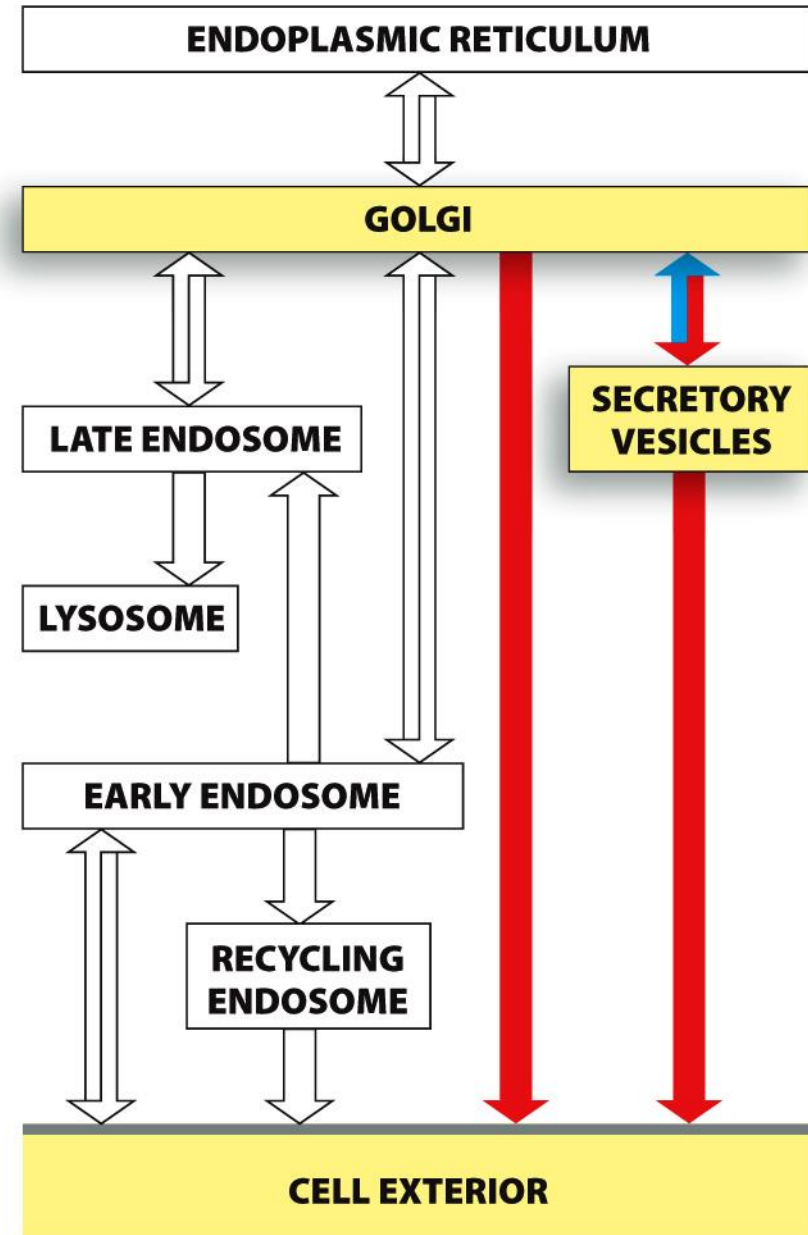


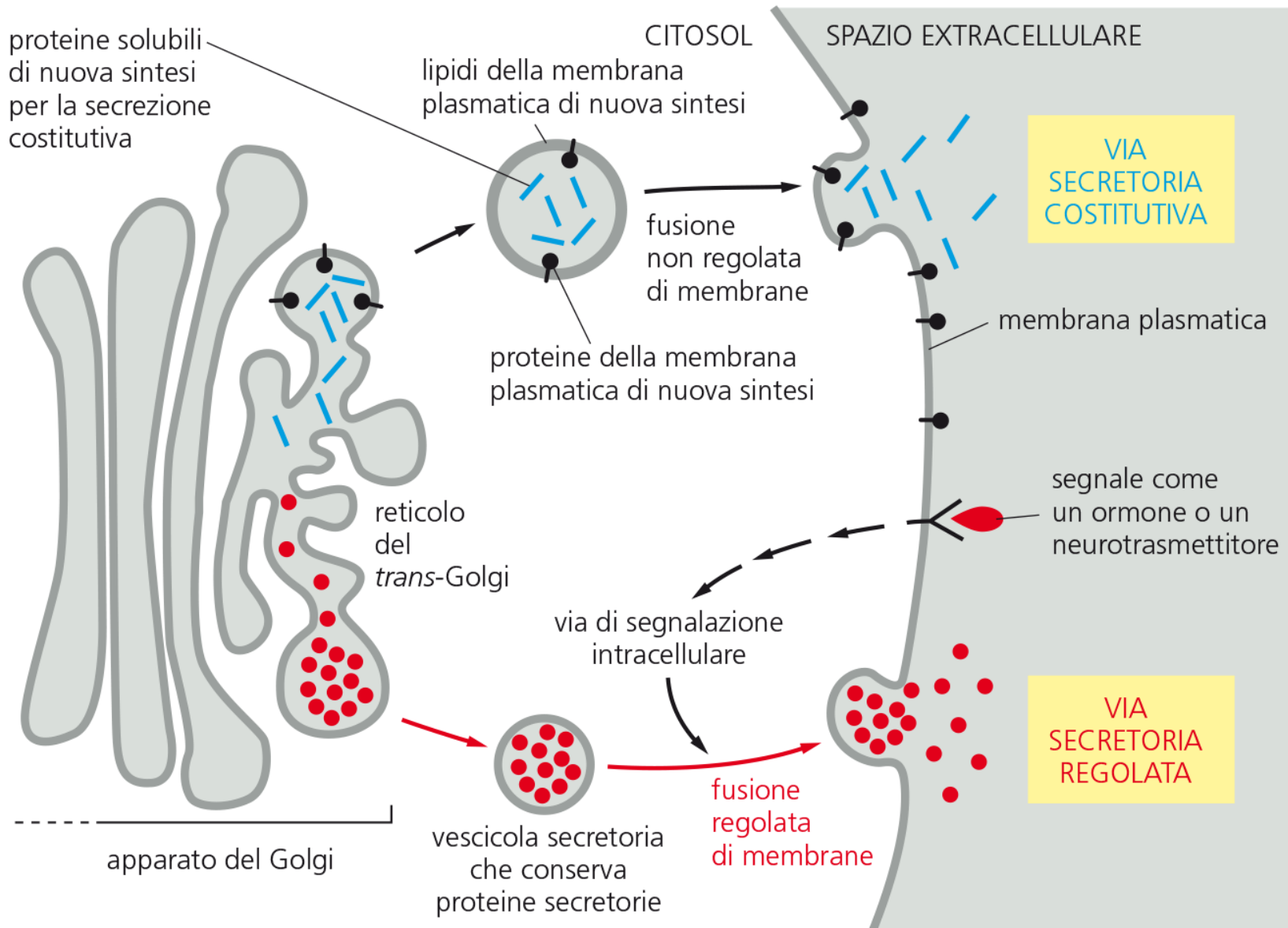
# **Trasporto vescicolare – esocitosi**

# Il trasporto dal TGN all'esterno della cellula esocitosi

- Le vescicole lasciano il TGN in un flusso continuo di tubuli
- Vengono trasportati lipidi e proteine per la membrana plasmatica e proteine e proteoglicani per la secrezione (matrice extracellulare)

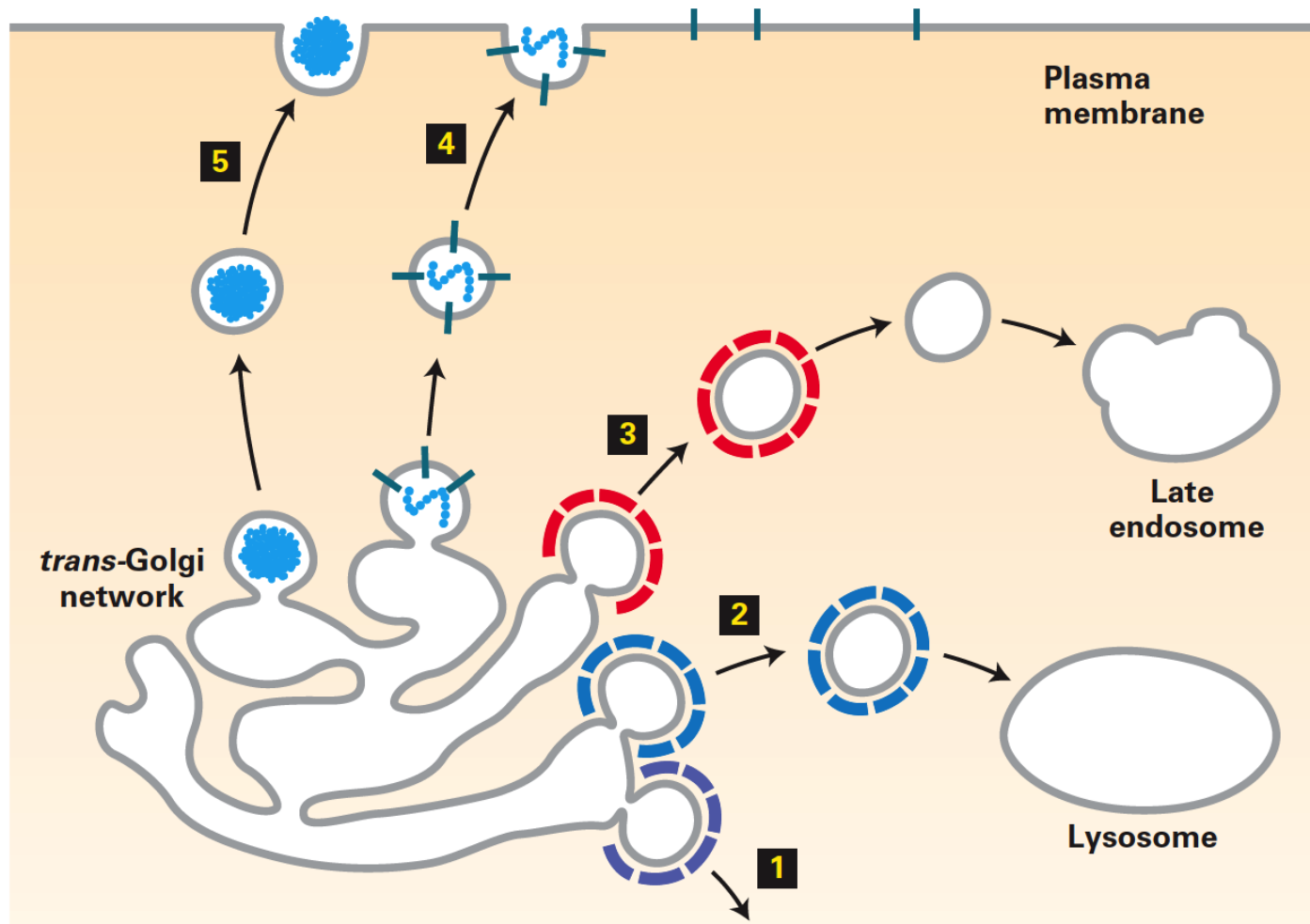


- Tutte le cellule hanno una **via secretoria costitutiva**
- Alcune cellule specializzate hanno una **via secretoria regolata**

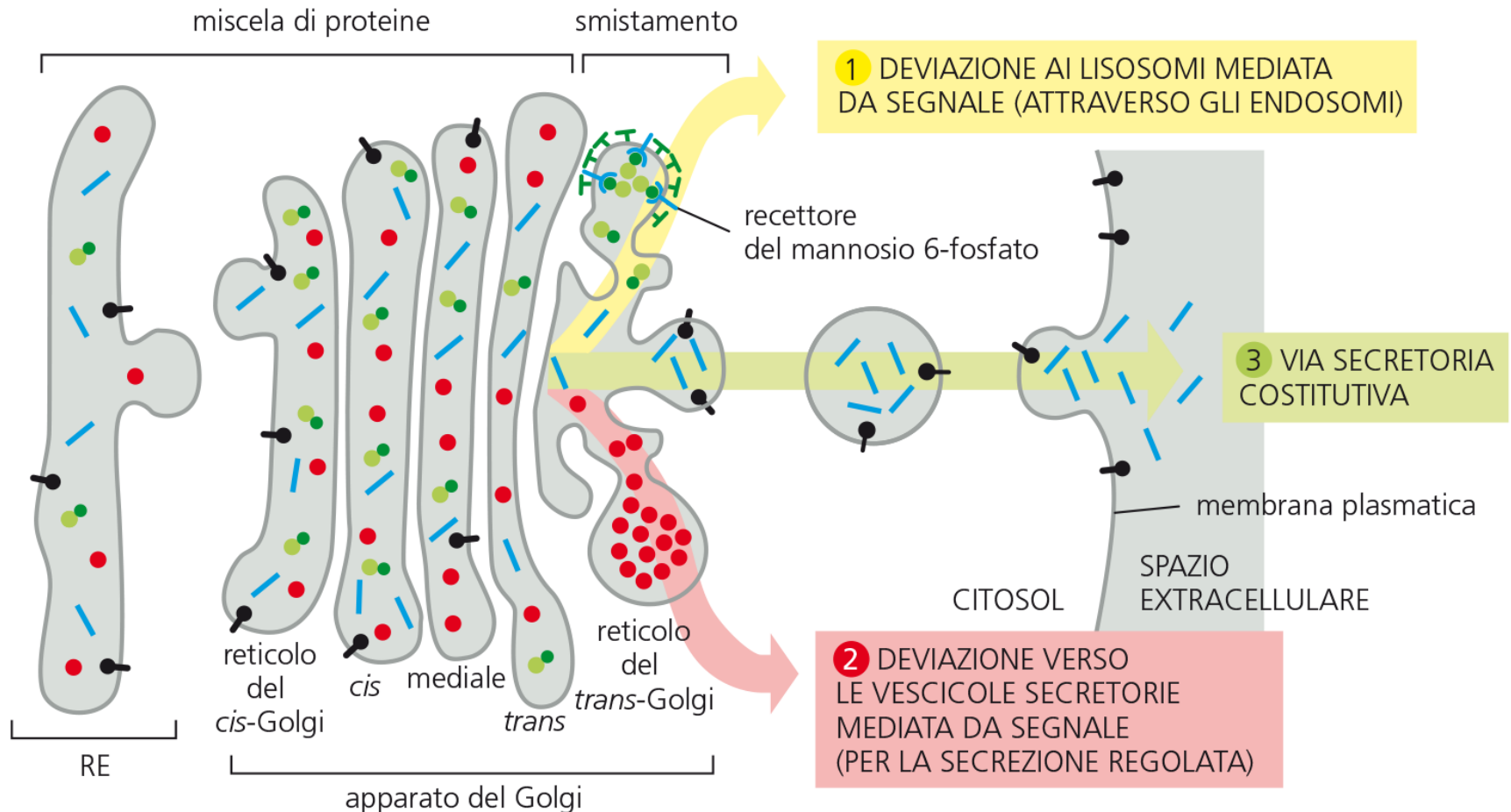


Nelle cellule con una via secretoria regolata, le proteine nel TGN hanno 3 possibili destinazioni:

