



# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Corso di Dottorato in Scienze Molecolari e Biomolecolari

Dipartimento STEBICEF

Settore Scientifico Disciplinare BIO 06

## **Caratterizzazione di vescicole rilasciate da cellule staminali di topo: loro ruolo nella segnalazione autocrina e paracrina.**

IL DOTTORE

**WALTER SPINELLO**

IL COORDINATORE

**PROF.SSA PATRIZIA DIANA**

IL TUTOR

**DOTT.SSA FABIANA GERACI**

CICLO XXIX

ANNO DI CONSEGUIMENTO 2017

# *Indice*

<b>INDICE</b>	2
<b>INTRODUZIONE</b>	6
I Mesoangioblasti	7
Comunicazione cellulare	9
Microvescicole	9
<b>1. Classificazione</b>	10
<b>2. Meccanismo di rilascio delle vescicole di membrana</b>	12
<b>3. Arricchimento selettivo delle vescicole di membrana</b>	14
<b>4. Interazione delle EVs con le cellule target</b>	15
<b>5. Funzioni ed effetti biologici delle EVs</b>	17
<b>5.1 Trasferimento di complessi recettoriali alle cellule target</b>	17
<b>5.2 Le EVs durante lo sviluppo</b>	17
<b>5.3 Ruolo protettivo delle EVs</b>	18
<b>6. Trasferimento di materiale genetico alle cellule riceventi per via orizzontale</b>	18
<b>7. Le EVs nei tumori</b>	19
<b>8. Le EVs e la nicchia staminale</b>	21
<b>9. EVs come fattori paracrini e prospettive in medicina rigenerativa</b>	23
<b>MATERIALI E METODI</b>	26
Colture cellulari	27
Isolamento di vescicole di membrana	27
Determinazione proteica: il metodo Bradford	28
Attività acetilcolinesterasica	28
Marcatura vescicole con PKH26	29
Marcatura vescicole con DiI	29
Immunofluorescenza	29

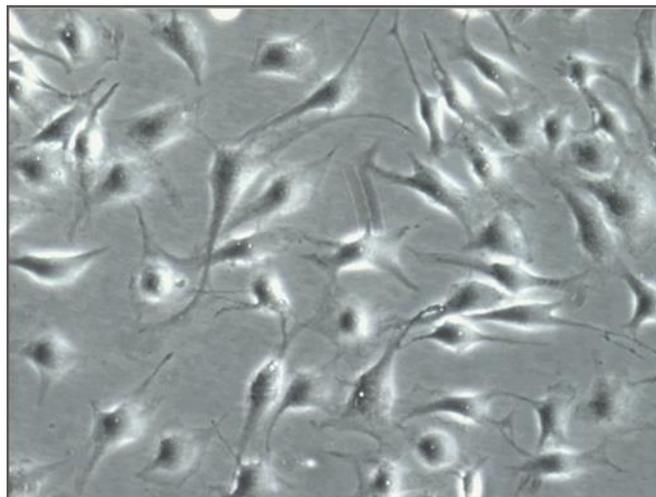
Analisi FACS di interazione autocrina e paracrina delle vescicole	31
Analisi FACS del contenuto di acidi nucleici nelle vescicole	31
Estrazione di RNA totale da cellule A6 e da EVs A6	32
Quantizzazione ed integrità dell'RNA totale	33
Analisi di microarray	34
Sintesi di cDNA marcato	34
Acquisizione ed analisi dei dati	36
Analisi funzionale dei geni espressi	36
Saggio di formazione dei vasi <i>in vitro</i>	36
Scratch test o Wound healing assay	37
Elettroforesi monodimensionale e Western blot	38
Preparazione dei lisati cellulari totali	39
Profilo proteomico mediante array XL di citochine	39
Profilo proteomico mediante array di recettori tirosin-chinasici fosforilati	40
Saggio di attivazione dei linfociti	42
Saggio di proliferazione dei linfociti	42
Profilo di legame delle EVs con lectine	43
Trattamento delle EVs con glicosidasi	43
<b>Scopo del lavoro</b>	45
<b>RISULTATI</b>	46
Interazione autocrina delle vescicole	47
Interazione paracrina delle vescicole	51
Determinazione della presenza di acidi nucleici all'interno delle vescicole	53
Formazione di vasi <i>in vitro</i>	55
Effetto delle vescicole sulla migrazione cellulare	59
Analisi sul trascrittoma delle vescicole	61

Analisi qualitativa dell'RNA estratto	61
Analisi dell'espressione genica mediante microarray	62
Valutazione di markers proteici delle EVs	71
Profilo proteomico mediante array XL di citochine	73
Profilo proteomico mediante array di recettori tirosin-chinasici fosforilati	85
Valutazione dell'attività immunomodulatoria delle EVs	89
Profilo di legame delle EVs con lectine e valutazione di interazione dopo rimozione enzimatica di glicani N-linked	101
<b>CONCLUSIONI</b>	110
<b>RINGRAZIAMENTI</b>	113
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	115

# *Introduzione*

## MESOANGIOBLASTI

I mesoangioblasti sono cellule staminali/progenitrici multipotenti associate ai vasi, isolabili da tessuti sia embrionali che adulti (Diaz-Manera et al., 2010) (Figura 1). In particolare, sono stati isolati dall'aorta dorsale di embrioni di topo allo stadio di sviluppo E9.5 (Tagliafico et al., 2004) e dalle pareti microvascolari del muscolo scheletrico adulto (Dellavalle et al., 2007). Costituiscono una popolazione di cellule staminali a se stante, differente sia dalle cellule staminali embrionali, localizzate nella massa interna della blastocisti, sia dalle cellule staminali che si ritrovano nei tessuti adulti. I cloni di origine embrionale coesprimono markers miogenici (*MyoD*, *Myf-5*, *desmina*, *Myocyte Nuclear Factor*, *c-Met*, e *M-caderina*) ed endoteliali (*VE-caderina*, *VEGF-R2*,  *$\alpha$ M-integrin*,  *$\beta$ 3integrin*, *P-selectina*) (De Angelis et al., 1999). Il nome “mesoangioblasti” è stato quindi scelto per indicare questo comune progenitore di tessuti mesodermici vascolari ed extra-vascolari (g e Bianco, 2003). Queste cellule possono essere considerate come i progenitori delle cellule staminali stromali mesenchimali, da cui differiscono per l'espressione del CD-34, ma anche per il maggiore potenziale differenziativo. I mesoangioblasti, infatti, quando trattati con appropriate molecole segnale (TGF- $\beta$ , BMPs, etc.), o cresciuti in co-coltura con cellule in differenziamento ed in presenza di molecole rilasciate da queste ultime, sono capaci di differenziarsi in citotipi mesodermici differenti (Minasi et al., 2002), come ad esempio muscolo scheletrico e cardiaco, muscolo liscio, osso, cartilagine ed endotelio (Sampaolesi et al., 2003; Tagliafico et al., 2004). Inoltre, evidenze sperimentali recenti hanno dimostrato che l'inibizione farmacologica della chinasi Rho e la contemporanea somministrazione di IGF-1 e PDGF inducono i mesoangioblasti derivati da aorta al lineage oligodendrocitico (Wang et al., 2012).



**Figura 1. Mesoangioblasti di topo in coltura, linea cellulare A6.**

È stato dimostrato che i mesoangioblasti, in seguito ad iniezione nell'arteria femorale in topi ed in cani affetti da distrofia muscolare, contribuiscono alla rigenerazione del tessuto muscolare danneggiato, inducendo la formazione di nuove fibre muscolari esprimenti la distrofina, proteina difettiva in questa patologia (Sampaolesi et al., 2003, 2006; Díaz-Manera et al., 2010). Una volta raggiunto il tessuto danneggiato, infatti, le cellule riescono a ricostituire il compartimento di cellule staminali locali e sono in grado di fondersi con le cellule satelliti residenti, sostenendo la rigenerazione del muscolo compromesso (Sampaolesi et al., 2003; Dellavalle et al., 2007). Se iniettati nella circolazione sanguigna sono in grado di attraversare la barriera endoteliale, ma solo in presenza di infiammazione, come nel caso del muscolo distrofico. Infatti, i mesoangioblasti esprimono recettori per citochine infiammatorie e sono in grado di migrare, sia *in vitro* che *in vivo*, in risposta a HMGB1 (Palumbo et al., 2004), una proteina nucleare che quando rilasciata da cellule necrotiche funge da citochina pro-infiammatoria (Scaffidi et al., 2002).

