

Didascalia Figura di Robbins & Morelli, 2014

Figure 1 | Biogenesis of extracellular vesicles. Extracellular vesicles are generated as intraluminal vesicles (ILVs) in multivesicular bodies (MVBs) by mechanisms that are endosomal sorting complex for transport (ESCRT) machinery dependent or independent. Proteins that are transported from the Golgi (for example, MHC class II molecules) or that are internalized from the cell surface (for example, activated growth factor receptors) are ubiquitinated on their cytosolic domains. However, not all proteins, such as MHC class II molecules, require ubiquitylation for targeting to vesicles. The ESCRT0 complex recognizes the ubiquitylated proteins on the cytosolic side of the endosome or MVB membrane, segregates the proteins into microdomains and binds the ESCRTI complex, which in turn recruits ESCRTII subunits. ESCRTI and ESCRTII initiate the reverse budding of the nascent ILVs within MVBs. Following this, cytosolic RNAs and proteins have direct access into the interior of the forming vesicles. Next, the ESCRTII complex recruits ESCRTIII subunits inside the neck of the nascent ILVs, which results in their cleavage into free vesicles. The free ubiquitin (Ub) molecules and ESCRT subunits are released into the cytosol for recycling. Certain proteins (for example, proteolipid protein (PLP)) are sorted into ILVs independently of the ESCRT machinery through raft-based microdomains that are rich in sphingolipids, from which ceramides are formed by sphingomyelinases. Ceramide induces coalescence of the microdomains and triggers ILV formation. The dashed arrow indicates that the role of ceramide in ILV formation is still controversial. The MVBs then follow either the secretory or the degradative pathway. In the secretory pathway, MVBs traffic to the cell periphery and fuse with the plasma membrane, constitutively releasing the ILVs (now termed extracellular vesicles), or following activation of surface receptors that trigger calcium influx. In the degradative route, MVBs release the ILVs into lysosomes. The lysosomal pathway is crucial for limiting the signalling of activated growth factor receptors. It is likely that differences in the MVBs confer the route of traffic. ER, endoplasmic reticulum; miRNA, microRNA; t-SNARE, target SNAP receptor; v-SNARE, vesicle SNARE.

Robbins PD, Morelli AE. Regulation of immune responses by extracellular vesicles. Nat Rev Immunol. 2014 Mar;14(3):195-208.

Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles

Trends in Cell Biology, June 2015, Vol. 25, No. 6

Emanuele Cocucci^{1,2} and Jacopo Meldolesi^{3,4}

¹Department of Pediatrics, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA

²Program in Cellular and Molecular Medicine, Boston Children's Hospital, Boston, MA 02115, USA

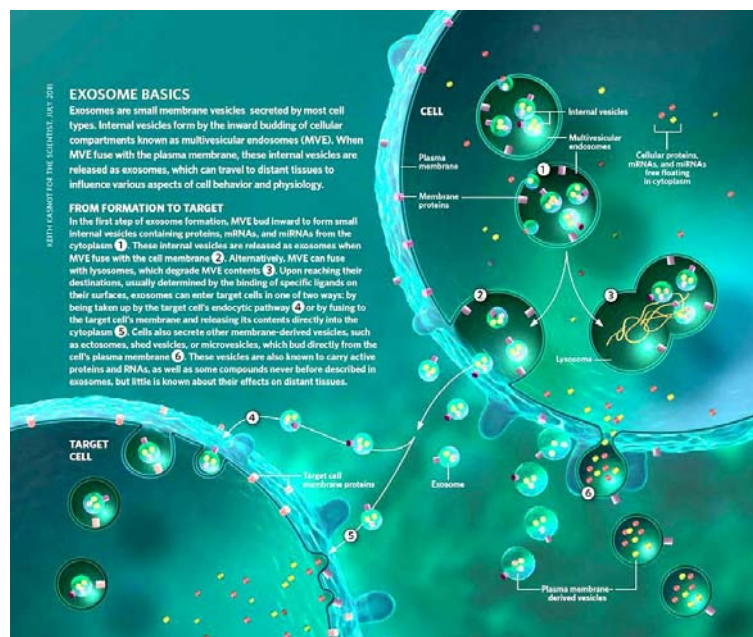
³Vita-Salute San Raffaele University, 20132 Milan, Italy

⁴San Raffaele Scientific Institute, 20132 Milan, Italy

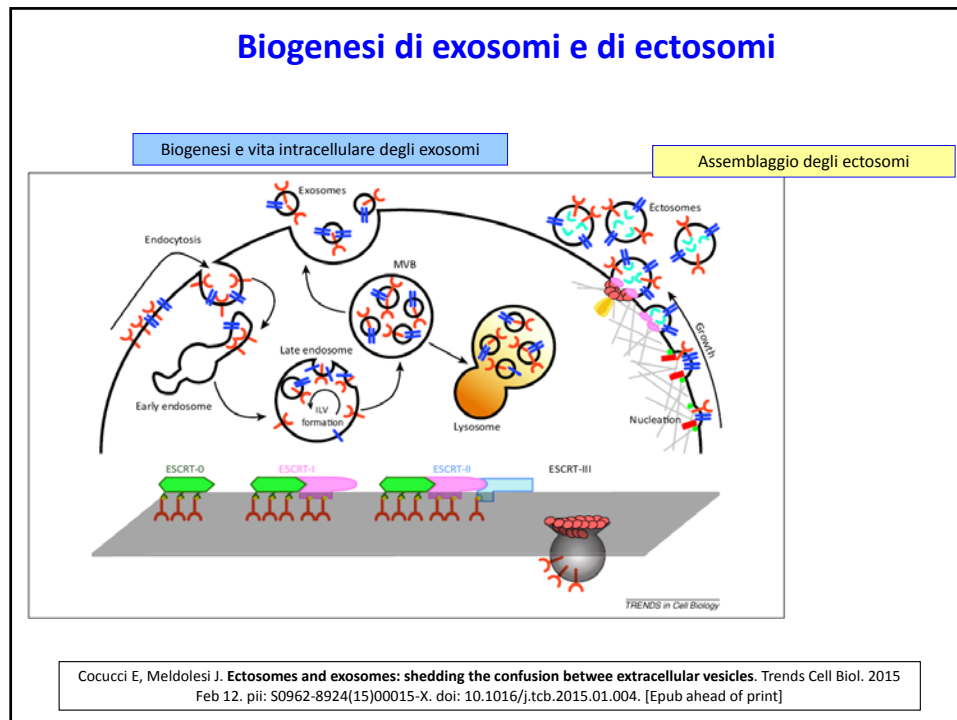
Long- and short-distance communication can take multiple forms. Among them are **exosomes** and **ectosomes**, **extracellular vesicles (EVs)** released from the cell to deliver signals to target cells. While most of our understanding of how these vesicles are assembled and work comes from mechanistic 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.



Emanuele Cocucci
Boston Children's Hospital,
Boston



<http://www.gene-quantification.de/they-exosome-basics-graph.jpg>

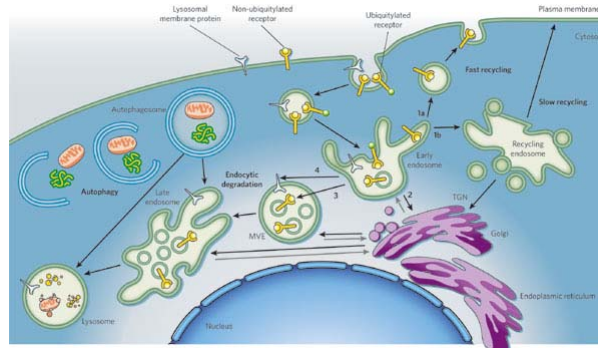


Didascalia Figura Genesi di exosomi ed ectosomi - 1

- ✚ **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 “**Endosomal Sorting Complex Required for Transport**” (ESCRT), **ESCRT-0** recluta proteine ubiquitinate, mentre i complessi **ESCRT-I** e **-II** mediano la gemmazione delle vescicole intraluminali (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.

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]

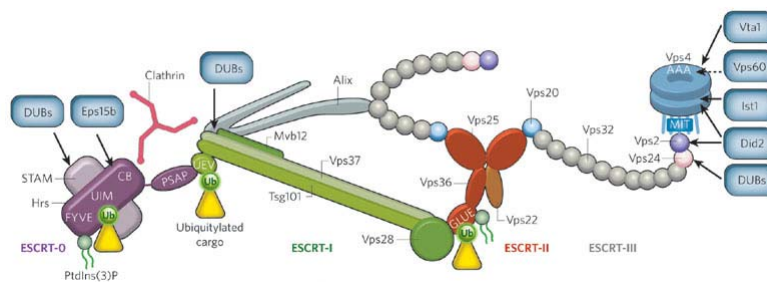
Internalizzazione e smistamento («sorting») per via endocitica



Membrane proteins of different kinds are brought inside the cell by endocytosis and translocated to early endosomes, which also receive cargoes from the trans-Golgi network (TGN). Depending on the various proteins that enter the endosome membrane, these cargoes are sorted to distinct destinations. Some cargoes, such as nutrient receptors, are recycled back to the plasma membrane, either directly (**step 1a**) or indirectly through the recycling endosome (**step 1b**). Others, such as receptors for lysosomal enzymes and some protein toxins, are sorted to the TGN (**step 2**). Ubiquitylated membrane proteins, such as activated growth-factor receptors, are sorted into intraluminal vesicles and eventually end up in the lysosome lumen via MVEs (**step 3**). In contrast, lysosomal membrane proteins reach their destination by being preferentially sorted to the perimeter membrane of the MVE (**step 4**). The contents of autophagosomes are also degraded within lysosomes.