- I lisosomi
- Le vescicole secretorie
- La membrana plasmatica



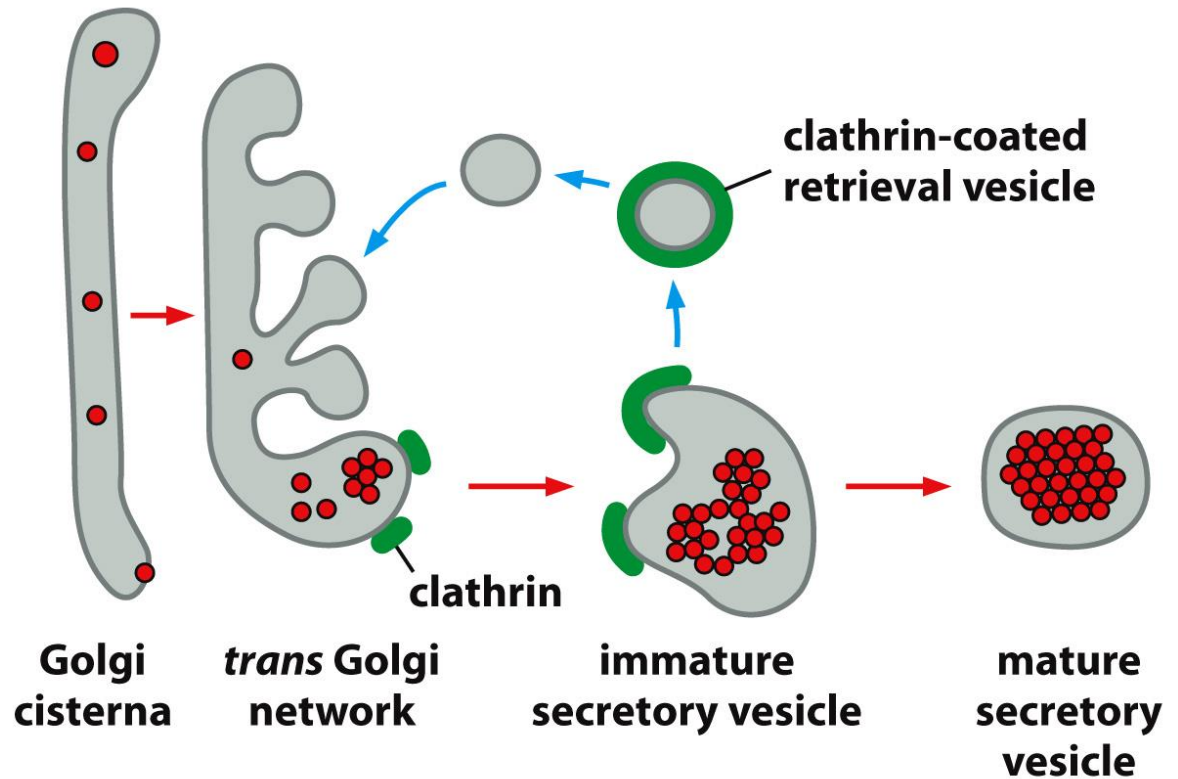
Nelle cellule non polarizzate le proteine non legate a M6P vanno alla membrana plasmatica (**via di default**), che non necessita di segnali particolari.



Le cellule con una via secretorie regolata formano **vescicole secretorie (o granuli secretori)** dal TGN. Queste rilasciano all'esterno il loro contenuto a seguito di un segnale.

Il meccanismo con cui le proteine secretorie vengono selettivamente impacchettate nel TGN non è noto ma richiede l'aggregazione delle proteine secretorie.

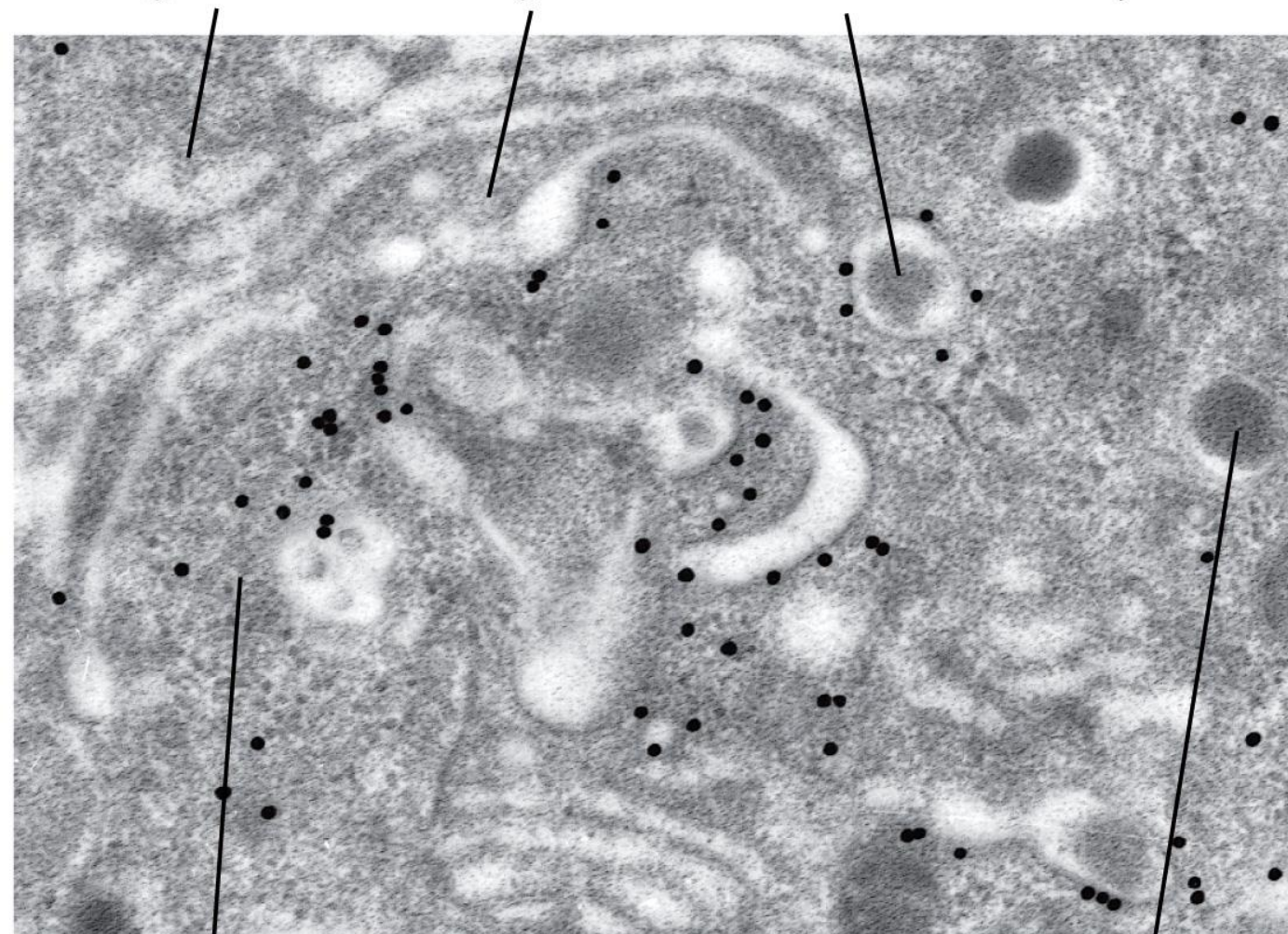
Inizialmente si formano vescicole immature che poi si fondono e concentrano il contenuto, e lasciano il Golgi con vescicole di clatrina. Il lume si acidifica.



**CARGO CONCENTRATION**



***cis* Golgi network**   **Golgi stack**   **immature secretory vesicle**



***trans* Golgi network**

200 nm

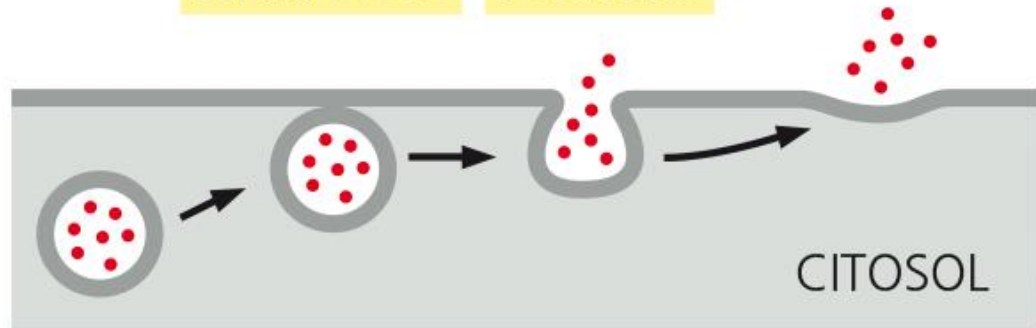
**mature secretory vesicle**

Cellule  $\beta$  del pancreas

Il rivestimento di clatrina (•) presente nelle vescicole secretorie immature viene perso nelle vescicole mature. Le vescicole mature sono più elettrondense.

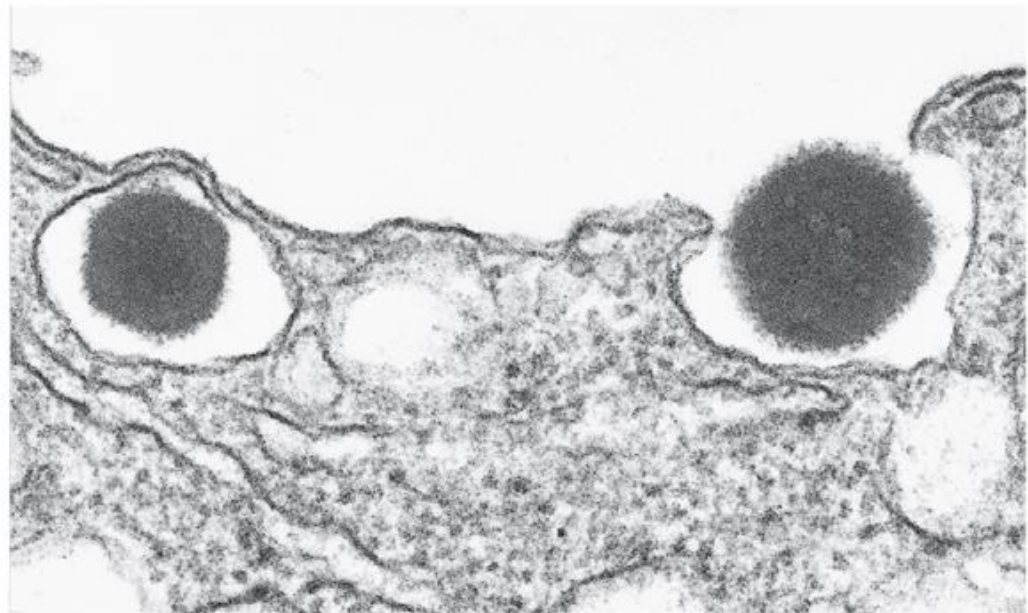
Figure 13-64b Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

ATTRACCO FUSIONE



La cellula scarica  
grosse quantità di  
materiale mediante  
esocitosi.

Quella rappresentata  
qui è insulina.



0,2  $\mu\text{m}$

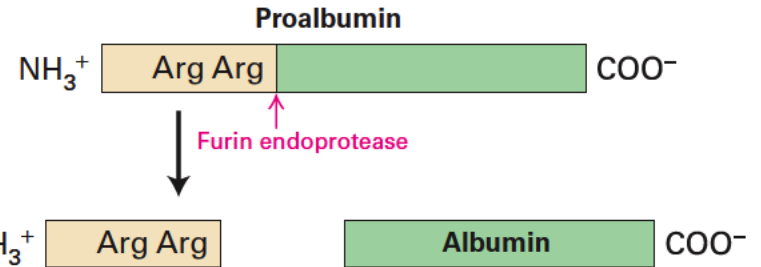


# Tagli proteolitici

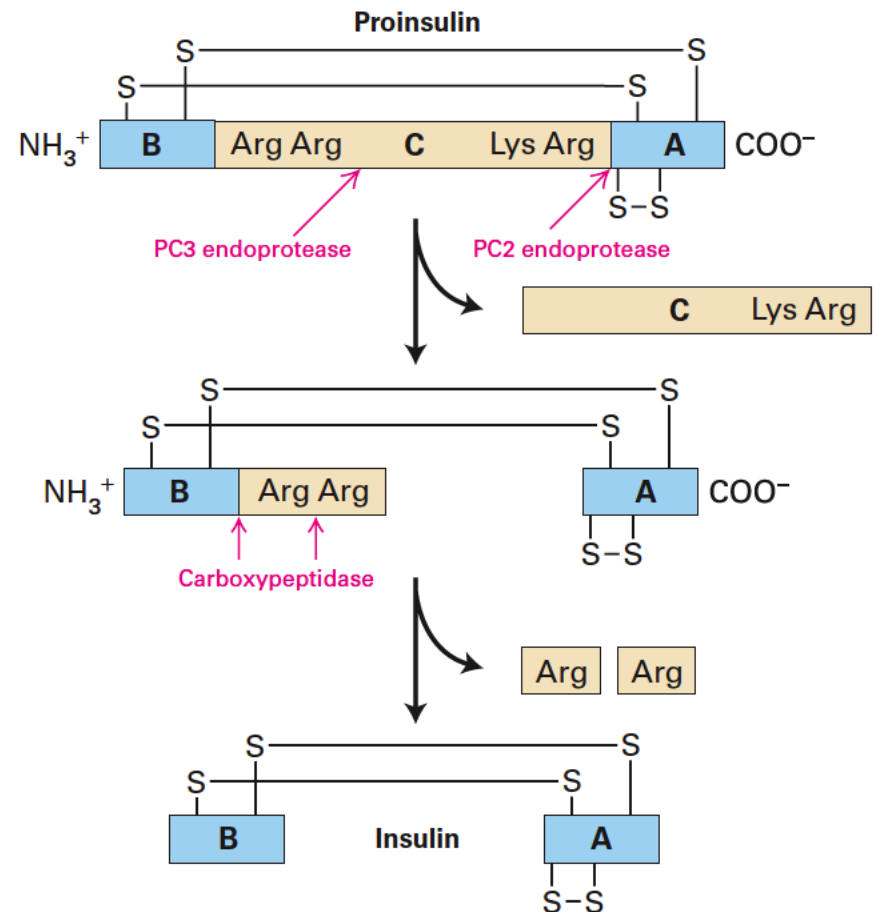
I precursori delle proteine secretorie sono spesso processati proteoliticamente durante la formazione delle vescicole secretorie.

I tagli proteolitici avvengono ad opera di proteasi presenti nelle vescicole o subito dopo la secrezione.

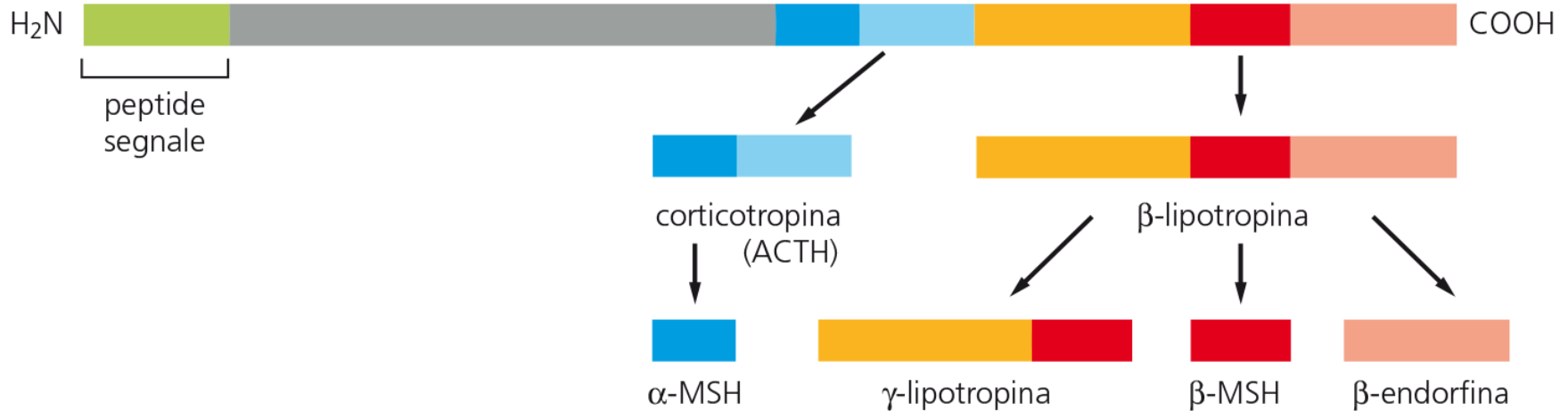
Alcune proteine sono prodotte come **pre-pro-proteine**.



