

# **DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA CELLULARE E DELLO SVILUPPO**

## **Proposta di assegnazione di una borsa di Dottorato**

### **Titolo della ricerca: La biogenesi degli esosomi nella secrezione cellulare**

#### **Docente guida proposto:**

Dr. Massimo SARGIACOMO (Istituto Superiore di Sanità)

Dr. Giancarlo POIANA (docente interno)

### **DESCRIZIONE DELLA RICERCA (max 2 pagine)**

#### **Obiettivi della ricerca**

L'attività del gruppo da me diretto è fortemente incentrata sullo studio di alcune specializzazioni delle membrane cellulari in particolare le caveole e i rafts e gli esosomi. Caveole e Rafts sono porzioni distinte, che costituiscono microdomini della plasma membrana, in cui si concentrano le associazioni molecolari che organizzano i segnali cellulari. Questi sub-compartmenti cellulari sono siti implicati nella progressione neoplastica e nell'infettività virale come nel caso dell'HIV e in quanto tali rappresentano potenziali bersagli terapeutici. Gli esosomi sono organelli di 50-150 nm secreti da tutti i tipi cellulari attraverso un complesso meccanismo di esocitosi, costituiscono la più importante via di comunicazione tra cellula e cellula sia in condizioni fisiologiche che patologiche. Contengono miRNA, mRNA, DNA, molecole segnale, fattori di trascrizione che trasferiti con grande efficienza all'interno delle popolazioni cellulari mantengono l'omeostasi fisiologica. Un'altra importante funzione degli esosomi è anche quella di mediatori della risposta immunitaria in quanto trasportano antigeni che attraverso i complessi di istocompatibilità di classe 2 (MHC II) sono in grado di stimolare linfociti specifici e cellule dendritiche per sopprimere la crescita dei tumori in vivo. In modo antitetico gli esosomi provenienti da cellule patologiche trasmettono molecole in grado di indurre modificazioni epigenetiche che favoriscono l'insorgenza di tumori. Alcune porzioni delle caveole e rafts pur appartenendo a microdomini funzionalmente distinti della plasma membrana durante il riciclo intracellulare del traffico delle membrane prendono parte alla formazione dei Corpi Multi Vescicolari (CMV). I CMV sono endosomi tardivi che attraverso un processo di invaginazione e di auto sigillazione incorporano specifiche molecole citosoliche e di trasmembrana generando le vescicole intraluminari, che rilasciate nel mezzo extracellulare diventano esosomi. La proteina Nef rappresenta un modello esemplare per tracciare il percorso di formazione degli esosomi a partire dai microdomini della plasma membrana fino alla secrezione delle vescicole. L'HIV si assembla nei rafts prima di gemmare lasciando ancorata la proteina Nef la cui funzione è quella di alterare il macchinario cellulare per ottimizzare i processi di infettività virale e in virtù di una miristilazione si ancora ai rafts. Grazie alla collaborazione con il Dott. Federico, virologo e ricercatore dell'ISS che ha brillantemente isolato un Nef mutante, inattivo sui processi cellulari ma che mantiene inalterato il percorso intracellulare, potremo utilizzare diverse varianti di questa proteina ingegnerizzate al fine di creare proteine fluorescenti. I vettori a DNA che esprimono Nef<sup>mut</sup> saranno transfettati nelle cellule bersaglio e ci permetteranno di ampliare i nostri studi sulla biogenesi degli esosomi permettendoci di tracciarne il percorso sia dal punto di vista dei lipidi che delle proteine. La biogenesi e il contenuto molecolare di queste nano-vescicole è un processo finemente regolato da meccanismi cellulari che rispondono alle sollecitazioni molecolari del microambiente sui domini della plasma membrana. I microdomini di plasma membrana e gli esosomi qualora isolati e studiati con metodi d'analisi avanzata (proteomica, lipidomica e trascrittomica) costituiscono pertanto un insieme unico ed integrabile di informazioni utili all'indagine delle basi molecolari di stati cellulari patologici quali la cancerogenesi.