Raiborg C, Stenmark H. **The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins.** Nature. 2009 Mar 26;458(7237):445-52.

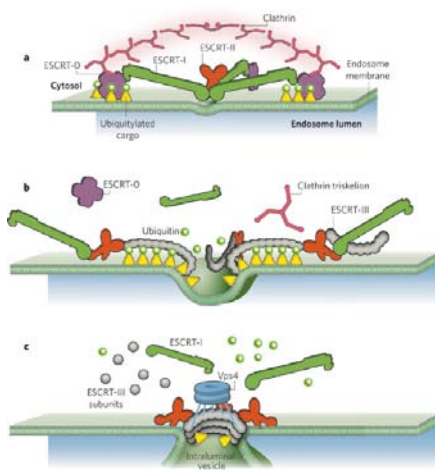
Composizione e interazioni molecolari del macchinario ESCRT



Interactions between the four ESCRTs are indicated, as are interactions with ubiquitylated cargo and accessory molecules such as PtdIns(3)P, deubiquitylating enzymes (DUBs), Alix and the ATPase Vps4. Mammalian protein names have been used but the figure is a composite of data obtained from studies of yeast and mammalian ESCRTs. Protein domains are labelled in white. CB, clathrin-box motif. Ub, ubiquitin. Dashed arrow indicates interaction predicted by genetic studies but not yet confirmed biochemically.

Raiborg C, Stenmark H. **The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins.** Nature. 2009 Mar 26;458(7237):445-52.

Il macchinario ESCRT nello smistamento negli endosomi delle proteine di membrane ubiquitinate



a, Cargo sorting into clathrin-coated microdomains. Initial recognition of ubiquitinated cargo is mediated by ESCRT-0, which is concentrated in microdomains through interaction with clathrin (pink). ESCRT-0 also serves to recruit ESCRT-I. The elongated ESCRT-I recruits ESCRT-II and may contribute to membrane involution. **b, Membrane deformation.** ESCRT-III complexes are recruited by binding to the two Vps25 subunits of ESCRT-II and form spiral-shaped filaments that gate cargo into invaginations that ESCRT-III filaments cause. During this process, cargo is deubiquitinated by DUBs that are recruited by ESCRT-III, but the diffusion of cargo itself is strictly limited by the ESCRT-III filaments. **c, Membrane abscission.** As ESCRT-III filaments assemble into circular arrays, the membrane continues to invaginate. Vps4 enters the invagination to disassemble ESCRT-III filaments, ensuring that its subunits are recycled and that the filaments assemble only at the neck of the forming intraluminal vesicle. For simplicity, the cytosolic part of the transmembrane cargo (yellow) has been omitted in the figure.

Raiborg C, Stenmark H. The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitinated membrane proteins. Nature. 2009 Mar 26;458(7237):445-52.

Didascalia figura Genesi di exosomi 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^{2+}** (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]

EMERGING TOPICS
PHYSIOLOGY 20: 218-224, 2005; 10.1152/physiol.00015.2005

Protein-Protein Interactions in the Tetraspanin Web

Tetraspanins are evolutionarily conserved membrane proteins that tend to associate laterally with one another and to cluster dynamically with numerous partner proteins in membrane microdomains. Consequently, members of this family are involved in the coordination of intracellular and intercellular processes, including signal transduction; cell proliferation, adhesion, and migration; cell fusion; and host-parasite interactions.

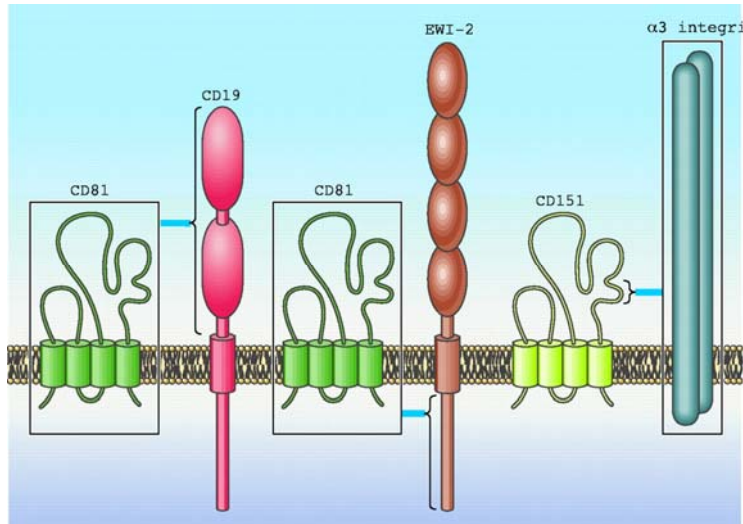
Levy S, Shoham T. Protein-protein interactions in the tetraspanin web. Physiology (Bethesda). 2005 Aug;20:218-24.

Aggregazione nell'ambito della membrane di microdomini arricchiti in tetraspanine

A: vista "aerea" delle interazioni tetraspanine-partner e tetraspanine-tetraspanine. B: vista laterale di associazioni laterali di tetraspanine con molecole partner. **L'aggregazione è facilitata dalla palmitoilazione** di residui conservati di cisteine nei domini intracellulari delle proteine interagenti (a destra). Le tetraspanine sono illustrate in tonalità diverse di verde; i partners della superfamiglia delle immunoglobuline sono illustrate in rosso e marrone e quelli delle integrine in azzurro.

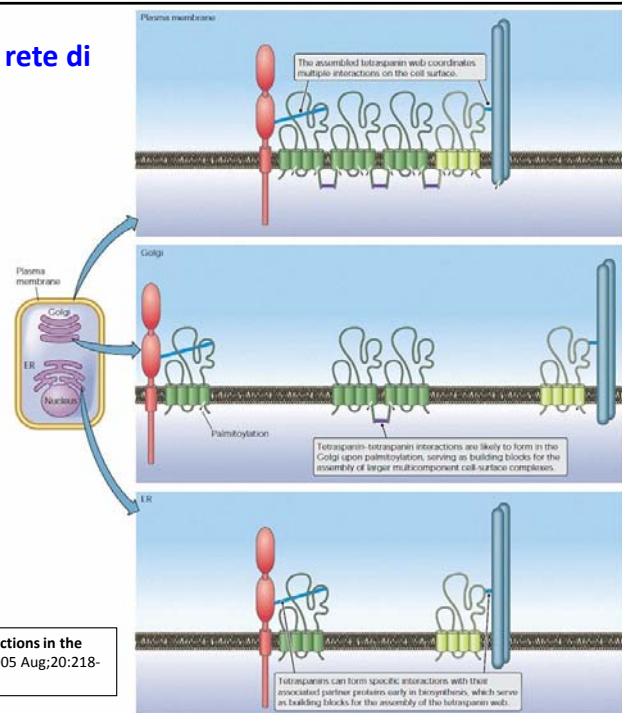
Levy S, Shoham T. Protein-protein interactions in the tetraspanin web. Physiology (Bethesda). 2005 Aug;20:218-24.

Le interazioni delle tetraspanine con proteine partner possono essere formate mediante domini strutturali diversi



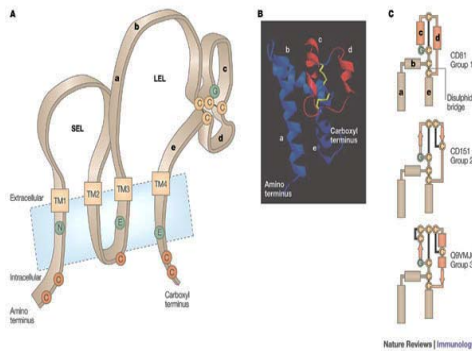
Levy S, Shoham T. **Protein-protein interactions in the tetraspanin web.** Physiology (Bethesda). 2005 Aug;20:218-24.

Assemblaggio della rete di tetraspanine



Levy S, Shoham T. **Protein-protein interactions in the tetraspanin web.** Physiology (Bethesda). 2005 Aug;20:218-24.

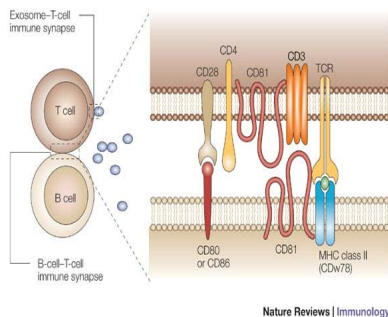
Struttura schematica delle tetraspanine



Levy S, Shoham T. **The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes.** Nat Rev Immunol. 2005 Feb;5(2):136-48. http://www.nature.com/nri/journal/v5/n2/fig_tab/nri1548_F1.html#figure-title

- A. È illustrata la **CD 82** come **tetraspanina** tipica. I quattro domini transmembrana TM contengono residui polari conservati (cerchi verdi) e affiancano gli loops extracellulari piccolo ("small") e grande ("large") (SEL e LEL, rispettivamente). Il LEL è composto da una zona centrale formata dalle eliche a, b e d, e questa struttura centrale è conservata fra le tetraspanine. Le eliche c e d comprendono le porzioni variabili del LEL, e sono affiancate dal motivo CCG e ulteriori residui di cisteina conservati (cerchi giallo). Questa regione è ripiegata come risultato di ponti disolfuro (linee nere) formando una sorta di fungo. Sono anche indicati siti potenziali di palmitoilazione nei residui intracellulari conservati di cisteina (cerchi arancione).
- B. Una rappresentazione monomerica a nastro della struttura tridimensionale della LEL della CD81. Le eliche conservate a, b ed e sono colorate in blu, e la regione divergente, che nella CD81 è rappresentata dalle eliche c e d, è colorata rosso. I ponti disolfuro sono mostrati come linee gialle.
- C. Modello della topologia della LEL delle tetraspanine contenente quattro (gruppo 1), sei (gruppo 2b) o otto (gruppo 3) residui di cisteina nei loro LELs. Rettangoli, frecce e linee sottili corrispondono ad eliche, filamenti e avvolgimenti, rispettivamente. I ponti disolfuro sono rappresentati da linee nere.