(b) Regulated secreted proteins



# Peptidi pro-opiomelanocortinici



Altre, come i peptidi pro-opiomelanocortinici, sono prodotte come **poliproteine**. Numerosi tagli generano ormoni diversi in regioni diverse dell'ipofisi.

# Vescicole secretorie nelle cellule nervose

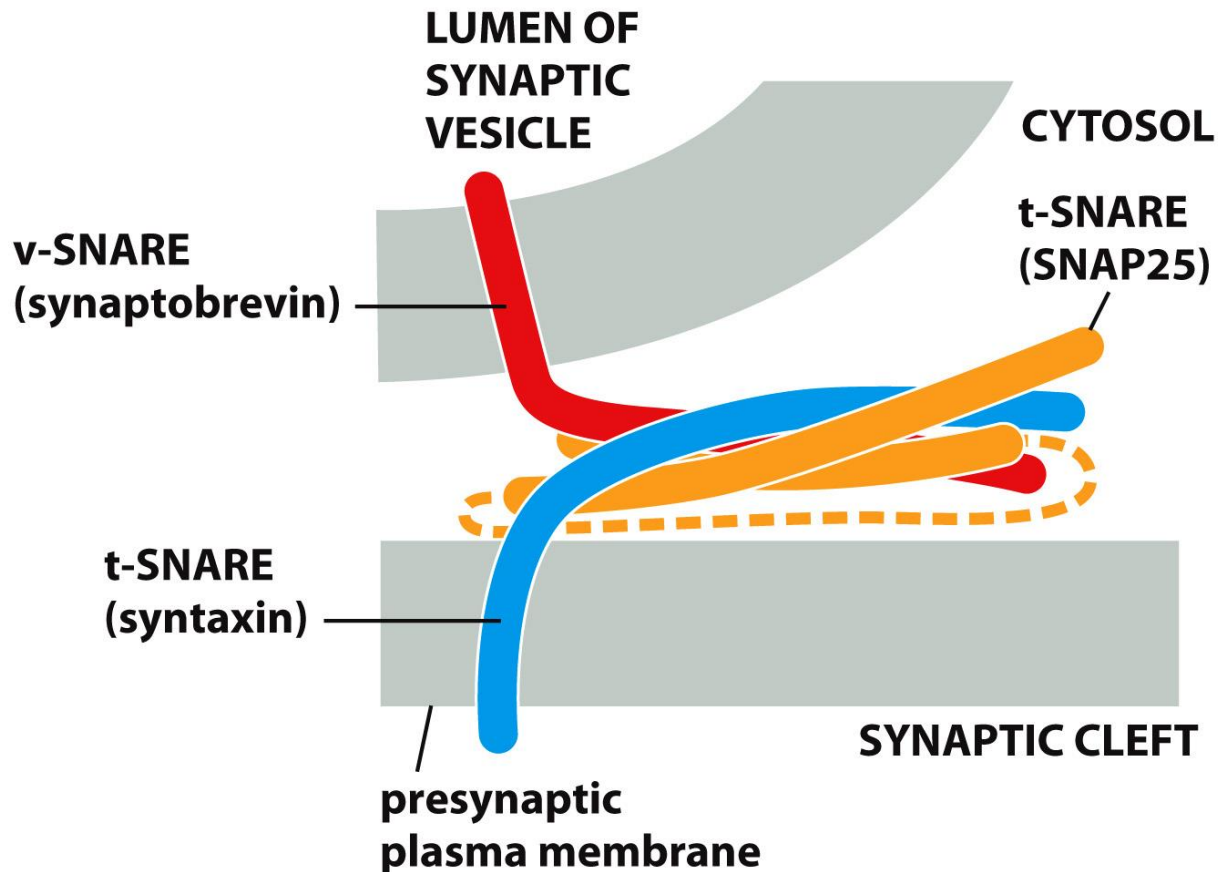
Le vescicole secretorie restano in attesa del segnale per la secrezione.

Nelle cellule nervose il TGN può essere molto distante dalla terminazione nervosa; le vescicole secretorie devono quindi viaggiare lungo l'assone, grazie ai microtubuli.

Le cellule nervose possiedono anche un tipo specializzato di vescicole secretorie dette **vescicole sinaptiche**, che immagazzinano piccoli neurotrasmettitori come acetilcolina, glutammato, glicina o GABA.

La fusione delle vescicole sinaptiche con la membrana plasmatica è indotta da un **aumento di  $Ca^{2+}$**  all'arrivo del potenziale d'azione.

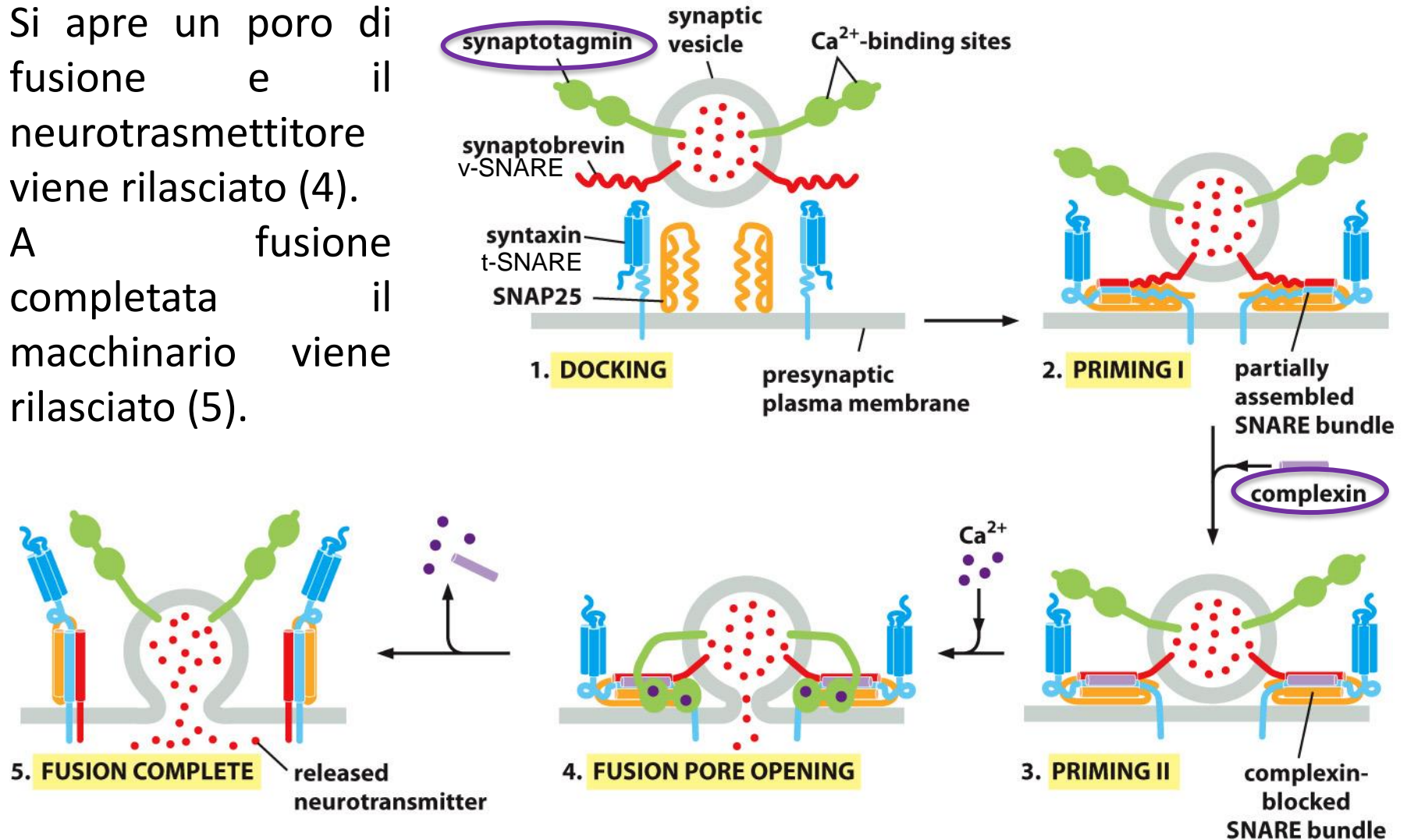
Il rilascio delle vescicole deve essere rapidissimo. Questo è possibile perché quando le vescicole sono attaccate alla membrana presinaptica subiscono una fase di preparazione, nella quale le SNARE sono accoppiate, ma senza avvolgimento delle eliche, perché sono bloccate in questo stadio metastabile da proteine dette **complexine**.



Le SNARE aderiscono ma la **complessina** blocca la fusione (1,2 e 3). Il rilascio di  $\text{Ca}^{2+}$  innesca il legame della **sinaptotagmina** (che lega calcio) alle SNARE, scalzando la complessina (4).

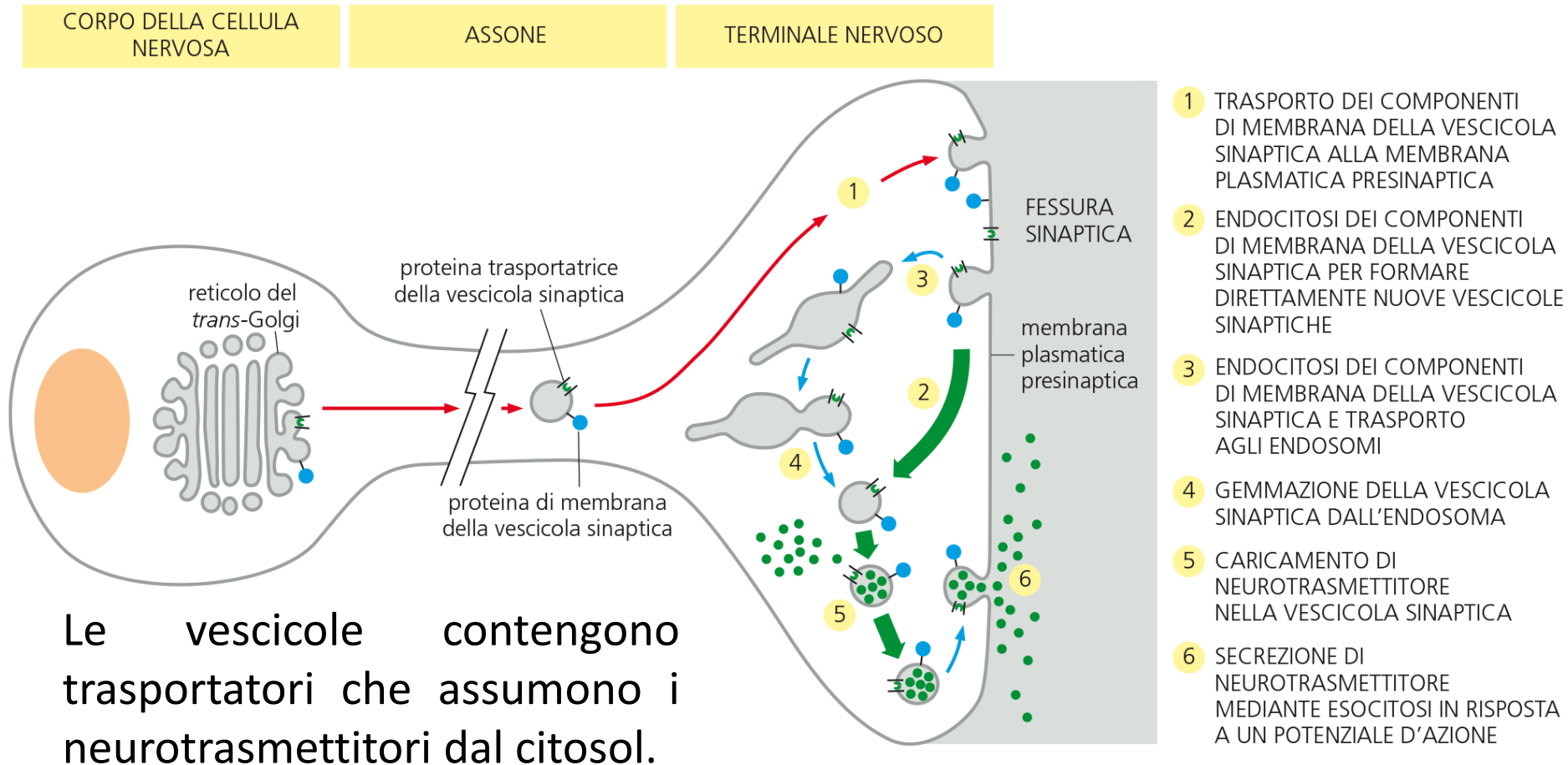
Si apre un poro di fusione e il neurotrasmettore viene rilasciato (4).

A fusione completata il macchinario viene rilasciato (5).



# Per una risposta veloce, le vescicole vengono riciclate dalla membrana plasmatica presinaptica

I componenti vengono portati alla membrana dalla via secretoria e recuperati per endocitosi.



Le vescicole contengono trasportatori che assumono i neurotrasmettitori dal citosol.



