

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** («Endosomal Sorting Complex Required for Transport»): 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 nel **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 di altri organelli con la membrana plasmatica, mediate 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'organelle nello spazio extracellulare.

Cocucci E, Meldolesi J. Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles. Trends Cell Biol. 2015 Jun;25(6):364-72.

Vescicole extracellulari: Glossario - 2

- ✚ **Exosoma**: vescicola extracellulare rilasciata mediante esocitosi 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 intraluminali (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 Jun;25(6):364-72.

Vescicole extracellulari: Glossario - 3

- ✚ **Fagocitosi**: processo mediante il quale le cellule inghiottano 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.

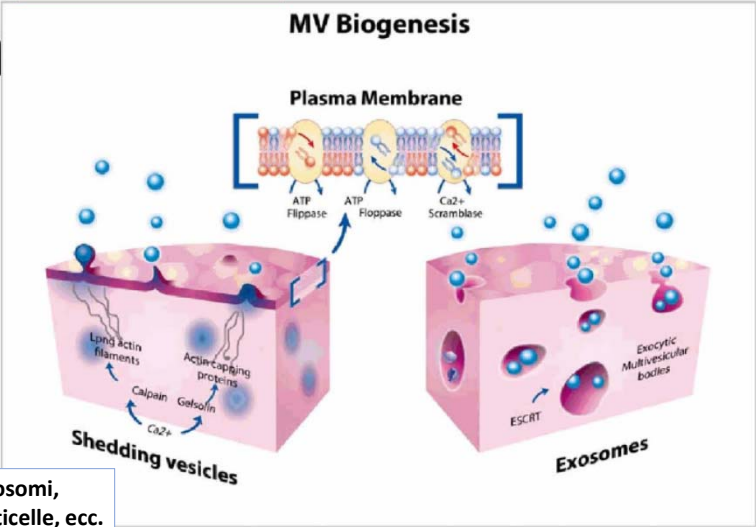
(NSF: "N-ethylmaleimide Sensitive Fusion Protein" è una AAA-ATPasi omoesamERICA coinvolta nei processi di fusione di membrane).

Cocucci E, Meldolesi J. Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles. Trends Cell Biol. 2015 Jun;25(6):364-72.



Prof. Giovanni Camussi,
Università di Torino

MV Biogenesis



The diagram illustrates the biogenesis of microvesicles (MV). It shows the plasma membrane with various transporters: ATP Flippase, ATP Floppase, and Ca²⁺ Scramblase. On the left, Shedding vesicles are formed from the plasma membrane, containing long actin filaments, actin-capping proteins, calpain, and gelsolin. On the right, Exosomes are formed from endocytic multivesicular bodies, containing ESCRT proteins.

Alias: Ectosomi, microparticelle, ecc.

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

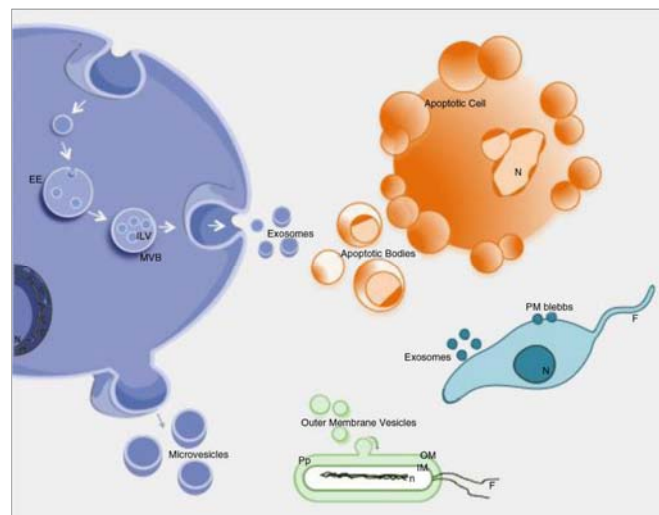
Rappresentazione schematica della biogenesi delle vescicole esfoliate e degli exosomi

[didascalia Fig. Camussi et al., 2013, **corretta**]

- Le **vescicole esfoliate** originano dalla vescicolazione della membrana cellulare, associata ad alterazioni dell'assimetria di membrana. L'aumento di concentrazione di Calcio in seguito all'attivazione cellulare porta a : (i) **inattivazione** dell'aminofosfolipidi traslocasi (**flippasi**) ATP-dipendente, con conseguente **traslocazione della fosfatidilserina (PS) al foglietto esterno del doppio strato della membrana** plasmatica; (ii) **attivazione della floppasi**, un enzima ATP-dipendente che catalizza il trasferimento lipidico dal foglietto interno della membrana cellulare al foglietto esterno, probabilmente in congiunzione con la flippase; (iii) **attivazione della scramblasi** che catalizza il movimento bidirezionale dei fosfolipidi avanti e indietro fra i due foglietti della membrana cellulare con collasso dell'asimmetria dei fosfolipidi nella membrana cellulare; (iv) **attivazione della calpaina** che scinde i lunghi filamenti di actina del citoscheletro e **attivazione della gelsolina** nelle piastrine che scinde le proteine di incappucciamento dell'actina permettendo una riorganizzazione e rottura del citoscheletro, che porta alla gemmazione della membrana.
- Gli **exosomi** derivano dal compartimento endosomiale. Dagli endosomi precoci intracellulari evolvono in corpi multivescicolari, probabilmente sotto il controllo del "endosomal sorting complex required for transport; ESCRT" e possono in seguito essere rilasciati nello spazio extracellulare dopo fusione con la membrana cellulare.

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

Biogenesi e rilascio di microvescicole



Yáñez-Mó M. **Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions**. J Extracell Vesicles. 2015 May 14;4:27066. doi: 10.3402/jev.v4.27066. eCollection 2015.

Didascalia Fig. 1 Yanez-Mo

- ✚ In grandi linee, le vescicole extracellulari possono essere classificate in 3 classi principali:
- (a) Microvescicole/microparticelle/**ectosomi**, che sono prodotte mediante la gemmazione e fissione della membrana plasmatica;
 - (b) **Exosomi** che si formano all'interno della rete endosomale e sono rilasciati mediante fusione di corpi multivescicolari con la membrana plasmatica;
 - (c) **Corpi apoptotici** rilasciati come "bolle" dalle cellule in apoptosi.
- ✚ Anche gli organismi inferiori, quali batteri e parassiti, sono in grado di secernere EVs. Le "Outer membrane vesicles; OVM" sono formate dalla sporgenza della membrana esterna dei batteri Gram-negativi.
- EE: "early endosome" (endosoma precoce); MVB: "multi-vesicular body"; **ILV**: "intraluminal vesicles" (vescicole intraluminari dei MVBs); **N**: Nucleo; **OM**: "outer membrane" (membrana esterna); **Pp**: periplasma; **IM**: "inner membrane" (membrana interna); **n**: nucleotide; **F**: flagella.