Ruolo duplice della tetraspanina CD81 nell'immunosinapsi tra cellula presentante l'antigene e la cellula T



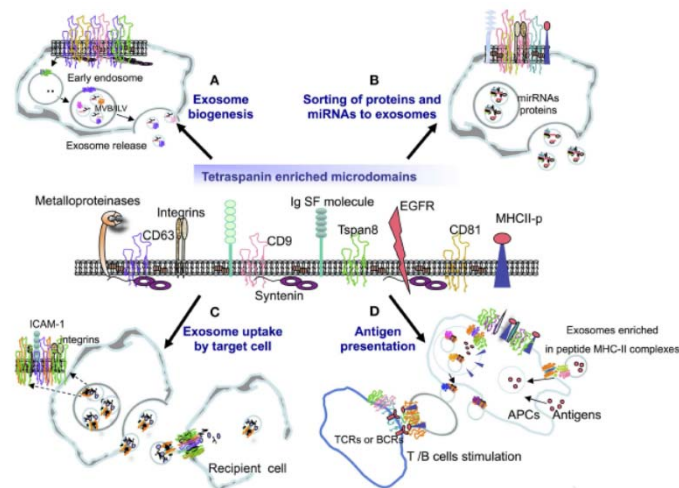
Levy S, Shoham T. **The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes.** Nat Rev Immunol. 2005 Feb;5(2):136-48. http://www.nature.com/nri/journal/v5/n2/fig_tab/nri1548_F3.html#figure-title

- Nelle **cellule che presentano l'antigene** (illustrate qui come un linfocito B), la tetraspanina CD81 si associa con molecole dei MHC di classe II, particolarmente con il sotto-insieme contenente l'epitopo CDw78.
- Allo stesso modo gli **exosomi** (illustrati come vescicole secrete colorate in blu), che sono arricchiti in tetraspanine, **sono coinvolti nella presentazione di antigene.**
- Nei linfociti T, la CD81 si associa con CD3 e CD4; il suo effetto co-stimolatorio, e quello delle tetraspanine in genere, è simile a quello del CD28.
- Ci sono anche dati che la CD81 sia distribuita al "central supramolecular activation complex" (cSMAC).
- Per ora, sono state descritte e rimane da determinare se esse formano anche trans-interazioni. TCR: "T-cell receptor".

Didascalia Fig. Levy

- In un modello ipotetico, la rete di tetraspanine aggrega transitoriamente componenti delle vie di segnalazione transmembrane ed intracellulari, in questo modo facilitando una risposta specifica e altamente regolata a diversi segnali extracellulari.
- Nei leucociti circolanti, le integrine mediano in modo esclusivo la risposta cellulare sia a segnali adesivi che stimolatori provenienti dalle cellule endoteliali, quali le chemochine. Le chemochine si legano ai loro rispettivi recettori associati a proteine G (GPCRs) presenti sulla superficie dei leucociti, aumentano l'avidità delle integrine e aumentano l'adesività.
- Le tetraspanine si associano con le integrine e potrebbero mediare il trasferimento del segnale fra stimoli associati al GPCR e alle integrine. In effetti, associazioni altamente specifiche fra le tetraspanine e membri della famiglia GPCR furono recentemente descritti.
- Un ulteriore contributo delle tetraspanine è la loro capacità di reclutare particolari enzimi coinvolti nel segnalamento cellulare, incluso la proteina chinasi C (PKC) che si sa essere coinvolta nella fosforilazione delle integrine, e i componenti intracellulari del complesso GPCR, le subunità della proteina G. Inoltre, la CD81 si associa con un'isoforma che appartiene alla famiglia di proteine 14-3-3; questa associazione dipende dallo stato di ossidazione della cellula e dalla palmitoilazione del CD81. La famiglia 14-3-3 è stata implicata nella regolazione delle vie di segnalamento intracellulari.
- Vi sono inoltre ulteriori associazioni laterali tra le tetraspanine e altri membri della superfamiglia delle immunoglobuline, quali EW12 (un componente della superfamiglia delle immunoglobuline che contiene un motivo EW1 di aminoacidi).
- Complessivamente, la capacità delle tetraspanine di simultaneamente associarsi una con l'altra, con partners e con diverse classi di proteine di segnalamento permette la trasmissione di segnali laterali e facilita il coordinamento degli eventi di segnalamento intracellulare. Gα: subunità α della proteina G.

Levy S, Shoham T. **The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes.** Nat Rev Immunol. 2005 Feb;5(2):136-48.



Tetraspanins have the capacity to interact with several receptor and signaling molecules at the membrane, organizing specialized tetraspanin-enriched microdomains (TEMs) that may play a role in (A) EV biogenesis, (B) the selection of exosome cargo (proteins and miRNAs), (C) the binding and uptake of exosomes by target cells, or (D) the ability of exosomes to present antigen in the context of an immune response.

Andreu Z, Yáñez-Mó M. **Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function.** Front Immunol. 2014 Sep 16;5:442.

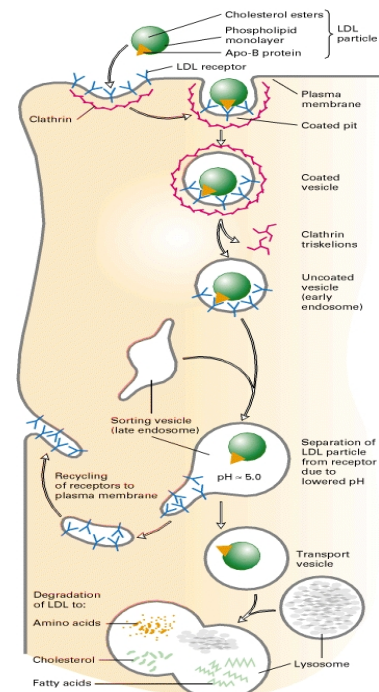
Didascalia figura Genesi di exosomi ed ectosomi - 3

- ✚ 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]

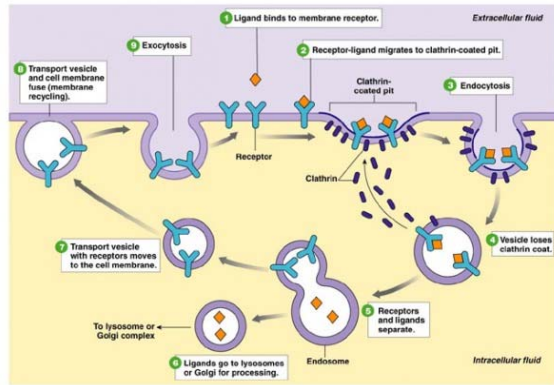
Endocitosi mediata da recettori (Descrizioni classiche – 1)

Ripasso argomenti triennale



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

Endocitosi mediata da recettori (Descrizioni classiche – 2)

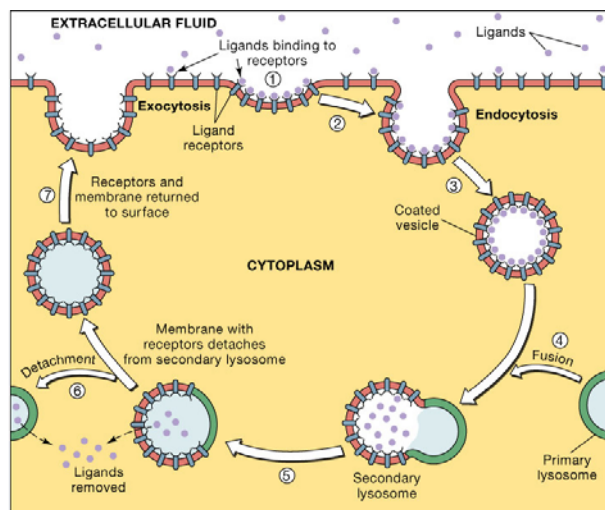


L'endocitosi mediata da recettori (RME), nota anche come **endocitosi mediata dalla clatrina**, è un processo tramite il quale le cellule internalizzano molecole mediante l'invaginazione verso l'interno di vescicole della membrana plasmatica contenenti proteine con siti recettori specifici per le molecole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

Fig. 5-24

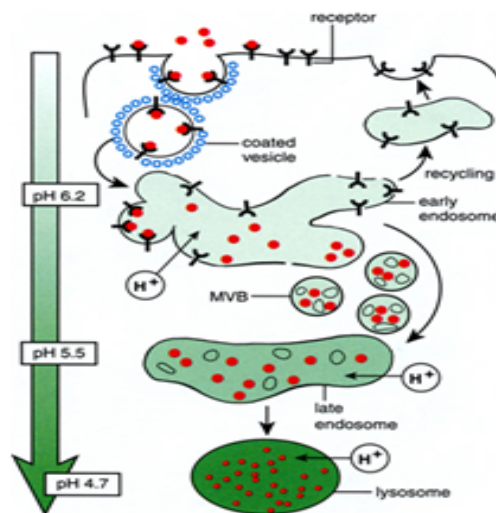
<http://virusabc.weebly.com/part-i.html>

Endocitosi mediata da recettori (Descrizioni classiche – 3)



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

Endocitosi mediata da recettori (Descrizioni classiche – 4)



Importanza del pH
per l'affinità
recettore-ligando

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 Ca^{2+} , mentre il **rilascio che consegue a una stimolazione (esocitosi regolata) è regolato dal Ca^{2+}** . [da controllare]

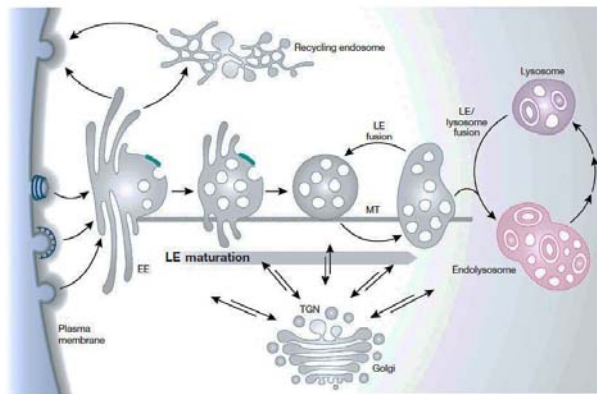
Genesi degli exosomi - 2

- ✚ Gli **exosomi** hanno origine nel **compartimento endosomiale**. Dopo formazione degli **endosomi** intracellulari **precoci** 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, alcuni 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**.