L'utilizzo delle cellule staminali nel trattamento di varie patologie ha riscontrato negli ultimi dieci anni un crescente interesse nel panorama scientifico internazionale. Diversi studi suggeriscono che il trapianto di cellule staminali e di progenitori cellulari stimoli la riparazione e la rigenerazione tissutale in vari organi, compresi il cuore, i muscoli, il fegato, il rene e la cornea (Sampaolesi et al., 2003, 2006; Cantley et al., 2005; Wollert et al., 2005; Fiegel et al., 2006; Pellegrini et al., 2009). In questi casi si ipotizza un attecchimento delle cellule staminali attraverso transdifferenziazione o tramite fusione delle stesse con gli organi target. Tuttavia, un numero crescente di evidenze sperimentali indica che la semplice localizzazione delle cellule staminali nel tessuto danneggiato ed il loro differenziamento non possono essere sufficienti per favorire gli eventi rigenerativi, suggerendo che il rilascio di mediatori paracrini da parte di queste cellule possa intervenire nella rigenerazione.

## **COMUNICAZIONE CELLULARE**

Tutte le cellule sono in grado di comunicare tra loro e con l'ambiente che le circonda. Questo è valido sia per gli organismi unicellulari, sia per gli organismi pluricellulari, nei quali meccanismi diversi e complessi sottendono alla regolazione della crescita, della proliferazione e del differenziamento, nonché ad un appropriato coordinamento dei diversi tipi cellulari che coesistono all'interno dei tessuti adulti.

La comunicazione tra le cellule può avvenire tramite contatto diretto, come nel caso delle giunzioni gap, la cui permeabilità è strettamente regolata e attraverso le quali possono passare diversi tipi di molecole che coinvolgono queste giunzioni in svariati processi cellulari come proliferazione, differenziamento, apoptosi e carcinogenesi (Goodenough e Paul, 2009). Inoltre, la comunicazione cellulare può anche verificarsi mediante il legame di molecole presenti sulla superficie cellulare con recettori presenti sulla superficie di cellule target, oppure anche grazie al rilascio di fattori solubili (ad esempio chemochine, citochine, fattori di crescita ed ormoni) che possono agire in modo autocrino sulla stessa cellula che li ha rilasciati. Gli stessi fattori possono agire in modo paracrino su cellule che si trovano in prossimità della cellula che ha generato il segnale, o in modo endocrino su cellule distanti che possono essere raggiunte attraverso i fluidi biologici (Lucas et al., 2001; Albi et al., 2004; Levine et al., 2004; Taback et al., 2004).

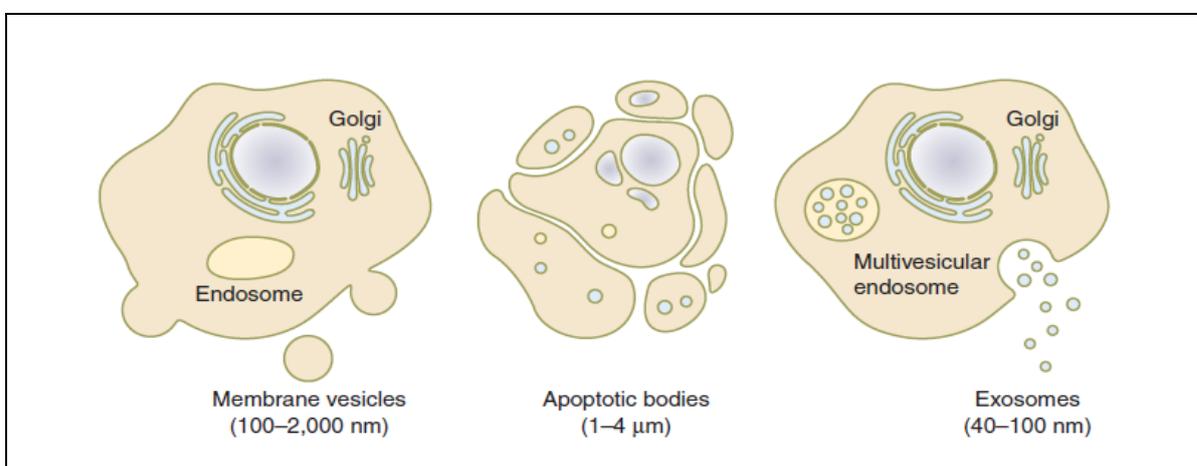
## **MICROVESCICOLE**

Da alcuni anni è stato dimostrato che le microvescicole extracellulari oltre ad essere parte integrante del microambiente intercellulare, rappresentano un altro importante meccanismo atto a mediare la comunicazione cellulare (Majka et al., 2001; Ratajczak et al., 2006b; Cocucci et al., 2009; Camussi et al., 2010a; Turturici et al., 2014).

Per molto tempo si è pensato che queste vescicole extracellulari fossero detriti cellulari inerti, che si potevano riscontrare nel sangue o negli spazi interstiziali, derivanti da cellule danneggiate o dal normale turnover delle membrane plasmatiche (Siekevitz, 1972). La loro presenza nello spazio extracellulare è stata descritta per la prima volta nel 1960 da Chargaff e West. Solo successivamente, nel 1977, De Broe e colleghi hanno suggerito che queste vescicole potessero avere un ruolo nella fisiologia cellulare, e che il loro rilascio potesse derivare da uno specifico meccanismo, dato che esse veicolavano enzimi di membrana funzionali, analoghi a quelli presenti nella membrana delle cellule da cui erano state generate (De Broe et al., 1977).

## 1. Classificazione

Le microvescicole differiscono tra loro per l'origine, la composizione antigenica ed anche per le dimensioni (Diamant et al., 2004; Ratajczak et al., 2006b). Per evitare confusione nella loro definizione l'International Society for Extracellular Vesicles recentemente ha suggerito di utilizzare il termine *vescicole extracellulari* (EVs) per indicare genericamente tutte le vescicole che possono essere rilasciate nell'ambiente extracellulare (Katsuda et al., 2013), cioè esosomi, vescicole di membrana, corpi apoptotici (Figura 2), microparticelle (rilasciate dalle piastrine) ed ectosomi (rilasciate dai leucociti polimorfonucleati). I principali tipi di vescicole extracellulari, che hanno spesso generato più confusione in letteratura, sono gli *esosomi* e le *vescicole di membrana*.



**Figura 2. Origine delle varie classi di vescicole extracellulari. Le vescicole di membrana si formano dalla protusione della membrana plasmatica ed il seguente rilascio della vescicola nello spazio extracellulare. I corpi apoptotici originano durante le fasi tardive dell'apoptosi. Gli esosomi si formano dal comparto endosomiale multivescicolare (Turturici et al., 2014).**

Gli *esosomi* sono piccole particelle omogenee nella forma, le cui dimensioni variano da 40 a 100 nm, e che derivano dal riciclo del pathway endocitico. Durante l'endocitosi, infatti, le vescicole che si formano a livello della membrana plasmatica si fondono per formare endosomi precoci, questi maturano in endosomi tardivi e da questi in corpi multivescicolari che, invece di associarsi con i lisosomi, si fondono direttamente con la membrana plasmatica rilasciando gli esosomi nello spazio extracellulare (Pant et al., 2012). La biogenesi degli esosomi, il sorting delle proteine cargo ed il loro rilascio necessitano del "complesso di ordinamento endosomiale necessario per il trasporto" (complesso ESCRT) (Mayers et al., 2012) e di altre proteine associate come Alix e Tsg101 (Heijnen et al., 1999; Yu et al., 2006; Thèry et al., 2011; Hurley and Odorizzi, 2012; Nabhan et al., 2012). Questo meccanismo di

rilascio può avvenire costitutivamente o in modo regolato. Una delle ipotesi è che ciò avvenga secondo un meccanismo simile a quello che permette la fusione e la secrezione dei lisosomi (van Niel et al., 2006). Anche gli stress cellulari, come lo shock termico o l'esposizione a raggi  $\gamma$ , possono stimolare il rilascio degli esosomi: il danno al DNA, infatti, attiva il soppressore tumorale p53, che promuove la loro esocitosi, probabilmente come meccanismo difensivo o per stimolare l'espressione genica delle cellule adiacenti (Yu et al., 2006).