Yáñez-Mó M. *Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions*. J Extracell Vesicles. 2015 May 14;4:27066. doi: 10.3402/jev.v4.27066. eCollection 2015.

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 rimanenze nucleari.

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

Biogenesi delle microvescicole

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

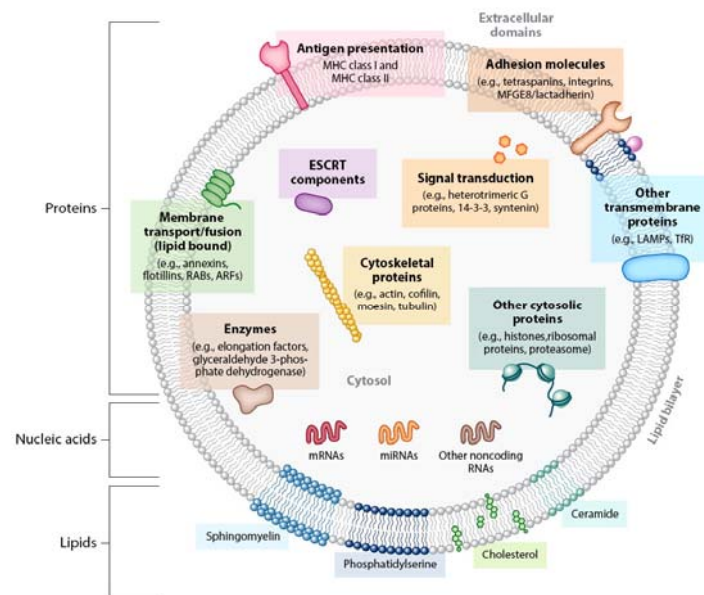
ESCRT, endosomal sorting complex required for transport, MFGE8, milk fat globule-EGF factor 8 protein; PDCD6IP, programmed cell death 6 interacting protein (also known as ALIX); TSG101, tumour susceptibility gene 101 protein; TSPAN29, tetraspanin 29.

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

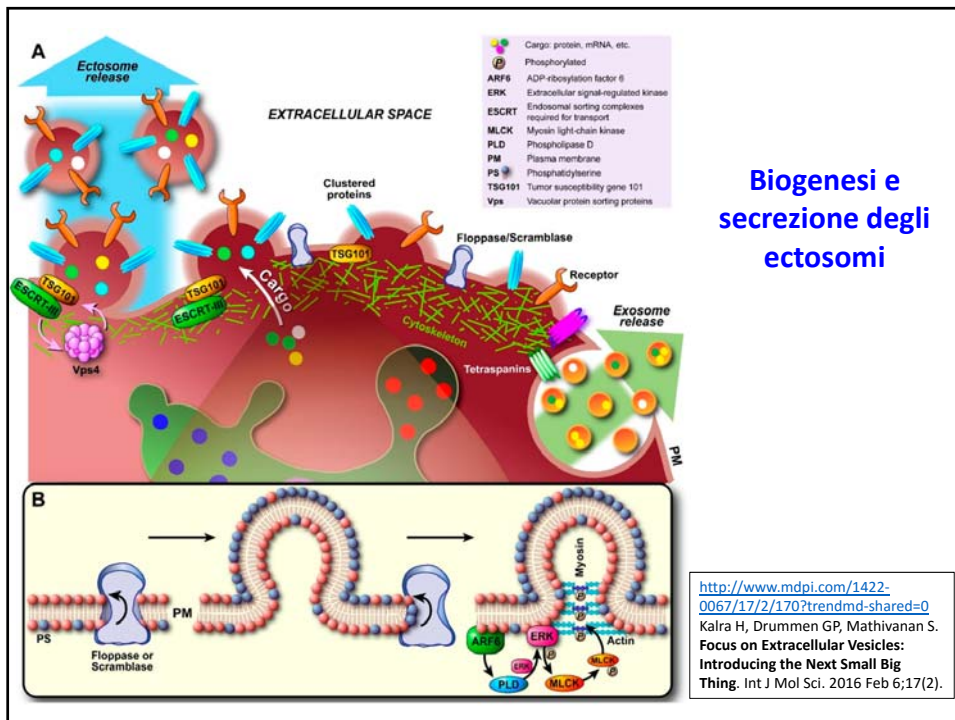
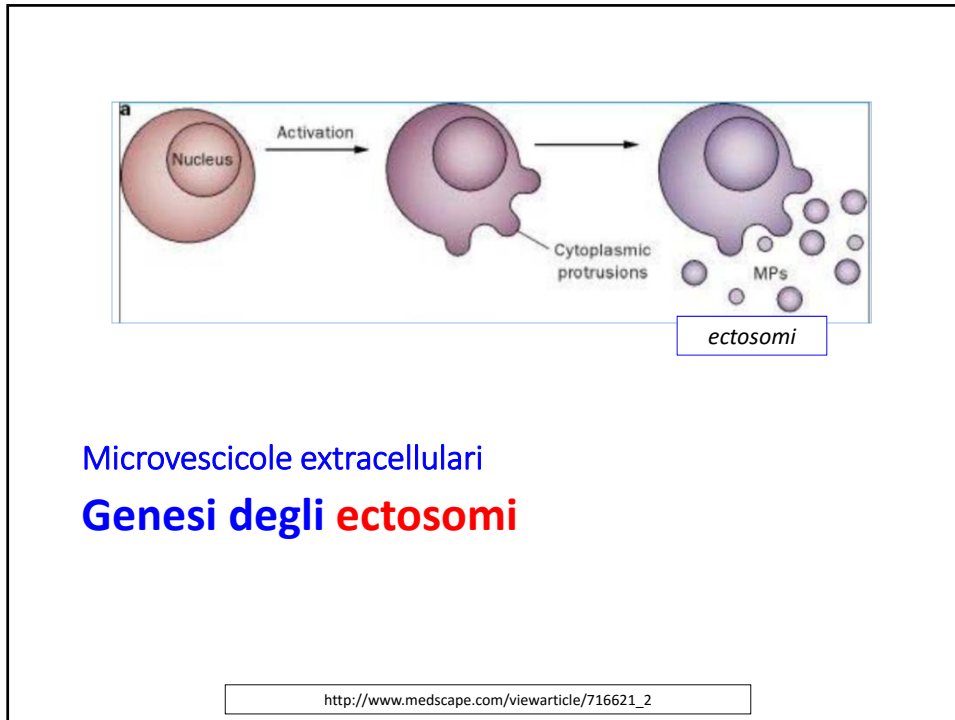
Tuttavia, i marcatori delle vescicole extracellulari non sono specifici esclusivamente di un certo tipo, e gli stessi marcatori possono essere anche presenti in altri tipi di vescicole.