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.

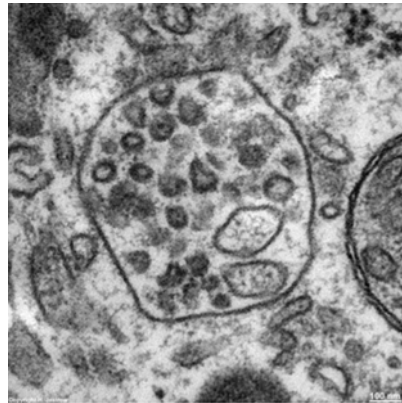
Huotari J, Helenius A. Endosome maturation. EMBO J. 2011 Aug 31;30(17):3481-500.

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

- ✚ Gli endosomi tardivi (LE) subiscono reazioni di **fusione omotipica**, crescono di dimensione, e formano **corpi multivescicolari con un numero crescente di Vescicole Intraluminali eterogenee (ILVs)**.
- ✚ Il ruolo «alimentatore» (feeder») degli endosomi tardivi è quello di consegnare ai lisosomi questa miscela di componenti endocitici e secretori.
- ✚ 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.

Seminaio

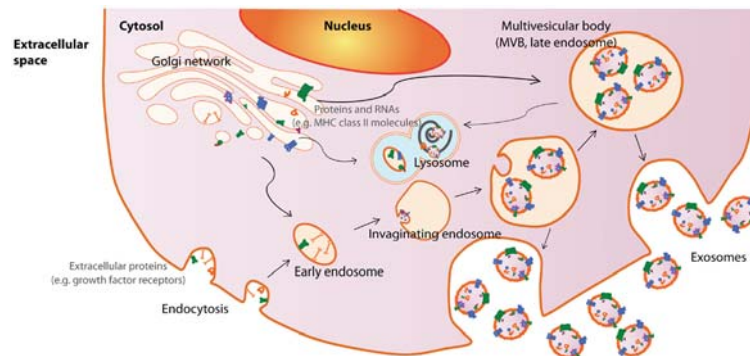


Endocitosi

Formazione di corpi multivescicolari

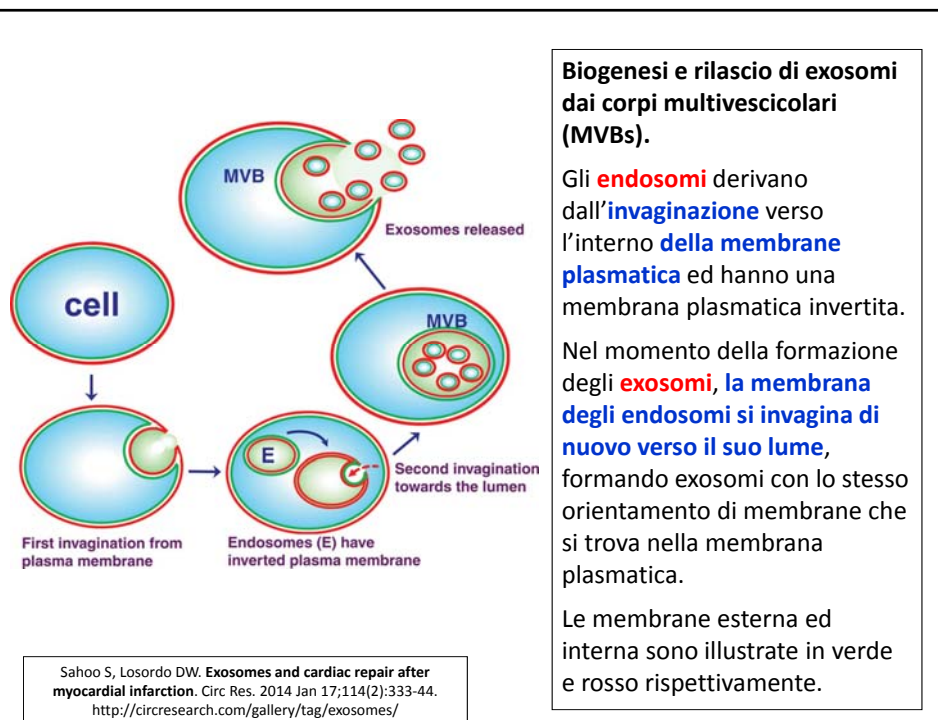
Waldenström A, Ronquist G. **Role of exosomes in myocardial remodeling**. Circ Res. 2014 Jan 17;114(2):315-24.

Biogenesi e secrezione degli exosomi



Gli exosomi sono rilasciati dalle cellule quando organelli intracellulari chiamati corpi multivesicolari (MVBs) si fondono con la membrana plasmatica. I MVBs si formano mediante invaginazione degli endosomi tardivi («late»), che contenevano molecole derivate dal Golgi (ad es. molecole di MHC di classe II) o dalla superficie cellulare (ad es. recettori per fattori di crescita). Perciò, gli exosomi contengono **materiali citosolici**, sono arricchiti in **marcatori proteici associati agli endosomi** quali le proteine Rab, ALIX, TSG101, e molecole di MHC classe II oppure proteine endocitiche, quali i recettori per la transferrina e clatrine.

Zhang B, Yin Y, Lai RC, Lim SK. **Immunotherapeutic potential of extracellular vesicles.** Front Immunol. 2014 Oct 22;5:518.



Biogenesi e rilascio di exosomi dai corpi multivesicolari (MVBs).

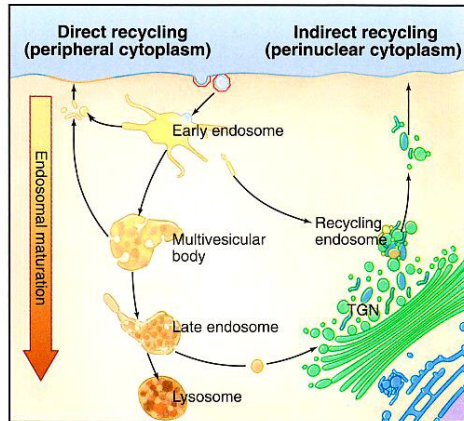
Gli **endosomi** derivano dall'**invaginazione** verso l'interno **della membrana plasmatica** ed hanno una membrana plasmatica invertita.

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/>

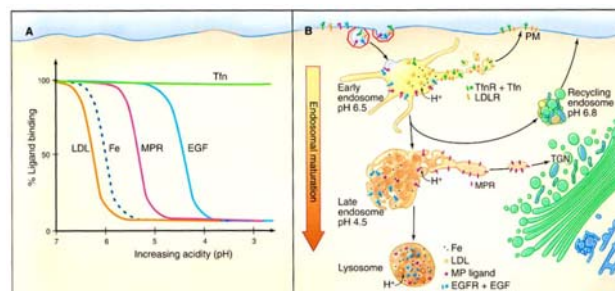
Endocitosi: descrizione più moderna già con indicazione dei corpi multivescicolari



Pollard & Earnshaw + Lippincott-Schwartz: *Cell Biology*, 2^a ed.,
Saunders, 2007

Traffico di membrana lungo la via endocitica

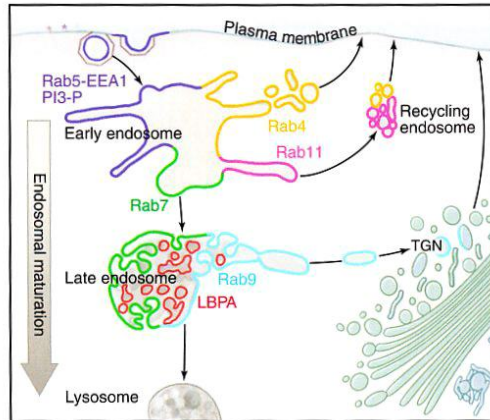
- I carichi e le membrane, catturati mediante endocitosi mediata da clatrina, sono consegnati agli **endosomi precoci tubulo-vescicolari**, che sono **moderatamente acidi**.
- La maggior parte delle **membrane**, insieme ai **recettori**, viene **riciclata**, sia mediante una via rapida, diretta, che 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.