Le *vescicole di membrana* invece sono più grandi degli esosomi, infatti il loro diametro è compreso tra 100 nm e 1  $\mu$ m. Esse si originano per gemmazione diretta dalla membrana plasmatica, con un meccanismo calcio dipendente. Uno degli aspetti più caratteristici delle vescicole di membrana, da qui in avanti indicate con il termine di EVs, è la presenza della fosfatidilserina sul versante esterno della membrana che delimita le vescicole, nonché la presenza di proteine associate ai raft lipidici, microdomini di membrana ricchi in colesterolo, sfingolipidi e proteine deputate alla trasduzione del segnale, al traffico di membrana o alla riorganizzazione del citoscheletro (Simons and Ikonen, 1997; Pike, 2003). I raft lipidici svolgono un ruolo importante nel rilascio delle vescicole, così come è stato evidenziato anche per il rilascio degli esosomi. Dati di letteratura riportano infatti una riduzione della capacità di rilascio delle vescicole in seguito alla rimozione del colesterolo dalle membrane con il trattamento con la methyl beta-ciclodestrina, sostanza che distrugge in modo specifico i raft lipidici (Del Conde et al., 2005), come è stato dimostrato per i mesoangioblasti di topo (Candela et al., 2010), e per cellule endoteliali (Burger et al., 2011).

Evidenze sperimentali hanno permesso di dimostrare che le cellule staminali sono un'abbondante fonte di EVs (Candela et al., 2010; Drago et al., 2013; Katsuda et al., 2013; Tetta et al., 2013), ipotizzando che queste ultime potessero costituire un importante meccanismo per il supporto, l'autorinnovamento e l'espansione delle stesse cellule staminali. Le EVs sono veicolo per trasferire proteine, RNA messaggeri, micro RNA e piccoli RNA non codificanti in grado di alterare l'espressione genica, la proliferazione ed il differenziamento delle cellule riceventi (Ratajczak et al., 2006a; Valadi et al., 2007; Skog et al., 2008; Bellingham et al., 2012; Nolte-'t Hoen et al., 2012). Ovviamente vescicole di membrana rilasciate da tipi cellulari differenti, come già detto prima, possono avere misure diverse, ma può variare ovviamente anche la loro composizione antigenica, cioè possono variare i fosfolipidi, le proteine ed altre molecole che queste esprimono in superficie.

Queste evidenze sperimentali sollevano un importante quesito, e cioè se una terapia rigenerativa possa, di fatto, essere possibile affrancandosi dal trapianto di cellule staminali,

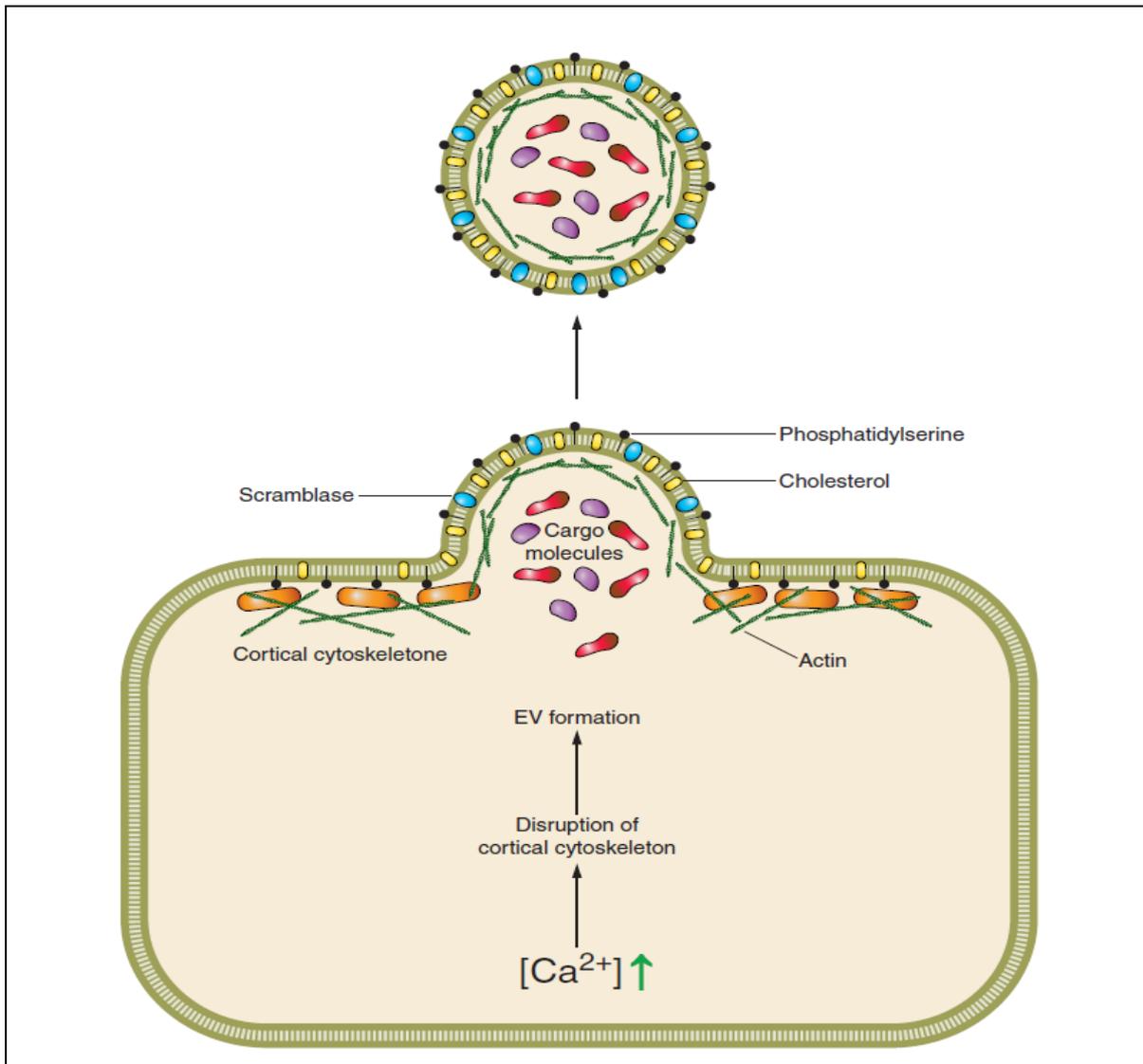
utilizzando invece le EVs provenienti dalle stesse cellule come veicolo di informazioni genetiche o proteine in grado di riprogrammare le cellule residenti del tessuto danneggiato per riparare le lesioni.

Il termine microparticelle include anche i *corpi apoptotici*, più grandi sia degli esosomi sia delle vescicole di membrana (diametro compreso tra 1 e 4  $\mu\text{m}$ ). Esse contengono acidi nucleici, organelli cellulari e porzioni citoplasmatiche o di membrana, che vengono rilasciati dalle cellule durante i processi di apoptosi, per essere fagocitati dai macrofagi ed evitare la dispersione del contenuto cellulare all'esterno, che potrebbe innescare un processo infiammatorio (Hristov et al., 2004; Berda-Haddad et al., 2011; Dignat-George et al., 2011; György et al., 2011).

Oggi è ormai noto che tutte le cellule sono in grado di rilasciare EVs (es. cellule del sangue, dendritiche, endoteliali, epiteliali, nervose e staminali), ciò vale anche per le cellule tumorali, le cui EVs (tEVs) giocano un ruolo chiave nella progressione tumorale.