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

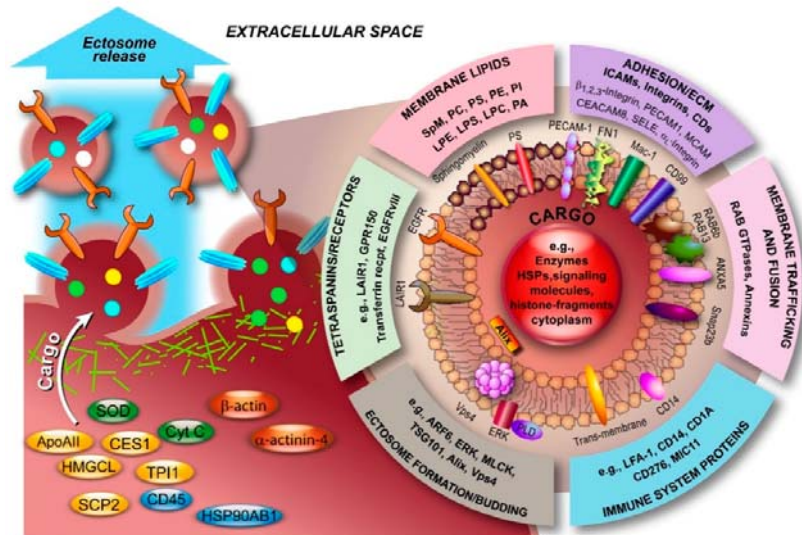
EL Andaloussi S, Mäger I, Breakefield XO, Wood MJ. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. Nat Rev Drug Discov. 2013 May;12(5):347-57.



Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. Annu Rev Cell Dev Biol. 2014;30:255-89.



Composizione molecolare degli ectosomi



<http://www.mdpi.com/1422-0067/17/2/170?trendmd-shared=0>

Kalra H, Drummen GP, Mathivanan S. Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next Small Big Thing. Int J Mol Sci. 2016 Feb 6;17(2).

Altre designazioni per ECTOSOMI

- ✚ «Microparticles», «Microvesicles», «Shedding vesicles», «exosome-like vesicles», «nanoparticles», «oncosomes»
- ✚ **ECTOSOMI**: il termine enfatizza il fatto che **queste vescicole sono scaricate fuori dalle cellule** e non all'interno delle cellule e che **sono simili ma distinte dagli exosomi**

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

Cocucci E, Meldolesi J. Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles. Trends Cell Biol. 2015 Feb 12. pii: S0962-8824(15)00015-X. doi: 10.1016/j.tcb.2015.01.004.

Ectosomi (1)

- ✚ Gli ectosomi sono molto eterogeni, sia in dimensioni che in composizione.
- ✚ Hanno **componenti** che sono **tipiche 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, stimulate) 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 membrana plasmatica e al citosol della cellula di origine.

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

Ectosomi (2)

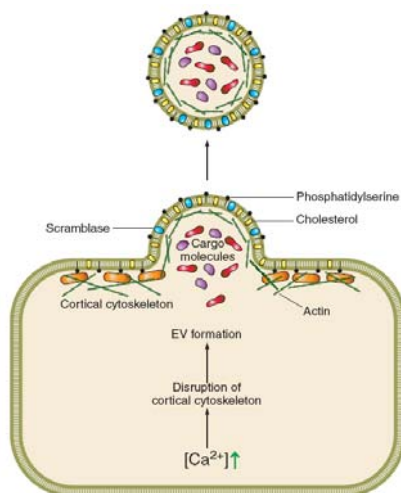
- ✚ La generazione degli ectosomi è un processo complesso ma estremamente efficace.
- ✚ Alcuni **domini** si assemblano nel piano della membrana plasmatica; **le proteine destinate a comparire negli ectosomi vengono smistate a questi domini** mentre **le proteine destinate a rimanere nella cellula sono 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 con i loro associati 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.