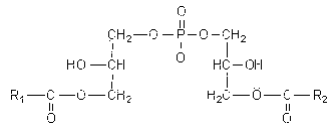
Pollard & Earnshaw + Lippincott-Schwartz: *Cell Biology*, 2^a ed.,
Saunders

Un progressivo calo del pH lumenale facilita lo smistamento delle proteine nel compartimento endosomiale. Le interazioni tra diverse molecole trasportate con i loro recettori sono dipendenti dal pH (B). La dissociazione colloca i **ligandi nello spazio lumenale**, mentre i **recettori rimangono associati alla membrana**. Considerazioni geometriche, nonché motivi di smistamento nei recettori, facilitano lo smistamento delle membrane dai contenuti interni. I recettori non occupati, i cui ligandi come ad es. le **LDL**, si sono dissociati a causa delle moderate condizioni acide che si trovano negli endosomi precoci, sono efficientemente riciclati verso la superficie cellulare. Invece il **ferro**, trasportato dalla transferrina (Tfn), si dissocia ad un pH di circa 6, ma la apoTfn (transferrina senza ferro legato) rimane legata e viene riciclata con il suo recettore. I **recettori per il mannosio-6-fosfato** (MPRs) trasportano i loro ligandi agli endosomi tardivi prima della dissociazione a pH più basso e al riciclaggio in dietro verso il TGN. L'**EGF** rimane legato, e sia il ligando che il recettore (EGFR) sono consegnati e degradati nei lisosomi. (PM: membrana plasmatica). Queste differenze nell'entità del legame dei ligandi a differenti pH portano ad una **«firma» dipendente dal pH per ogni sistema ligando-recettore** nelle prove sperimentali sul legame con i ligandi (A).

Organizzazione dei domini nella via endocitica

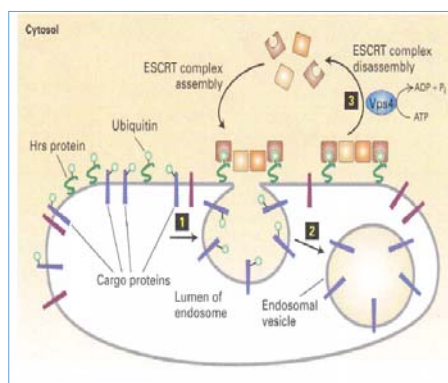


Sub-regioni delle membrane endosomiali contengono Rabs [piccole proteine G] ed effettori dei Rabs (evidenziati con colori diversi). Queste sub-regioni mantengono la loro organizzazione mediante produzione localizzata di Pls (fosfolipidi) che reclutano proteine quali le EEA1 leganti le GTPasi Rab. **I diversi domini permettono al sistema endosomiale di svolgere funzioni diverse.** LBPA: acido lisobisfosfatidico.



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

Modello dei meccanismi per la formazione degli endosomi multivescicolari



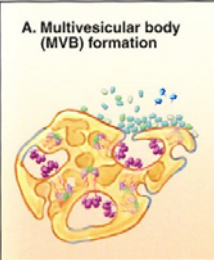
Hrs: «Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate»

⚡ Nel processo di **gemmazione negli endosomi**, l'**ubiquitinazione della proteina 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**.

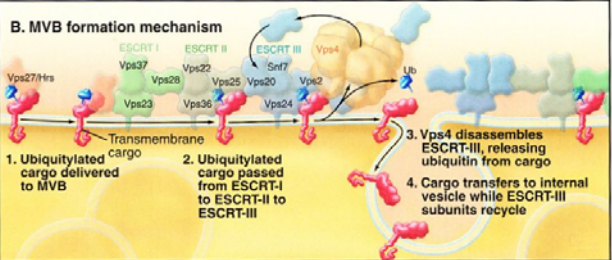
⚡ Dopo che l'insieme di complessi ESCRT media il completamento e il distacco delle vescicole verso l'interno (passo **2**), esse sono disassemblate dalla ATPasi Vps4 e ritornano al citosol: passo **3**.

Lodish et al., 7° ed. 2013

A. Multivesicular body (MVB) formation



B. MVB formation mechanism



1. Ubiquitinated cargo delivered to MVB
2. Ubiquitinated cargo passed from ESCRT-I to ESCRT-II to ESCRT-III
3. Vps4 disassembles ESCRT-III, releasing ubiquitin from cargo
4. Cargo transfers to internal vesicle while ESCRT-III subunits recycle

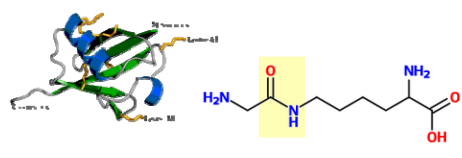
A: Smistamento delle proteine nei corpi multivesicolari. L'ubiquitinazione delle proteine cargo delle membrane internalizzate provoca la loro **internalizzazione** in domini della membrana endosomiale contenenti Hrs e clatrina. Mediante l'azione delle ESCRT-I, -II e III le proteine di membrana vengono **smistate nelle vescicole intraluminali** e indirizzate mediante i corpi multivesicolari (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 allora 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 intraluminali contenente il recettore è mediata mediante 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° ed., Saunders

Seminario

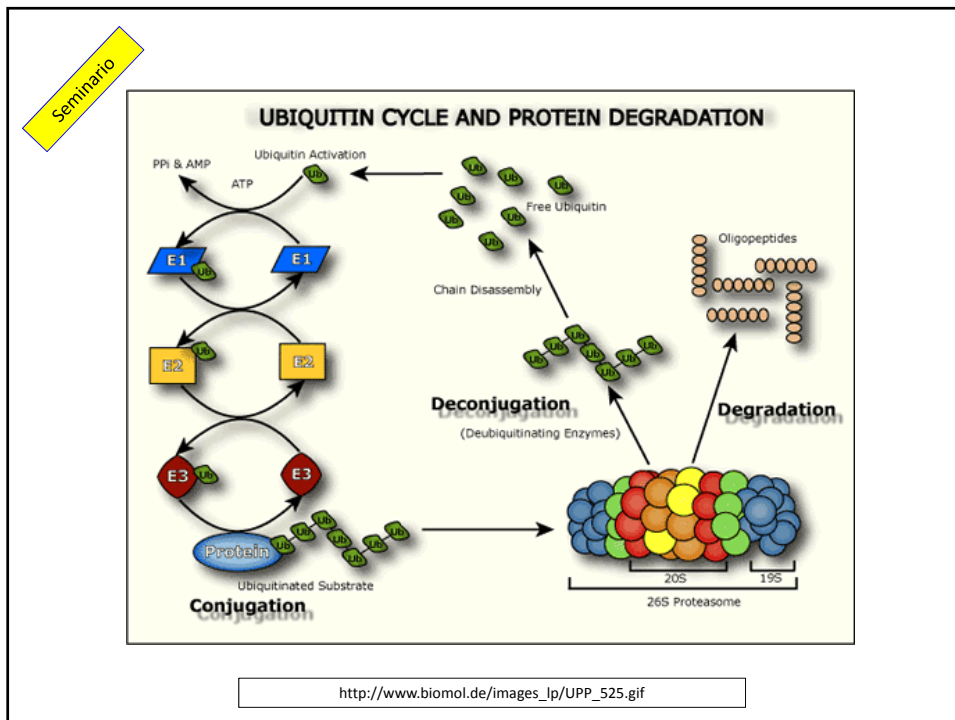
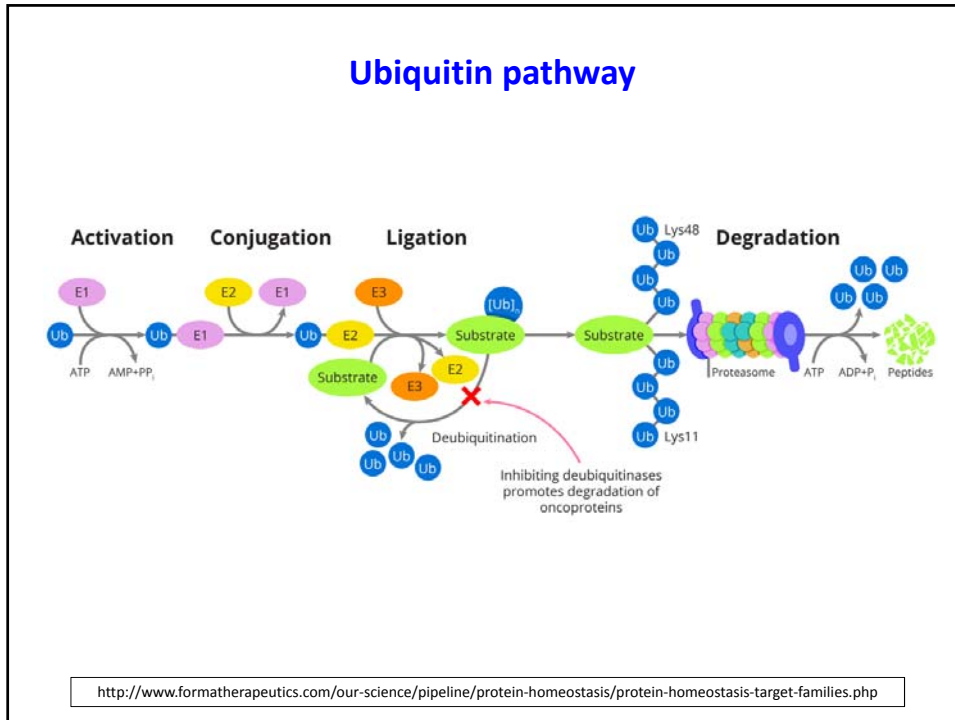
Ubiquitinazione



Glicina e lisina sono 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



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.^{[4][5][6]} 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).^[31]

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.^[31] **Monoubiquitination** affects cellular processes such as membrane trafficking, endocytosis and viral budding.^{[9][32]}

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.^[31] 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

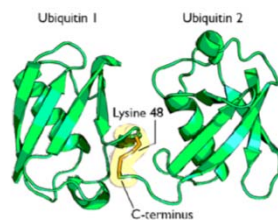


Diagram of lysine 48-linked diubiquitin. The linkage between the two ubiquitin chains is shown in orange.