## ***2. Meccanismo di rilascio delle vescicole di membrana***

Il rilascio delle vescicole di membrana è da considerarsi un fenomeno fisiologico che avviene con un meccanismo calcio dipendente, il quale innesca modifiche del citoscheletro actinico a livello della membrana plasmatica, e del citoscheletro tubulinico (Pilzer et al., 2005; Moskovich et al., 2007). L'aumento del calcio intracellulare, indotto da un segnale esterno, determina, inoltre, la perdita dell'asimmetria del doppio strato fosfolipidico agendo sull'attività di enzimi, quali flippasi, floppasi e scramblasi (Hugel et al., 2005). Il calcio, infatti, attiva la scramblasi, enzima responsabile dello spostamento della fosfatidilserina dal versante interno a quello esterno della membrana, ed inibisce la flippasi, enzima responsabile invece del suo spostamento in senso opposto. Gli ioni calcio sono responsabili, inoltre, dell'attivazione di enzimi, quali gelsolina e calpaina, che modificano il citoscheletro di actina permettendo il disassemblaggio dell'actina corticale localizzata al di sotto della membrana plasmatica. Quanto appena descritto determina la curvatura e la protrusione della membrana plasmatica ed il conseguente distacco della vescicola dalla membrana (Cocucci et al., 2009) (Figura 3).



**Figura 3. Meccanismo proposto per la formazione delle vescicole di membrana (EVs). Il processo è accompagnato da un aumento dei livelli del calcio intracellulare, responsabile dell'attivazione della scramblasi e dello switch della fosfatidilserina dal versante interno a quello esterno del bilayer fosfolipidico, contemporaneamente al disassemblaggio dell'actina corticale (Turturici et al., 2014).**

Il ruolo dell'actina citoscheletrica nel processo di rilascio delle vescicole è stato confermato anche da alcuni esperimenti riportati in letteratura. La citocalasina D, o altre droghe capaci di inibire la polimerizzazione dei microfilamenti, determinano infatti un aumento delle EVs rilasciate da piastrine, megacariociti o linfociti T (Distler et al., 2005; Cauwenberghs et al., 2006; Flaumenhaft et al., 2009). Analogamente è stato dimostrato che il trattamento dei mesoangioblasti con nocodazolo, inibitore della sintesi dei microtubuli, causa una riduzione del rilascio delle EVs, laddove invece l'integrità dei microfilamenti non ne influenza il rilascio (Candela et al., 2010).

Il calcio, tuttavia, non è l'unico secondo messaggero coinvolto nel meccanismo di rilascio delle EVs, infatti in diversi tipi cellulari è stato dimostrato che l'attivazione della PKC ad opera dell'estere del forbolo è in grado di innescare il rilascio delle EVs (Sidhu et al., 2004; Pilzer et al., 2005; Baj-Krzyworzeka et al., 2006).

### ***3. Arricchimento selettivo del carico delle vescicole di membrana***

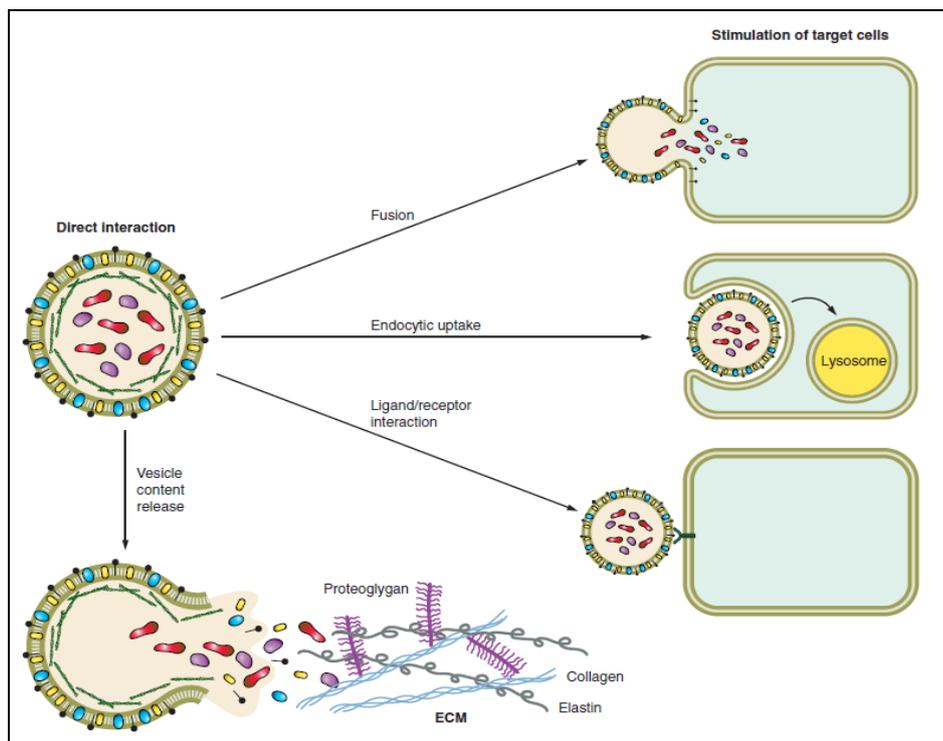
Il doppio strato fosfolipidico delle vescicole racchiude un ampio repertorio di macromolecole, incluse proteine (ad es. citochine, recettori di membrana), acidi nucleici (DNA, mRNA, miRNA) e lipidi. Sebbene il contenuto delle EVs rifletta la cellula da cui hanno avuto origine, vi è un targeting selettivo delle macromolecole incluse al loro interno. I meccanismi con cui questo processo avviene rimangono però ancora da definire (Skog et al., 2008; Li et al., 2013). Specifiche proteine possono, infatti, essere incluse o escluse dalle EVs e pertanto il loro pattern di espressione può differire rispetto alla superficie cellulare da cui hanno avuto origine (Moskovich and Fishelson, 2007). Ad esempio, le EVs rilasciate dai leucociti polimorfonucleati (PMN) mancano di CD14 e FcγRII, presenti invece sulla superficie di questi ultimi (Gasser et al., 2003). Diverse proteine, tra cui MHC di classe I, intergrina β1 e VAMP3 (vesicle-associated membrane protein 3), che derivano da un pathway di riciclaggio endosomiale ARF6-dipendente, sono selettivamente incorporate nelle microvescicole rilasciate da cellule tumorali (D'Souza-Schorey and Chavrier, 2006). È interessante però notare che il recettore della transferrina, presente sulla superficie cellulare e sugli endosomi precoci, non viene reclutato nelle tEVs (D'Souza-Schorey and Chavrier, 2006). Collettivamente, questi risultati suggeriscono una incorporazione selettiva del cargo nelle EVs. Rimane tuttavia da definire come proteine citosoliche o acidi nucleici possano essere indirizzati all'interno delle EVs.

Il contenuto delle EVs può, inoltre, includere enzimi come metalloproteasi che incrementano la mobilità delle cellule tumorali (Sidhu et al., 2004), o molecole segnale come la citochina pro-infiammatoria IL-1β, rilasciata da macrofagi e da cellule dendritiche (Wilson et al., 2004; Pizzirani et al., 2007). Proteine come IL-1β e bFGF mancano del peptide segnale di rilascio e pertanto non possono essere secrete attraverso il classico pathway esocitico (Rubartelli and Sitia, 1997). La formazione di EVs può quindi rappresentare una via alternativa per il rilascio di queste proteine "leaderless" (Rubartelli et al., 1990; Mignatti e Rifkin, 1991; Mignatti et al., 1992; MacKenzie et al., 2001; Taverna et al., 2008; Candela et al., 2010).

#### 4. Interazione delle EVs con le cellule target

Una volta rilasciate, le EVs possono degradarsi rapidamente, liberando così il loro carico nell'ambiente extracellulare in vicinanza delle cellule che le hanno rilasciate, oppure possono entrare in circolo in diversi fluidi biologici e raggiungere siti bersaglio lontani dal sito di rilascio. Questo spiega perché le EVs si ritrovino in tutti i fluidi biologici, quali sangue, urine, latte e liquido cerebrospinale. Ciò accade anche per le EVs rilasciate dalle cellule tumorali, infatti nei fluidi biologici di pazienti affetti da patologie neoplastiche si possono trovare tEVs (Iero et al., 2008; Camussi et al., 2010a), ed ormai si sta cercando di attribuire loro un ruolo diagnostico/prognostico, al fine di poter ottenere delle informazioni in merito allo stadio della malattia o di valutarne la prognosi.