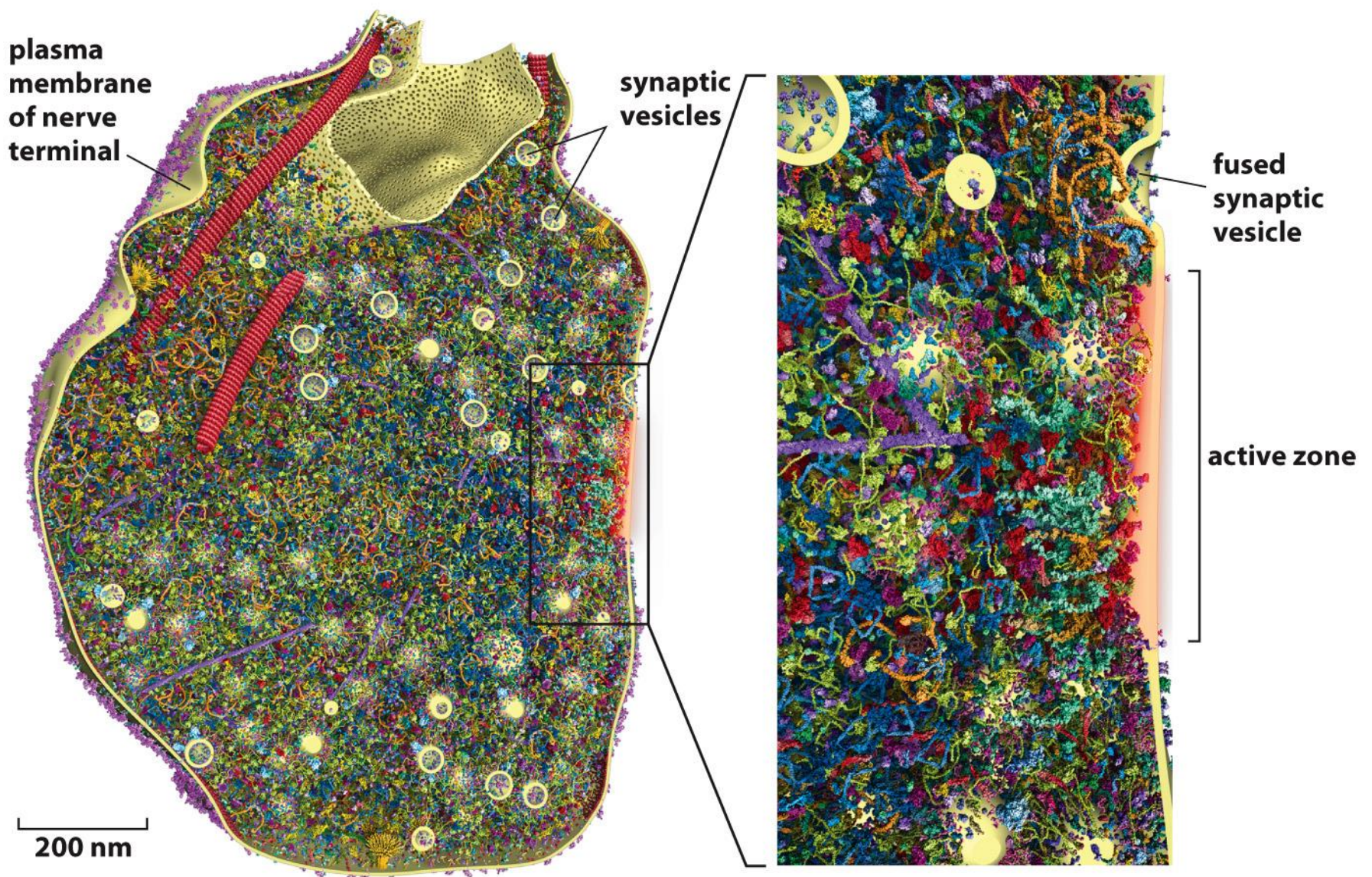
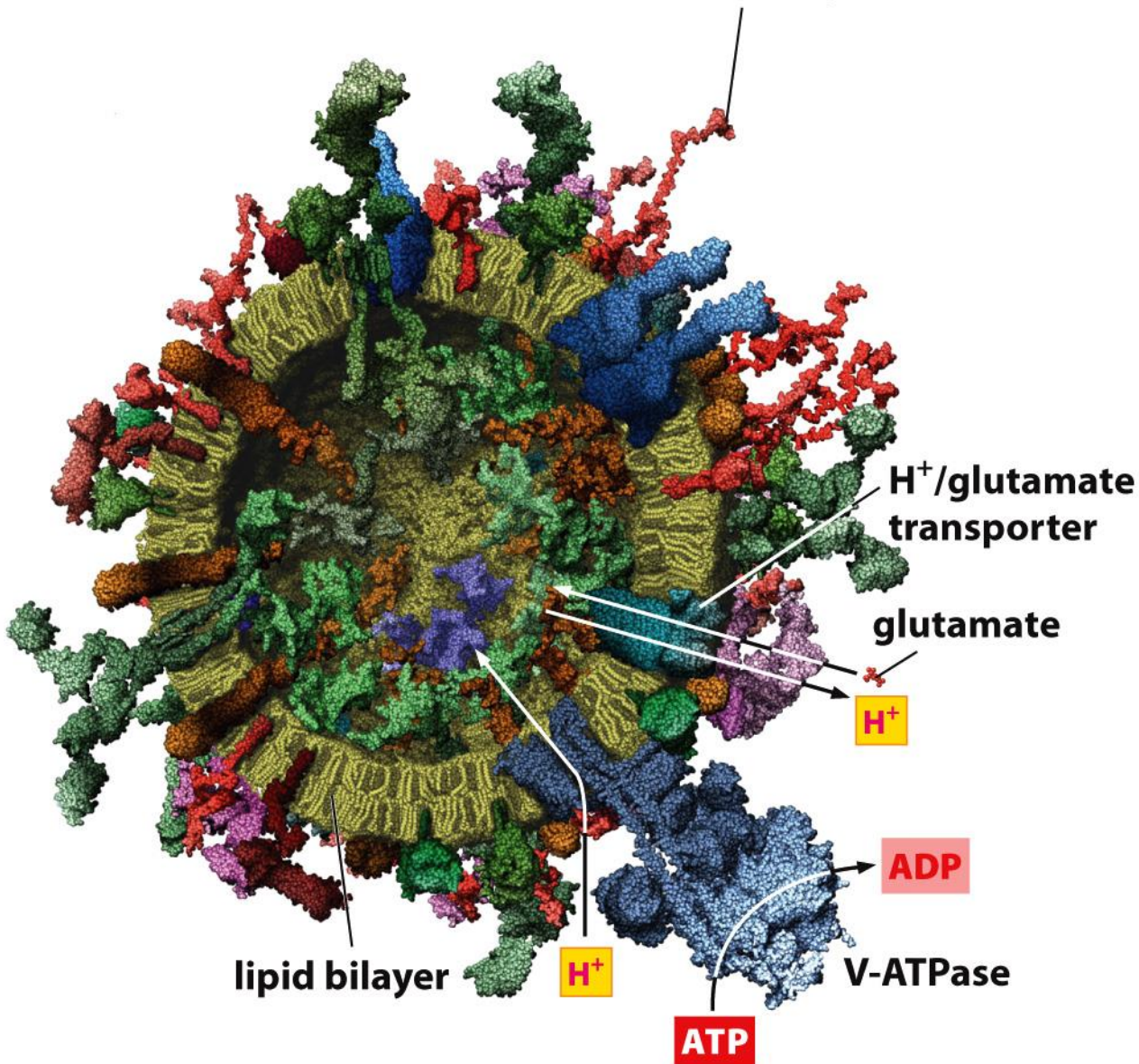


Figure 13-69 (part 1 of 2) Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Modello di **terminale presinaptico**: contiene 300.000 proteine di 60 tipi diversi; l'ingrandimento rappresenta il 70% delle proteine realmente presenti.



**v-SNARE (synaptobrevin)**

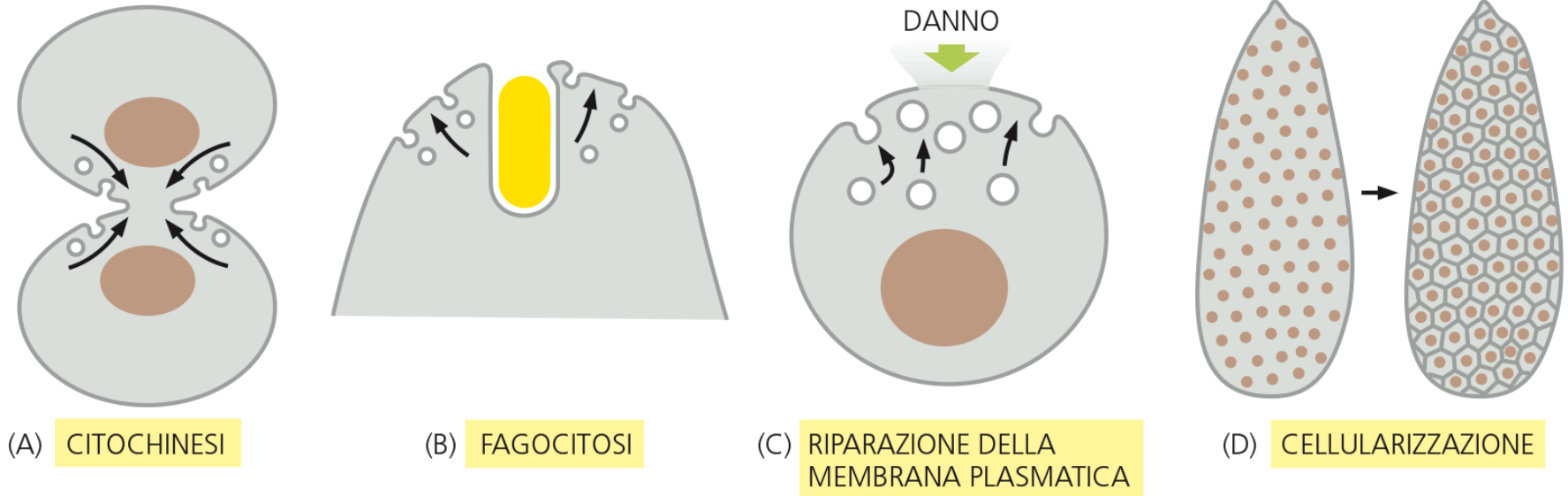


Modello di una  
**vescicola**  
**presinaptica**, che  
contiene:

- 7000 fosfolipidi
- 5700 molecole di colesterolo
- 50 diversi tipi di proteine integrali di membrana

Figure 13-69 (part 2 of 2) Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

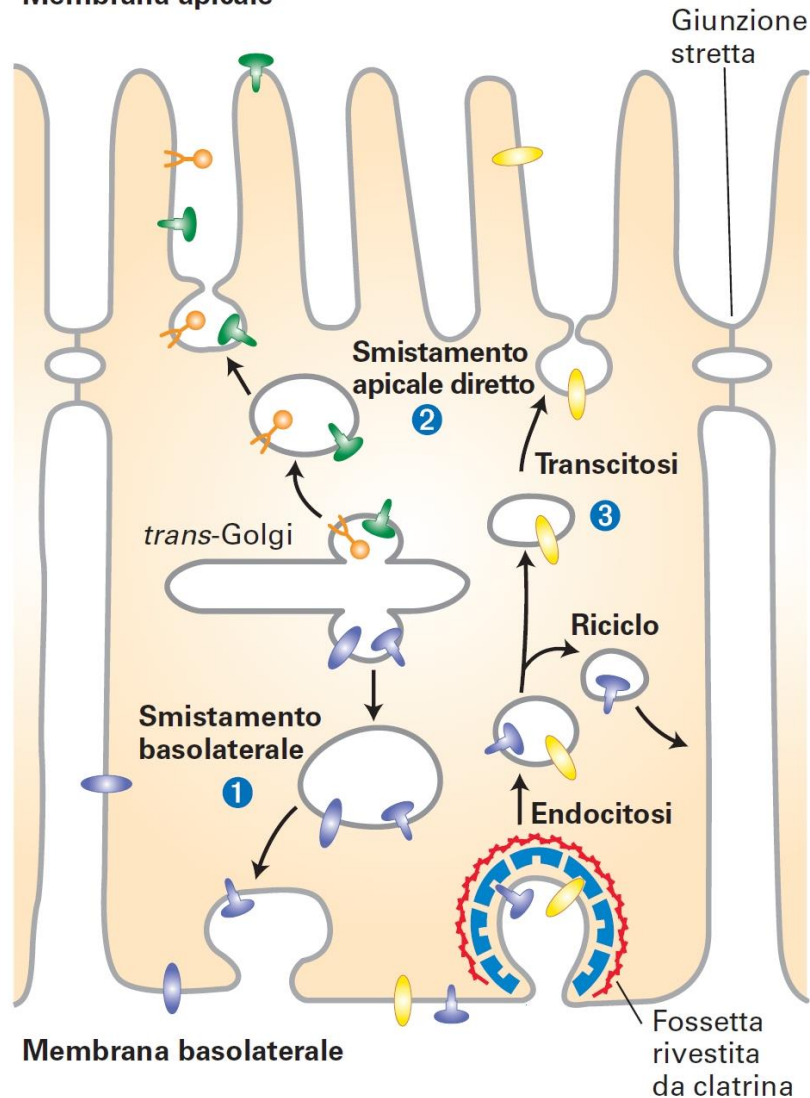
# L'esocitosi permette di ingrandire la membrana plasmatica



Esempi di esocitosi regolata che portano ad un ingrandimento della membrana plasmatica:

- Citochinesi e fagocitosi – la membrana deriva dagli endosomi
- Riparazione – deriva dai lisosomi
- Cellularizzazione di un embrione, che inizialmente è un sincizio con molti nuclei – deriva dalle vescicole citoplasmatiche

Membrana apicale



Membrana basolaterale

Proteine apicali

- Proteina con àncora GPI
- Glicoproteina HA dell'influenza
- Proteina trasportata tramite transcitosi

Proteine basolaterali

- Proteina G del VSV
- Proteina basolaterale

# Cellule polarizzate

Nelle cellule polarizzate la membrana basolaterale e quella apicale sono morfologicamente e funzionalmente diverse. Le giunzioni strette separano i due domini della membrana.

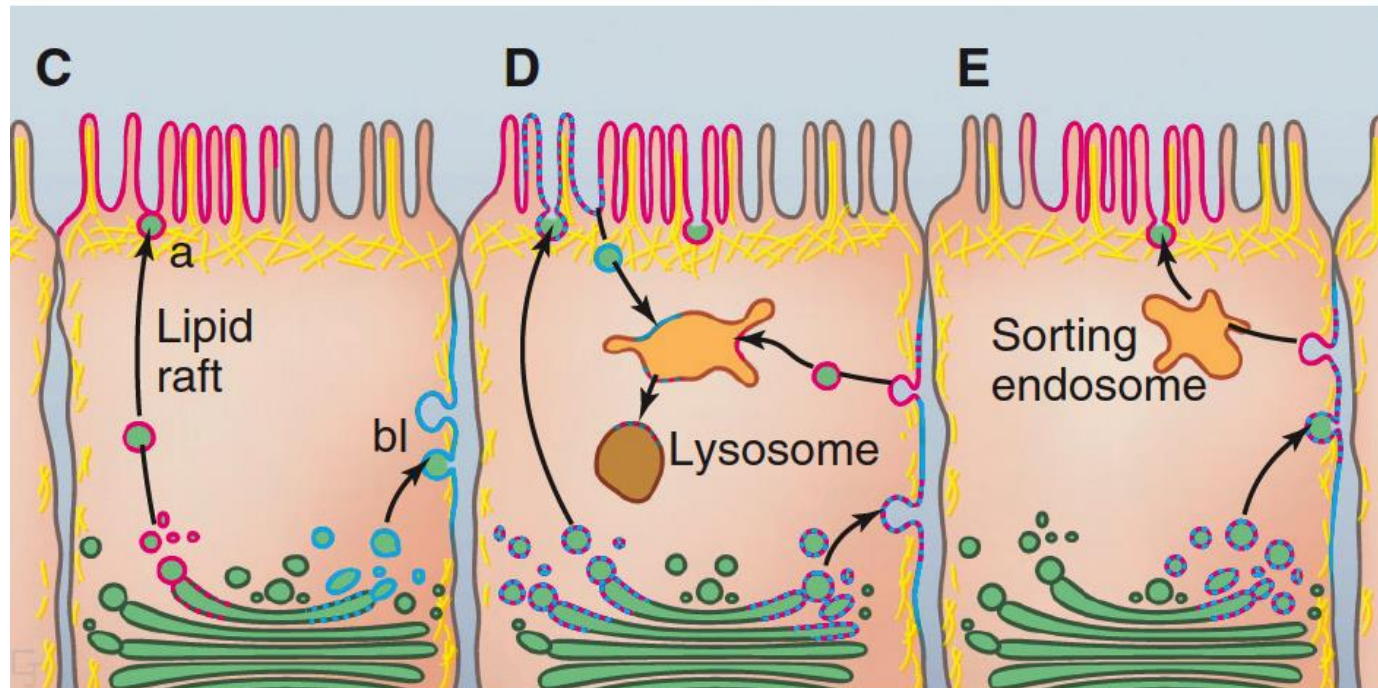
La membrana apicale è ricca di sfingolipidi e proteine attaccate mediante ancore GPI.