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

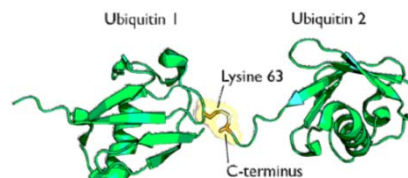


Diagram of lysine 63-linked diubiquitin. The linkage between the two ubiquitin chains is shown in orange.

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.^[9] 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.^{[38][39]}

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

Gli endosomi multivescicolari segregano le proteine di membrana destinate alle membrane lisosomiali dalle proteine destinate alla degradazione nei lisosomi (1)

- ✚ Le **proteine residenti nei lisosomi**, quali la pompa di classe V e i trasportatori degli aminoacidi, possono **svolgere le loro funzioni e rimanere nella membrana lisosomiale**, dove sono protetti dagli enzimi idrolitici solubili che lavorano nel lume.
- ✚ Tali proteine sono consegnate alla membrana lisosomiale mediante vescicole di trasporto che gemmano dalla rete trans del Golgi.
- ✚ Viceversa, le **proteine di membrana endocitate**, quali ad es. le proteine recettrici, che devono essere degradate, sono trasportate all'**interno** del lisosoma mediante un processo specializzato.
- ✚ Ci sono prove che le proteine di membrana endocitate siano incorporate in **vescicole specializzate che si formano dalla membrana endosomiale**.

Lodish et al., 7° ed. 2013

Gli endosomi multivescicolari segregano proteine di membrana destinate alle membrane lisosomiali dalle proteine destinate alla degradazione nei lisosomi (2)

- ✚ Nonostante le vescicole formate a partire dalle membrane endosomiali siano somiglianti in dimensione e aspetto alle vescicole di trasporto fra il reticolo e il Golgi, esse differiscono **topologicamente**.
- ✚ Le **vescicole di trasporto** gemmano verso l'esterno dalla superficie di un organello donatore in direzione al citosol, mentre **le vescicole all'interno dell'endosoma gemmano verso l'interno dalla superficie verso il lume** (ossia, allontanandosi dal citosol).
- ✚ Gli endosomi maturi contenenti numerose vescicole al loro interno son di solito chiamati endosomi tardivi o **corpi multivescicolari**.

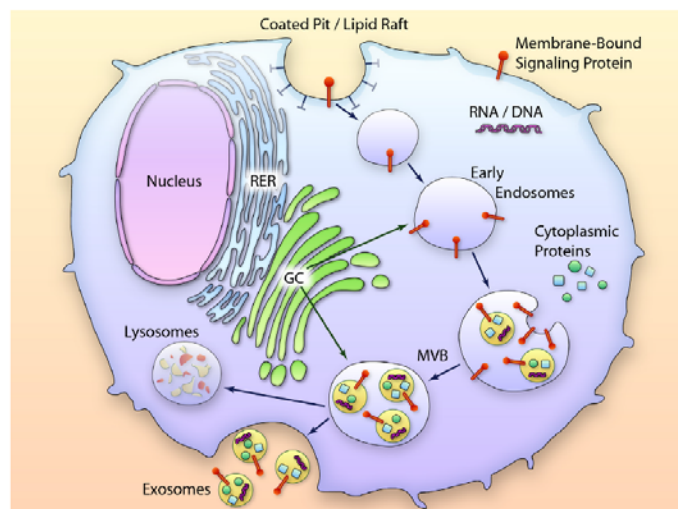
Lodish et al., 7° ed. 2013

Gli endosomi multivescicolari segregano proteine di membrana destinate alle membrane lisosomiali dalle proteine destinate alla degradazione nei lisosomi (3)

- ✚ La membrana superficiale di un endosoma multivescicolare si fonde con la membrana di un lisosoma così consegnando le sue vescicole interne e le proteine di membrana che esse contengono all'interno del lisosoma per degradazione.
- ✚ Perciò, lo smistamento delle proteine nella membrana endosomiale determina quali di esse rimangono sulla superficie del lisosoma (ad es. pompe e trasportatori) e quali saranno incorporate nelle vescicole interne e infine degradate nei lisosomi.

Lodish et al., 7° ed. 2013

RIASSUNTO DELLA BIOGENESI DEGLI EXOSOMI



Waldenström A, Ronquist G. **Role of exosomes in myocardial remodeling.** Circ Res. 2014 Jan 17;114(2):315-24.

Didascalia Figura di Waldenstrom & Ronquist, 2014

Figure 1. Biogenesis of exosomes. Exosomes are generated in the late endosomal compartment and carry recycled proteins from coated pits/lipid rafts in the cellular membrane, proteins directly sorted to the MVBs from RER and GC, mRNA, microRNA, and DNA. Note that the generation of exosomes by inward budding of the limiting membrane of MVB ensures that the membrane-bound proteins preserve the same orientation and folding on the exosomal membrane as those on the plasma membrane. The exosome-filled MVBs are either fused with the plasma membrane to release exosomes or sent to lysosomes for degradation. Exosomes are different from ectosomes and apoptotic bodies because the latter extracellular vesicles are the result of a direct budding process of the plasma membrane. GC indicates Golgi complex; MV, microvesicle internalized from the cellular membrane, early endosomes; MVB, multivesicular body; and RER, rough endoplasmic reticulum. The role of placental exosomes in reproduction. (Illustration credit: Ben Smith). Reprinted from Mincheva-Nilsson

Waldenström A, Ronquist G. Role of exosomes in myocardial remodeling. Circ Res. 2014 Jan 17;114(2):315-24.

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 eterogena e dipende dalla cellula di origine.
- ✚ **Cellule tumorali** e **neutrofili** producono vescicole arricchite di **enzimi proteolitici** e **metalloproteasi** per degradare la matrice extracellulare.
- ✚ Le **pastrine** generano vescicole che trasportano molecole critiche per la coagulazione del sangue: 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.

Espressione molecolare differenziale - 2

EXOSOMI:

- ✚ Viceversa, gli exosomi espongono in superficie molecole quali 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.



Alix
(ESCRT; adaptor/Scaffold)

- ✓ **Alix** an adaptor protein that may **regulate the function of receptor and cytoskeleton-associated tyrosine kinases**.
- ✓ A class E vacuolar protein sorting (VPS) factor involved in **concentration and sorting of cargo proteins of the multivesicular body (MVB) for incorporation into intraluminal vesicles**.
- ✓ Fusion between endosomes and the vacuole will then target the cargo proteins to the vacuolar lumen. In case of infection, the HIV-1 virus directly takes advantage of its function for viral exocytosis and budding, via its interaction with HIV-1 p6 protein.
- ✓ May play a role in the regulation of both apoptosis and cell proliferation.

https://www.google.it/search?q=wikipedia+Alix+protein&ie=utf-8&oe=utf-8&gws_rd=cr&ei=nGrxVo2gJ4mF6ATg-6TIBg#q=ALIX+protein

TSG101 protein: **Tumor susceptibility gene 101 protein**
 - Q99816 (TS101_HUMAN)

Function

Component of the ESCRT-I complex, a regulator of vesicular trafficking process. Binds to ubiquitinated cargo proteins and is required for the sorting of endocytic ubiquitinated cargos into multivesicular bodies (MVBs). Mediates the association between the ESCRT-0 and ESCRT-I complex. Required for completion of cytokinesis; the function requires CEP55. May be involved in cell growth and differentiation. Acts as a negative growth regulator. Involved in the budding of many viruses through an interaction with viral proteins that contain a late-budding motif P-[ST]-A-P. This interaction is essential for viral particle budding of numerous retroviruses. Required for the exosomal release of SDCBP, CD63 and syndecan .

<http://www.uniprot.org/uniprot/Q99816>

HSC70 Acts as a repressor of transcriptional activation.

Molecular Function: ATP binding; ATPase activity; ATPase activity, coupled; enzyme binding; G-protein-coupled receptor binding; heat shock protein binding; protein binding; ubiquitin protein ligase binding; unfolded protein binding.

<http://www.phosphosite.org/proteinAction?id=4119&showAllSites=true>

CD63 antigen is a protein that in humans is encoded by the CD63 gene. CD63 is mainly associated with membranes of intracellular vesicles, although cell surface expression may be induced. (<https://en.wikipedia.org/wiki/CD63>).

CD81 molecule, also known as CD81 (Cluster of Differentiation 81), is a protein which in humans is encoded by the CD81 gene.[1][2] It is also known as 26 kDa cell surface protein, TAPA-1 (Target of the Antiproliferative Antibody 1), and Tetraspanin-28 (Tspan-28). (<https://en.wikipedia.org/wiki/CD81>)

CD9

- The protein encoded by this gene is a member of the transmembrane 4 superfamily, also known as the **tetraspanin family**. Most of these members are cell-surface proteins that are characterized by the presence of four hydrophobic domains. The proteins **mediate signal transduction events that play a role in the regulation of cell development, activation, growth and motility**.
- CD9 is a cell surface glycoprotein that is known to complex with integrins and other transmembrane 4 superfamily proteins. It is found on the surface of exosomes. **It can modulate cell adhesion and migration and also trigger platelet activation and aggregation**. In addition, the protein appears to promote muscle cell fusion and support myotube maintenance. This protein also seems to be a key part in the egg-sperm fusion during mammalian fertilization. While oocytes are ovulated CD9-deficient oocytes are not properly fused with sperm upon fertilization. CD9 is located in the microvillar membrane of the oocytes and also appears to intervene in maintaining the normal shape of oocyte microvilli.