Le EVs non sono in grado di interagire con tutti i tipi cellulari, bensì solo con specifiche cellule, ad esempio le vescicole rilasciate dalle piastrine possono interagire con i macrofagi o con le cellule endoteliali, ma non con i neutrofilo (Lösche et al., 2004). L'interazione con le cellule target può avvenire attraverso meccanismi diversi (Figura 4):



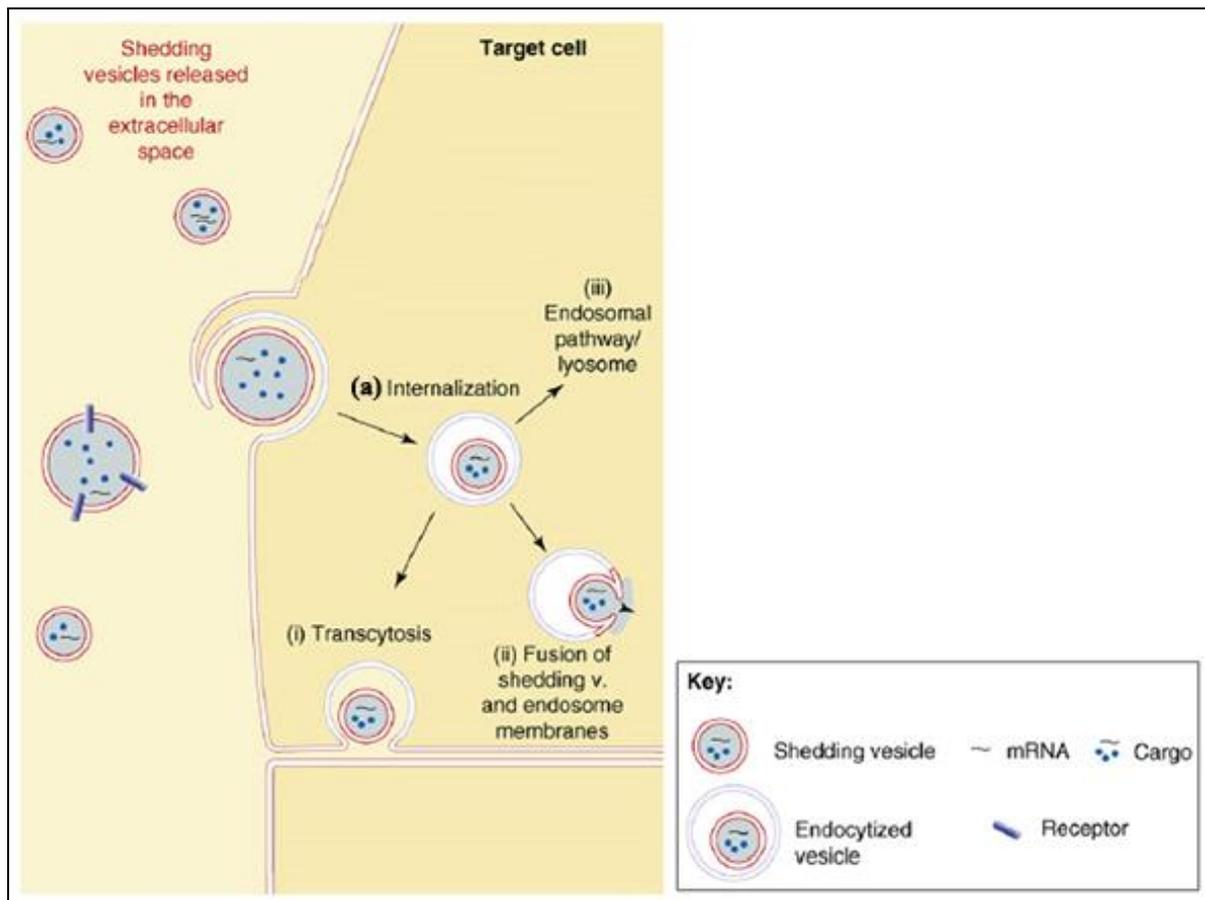
**Figura 4.** Rappresentazione schematica dei meccanismi di interazione tra le vescicole extracellulari e le cellule target. Una volta rilasciate nello spazio extracellulare le vescicole possono: a) fondersi direttamente con la membrana della cellula target; b) essere internalizzate per endocitosi. Infine, c) legare specifici recettori (Turturici et al. 2014).

- attraverso il legame con specifici recettori espressi sulla superficie delle cellule target, i quali possono innescare un meccanismo di segnalazione e la conseguente formazione di un complesso extracellulare multimolecolare;
- per fusione diretta della propria membrana con quella della cellula target, rilasciando così immediatamente il proprio contenuto all'interno della cellula;
- per endocitosi.

In quest'ultimo caso la EV endocitata può essere avviata a tre differenti destini:

- rimanere segregata all'interno degli endosomi per poi fondersi con i lisosomi ed essere degradata;
- fondere la propria membrana con quella endosomiale per rilasciare il proprio contenuto all'interno del citoplasma della cellula target;
- o per transitosi raggiungere lo spazio extracellulare in seguito alla fusione dell'endosoma con la membrana plasmatica (Köppler et al., 2006).

(Figura 5)



**Figura 5.** Destini alternativi in seguito ad endocitosi: a) in seguito all'internalizzazione le vescicole possono essere avviate a tre differenti destini: i) raggiungere lo spazio extracellulare per transitosi; ii) fondere la propria membrana con quella endosomiale per rilasciare il proprio contenuto all'interno del citoplasma; iii) rimanere segregata all'interno degli endosomi (Cocucci et al., 2009).

## **5. Funzioni ed effetti biologici delle EVs**

Le funzioni biologiche delle EVs variano in base al tipo cellulare da cui esse derivano, e di conseguenza anche da ciò che esse contengono. Come è stato dimostrato per le EVs rilasciate dai procarioti, anche le EVs provenienti dalle cellule eucariotiche degli organismi pluricellulari rappresentano dei veicoli che consentono la comunicazione intercellulare, in grado di influenzare il comportamento delle cellule target in vari modi. Esse, infatti, possono agire fungendo da complesso segnalatorio, trasferendo recettori di membrana ed altre proteine alle cellule target, oppure modificandone il fenotipo mediante il trasferimento orizzontale di informazioni genetiche. Inoltre, rappresentano anche uno degli strumenti di difesa di cui le cellule si servono, per proteggersi dagli stress intracellulari ed extracellulari.

### **5.1 Trasferimento di complessi recettoriali alle cellule target**

Le EVs possono mediare il trasporto di secondi messaggeri, citochine o recettori di membrana. Il fenomeno del trasferimento di recettori è stato largamente studiato nelle EVs derivate dalle piastrine, capaci di trasferire alle cellule ematopoietiche molecole di adesione specifiche delle piastrine (Janowska-Wieczorek et al., 2001; Baj-Krzyworzeka et al., 2002). Inoltre, del Conde e colleghi hanno dimostrato che le vescicole di membrana dei leucociti possono trasferire il *tissue factor* (TF) sulla membrana delle piastrine attivate, secondo un meccanismo dipendente dai raft lipidici, per dare inizio al processo di coagulazione (del Conde et al., 2005). Un altro esempio di trasferimento di recettori di membrana tra le cellule è dimostrato dai linfociti B inattivi che acquisiscono i recettori per gli antigeni dalle EVs rilasciate dai linfociti B attivati, determinando così una rapida espansione delle cellule B capaci di presentare l'antigene ai linfociti T CD4<sup>+</sup> (Quah et al., 2008).

### **5.2 Le EVs durante lo sviluppo**

Le EVs possono anche intervenire nei processi di sviluppo. Greco e collaboratori hanno infatti dimostrato che, durante il differenziamento tissutale, alcune cellule rilasciano morfogeni quali Hedgehog, Wntless o Decapentaplegic attraverso vescicole di membrana. In questo modo si viene a creare un gradiente di morfogeni, necessario per il corretto sviluppo embrionale (Greco et al., 2011). Recentemente è stato dimostrato che alcune particelle simili alle EVs (NVPs), contenenti morfogeni come Hedgehog e acido retinoico, intervengono nello sviluppo dell'asse destra-sinistra dei mammiferi (Hirokawa et al., 2009).