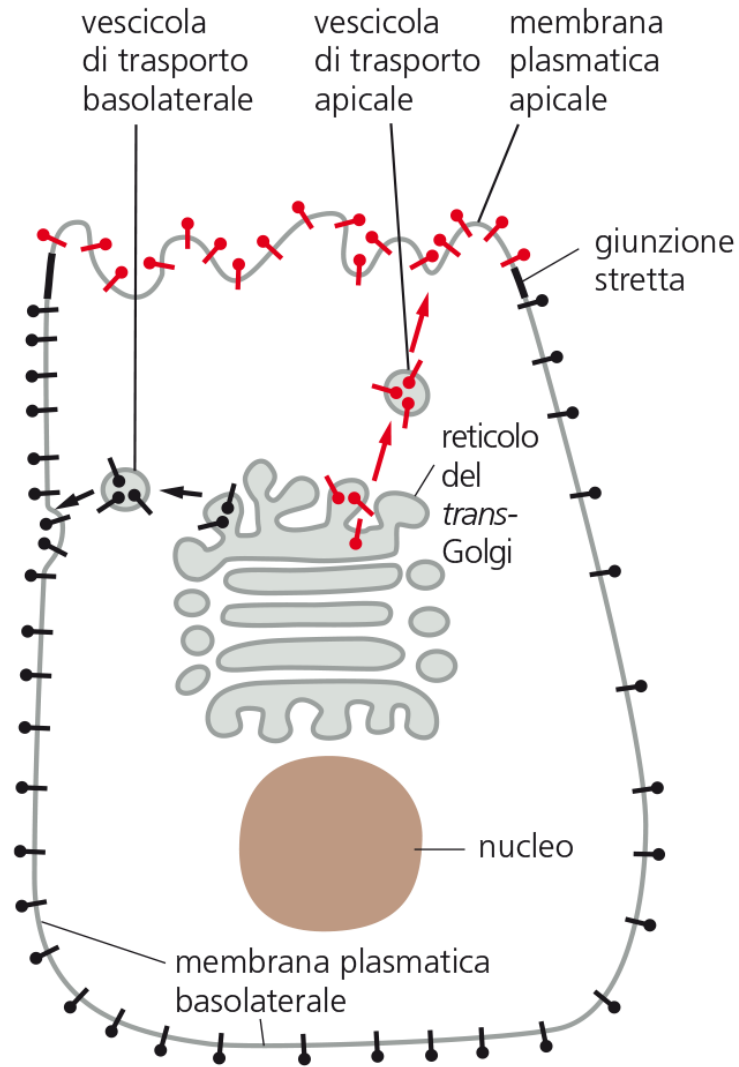
Nelle cellule polarizzate esistono sia lo smistamento diretto che tramite transcitosi.



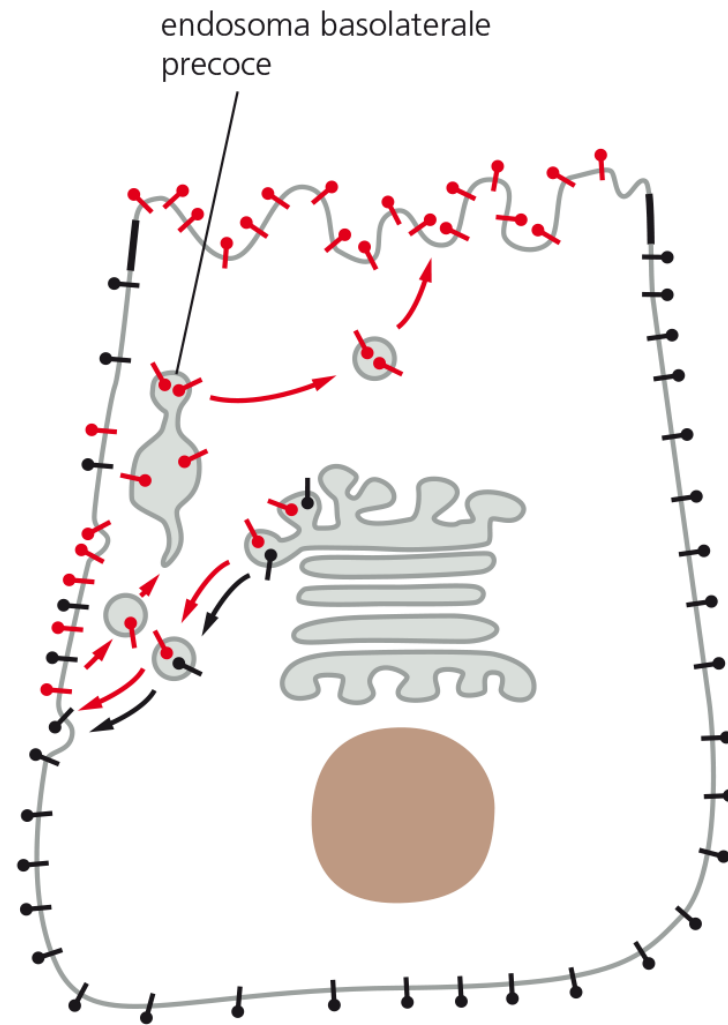
Le proteine possono essere smistate con 3 diverse modalità:

- **Sorting diretto dal TGN alla membrana apicale** (via lipid rafts). Le proteine con ancora GPI si associano ai glicosfingolipidi delle zattere lipidiche.
- **Sorting diretto dal TGN alla membrana basolaterale**. Le proteine hanno segnali di smistamento specifici nella loro coda citosolica.
- **Sorting indiretto casuale**: le proteine vengono stabilizzate nella zona corretta o rimosse e spostate tramite transitosi.



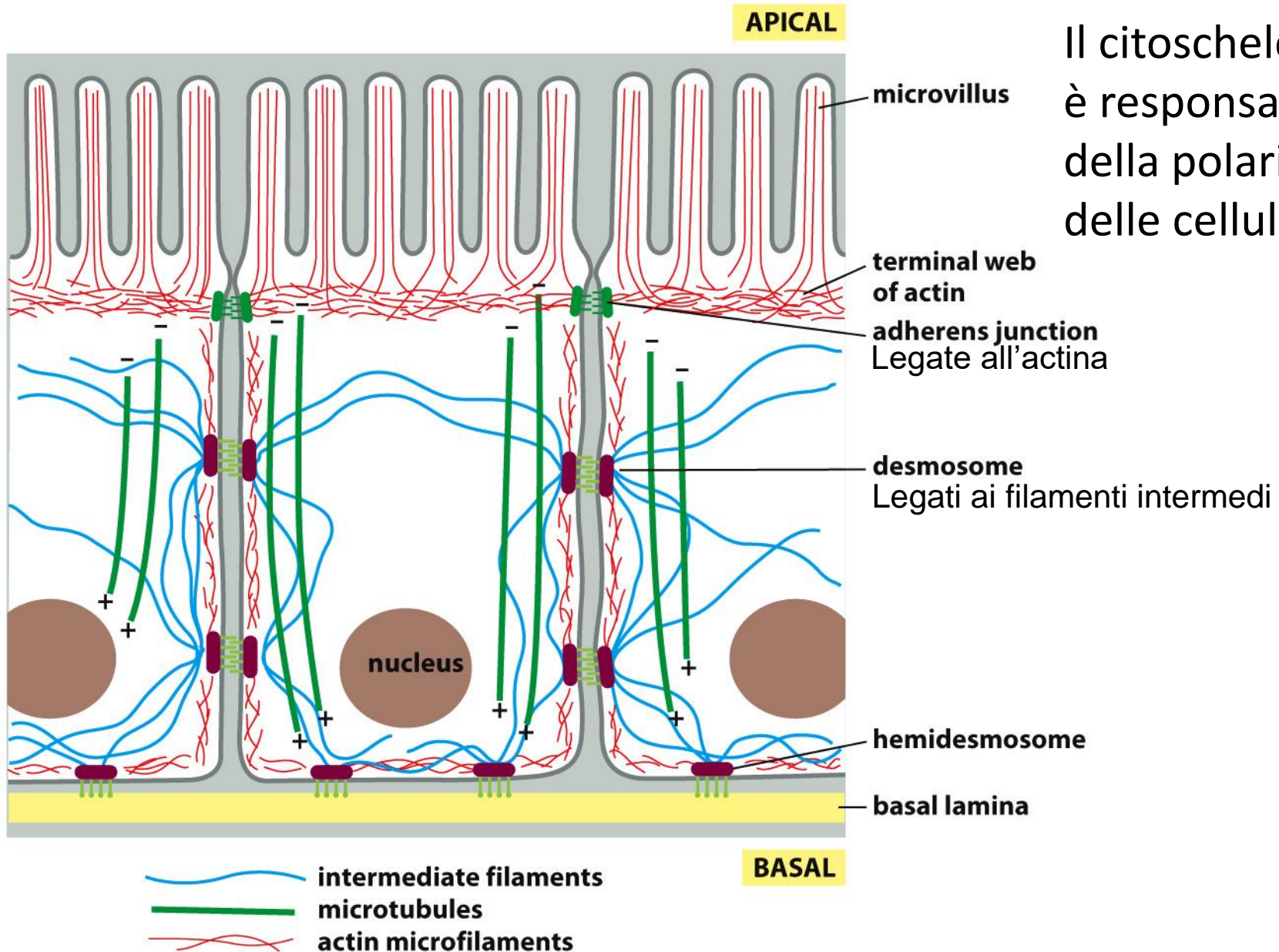


(A) SMISTAMENTO DIRETTO  
NEL RETICOLO DEL *TRANS*-GOLGI



(B) SMISTAMENTO INDIRETTO TRAMITE  
GLI ENDOSOMI PRECOCI





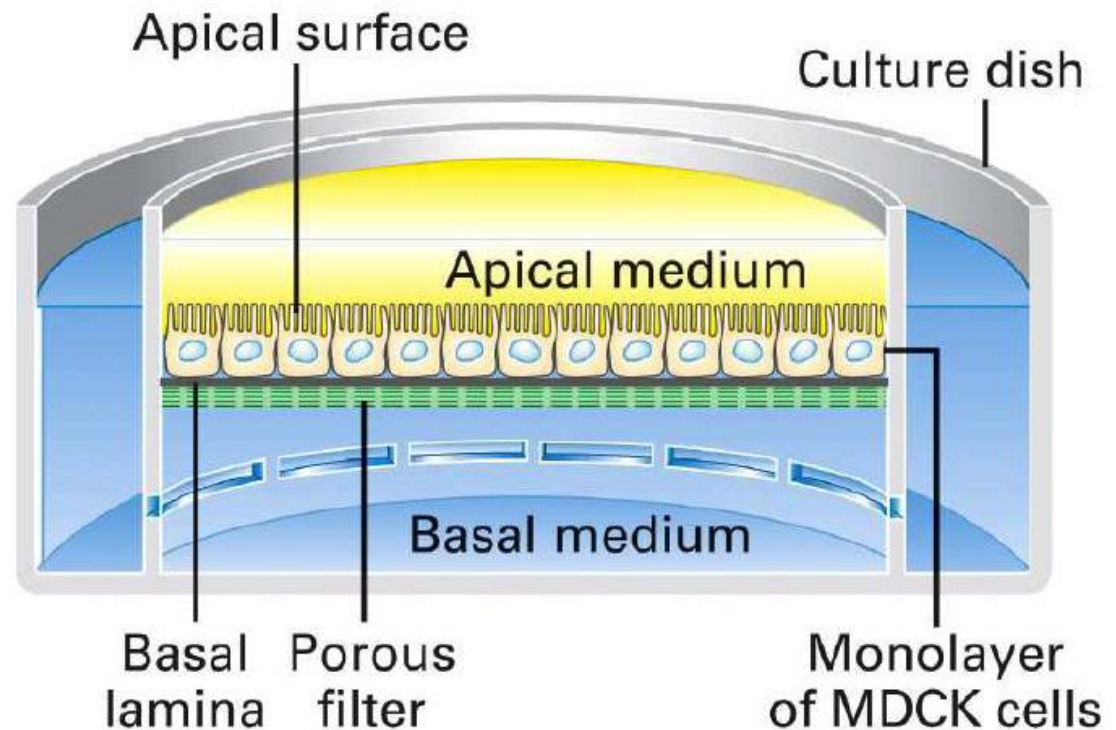
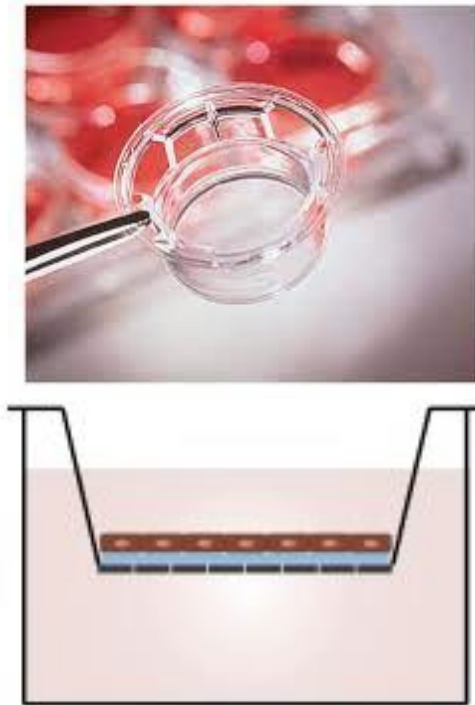
Il citoscheletro è responsabile della polarità delle cellule.

Figure 16-4 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

## Cellule polarizzate MDCK di rene canino

Modello sperimentale molto usato di cellule polarizzate. Si usano dei transwell per differenziare tra lato basale e lato apicale e far polarizzare le cellule.

**MDCK: un metodo efficiente per studiare la trascitosi negli epiteli polarizzati**





© Nobel Media AB. Photo: A. Mahmoud

**James E. Rothman**

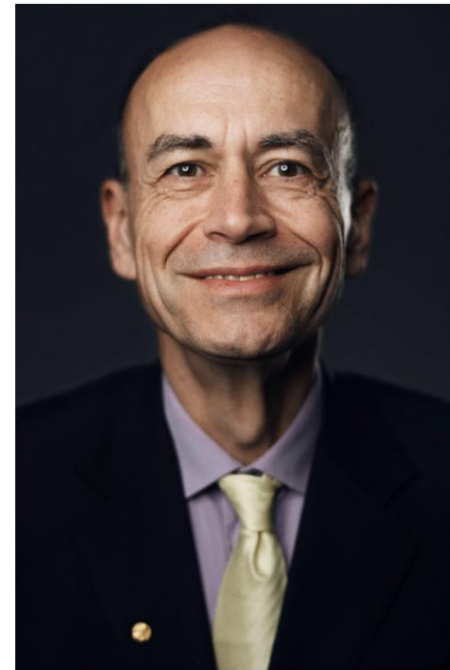
Prize share: 1/3



© Nobel Media AB. Photo: A. Mahmoud

**Randy W. Schekman**

Prize share: 1/3



© Nobel Media AB. Photo: A. Mahmoud

**Thomas C. Südhof**

Prize share: 1/3

---

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2013 was awarded jointly to James E. Rothman, Randy W. Schekman and Thomas C. Südhof "for their discoveries of machinery regulating vesicle traffic, a major transport system in our cells."