<https://en.wikipedia.org/wiki/CD9>

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 [‡]	Cup shape	Irregular shape and electron-dense	Bitamellar 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



Dr. Clotilde Théry

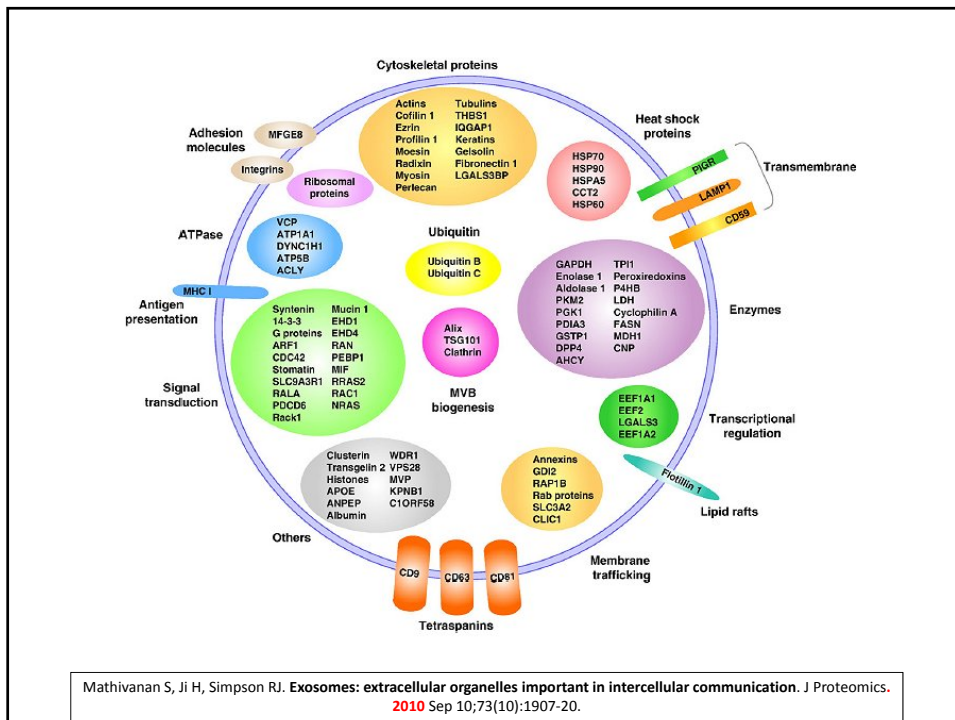
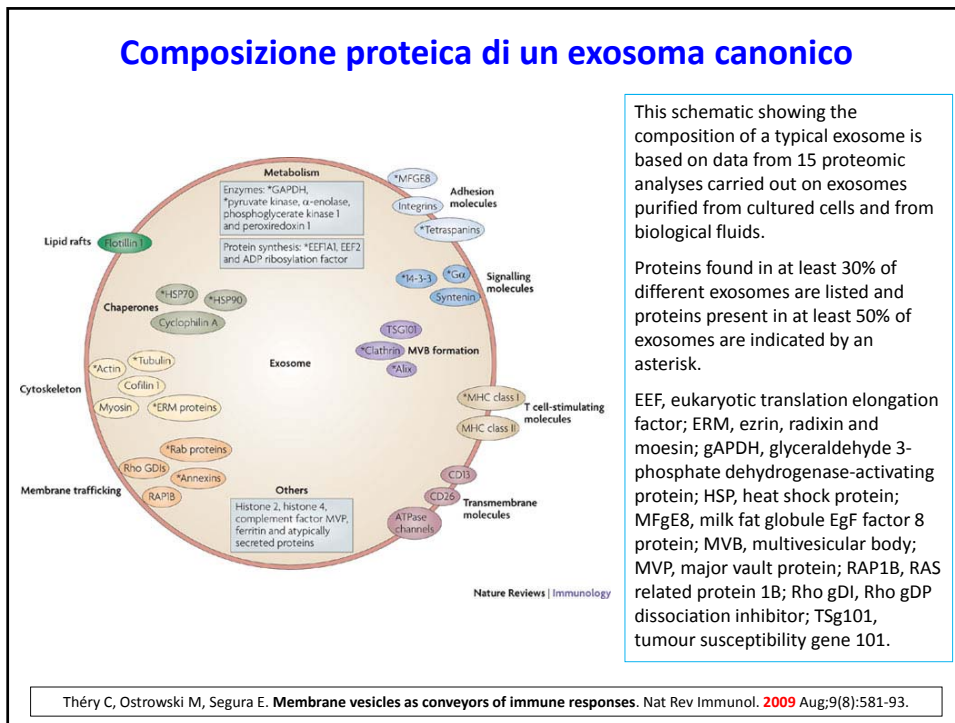
Research Director (DR2) at INSERM
Institute Curie
Scientific Advisory Board



Graça Raposo, Institut
Curie, Paris

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

Composizione proteica di un exosoma canonico



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⁺ and CD8⁺ T cells, CD20 (B cell)
- Platelet: CD41a, CD42a, CD42b, CD31⁺/CD42⁺, CD61, CD62b, CD62p
- Erythrocyte: CD235a
- Endothelial cell: CD31⁺/CD41⁻, 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.

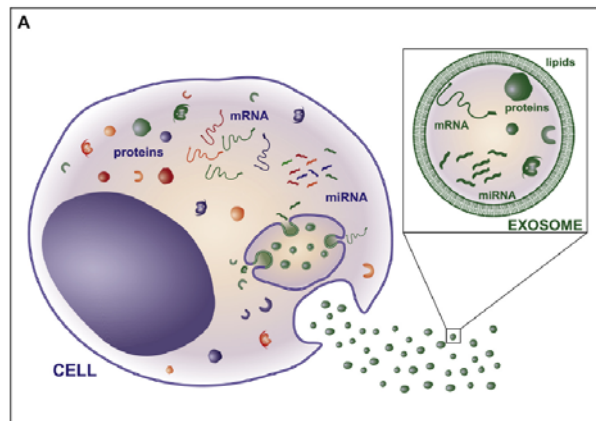
Abbreviation: TSG, tumour susceptibility gene.

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.

Composizione molecolare degli exosomi

- ✚ NON sono un mero riflesso della cellule.
- ✚ Al contrario, sono arricchiti in proteine, lipidi e RNA specifici, mentre altri sono assenti, indicando che l'esistenza di meccanismi specializzati che controllano lo smistamento delle molecole negli exosomi

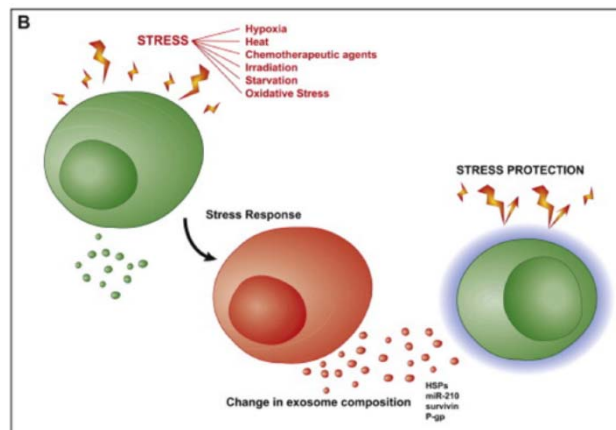
Villarroya-Beltri C, Baixauli F, Gutiérrez-Vázquez C, Sánchez-Madrid F, Mittelbrunn M. **Sorting it out: regulation of exosome loading.** Semin Cancer Biol. 2014 Oct;28:3-13.



Gli exosomi contengono repertori specifici di proteine, RNAs e lipidi.

(A) La composizione molecolare degli exosomi non è un riflesso della cellula. Gli exosomi sono arricchiti in proteine, lipidi e RNA specifici, mentre altri sono assenti, indicando l'esistenza di meccanismi specializzati che controllano lo smistamento di molecole verso gli exosomi.

Villarroya-Beltri C, Baixauli F, Gutiérrez-Vázquez C, Sánchez-Madrid F, Mittelbrunn M. **Sorting it out: regulation of exosome loading.** Semin Cancer Biol. 2014 Oct;28:3-13.

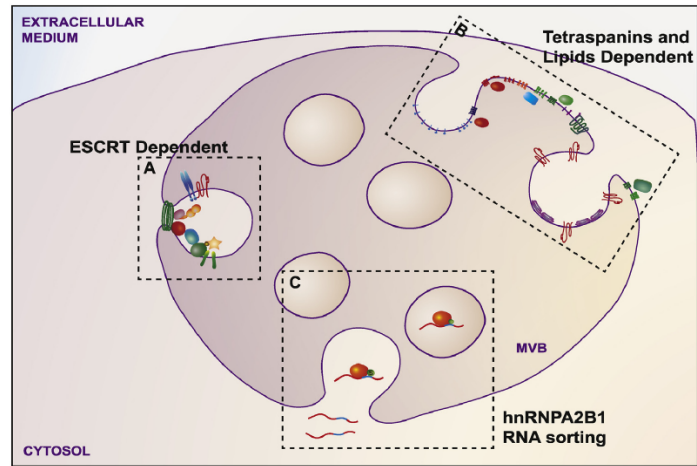


Gli exosomi contengono repertori specifici di proteine, RNAs e lipidi.

(B) Le alterazioni indotte da stress nella composizione in RNA e proteine exosomiali possono influenzare la risposta di cellule distanti allo stress fornendo segnali protettivi (sorveglianza, resistenza ai farmaci, ecc.)