Genesi degli ectosomi - 1

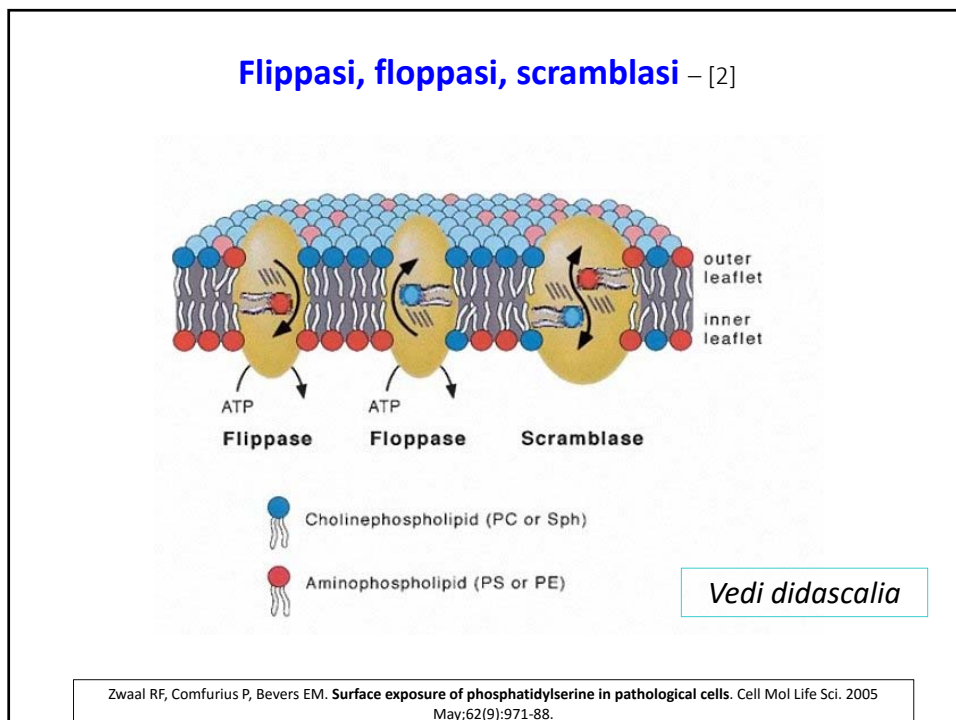
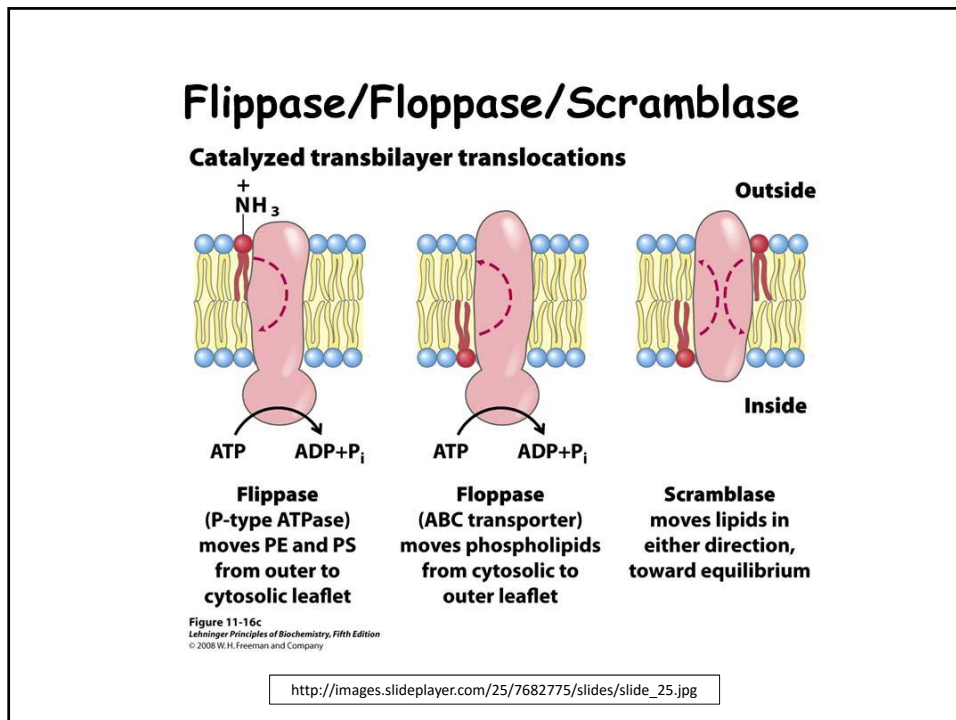
- ✚ Le vescicole esfoliate [**ectosomi**] sono una popolazione eterogenea di vescicole con dimensioni che vanno dai 100 ai 1000 nm, che derivano **dall'estrusione della membrana cellulare** in un processo che richiede **influsso di Calcio, riorganizzazione del citoscheletro e redistribuzione di componenti di membrana con formazione di nanodomini di membrana.**
- ✚ Le vescicole di membrana esfoliate contengono **elevate concentrazioni di colesterolo** e di **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 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, Ca^{2+} -dipendente, del citoscheletro induce l'esfoliazione di microvescicole dalla superficie cellulare.

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



Scambio mediato da trasportatori di fosfolipidi fra i foglietti lipidici della membrane cellulare – [1]

- Il trasporto unidirezionale di fosfolipidi tramite la **flippasi** è **diretto verso l'interno**, mentre la **floppasi** promuove il **trasporto verso l'esterno**.
- Entrambi i trasportatori sono **ATP-dipendenti** e frequentemente muovono i fosfolipidi **contro i loro rispettivi gradienti di concentrazione**.
- Ad es., l'**aminofosfolipide traslocasi** (flippasi) rapidamente trasporta PS e PE dal foglietto esterno a quello interno, mentre la ABCB1 (**floppasi**) muove sia la PC che gli aminofosfolipidi (PE, PS) lentamente verso il foglietto esterno.
- Si ritiene che l'azione concertata di entrambi i trasportatori crei uno stato stazionario di simmetria dinamica, in cui il **foglietto esterno è ricco di fosfolipidi con testa di colina**, mentre gli **aminofosfolipidi occupano predominantemente il foglietto interno**.

Zwaal RF, Comfurius P, Bevers EM. Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells. Cell Mol Life Sci. 2005 May;62(9):971-88.

Scambio mediato da trasportatori di fosfolipidi fra i foglietti lipidici della membrane cellulare – [2]

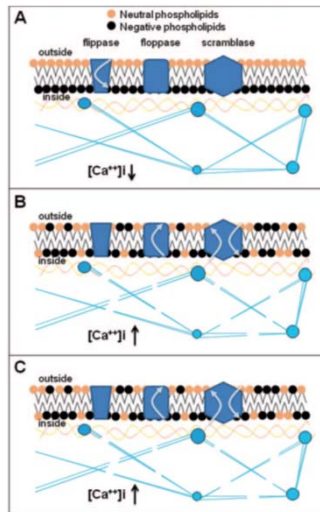
- Il **trasporto bidirezionale dei fosfolipidi** è catalizzato da una **scramblasi**, la cui attivazione può avere luogo in seguito ad un ingresso di Ca^{2+} oppure quando le cellule vanno in apoptosi.
- Dato che l'attività della **scramblasi** muove tutte le principali classi di fosfolipidi avanti e indietro fra i due foglietti, essa promuove il collasso dell'asimmetria dei fosfolipidi con comparsa di PS sulla superficie esterna delle cellule.



«Scrambled eggs»: uova strappazzate

Zwaal RF, Comfurius P, Bevers EM. Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells. Cell Mol Life Sci. 2005 May;62(9):971-88.