### ***5.3 Ruolo protettivo delle EVs***

Le EVs rappresentano anche un meccanismo di difesa per le cellule che le producono contro gli stress intracellulari ed extracellulari. Le EVs, per esempio, permettono l'eliminazione recettori che vengono espressi in sovrannumero, oppure permettono di eliminare molecole potenzialmente dannose le cellule, come chemioterapici, caspasi e fosfolipidi ossidati. Infatti, è stata dimostrata la presenza della caspasi-3 all'interno delle EVs isolate da cellule endoteliali, probabilmente come meccanismo di difesa per le cellule che in questo modo vengono protette dall'accumulo di alti livelli di caspasi-3 che ne determinerebbero la morte per apoptosi (Abid-Hussein et al., 2007).

### ***6. Trasferimento di materiale genetico alle cellule riceventi per via orizzontale***

Uno degli aspetti più interessanti su cui recentemente si è focalizzata l'attenzione, è la capacità che hanno le EVs di indurre modifiche nel fenotipo cellulare cellule target. Le EVs, oltre consentire il trasferimento di proteine, recettori di membrana e lipidi, possono trasferire anche informazioni genetiche. È stata dimostrata, infatti, la presenza al loro interno di acidi nucleici, in particolare mRNA e miRNA. Le vescicole offrono un doppio vantaggio nella veicolazione di queste molecole: permettono il loro trasferimento a lunga distanza, e li proteggono dagli enzimi di degradazione presenti a livello extracellulare (Collino et al., 2010). Dati in letteratura riportano che le EVs rilasciate dalle cellule staminali embrionali di topo sono in grado di supportare il self-renewal e l'espansione delle cellule staminali adulte grazie al trasferimento di mRNA (Ratajczak et al., 2006a; Deregibus et al., 2007). Inoltre, la riprogrammazione epigenetica di progenitori ematopoietici da parte di EVs derivate da cellule staminali embrionali murine è stata dimostrata da Ratajczak e colleghi. In queste cellule, le EVs hanno indotto un up-regolazione di marcatori precoci pluripotenti ed ematopoietici e la fosforilazione delle chinasi MAPK p42/44 e Akt. Questo effetto biologico è stato attribuito ad un trasferimento orizzontale di mRNA mediato dalle EVs. La loro analisi molecolare aveva difatti rilevato che queste erano abbondantemente e selettivamente arricchite, rispetto alle cellule parentali, di mRNA codificanti per diversi fattori trascrizionali pluripotenti (Ratajczak et al., 2006a). Aspetto ancora più rilevante è che gli mRNA trasferiti dalle EVs possono essere tradotti nelle cellule bersaglio nella corrispondente proteina, e la dimostrazione della sua traducibilità è stata ottenuta grazie al trasferimento, attraverso le EVs, dell'mRNA della proteina GFP all'interno di cellule endoteliali, dove poi si è riscontrata la presenza della proteina (Deregibus et al., 2007).

All'interno delle EVs sono state riscontrate anche proteine leganti l'RNA, implicate nella regolazione della stabilità e del traffico degli RNA tra il nucleo ed il citoplasma (Staufen 1 e 2) e nel trasporto e processamento dei miRNA (proteine della famiglia Argonaute). Questo può fare ipotizzare che durante la formazione delle EVs esista un fine meccanismo che regola l'accumulo degli mRNA e dei miRNA in modo selettivo (Yuan et al., 2009; Collino et al., 2010).

Oltre agli mRNA, le EVs possono veicolare nelle cellule bersaglio miRNA (Yuan et al., 2009; Collino et al., 2010), una classe di piccoli RNA non codificanti lunghi 19-23 nucleotidi, in grado di modulare l'espressione genica inibendo la trascrizione o promuovendo la degradazione dell'mRNA target, regolando, in ultima analisi, l'omeostasi, il differenziamento e la proliferazione delle cellule (Escudier et al., 2005; Krol et al., 2010). Un'analisi comparativa ha evidenziato che gli stessi miRNA selettivamente incorporati all'interno delle EVs sono assenti nelle cellule dopo il loro rilascio, mentre altri non vengono secreti nelle EVs e sono trattenuti all'interno delle cellule (Camussi et al., 2011). Questo suggerisce un processo regolato di compartimentazione dei miRNA, così come evidenziato nel caso degli mRNA.

L'analisi ontologica dei geni target (predetti e validati) dei miRNA abbondantemente espressi nelle EVs secrete da cellule staminali mesenchimali suggerisce che questi sono coinvolti in processi quali organogenesi, sopravvivenza cellulare, differenziamento e regolazione del sistema immunitario (Camussi et al., 2011).

## **7. *Le vescicole extracellulari nei tumori***

Le EVs giocano un ruolo importante e complesso anche in alcune patologie, in particolare nei tumori. Come già detto precedentemente anche le cellule tumorali sono in grado di rilasciare EVs, implicate nella comunicazione, nella protezione e nello scambio di informazioni genetiche, come nel caso di quelle rilasciate dalle cellule normali (Nieuwland and Sturk, 2010). Il rilascio delle tEVs rappresenta per le cellule tumorali un'opportunità che favorisce la progressione tumorale. Infatti, da un lato esse sostengono la crescita e l'espansione tumorale, dall'altro garantiscono la sopravvivenza delle stesse cellule.

Le tEVs favoriscono la crescita tumorale:

- a.* Possono favorire l'angiogenesi, perché al loro interno sono presenti mRNA che codificano per fattori di crescita quali VEGF ed HGF. Questi all'interno dei

monociti vengono tradotti promuovendo l'angiogenesi, che permette l'ossigenazione e la crescita della massa tumorale (Sims et al., 1988).

**b.** Possono promuovere la crescita invasiva della massa tumorale mediante *la degradazione della matrice extracellulare*, perché al loro interno si possono riscontrare metalloproteasi (MMP-2 e -9) e l'attivatore urochinasico del plasminogeno (uPA). Una volta rilasciate all'esterno, le metalloproteasi (MMPs) degradano i componenti della matrice extracellulare, mentre l'uPA converte il plasminogeno in plasmina, contribuendo anche in questo caso alla degradazione dei componenti della matrice extracellulare, oltre ad attivare le stesse MMPs (Dolo et al., 1998; Ginestra et al., 1998; Ginestra et al., 1999; Angelucci et al., 2000).

**c.** Le tEVs veicolano anche oncogeni che inducono la trasformazione del fenotipo delle cellule target, favorendo la *formazione di metastasi*.

Le tEVs, agiscono anche proteggendo le cellule tumorali in due modi:

**i)** Come nel caso delle EVs rilasciate dalle cellule normali, anche quelle provenienti dalle cellule tumorali possono contenere la caspasi-3 o i chemioterapici; in questo modo esse offrono alle cellule tumorali la possibilità di non andare incontro all'apoptosi (grazie all'eliminazione delle caspasi-3) e di acquisire anche la resistenza ai chemioterapici (Shedden et al., 2003; Safaei et al., 2005)

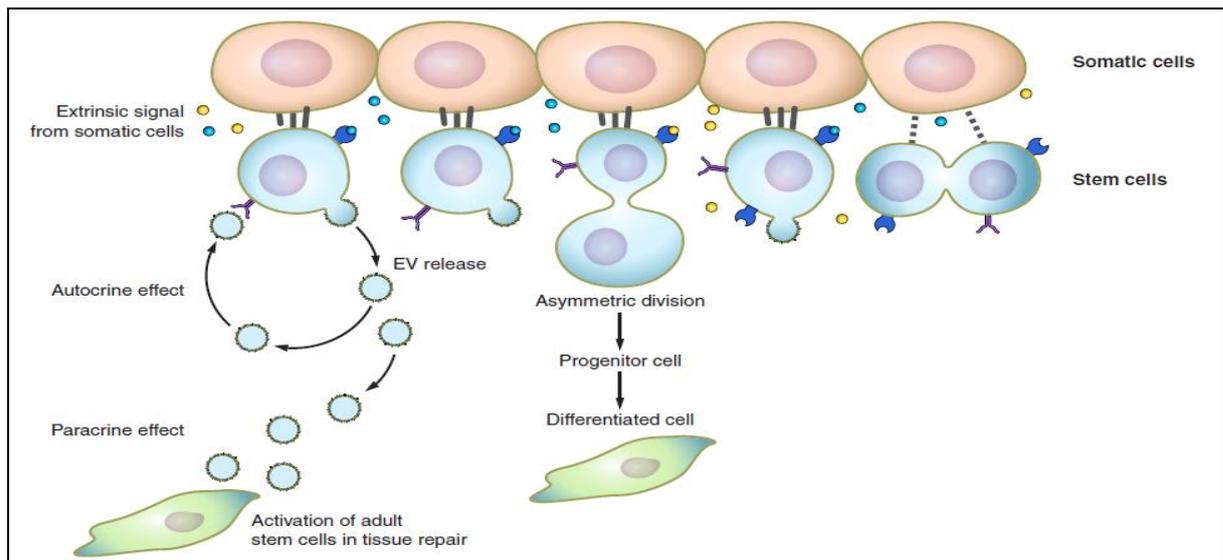
**ii)** Le tEVs sono anche capaci di eludere il sistema immunitario perché sulla loro superficie è esposto Fas ligand che, interagendo con il recettore Fas, può indurre l'apoptosi dei linfociti T (Andreola et al., 2002). Le tEVs sono anche in grado di interferire con il differenziamento dei monociti in cellule deputate alla presentazione dell'antigene (Valenti et al., 2006).