# Esosomi

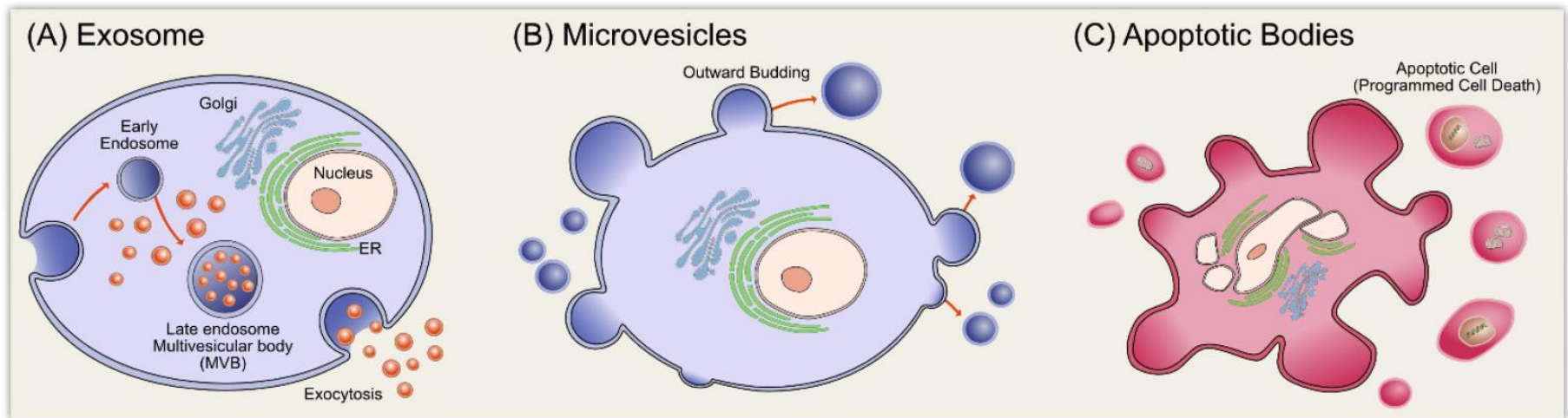


# Gli esosomi

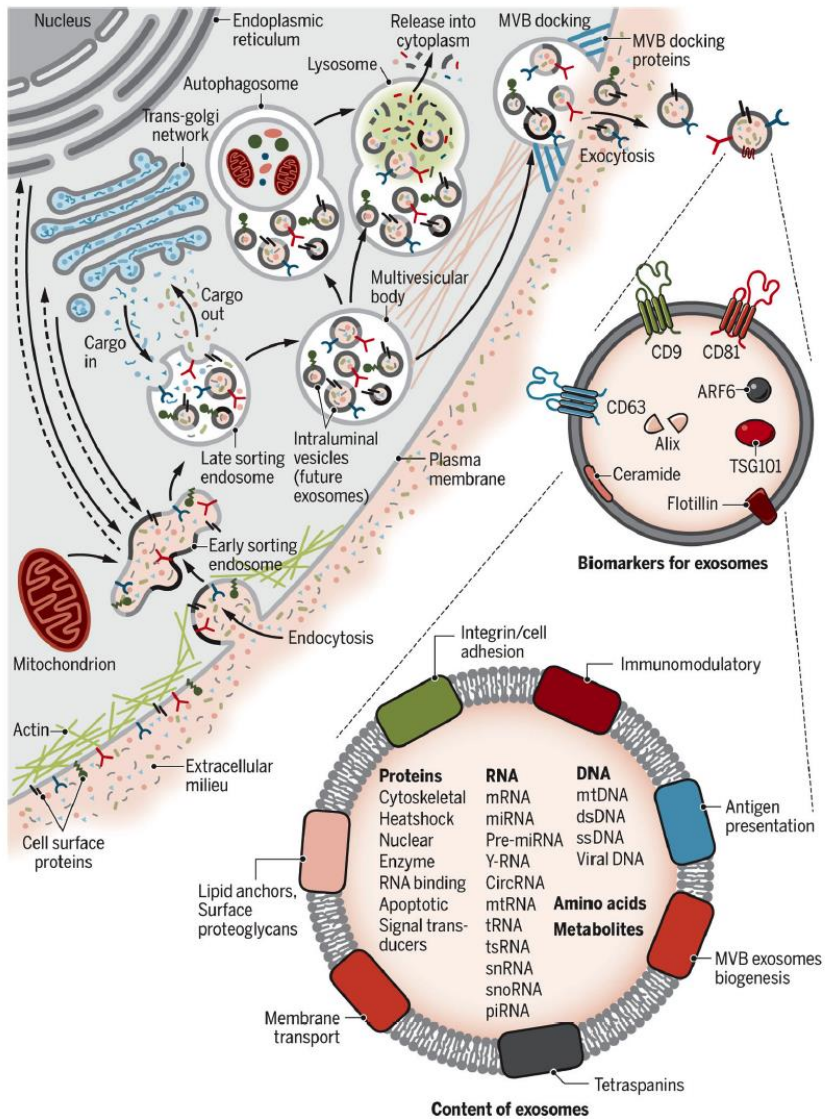
Le cellule rilasciano una serie di vescicole extracellulari (EV), che mediano la comunicazione tra cellula e cellula trasportando proteine, lipidi, RNA, DNA.

Tra di esse: gli **esosomi** (30-150 nm), le **microvescicole** (100-1000 nm) e i **corpi apoptotici** (>1000 nm).

Inizialmente (fino agli anni 1980) si pensava fossero materiale di scarto delle cellule.



**Figure 1.** Schematic representation of extracellular vesicles.



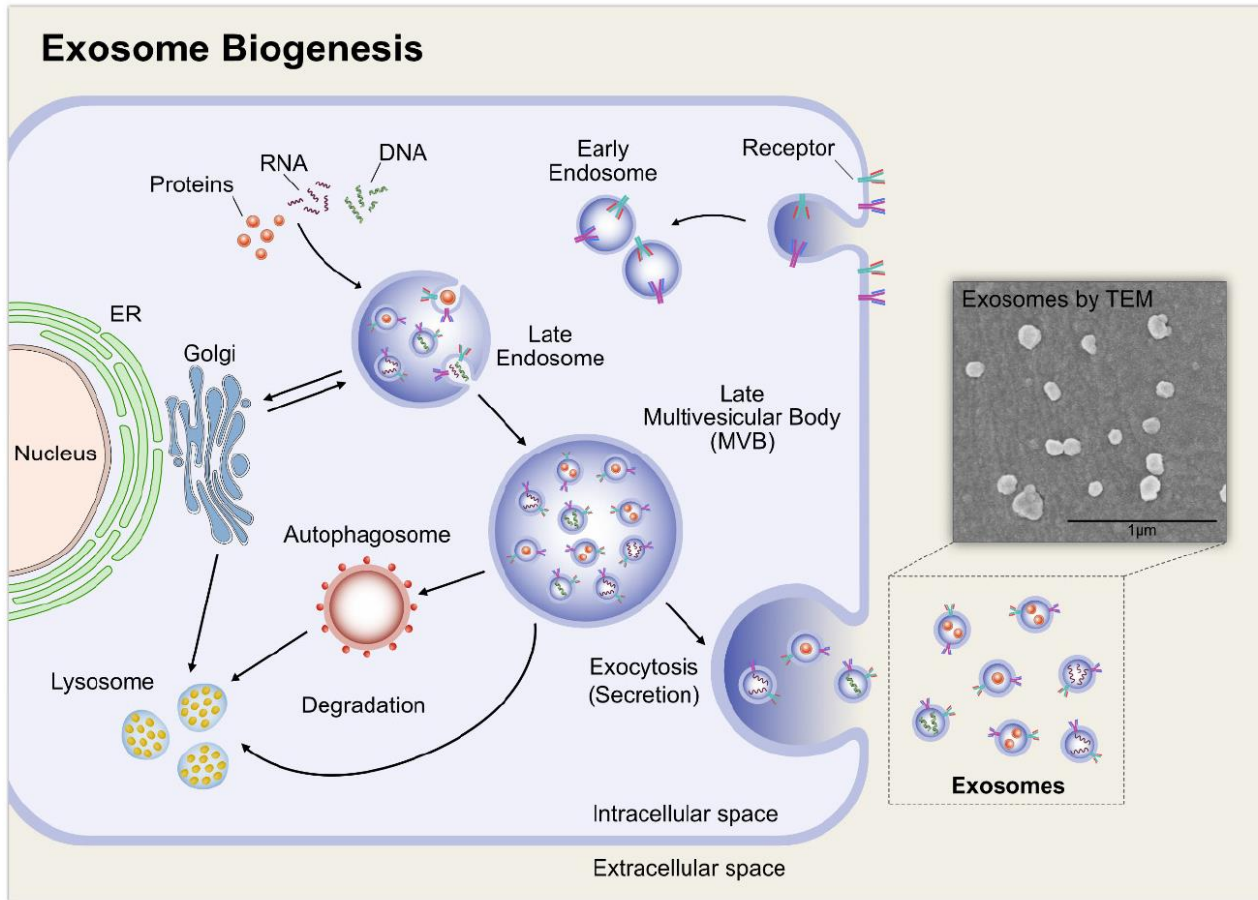
# Gli esosomi hanno origine dagli endosomi

Gli esosomi si formano dagli endosomi, che possono acquisire componenti all'interno della cellula.

Gli endosomi possono subire invaginazioni della membrana a dare vescicole intraluminali, all'interno dei corpi multivescicolari (*multi vesicular bodies* - MVB).



**A seguito dell'esocitosi dei corpi multivescicolari (MVB) gli esosomi vengono rilasciati nell'ambiente extracellulare mediante fusione con la membrana plasmatica.**

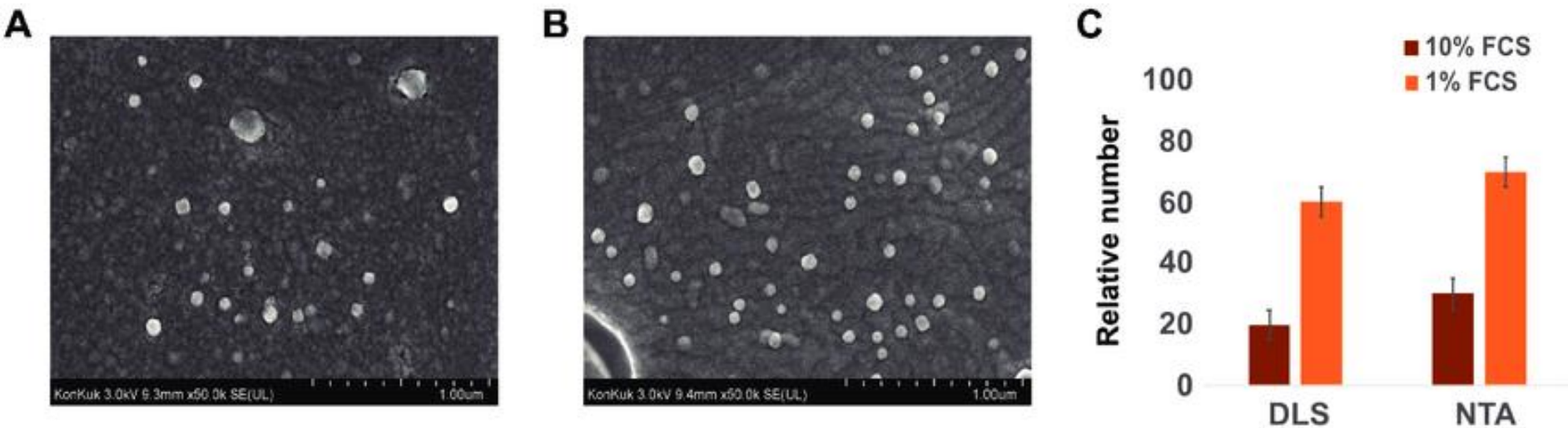


Il contenuto di questi corpi vescicolari riflette la natura e lo stato metabolico della cellula di provenienza.

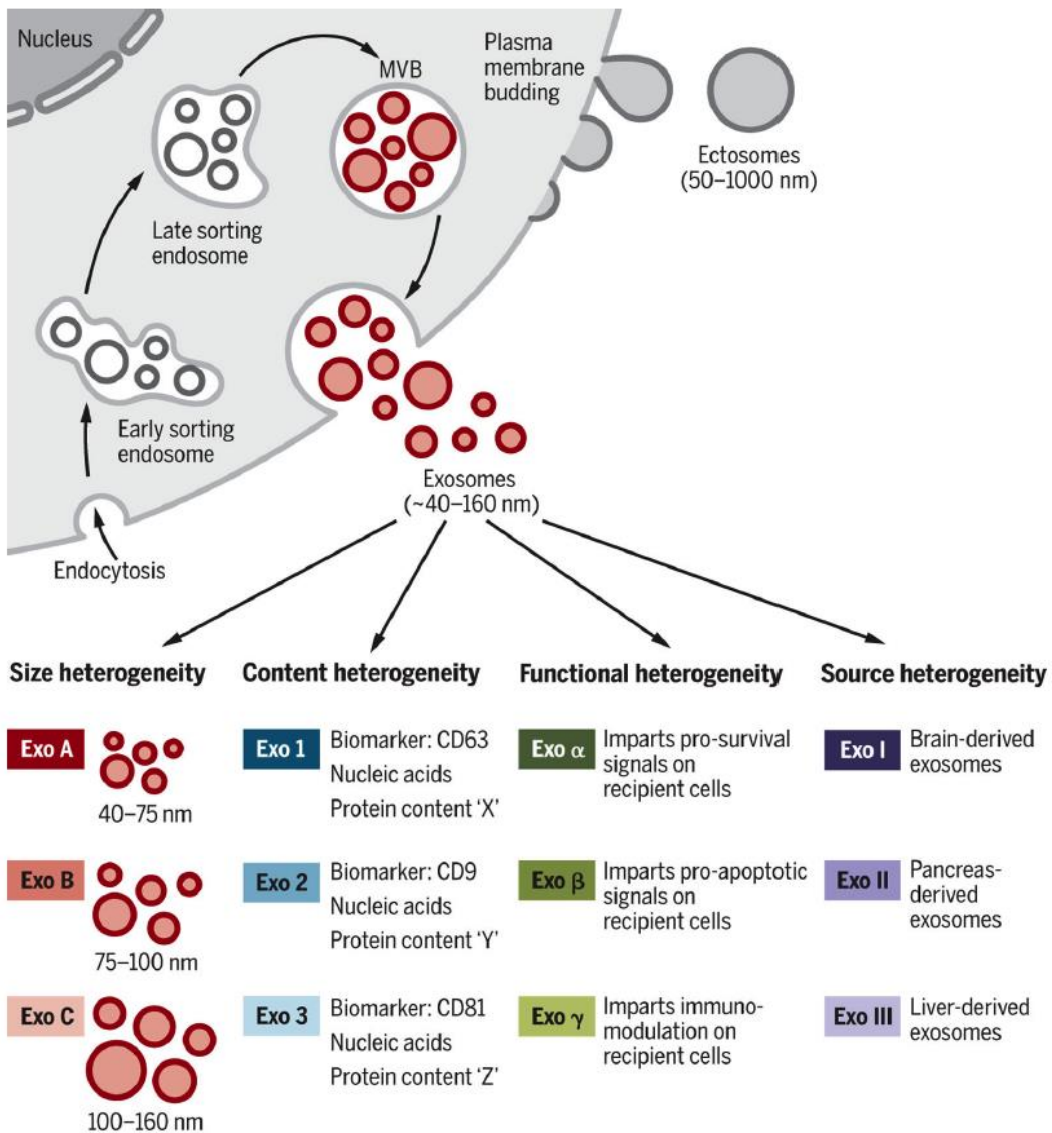
**Figure 2.** Biogenesis of exosomes. The insert shows biogenesis of exosomes of SHSY5Y cells.

Gli esosomi vengono secreti da molti diversi tipi cellulari e tessuti, come macrofagi, placenta, cellule epiteliali, embrioni, cellule tumorali, cellule staminali mesenchimali (MSC) e molte altre.

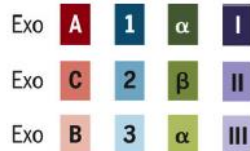
Si ritrovano abbondanti in diversi fluidi biologici, come plasma, saliva, urina, latte, liquido amniotico, liquido seminale etc.



La produzione di queste piccole strutture vescicolari dipende dal tipo cellulare ed è **stimolata da  $Ca^{2+}$  e ipossia**, ma anche da altre condizioni di stress in coltura (starvation da siero), mentre è inibita dal contatto tra le cellule.