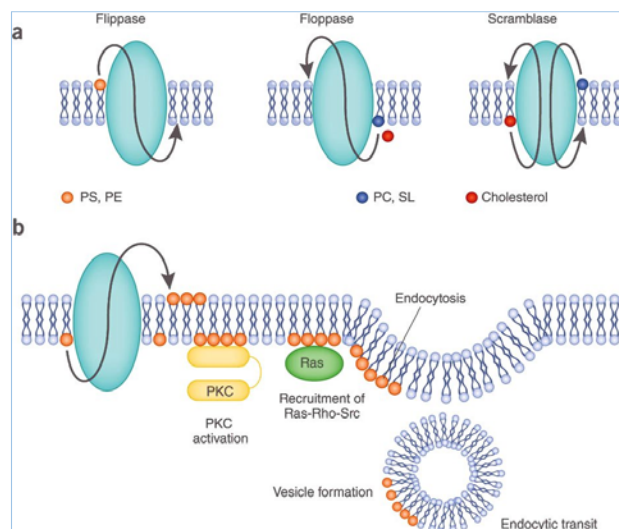
Modello di formazione di microparticelle



- A. 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.
- B. 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.
- C. 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.

Flippasi, floppasi e fosfatidilserina (PS)



Clark MR. **Flippin' lipids**. *Nat Immunol*. 2011 May;12(5):373-5.
http://www.nature.com/ni/journal/v12/n5/fig_tab/ni.2024_F1.html

Didascalia Figura Clark, 2011

- a. Paragone tra le funzioni delle **flippasi**, **floppasi** e **scramblasi** nella membrane plasmatica. Le **flippasi** (sinistra) usano l'ATP per muovere gli aminofosfolipidi fosfatidilserina (PS) e in minore quantità fosfatidiletanolamina (PE), dal foglietto esterno al foglietto interno della membrana plasmatica contro un gradiente di concentrazione. Le **floppasi** (mezzo) usano l'ATP per trasportare substrati quali la fosfatidilcolina (PC), sfingolipidi (SL) e colesterolo contro un gradiente di concentrazione nella direzione opposta. Le **scramblasi** (destra) sono indipendenti dall'ATP e meno substrato-specifiche e facilitano il movimento di lipidi lungo il loro gradiente di concentrazione.
- b. Alcune delle funzioni della **fosfatidilserina** nelle cellule. Quando le cellule subiscono l'apoptosi (sinistra), l'attivazione delle scramblasi permette la rapida comparsa di PS nel foglietto esterno della membrana plasmatica, dove fornisce il segnale "mangiatemi". Nel foglietto interno della membrana plasmatica (mezzo), la **PS aiuta ad organizzare i rafts lipidici** e può servire per reclutare membri della famiglia della proteina chinasi c (PKC) tramite il loro dominio C2, nonché molecole di segnalamento contenenti catene laterali idrofobiche [ancore lipidiche], quali Ras, Rho, e Src. La PS può indurre curvature localizzate della membrana (destra) e reclutare complessi effettori specifici che facilitano l'endocitosi di recettori, formazione di vescicole e traffico endocitico.

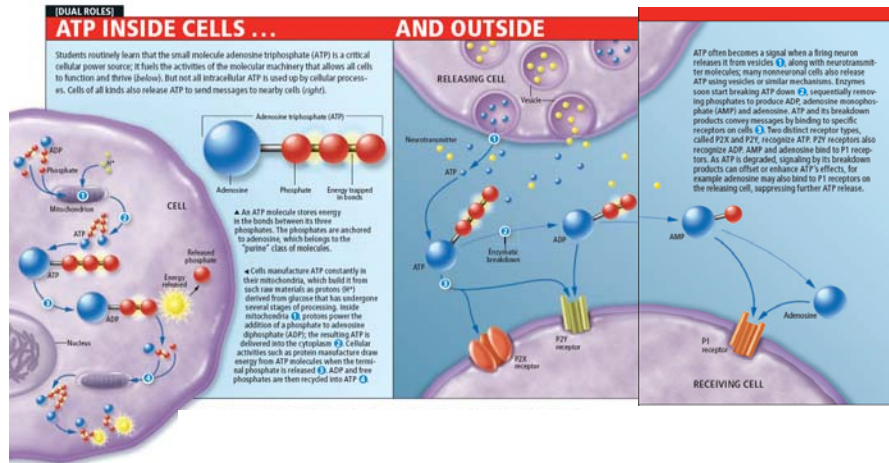
Clark MR. **Flippin' lipids**. Nat Immunol. 2011 May;12(5):373-5.

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 Ca²⁺**, quali, ad esempio, lipolisaccaridi batterici, citochine infiammatorie (Tumor Necrosis Factor- α , Interleuchina 1, ecc.), aggregati di lipoproteine a bassa densità, sfingomielinasi acida (aSMasi), 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** e dall'**attivazione del recettore P2X7** che porta all'attivazione della aSMasi e alla rapida idrolisi della sfingomielina. **L'idrolisi della sfingomielina provoca una aumentata fluidità della membrana che porta alla vescicolazione della membrana e rilascio di MVs.**

Camussi G, Derejibus 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. KHA KH 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

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

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.

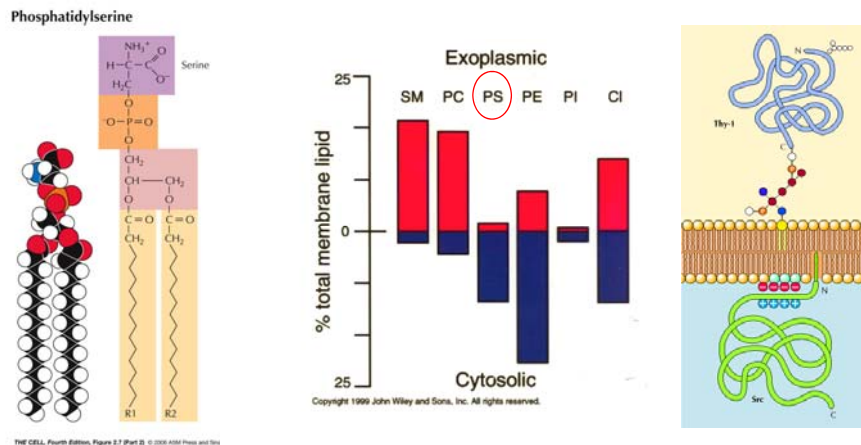
Khakh BS, Burnstock G. **The double life of ATP.** *Sci Am.* 2009 Dec;301(6):84-90, 92.