All'interno delle tEVs, oltre essere presenti mRNA, si possono riscontrare anche miRNA. Lo studio di tali miRNA può essere utile perché il loro pattern di espressione può cambiare in base alla stadiazione del tumore, come avviene per esempio nel tumore all'ovario (Taylor et al., 2008) e questo potrebbe offrire degli interessanti risvolti nel campo della diagnostica.

## 8. *Le EVs e la nicchia staminale*

Il termine *nicchia staminale* è stato coniato per la prima volta da Schofield nel 1978, e per definizione possiede le seguenti caratteristiche: è una regione anatomica definita, consente l'espansione delle cellule staminali, ne previene il differenziamento, è costituita da un numero limitato di cellule staminali, ed è in grado di determinare la reversione delle cellule figlie verso un fenotipo staminale (Quesenberry and Aliotta, 2008). La sua definizione deriva dall'osservazione del comportamento delle cellule ematopoietiche della milza. Era stato osservato, infatti, che queste possedevano una capacità proliferativa inferiore rispetto a quelle del midollo osseo; tale differenza è da attribuire all'assenza di cellule capaci di mantenere la staminalità delle cellule ematopoietiche a livello della milza (Schofield, 1978; Voog and Jones, 2010).

Le cellule staminali adulte sono presenti in tutti i tessuti adulti, e costituiscono un elemento essenziale per il mantenimento della loro omeostasi perché forniscono una riserva importante che permette di sostituire le cellule differenziate perse in seguito a danni o ai fisiologici processi di apoptosi. L'interazione tra le cellule staminali ed il microambiente che le circonda gioca un ruolo di fondamentale importanza nel determinare il fenotipo cellulare. In particolare, l'ambiente contribuisce al mantenimento dell'equilibrio tra l'*automantenimento* (*self-renewal*) ed il *differenziamento*, le due caratteristiche principali che contraddistinguono le cellule staminali. Questa struttura dinamica prende il nome di *nicchia delle cellule staminali* ed è in grado di influenzare il loro comportamento (Figura 6), sia attraverso l'interazione con tutti i tipi cellulari che costituiscono la nicchia stessa, sia attraverso l'interazione tra le stesse cellule staminali (Li and Xie, 2005; Moore and Lemischka, 2006; Jones and Wagers, 2008).



**Figura 6. Rappresentazione schematica di come le EVs, in condizioni fisiologiche, sono in grado di dare equilibrio tra self-renewal e differenziamento. In condizioni patologiche invece, le EVs rilasciate dalle cellule staminali infuse possono esercitare effetti paracrini sulle cellule staminali residenti nei tessuti danneggiati e/o sulle cellule somatiche, per ripristinare le funzioni tissutali originali (Turturici et al., 2014).**

La nicchia delle cellule staminali è costituita non solamente dalle cellule che la compongono, ma anche da fattori solubili o ancorati alla membrana, e dalle cellule di supporto, tutti elementi che contribuiscono a regolarne il funzionamento, insieme a metaboliti, ossigeno ed ormoni (Peerani and Zandstra, 2010). Ciò significa che il suo funzionamento dipende da una complessa rete di segnali integrati, che agiscono a corto ed a lungo raggio, e che coinvolgono le cellule staminali, le cellule differenziate e le cellule vicine (Watt and Hogan, 2000).

La nicchia, come detto prima, è deputata al mantenimento dell'omeostasi tissutale durante i processi fisiologici e patologici. Uno sbilanciamento dell'equilibrio tra autorinnovamento e differenziamento può determinare l'alterazione di questa omeostasi: da un lato, un aumento del numero di cellule staminali residenti all'interno di una nicchia comporterebbe un'espansione cellulare, e quindi l'innescarsi di un evento di tumorigenesi; al contrario, un aumento del numero di cellule differenziate determinerebbe il depauperamento del pool di cellule staminali che assicurano il normale turnover dei tessuti adulti.

La capacità della nicchia di regolare in modo dinamico il comportamento delle cellule staminali conferisce ad essa un ruolo di primo piano nei processi di riparo del danno tissutale ed anche nello sviluppo di tumori o di malattie croniche.

Recentemente è stato dimostrato che anche le cellule staminali, soprattutto quelle embrionali, sono capaci di rilasciare vescicole extracellulari. È stato ipotizzato che tali vescicole possano essere implicate *in vitro* nei processi di automantenimento ed espansione. Alcuni esperimenti,

infatti, hanno dimostrato che le vescicole rilasciate dalle cellule staminali embrionali contengono: Wnt-3, fattore responsabile dell'espansione delle cellule staminali (George et al., 1982; Hess et al., 1999; Greco et al., 2011) ed Oct-4, fattore di trascrizione responsabile della pluripotenza di queste cellule. In particolare, di quest'ultimo è stata dimostrata, in seguito al trattamento con RNAsi, la presenza all'interno delle vescicole anche dell'mRNA corrispondente, ciò significa che questo mRNA può essere trasferito all'interno delle cellule target (Ratajczak et al., 2006a). Numerosi studi hanno dimostrato, inoltre, che gli mRNA veicolati dalle vescicole extracellulari all'interno delle cellule target possono essere tradotti nelle proteine corrispondenti. All'interno delle vescicole extracellulari rilasciate dalle cellule staminali si possono ritrovare anche miRNA, piccoli RNA capaci di regolare l'attività di numerosi mRNA e di conseguenza il fenotipo cellulare (Valadi et al., 2007; Bruno et al., 2009a; Bruno et al., 2009b; Deregibus et al., 2010; Herrera et al., 2010).

La dimostrazione che anche le cellule staminali siano in grado di rilasciare vescicole extracellulari contenenti mRNA e miRNA suggerisce, quindi, un loro possibile coinvolgimento nella regolazione della *nicchia* (Yuan et al., 2009).