**Example of multiparameter heterogeneity of exosomes**

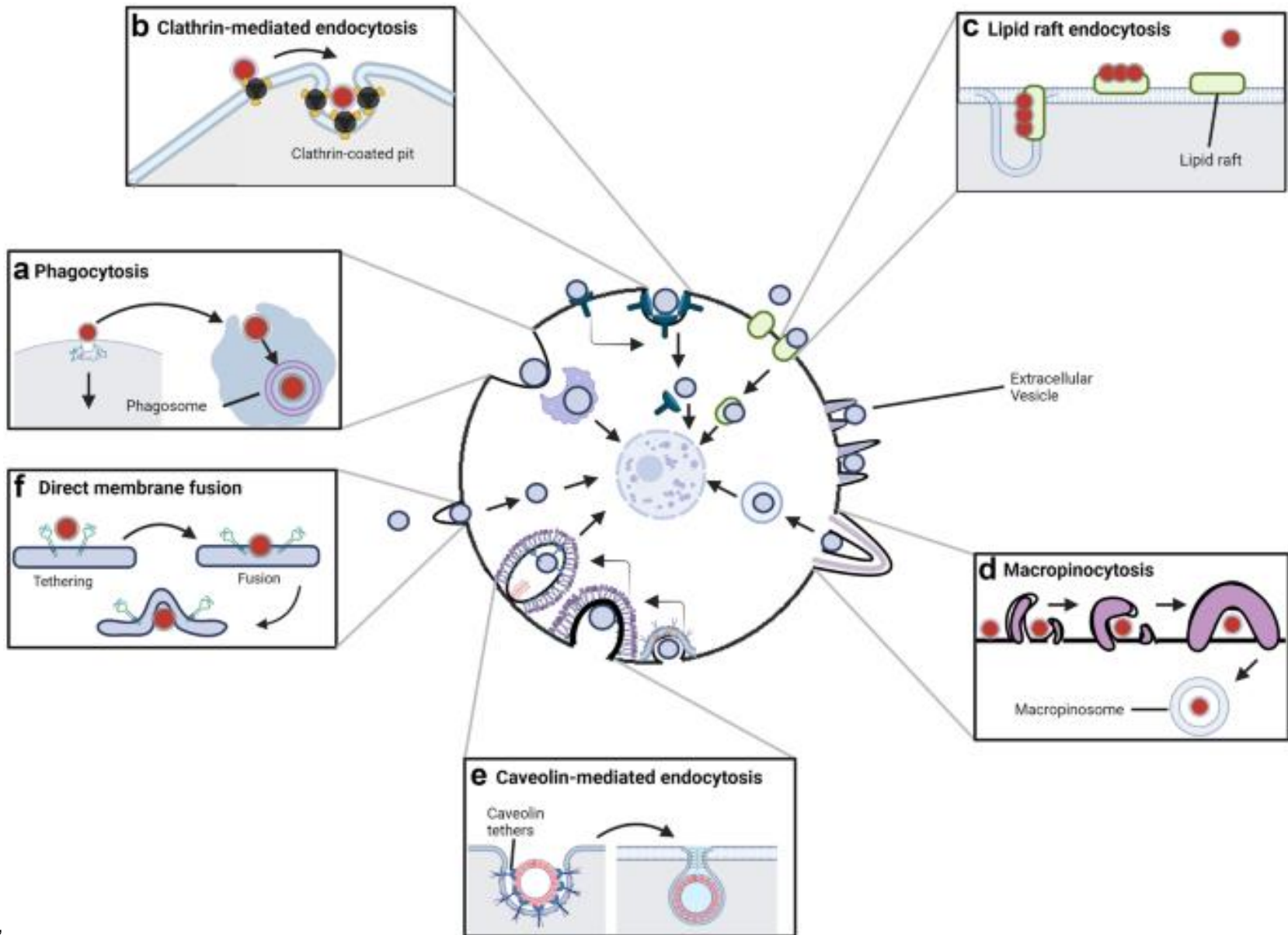


# Classificazione degli esosomi

Gli esosomi sono molto eterogenei e possono essere classificati sulla base di:

- Dimensione
- Contenuto (marcatori)
- Funzionalità
- Provenienza

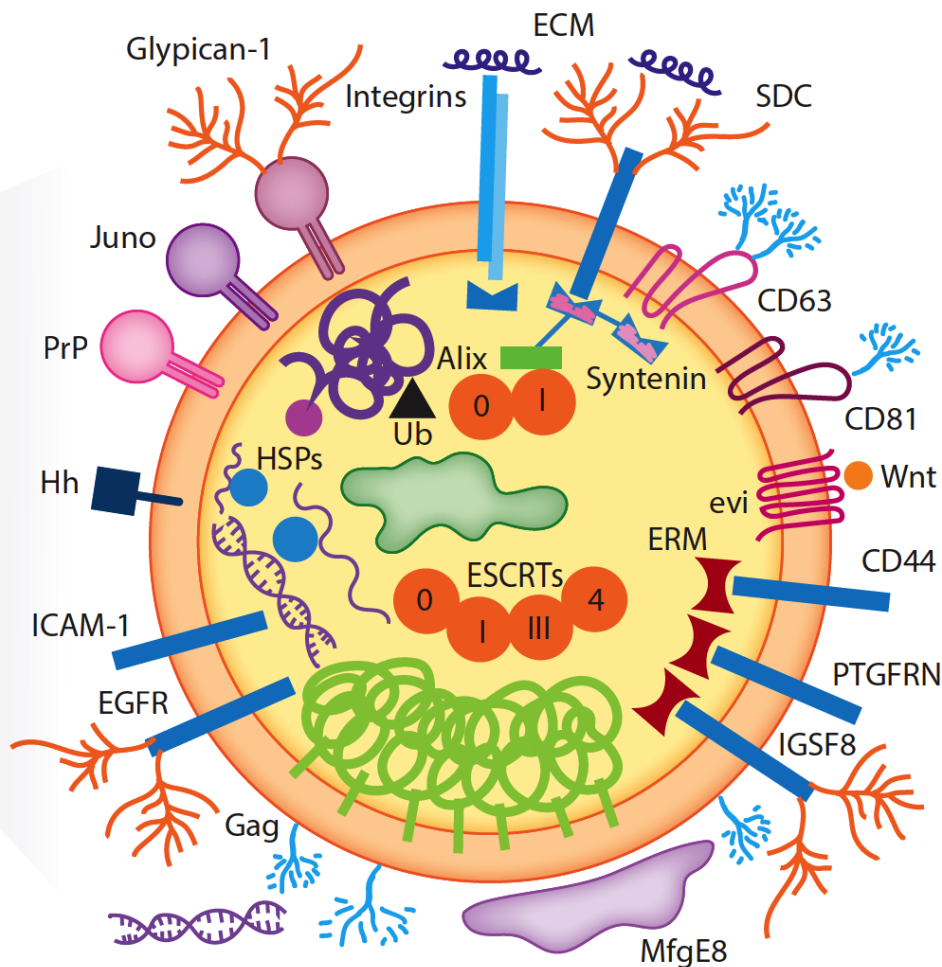
# Gli esosomi vengono assunti dalle cellule bersaglio mediante diversi meccanismi



## Gli esosomi sono messaggeri intercellulari

Trasportano proteine come tetraspannine, annexina, flotillina, HSP, GTPasi, recettori di fattori di crescita. Alcune di queste proteine servono proprio per la formazione degli esosomi.

Tra i lipidi è essenziale il ceramide, il precursore degli sfingolipidi.

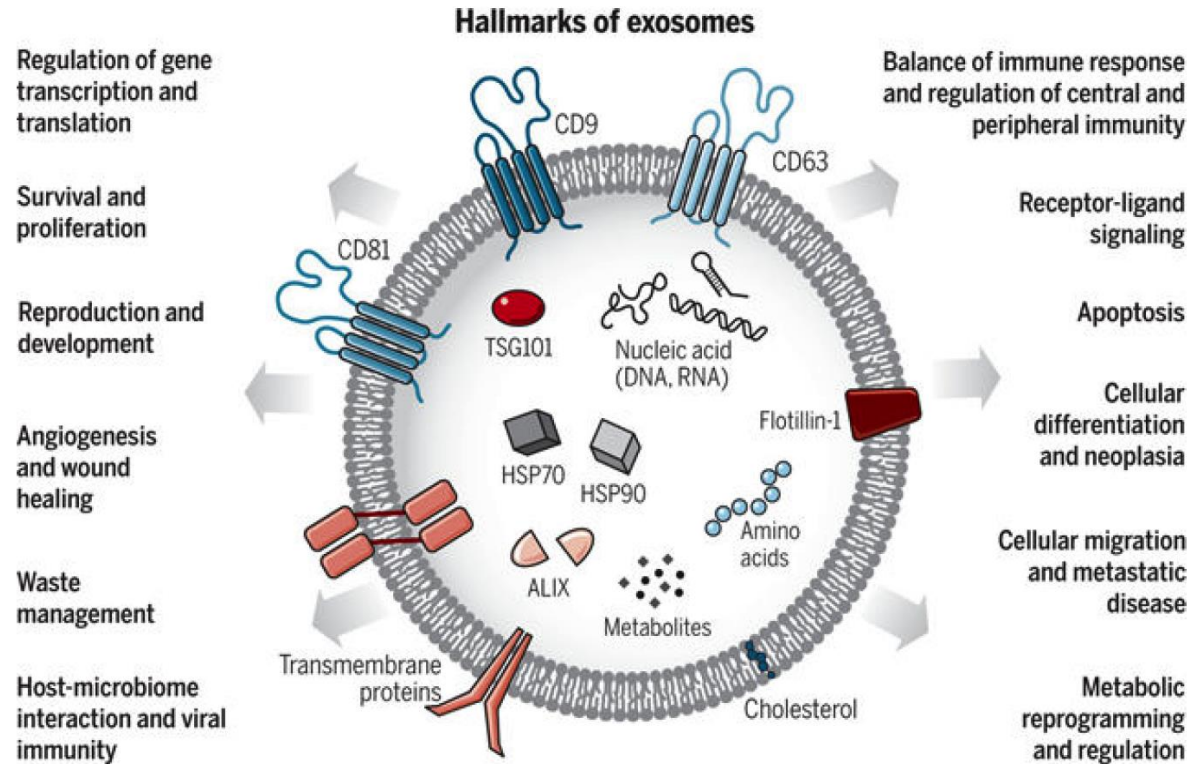




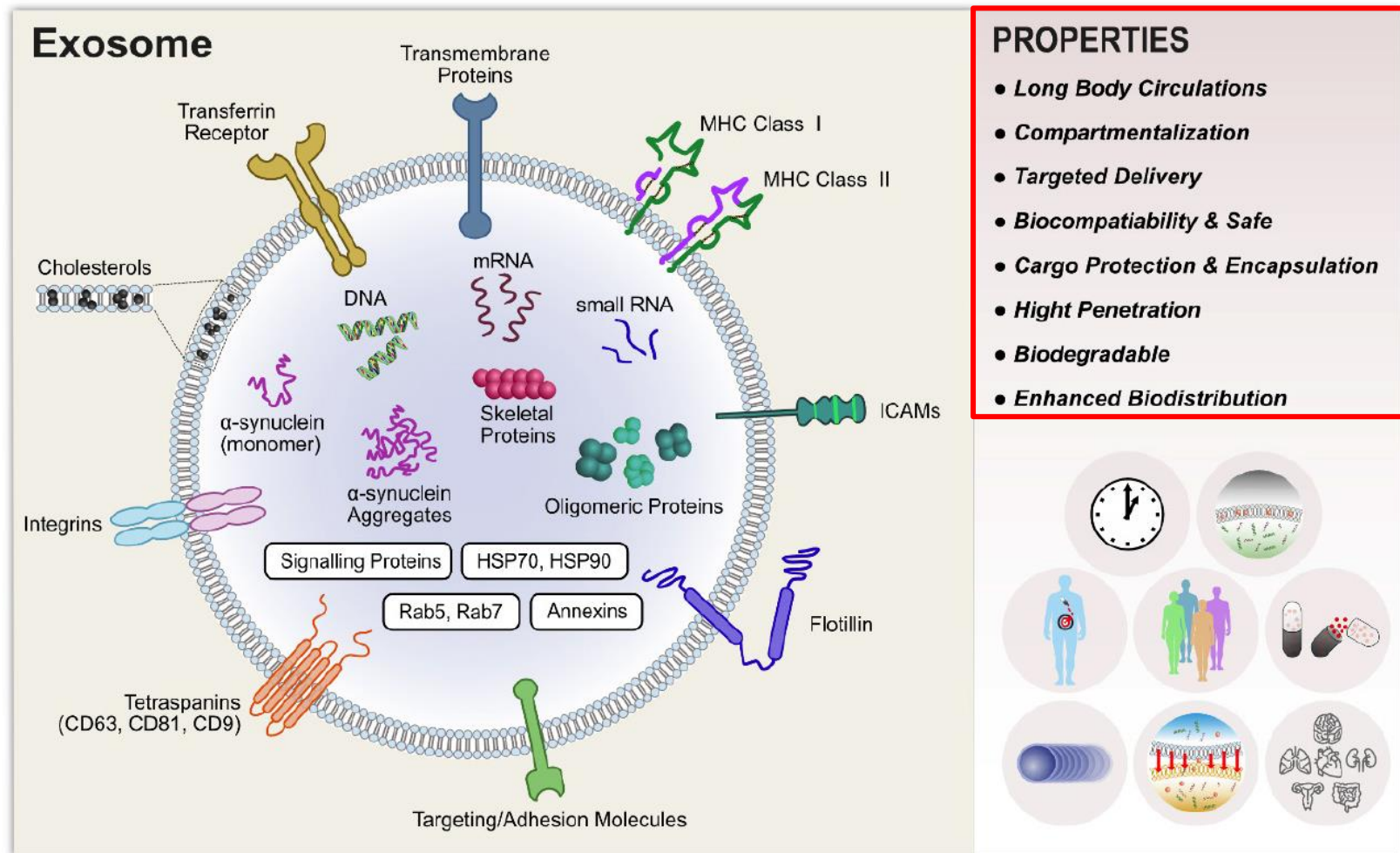
# Ruoli fisiologici degli esosomi

Gli esosomi possono regolare:

- angiogenesi
- migrazione
- apoptosi
- proliferazione
- presentazione dell'antigene
- infiammazione
- coagulazione
- metabolismo cellulare
- signaling
- sviluppo e riproduzione



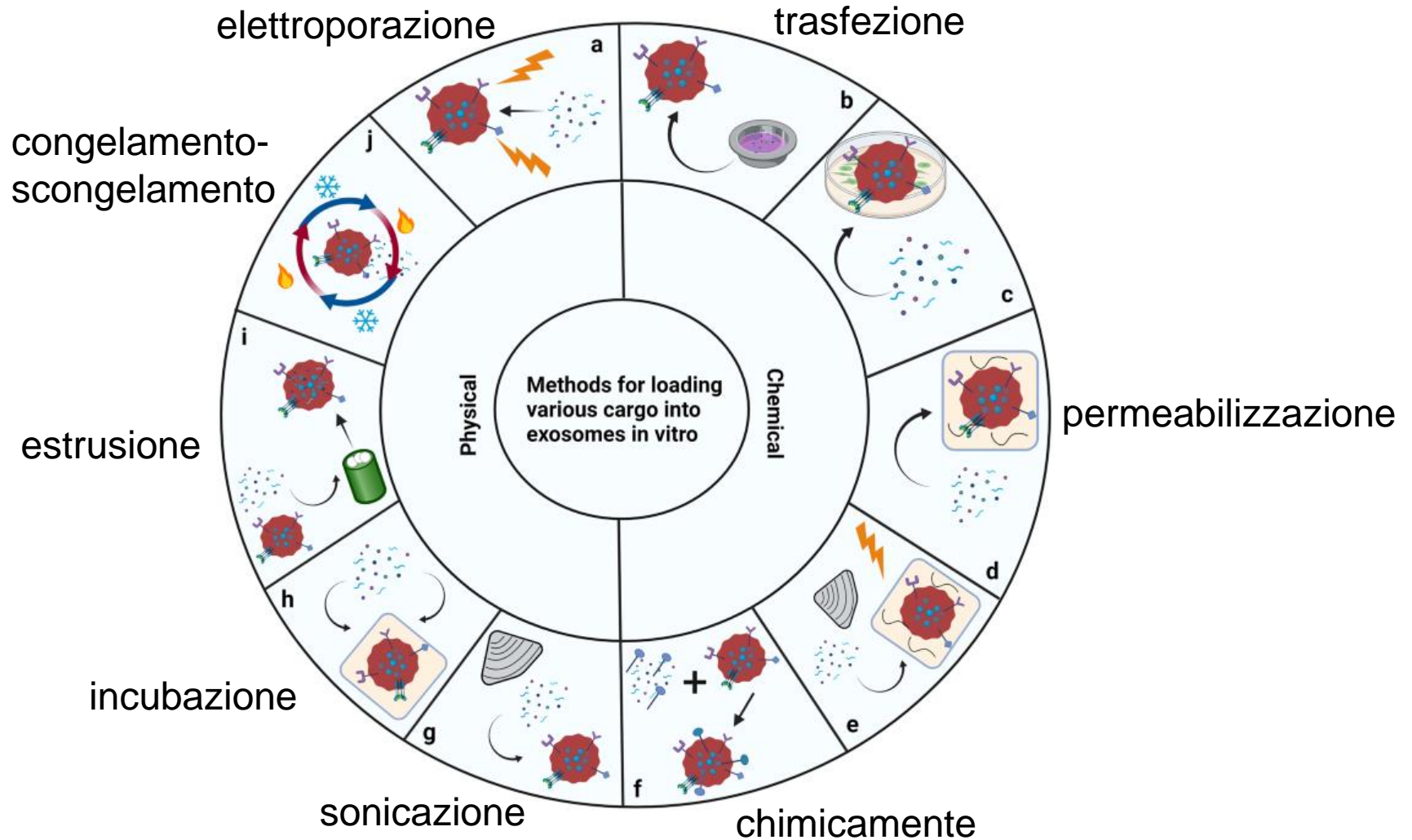
# Gli esosomi sono dei trasportatori che mediano la comunicazione tra cellula e cellula



Possono essere sfruttati per il **delivery di farmaci** per tutte queste loro caratteristiche.