Genesi degli ectosomi - 4

- ✚ Le cellule tumorali [*insieme ad altre cellule stromali e/o infiammatorie danneggiate*]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 β e IL-8), VEGF e Fibroblast Growth Factor-2 derivati dalla cellula di origine.

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

Fosfatidil serina nella membrana plasmatica: cellule non stimolate



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 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 e prominente alterazione della distribuzione lipidica è **l'esposizione sulla superficie cellulare di foafatidilserina**, seguita dal rilascio di microparticelle, permesso dalla degradazione del citoscheletro mediante proteolisi dipendente dal 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:
 - Può promuovere 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 nell'ottica che il loro **recettore (Ptdsr)** è stato recentemente individuato come avendo un inaspettato ruolo nello sviluppo embrionale come un importante fattore di differenziamento.

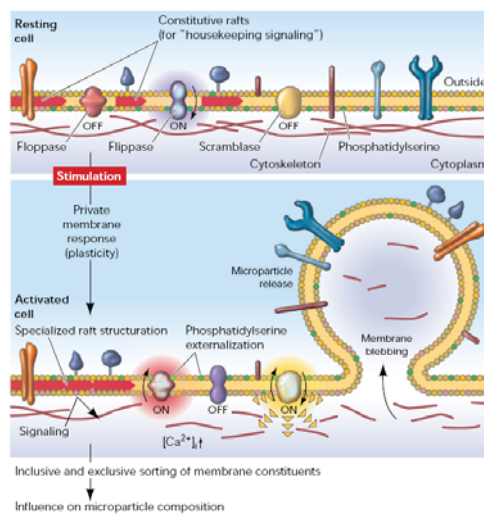
Hugel B, Martínez MC, Kunzelmann C, Freyssinet JM. **Membrane microparticles: two sides of the coin.** Physiology (Bethesda). 2005 Feb;20:22-7.

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 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

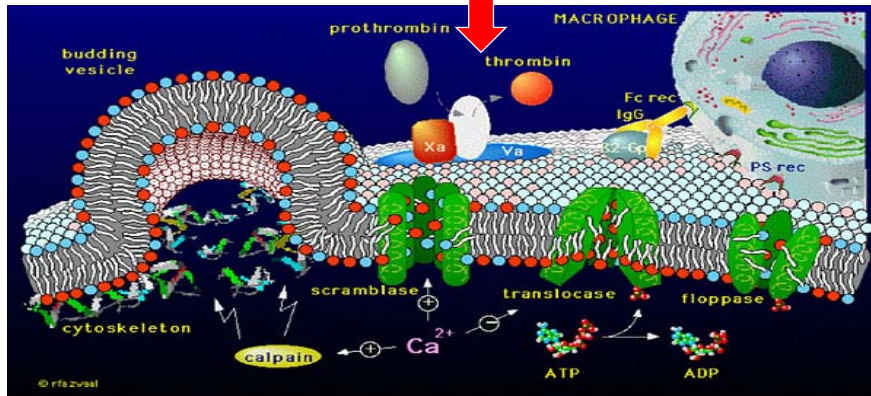


Hugel B, Martínez MC, Kunzelmann C, Freyssinet JM.
Membrane microparticles: two sides of the coin.
 Physiology (Bethesda). 2005 Feb;20:22-7.

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 redistribuzione 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.

L'esposizione della fosfatidilserina nel foglietto esterno porta alla formazione di una superficie con carica negativa necessaria per il legame, Ca-dipendente, dei fattori proteici della coagulazione II (protrombina), VII, IX e X, aumentando la loro attività biologica di diverse ordini di grandezza.

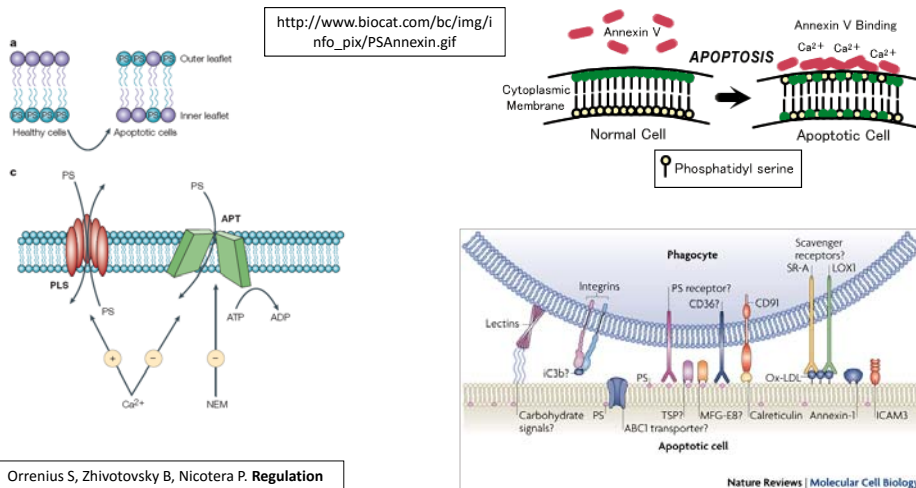


<http://www.nyas.org/image.axd?id=11c3573e-8c4e-4993-9d0a-68c1f5bf44e0&t=63478030436197000>
<http://www.nyas.org/publications/EBriefings/Detail.aspx?cid=8f6e304e-f219-4238-b555-bd2e4212f94a>
<http://www.nyas.org/Events/Detail.aspx?cid=3a8f6210-f881-4364-b320-abc40b42c93d>

Gardiner Cet al., **Extracellular vesicles, tissue factor, cancer and thrombosis - discussion themes of the ISEV 2014 Educational Day.** J Extracell Vesicles. 2015 Mar 13;4:26901

Seminario

Esposizione di fosfatidilserina nel foglietto extracellulare 1: Apoptosi

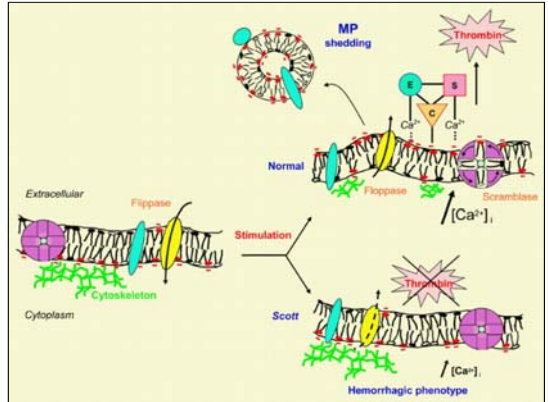
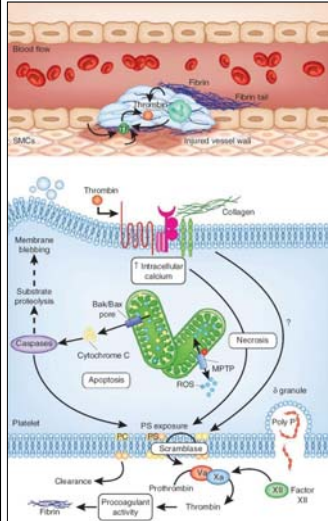


Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. **Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link.** Nat Rev Mol Cell Biol. 2003 Jul;4(7):552-65.

