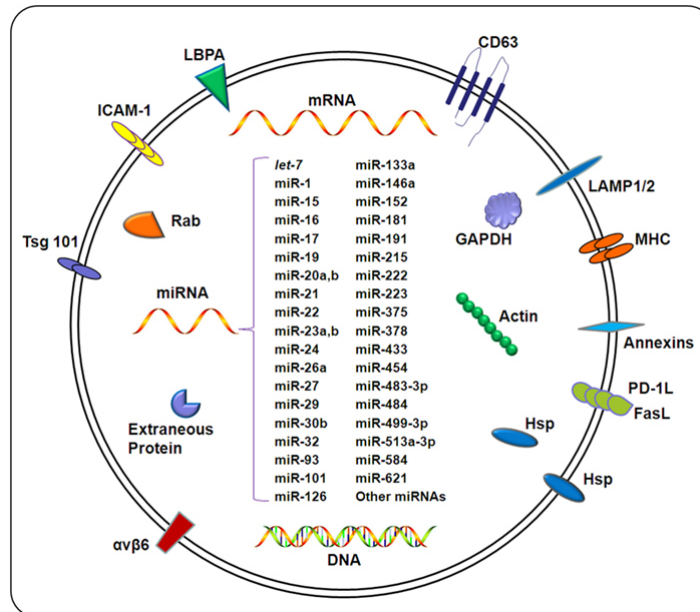
Table 1 | Physicochemical characteristics of different types of secreted vesicle

Feature*	Exosomes	Microvesicles	Ectosomes	Membrane particles	Exosome-like vesicles	Apoptotic vesicles
Size	50–100 nm	100–1,000 nm	50–200 nm	50–80 nm	20–50 nm	50–500 nm
Density in sucrose	1.13–1.19 g/ml	ND	ND	1.04–1.07 g/ml	1.1 g/ml	1.16–1.28 g/ml
Appearance by electron microscopy <sup>†</sup>	Cup shape	Irregular shape and electron-dense	Bilamellar round structures	Round	Irregular shape	Heterogeneous
Sedimentation	100,000 g	10,000 g	160,000–200,000 g	100,000–200,000 g	175,000 g	1,200g, 10,000 g or 100,000 g
Lipid composition	Enriched in cholesterol, sphingomyelin and ceramide; contain lipid rafts; expose phosphatidylserine	Expose phosphatidylserine	Enriched in cholesterol and diacylglycerol; expose phosphatidylserine	ND	Do not contain lipid rafts	ND
Main protein markers	Tetraspanins (CD63, CD9), Alix and TSG101	Integrins, selectins and CD40 ligand	CR1 and proteolytic enzymes; no CD63	CD133; no CD63	TNFR1	Histones
Intracellular origin	Internal compartments (endosomes)	Plasma membrane	Plasma membrane	Plasma membrane	Internal compartments?	ND

Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2009 Aug;9(8):581-93.



Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics.* 2010 Sep 10;73(10):1907-20.



Hu G, Drescher KM, Chen XM. Exosomal miRNAs: Biological Properties and Therapeutic Potential. *Front Genet.* **2012** Apr 20;3:56.

### Box 1 | Proposed markers of extracellular vesicles\*

#### Exosomes

Alix, CD9, CD63, CD81, heat shock proteins, TSG101

#### Microvesicles

Phosphatidylserine (detected using annexin V or lactadherin)

#### Cell type marker

- Leukocyte: CD45, CD11a, CD11b
- Granulocyte: CD66b
- Monocyte: CD14
- Lymphocyte: CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells, CD20 (B cell)
- Platelet: CD41a, CD42a, CD42b, CD31<sup>+</sup>/CD42<sup>+</sup>, CD61, CD62b, CD62p
- Erythrocyte: CD235a
- Endothelial cell: CD31<sup>+</sup>/CD41<sup>-</sup>, CD62e, CD51, CD105, CD144, CD146

#### Apoptotic bodies

Phosphatidylserine and/or DNA (detected using annexin V or propidium iodide), histones, DNA

\*These markers are largely used and the best identified so far, although none of them can be considered as 100% specific.  
Abbreviation: TSG, tumour susceptibility gene.

Lemoine S, Thabut D, Housset C, Moreau R, Valla D, Boulanger CM, Rautou PE. The emerging roles of microvesicles in liver diseases. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* **2014** Jun;11(6):350-61.