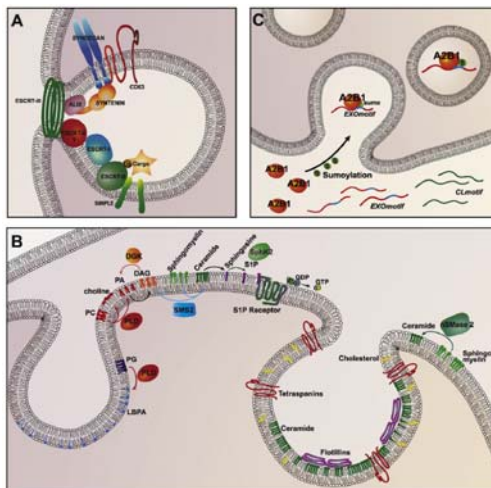
Villarroya-Beltri C, Baixauli F, Gutiérrez-Vázquez C, Sánchez-Madrid F, Mittelbrunn M. **Sorting it out: regulation of exosome loading.** Semin Cancer Biol. 2014 Oct;28:3-13.

MECHANISMS OF CARGO SORTING INTO EXOSOMES



Villarroya-Beltri C, Baixauli F, Gutiérrez-Vázquez C, Sánchez-Madrid F, Mittelbrunn M. **Sorting it out: regulation of exosome loading.** *Semin Cancer Biol.* 2014 Oct;28:3-13.

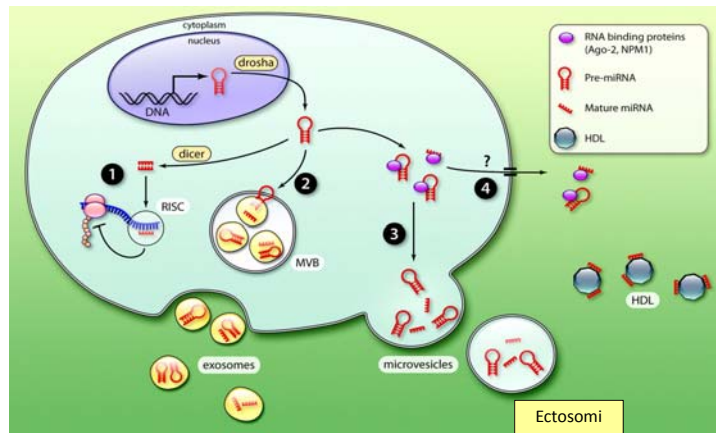
MECHANISMS OF CARGO SORTING INTO EXOSOMES



Mechanisms that control the sorting of cargo into exosomes

(A) Endosomal Sorting Complexes Required for Transport (ESCRT) 0, I and III, and Alix accessory protein control the sorting of ubiquitinated proteins into the intraluminal vesicles of multivesicular bodies (MVBs). Syntenin and the Small integral membrane protein of the lysosome/late endosome (SIMPLE) are also involved in exosome secretion through their interaction with specific components of the ESCRT complex. (B) Tetraspanins (CD81, CD9, CD63) play a key role in the composition of ESCRT-independent exosomes. Different lipids and lipid-related enzymes control the secretion of these exosomes. nSMase2: neutral sphingomyelinase 2; S1P: sphingosine-1-phosphate; SphK2: sphingosine kinase 2; DAG: diacylglycerol; SMS2: sphingomyelin synthase 2; PA: phosphatidic acid; PC: phosphatidyl choline; PLD: phospholipase D; LBPAs: lysophosphatidic acid. (C) Sumoylated hnRNP A2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific short motifs (EXOmotif).

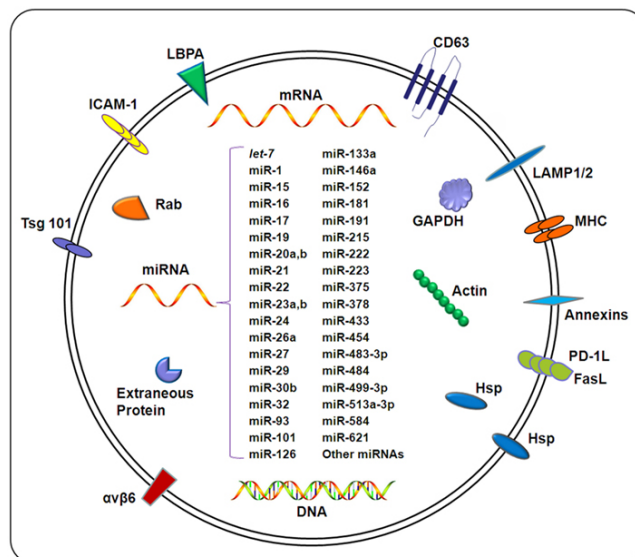
Villarroya-Beltri C, Baixauli F, Gutiérrez-Vázquez C, Sánchez-Madrid F, Mittelbrunn M. **Sorting it out: regulation of exosome loading.** *Semin Cancer Biol.* 2014 Oct;28:3-13.



RNA

Microvescicole

<http://circresearch.com/gallery/tag/exosomes/>



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

Carico di RNA negli exosomi -1

- ✚ Gli exosomi contengono **RNA** che possono essere **incorporati nelle cellule riceventi**.
- ✚ Il trasferimento di vescicole cariche di RNA gioca un ruolo chiave in diversi contesti e patologie.
- ✚ Il contenuto in RNA è particolarmente ricco di piccoli RNA che includono **miRNA** funzionanti nelle cellule riceventi.
- ✚ C'è sicuramente un sistema che regola **quali miRNA verranno smistati negli exosomi** dato che alcuni miRNA sono particolarmente concentrati mentre altri sono appena presenti.
- ✚ E' stato identificato un **motivo EXO-specifico (GGAG)** che **controlla il carico di questi miRNA negli exosomi**.
- ✚ Il motivo media il **legame ad una ribonucleoproteina eterogena A2B1 (hnRNP A2B1)** che **controlla il carico di questi miRNA negli exosomi**.

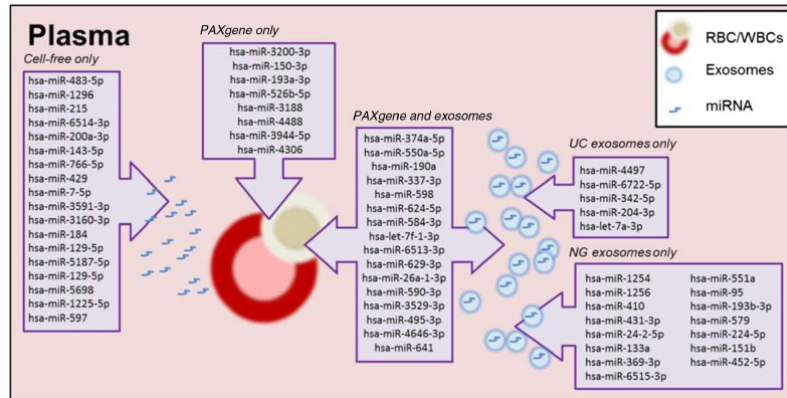
Villarroya-Beltri C, Baixauli F, Gutiérrez-Vázquez C, Sánchez-Madrid F, Mittelbrunn M. **Sorting it out: regulation of exosome loading**. Semin Cancer Biol. 2014 Oct;28:3-13.

Carico di RNA negli exosomi -2

- ✚ Oltre ai miRNA, gli exosomi trasportano **mRNA**, che pure sembrano avere un arricchimento specifico.
- ✚ Gli mRNA presenti negli exosomi sono particolarmente **ricchi di frammenti non tradotti nell'estremità 3' (3'UTR)** che sembrano essere importanti per lo **smistamento degli specifici mRNA in queste vescicole**.
- ✚ Esami con metodologie più moderne (NGS) hanno rivelato che gli RNA più abbondanti non sono i miRNAs nè gli mRNA ma l'RNA ribosomale (rRNA), diversi RNA strutturali (v-RNA, Y-RNA e SRP-RNA) e tRNA.

Villarroya-Beltri C, Baixauli F, Gutiérrez-Vázquez C, Sánchez-Madrid F, Mittelbrunn M. **Sorting it out: regulation of exosome loading**. Semin Cancer Biol. 2014 Oct;28:3-13.

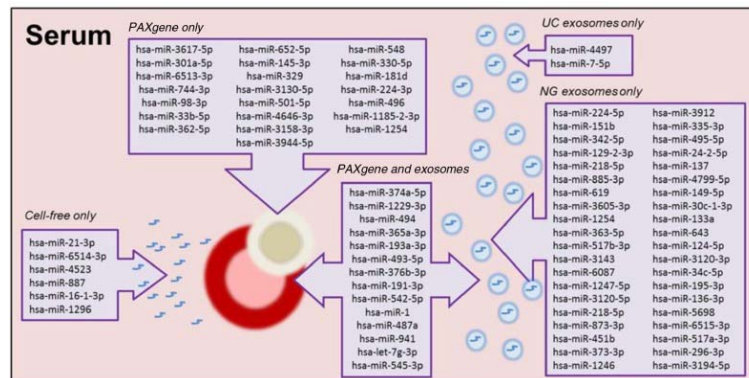
Riassunto schematico di miRNA caratteristici (“unique”) identificati in campioni intracellulari, “cell-free” ed exosomal preparati dal plasma (1)



Cheng L, Sharples RA, Scicluna BJ, Hill AF. Exosomes provide a protective and enriched source of miRNA for biomarker profiling compared to intracellular and cell-free blood. *J Extracell Vesicles*. 2014 Mar 26;3. doi: 10.3402/jev.v3.23743.

Riassunto schematico di miRNA caratteristici (“unique”) identificati in campioni intracellulari, “cell-free” ed exosomal preparati dal plasma (2)

Siero: plasma - fibrinogeno



Cheng L, Sharples RA, Scicluna BJ, Hill AF. Exosomes provide a protective and enriched source of miRNA for biomarker profiling compared to intracellular and cell-free blood. *J Extracell Vesicles*. 2014 Mar 26;3. doi: 10.3402/jev.v3.23743.