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

Seminario

Esposizione di fosfatidilserina nel foglietto extracellulare
2: Aggregazione piastrinica

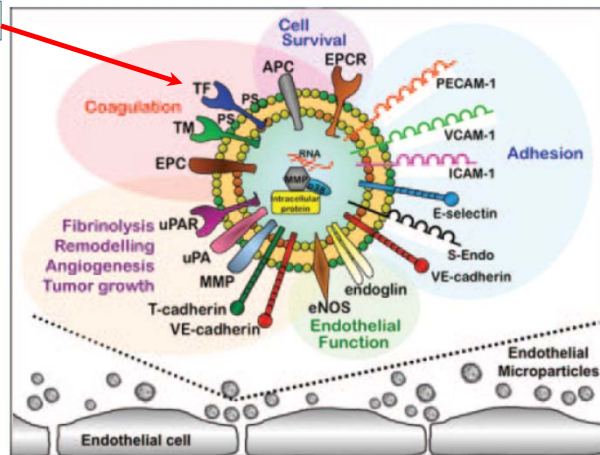


Jackson SP. Arterial thrombosis--insidious, unpredictable and deadly. Nat Med. 2011 Nov 7;17(11):1423-36.

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

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

Tissue factor



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

Diversi ruoli della formazione di microvescicole nel cancro

Emission

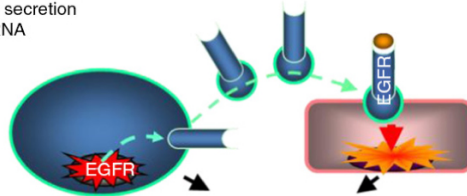
- Dumping cellular cargo
- Removal tumour suppressors
- Positive signal attenuation
- Extracellular proteolysis
- Non-gradient secretion
- Non coding RNA

Extracellular trafficking

- EVs
- Entry into biofluids
- 'Liquid biopsy'

Uptake/Stimulation

- Intercellular cargo transfer
- Sharing receptors/oncogenes
- Cellular coagulants (TF)**
- Tumour suppressors
- mRNA, miR, DNA
- Growth Factors
- Proteases
- Lipids



Biological Effects

- Horizontal transformation
- Trans-differentiation (emt)
- Invasion & metastasis
- Angiogenesis & vascular niche
- Coagulant phenotype (Coagulopathy)
- Immunity & inflammation

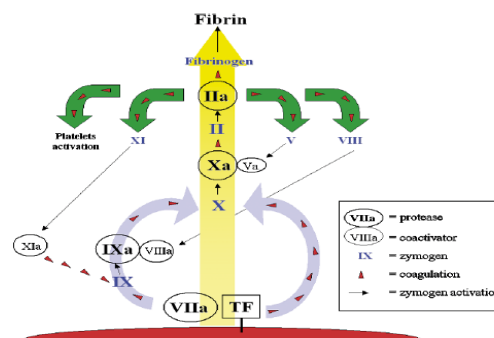
Gardiner C *et al.*, Extracellular vesicles, tissue factor, cancer and thrombosis - discussion themes of the ISEV 2014 Educational Day. J Extracell Vesicles. 2015 Mar 13;4:26901
http://www.journalofextracellularvesicles.net/index.php/jev/article/viewFile/26901/html_6/154078

Seminario

«Tissue Factor» - 1

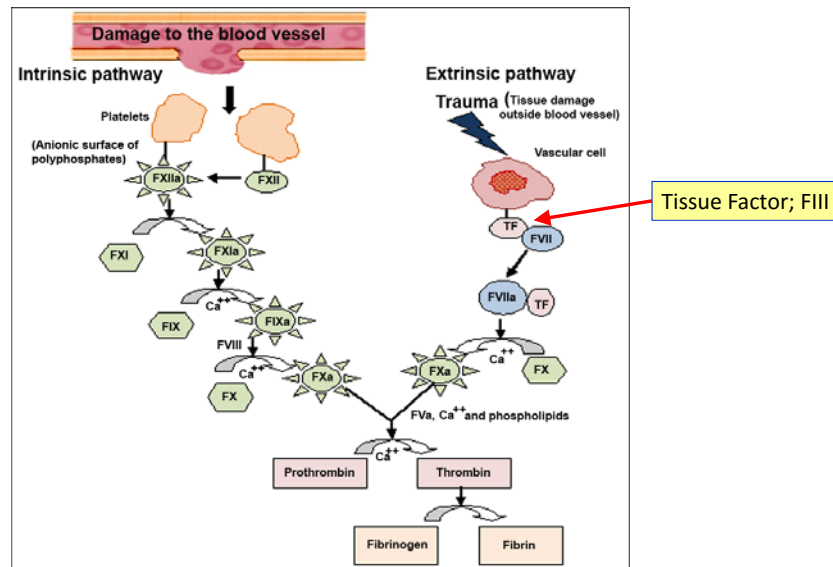
(Tromboplastina, **Fattore III** della coagulazione)

- ✚ Principale agente scatenante della **coagulazione**.
- ✚ Forma un complesso ternario con il fattore 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.