# Loading degli esosomi

Gli esosomi possono essere caricati con varie molecole e farmaci per essere usati per il delivery.



Gli esosomi hanno funzioni diverse e oggi possono essere sfruttati per la **diagnostica** e la **terapia**.

Possono trasportare anche proteine patologiche, come la sinucleina e la proteina prionica → **biomarkers**

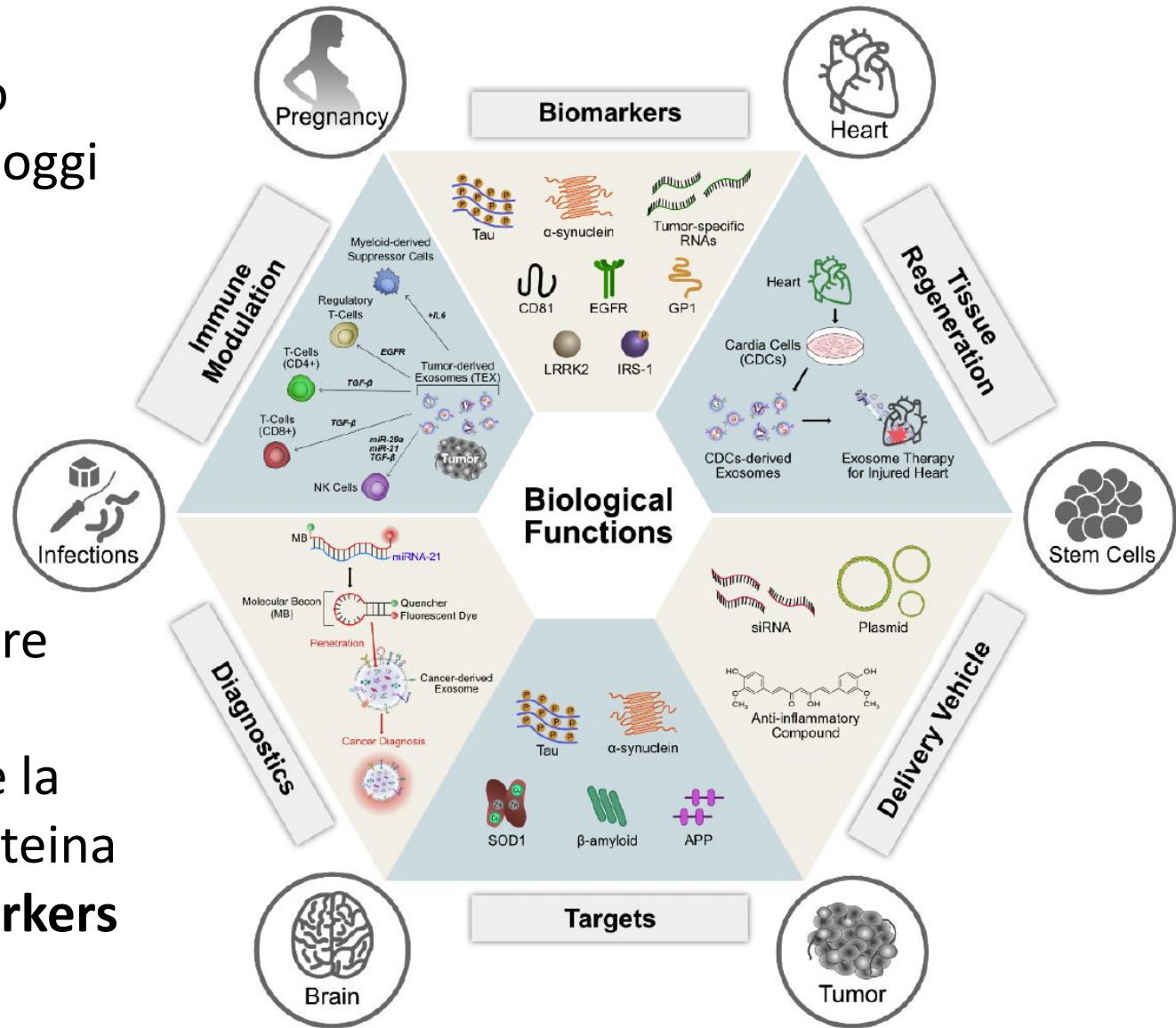
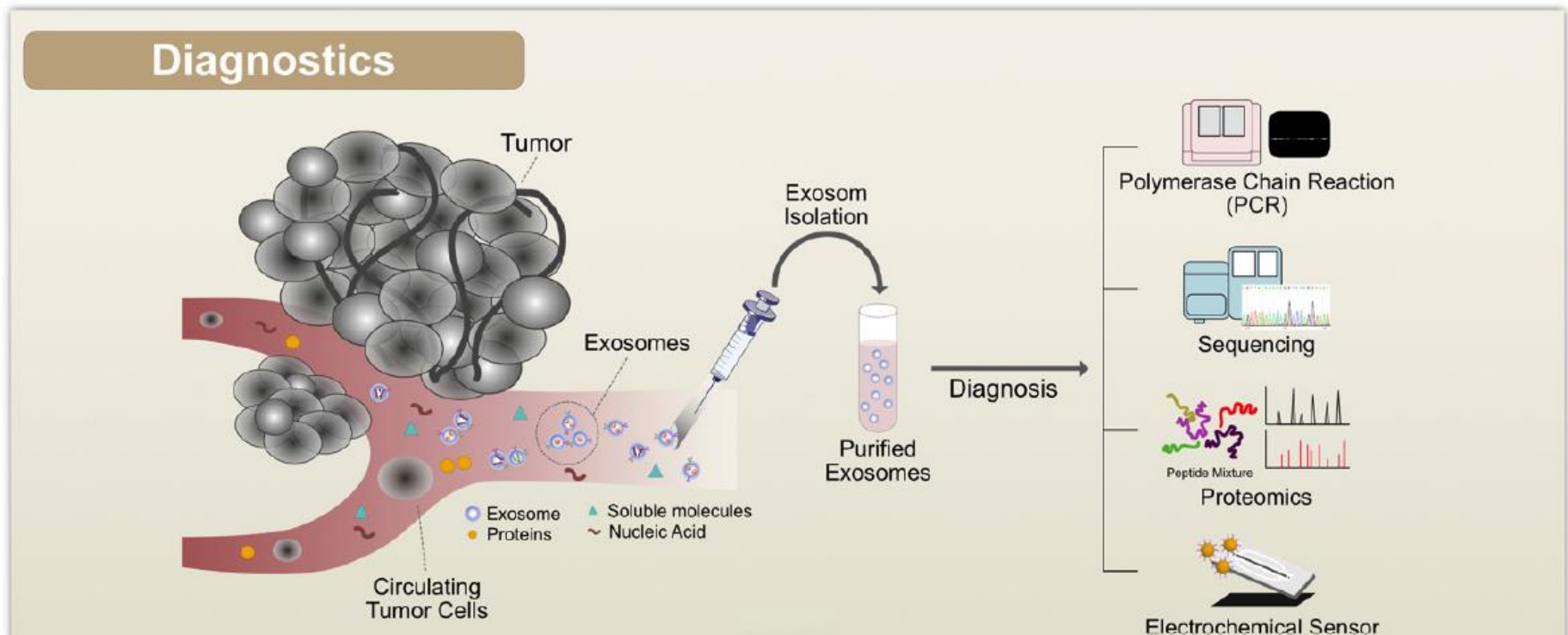


Figure 6. Biological function of exosomes.



# Utilizzi degli esosomi

A scopo **diagnostico** gli esosomi possono essere isolati dai pazienti e analizzati con varie tecniche, alla ricerca di marcatori che possano indicare la prognosi (ex alcuni miRNA, come miRNA21).



# Utilizzi degli esosomi

A scopo terapeutico, gli esosomi derivati dalle MSC hanno effetti anti-infiammatori e promuovono la rigenerazione tissutale attraverso un rimodellamento della ECM.

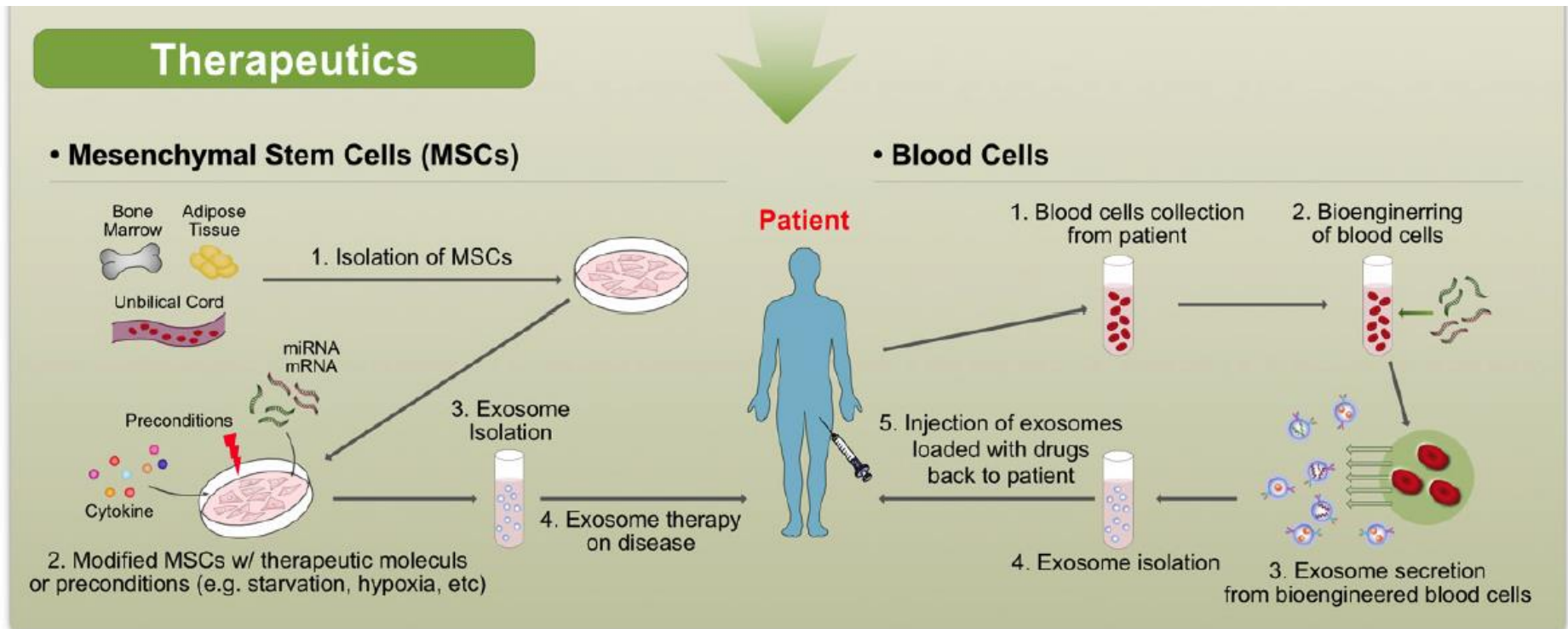


Figure 7. Diagnostic and therapeutic applications of exosomes.

# Come si studiano gli esosomi

E' necessario che gli esosomi isolati siano omogenei e ben caratterizzati.

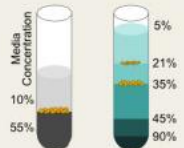
## Isolation

### Differential Centrifugation



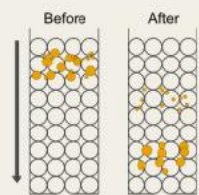
- Centrifugation at 300g for 10min, 2,000g for 20min and 10,000xg for 30min
- Ultracentrifugation at 100,000xg for 70min

### Density-gradient Ultracentrifugation



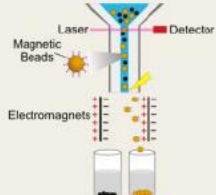
- Centrifugation at 2,000xg for 45min
- Transfer supernatant to the 30% sucrose solution
- Ultracentrifugation at 100,000xg for 70min

### Size Exclusion



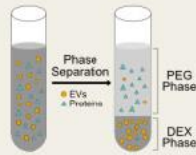
- 2ml of pellet-free plasma, 200ul of PEG (PEG6000 at 50% with 1X PBS) and 30ml of 75mM NaCl on ice
- Centrifugation at 1500xg for 30min
- Resuspension in 1X PBS and run chromatogram

### Magnetics Activated



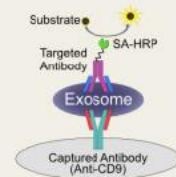
- Incubation with magnetic beads for 4h.
- Centrifugation at 100,000xg for 60min
- Elution with glycine Tris-HCl

### Polymer-Based



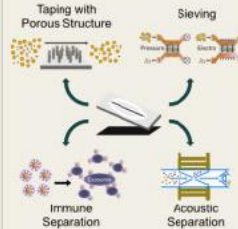
- Incubation with exosome precipitation solution (e.g. ExoQuick) for 45min
- Centrifugation at 1,500xg for 5min
- Resuspension in PBS

### Immunological Methods



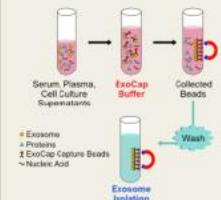
- Microplate-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for capturing and quantifying exosomes from plasma, serum and urine

### Microfluidics



- Physical and biochemical properties (e.g. size, density, immunoaffinity, electrophoretic) and electromagnetic based separation are combined

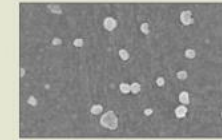
### ExoCap Kit



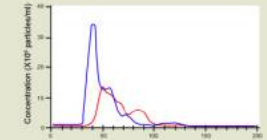
- Magnetic particles coupled with antibodies that recognize the exosome surface antigen.
- No centrifugation or Ultracentrifugation

## Characterization

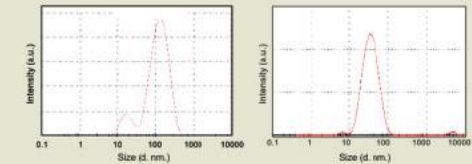
### TEM/SEM



### Exosome Tracking



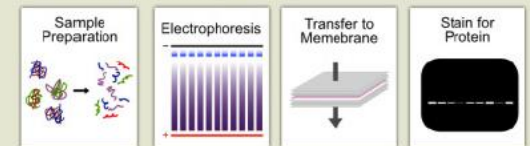
### Dynamic Light Scattering (DLS)



### Bradford Protein Assay



### Western Blotting



### Flow Cytometry