#### **Stato delle conoscenze**

Un obiettivo importante ottenuto dalla nostra ricerca è stato quello di identificare nel mezzo extracellulare gli esosomi propriamente detti, ovvero generati via CMV, in una popolazione mista di microvescicole che comprende anche gli ectosomi differenti dagli esosomi per carico molecolare, modalità di rilascio e funzionalità. Gli ectosomi infatti si generano per esocitosi o gemmazione diretta della plasma membrana. Abbiamo a questo scopo messo a punto una metodologia originale che usa un acido grasso fluorescente che attraverso il metabolismo cellulare converte la sonda in lipidi fluorescenti che diventano parte integrante delle membrane esosomiali. L'osservazione dell'incorporazione nella cellula di questa sonda tramite il

microscopio confocale ha messo in luce, in esperimenti di marcatura intermittente (pulse-chase) il percorso dei lipidi di nuova sintesi lungo i compartimenti intracellulari che prendono parte alla biogenesi degli esosomi. Si è potuto così constatare che i lipidi marcati si muovono in un circuito ristretto che coinvolge il Reticolo Endoplasmatico e i compartimenti endo-lisomiali ed escludendo completamente la plasma membrana. In questo modo si è aperta la possibilità di marcare specificamente solo gli esosomi e non gli ectosomi. L'isolamento ottimale degli esosomi fluorescenti nel secreto cellulare è stata ottenuta attraverso centrifugazioni differenziali, separazione in gradiente di densità ed infine per immuno-cattura con anti corpi contro il fluoroforo della sonda lipidica che ne hanno permesso la caratterizzazione proteica e lipidica. Attraverso innovazioni metodologiche in citofluorimetria possiamo valutare sia il numero che l'intensità di fluorescenza media del singolo esosoma. Questa metodologia ci ha permesso di stimare il numero di esosomi fluorescenti trasferiti in cellule accettrici e studiare i fenomeni epigenetici conseguenti al passaggio del bagaglio di molecole effettrici in cellule bersaglio. Molto rimane da indagare soprattutto riguardo alla biogenesi e la purificazione degli esosomi.

### **Lavori pubblicati negli ultimi 5 anni dal Docente Guida (2012-2017)**

#Cell Propagation of Cholera Toxin CTA ADP-Ribosylating Factor by Exosome Mediated Transfer. Zanetti C, Gallina A, Fabbri A, Parisi S, Palermo A, Fecchi K, Boussadia Z, Carollo M, Falchi M, Pasquini L, Fiani ML, **Sargiacomo M**. Int J Mol Sci. 2018

#Generation, Quantification, and Tracing of Metabolically Labeled Fluorescent Exosomes. Coscia C, Parolini I, Sanchez M, Biffoni M, Boussadia Z, Zanetti C, Fiani ML, **Sargiacomo M**. Methods Mol Biol. 2016;1448:217-35.

#Conditioned medium from human umbilical vein endothelial cells markedly improves the proliferation and differentiation of circulating endothelial progenitors. Castelli G, Parolini I, Cerio AM, D'Angiò A, Pasquini L, Carollo M, **Sargiacomo M**, Testa U, Pelosi E. Blood Cells Mol Dis. 2016

#Cell-to-cell propagation of the bacterial toxin CNF1 via extracellular vesicles: potential impact on the therapeutic use of the toxin. Fabbri A, Cori S, Zanetti C, Guidotti M, **Sargiacomo M**, Loizzo S, Fiorentini C. Toxins (Basel). 2015

#Proteomic analysis of detergent-resistant membrane microdomains in trophozoite blood stage of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. Yam XY, Birago C, Fratini F, Di Girolamo F, Raggi C, **Sargiacomo M**, Bachi A, Berry L, Fall G, Currà C, Pizzi E, Breton CB, Ponzi M. Mol Cell Proteomics. 2013

#Human melanoma cells express FGFR/Src/Rho signaling that entails an adhesion-independent caveolin-1 membrane association. Fecchi K, Travaglione S, Spadaro F, Quattrini A, Parolini I, Piccaro G, Raggi C, Fabbri A, Felicetti F, Carè A, Fiorentini C, **Sargiacomo M**. Int J Cancer. 2012

### **Fondi attualmente disponibili per svolgere il programma di ricerca.**

Borsa di Studio Istituto Superiore di Sanità

### **Collaborazioni con laboratori nazionali ed internazionali**

Dr Maurizio Federico ISS , Dr Fabio Tosini ISS,