Cascata della coagulazione del sangue

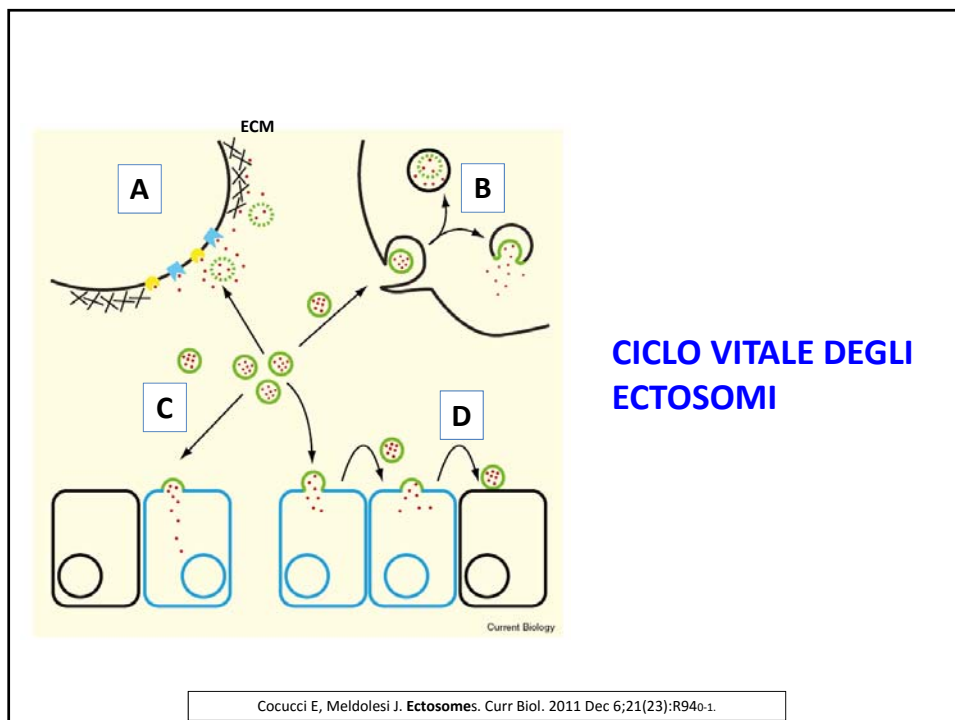
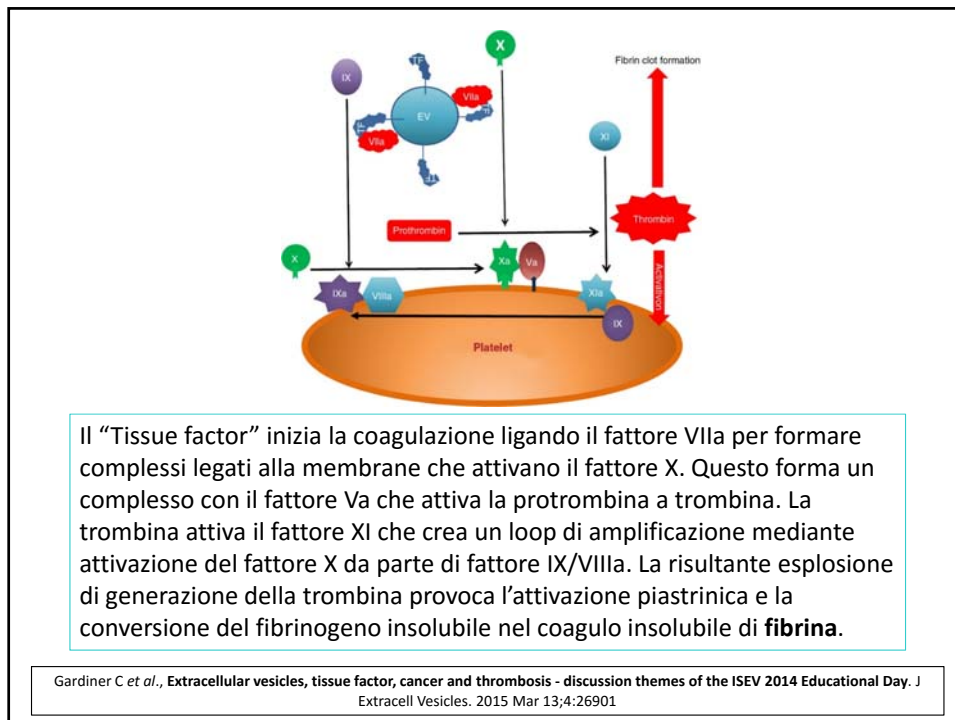


<http://www.intechopen.com/source/html/46041/media/image1.png>

«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 circolanti del sangue (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 simili 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)

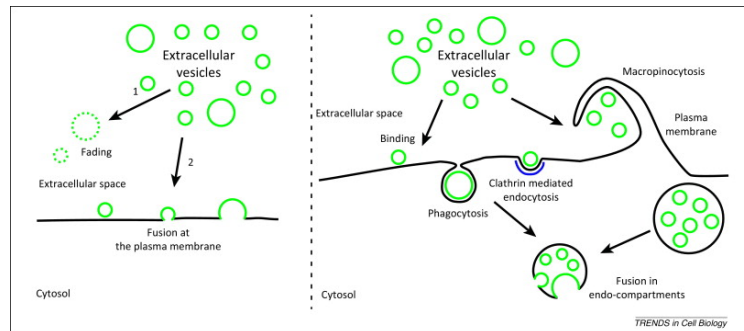
- ✚ La genesi degli ectosomi richiede la **segregazione di domini di membrana con associati pacchetti di proteine e di RNAs**.
- ✚ Dopo il loro rilascio gli ectosomi possono:
 - A. **Diffondere nello spazio extracellulare** dove possono rilasciare i loro contenuti (le molecole rilasciate possono interagire 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
 . Cocucci E, Meldolesi J. **Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles**. Trends Cell Biol. 2015 Jun;25(6):364-72.

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.



Extracellular vesicle (EV) interactions with target cells. Various forms of interaction are described in the two panels. The left panel shows EVs either **disassembled in the extracellular space** (releasing the active factors contained in their lumen) (fading, 1) or **establishing specific binding with the plasma membrane of their cell targets** (2). This stage can last many seconds, with the EVs rolling on the cell surface, until direct fusion starts and the luminal material is released into the cytosol of the target cells. The right panel illustrates the uptake of entire EVs by target cells, which occurs by various forms of endocytosis (here the clathrin-mediated form), by macropinocytosis, and by phagocytosis. Within target cells many EVs end up within MVBs. Some then fuse their membrane with the MVB limiting membrane by a process known as back fusion, corresponding to the opposite of intraluminal vesicle (ILV) generation.

Cocucci E, Meldolesi J. **Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles.** Trends Cell Biol. 2015 Jun;25(6):364-72.