### ***9. EVs come fattori paracrini e prospettive in medicina rigenerativa***

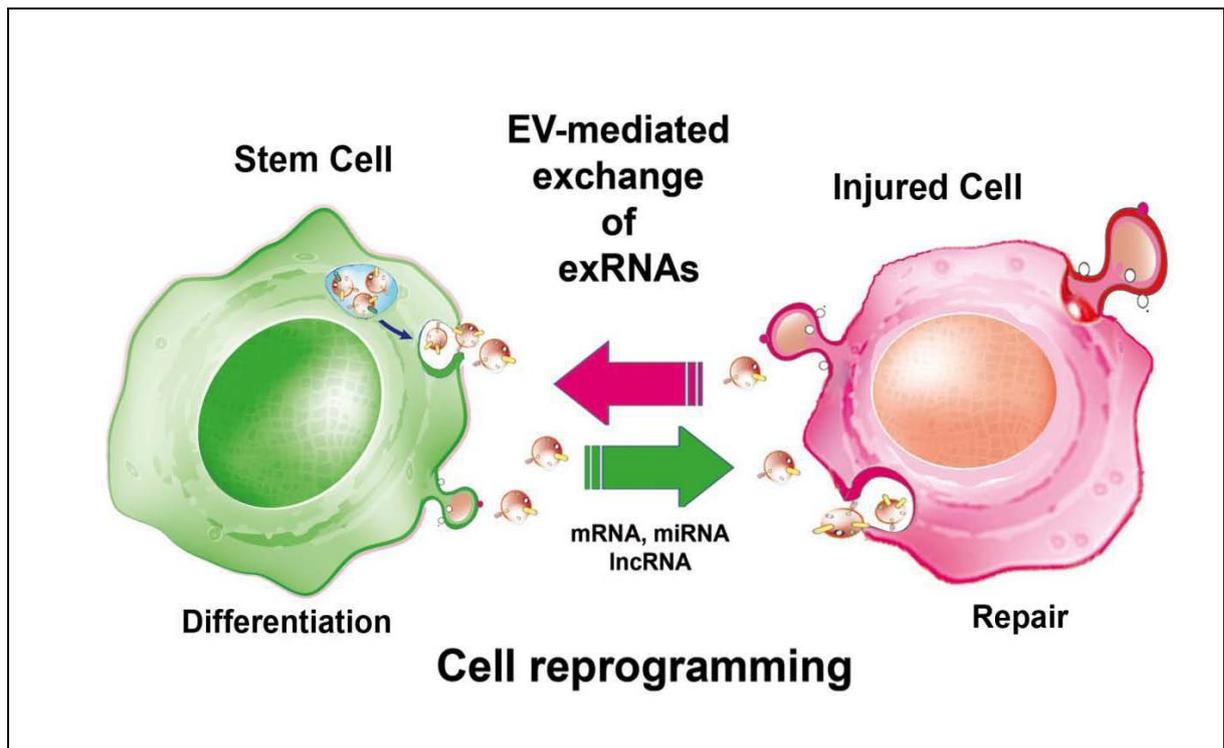
Al giorno d'oggi la comunità scientifica sta rivolgendo la propria attenzione in modo crescente verso le EVs, non solo perché queste rappresentano dei nuovi strumenti di cui la cellula si serve per la comunicazione, ma anche e soprattutto perché si è compreso che la loro versatilità potrebbe essere sfruttata a scopo terapeutico. In particolare, il campo dove le EVs sembrano riscontrare maggiore applicazione, è la medicina rigenerativa. L'obiettivo della terapia rigenerativa è sempre stato la ricerca di cellule staminali che potessero essere trapiantate in modo sicuro per il paziente ed essere in grado di determinare un'efficace rigenerazione dell'organo danneggiato affrancandosi delle complicazioni della risposta immunologica (Ratajczak et al., 2008; Borlongan, 2011; Staal et al., 2011). Risultati positivi sono stati ottenuti soprattutto in alcuni trial clinici per la cura dell'infarto del miocardio, o di danni epatici o renali causati da ischemia (Tendera et al., 2009; Howe et al., 2011). Purtroppo però le cellule staminali adulte, normalmente impiegate per questo tipo di trattamenti, sono estremamente rare ed il loro utilizzo può essere limitato dall'azione del sistema immunitario o dai fattori del complemento. Nei trapianti di cellule staminali, nonostante si osservino degli effetti benefici in diverse condizioni patologiche, solo poche delle cellule trapiantate vanno incontro a transdifferenziazione o a fusione con i tessuti lesionati (Herrera et al., 2007), e

certamente non in numero sufficiente a giustificare la rigenerazione dei tessuti (Herrera et al., 2007; Humphreys et al., 2008).

L'utilizzo delle cellule staminali è anche limitato dalle loro ridotte capacità migratorie (homing) verso il sito bersaglio e dalla bassa resistenza ad un ambiente citotossico che causa morte cellulare massiva (Giannotta et al., 2014).

Data la capacità ormai accertata anche per le cellule staminali di rilasciare EVs, sono stati condotti alcuni esperimenti in vitro utilizzando il mezzo condizionato delle cellule staminali in coltura, e si è visto che questo è in grado di inibire l'apoptosi, stimolare la proliferazione ed agire anche da chemioattraente per diversi tipi cellulari (Janowska-Wieczorek et al., 2001; Majka et al., 2001). Si è quindi ipotizzato che le EVs rilasciate dalle cellule staminali potrebbero rimpiazzare le cellule stesse nella terapia rigenerativa, e si è iniziato a parlare, in modo sempre più frequente, di *fattori paracrini*. Per avere la conferma che questi fattori paracrini siano le EVs sono stati condotti numerosi esperimenti da diversi gruppi di ricerca che, non solo hanno dimostrato che le EVs sono in grado di sostituire le cellule stesse, ma hanno anche permesso di identificare quali siano i veri responsabili dei risultati positivi ottenuti. Per esempio è stato dimostrato che le EVs isolate da cellule staminali embrionali di topo (ESC) sono in grado di indurre un aumento dell'espressione di alcuni marker di pluripotenza (Oct-4 e Nanog), ed anche di alcuni marker ematopoietici precoci in cellule progenitrici ematopoietiche di topo (Ratajczak et al., 2006). Un altro esperimento che ha dimostrato il trasferimento di mRNA è stato condotto somministrando EVs isolate da cellule mesenchimali stromali multipotenti (MSC) a livello renale subito dopo un danno ischemico. In seguito alla loro somministrazione ne è conseguita l'inibizione dell'apoptosi ed anche la stimolazione della proliferazione delle cellule epiteliali tubulari (Gatti et al., 2011).

Entrambi gli esperimenti hanno dimostrato che i fattori paracrini rilasciati dalle cellule staminali sono le EVs, e che i benefici ottenuti in seguito al loro utilizzo al posto delle cellule staminali che le rilasciano sono determinati sostanzialmente dal trasferimento di mRNA che possono indurre delle modifiche nel fenotipo o nell'espressione genica delle cellule target. Si ipotizza pertanto, che il trasferimento di informazioni genetiche mediato dalle EVs possa svolgere un ruolo fondamentale nella plasticità delle cellule staminali e nella rigenerazione dei tessuti (Aliotta et al., 2010; Deregibus et al., 2010) e che questo meccanismo probabilmente sia alla base dell'azione paracrina mediata dalle cellule staminali nella riparazione del danno tissutale (Figura 7) (Camussi et al., 2010b; Camussi et al. 2014).



**Figura 7.** Rappresentazione schematica dei meccanismi mediati dalle EVs attraverso i quali si verificano scambi bidirezionali di RNA extracellulari tra cellule staminali e cellule danneggiate. Il trasferimento di informazioni genetiche da queste ultime può indurre differenziazione delle cellule staminali residenti e espressione di fenotipi tessuto-specifici. Contrariamente, gli RNA extracellulari derivanti dalle cellule staminali possono indurre de-differenziamento e ripresa del ciclo cellulare, o attivare programmi rigenerativi nelle cellule riceventi con conseguente induzione di meccanismi di auto-riparazione del tessuto compromesso (Camussi et al., 2014).

Queste ipotesi aprono nuovi scenari e nuove opportunità terapeutiche, in maniera ancor più marcata se si auspica di poter modificare *in vivo* le EVs mediante aggiunta di mRNA e miRNA o di agenti terapeutici, durante il processo di biogenesi (Alvarez-Erviti et al., 2011; Zhuang et al., 2011.), o *in vitro* dopo isolamento (Majka et al., 2001). Sebbene l'arricchimento delle EVs con specifici farmaci, durante il processo di biogenesi o *in vitro*, richieda una comprensione ben più profonda dei processi di biogenesi.

In conclusione, risulta di essenziale importanza per il futuro, lo studio e la comprensione dei meccanismi che sottendono alla biogenesi ed al rilascio delle EVs, nonché ai meccanismi che regolano l'arricchimento selettivo di fattori paracrini e molecole di RNA, dei meccanismi che regolano l'interazione delle EVs con specifici tipi cellulari e degli effetti che il contenuto delle EVs è in grado di sortire sulle cellule riceventi.

# *Materiali e Metodi*

## ***Colture cellulari***

I cloni cellulari A6 e D16-GFP sono mesoangioblasti murini di origine embrionale. Il clone D16-GFP è stato stabilmente trasfettato con un vettore lentivirale di terza generazione esprime la *green fluorescent protein* (GFP) (Sampaolesi et al., 2003).

I mesoangioblasti vengono mantenuti in coltura in piastre pretrattate con collagene di tipo I (BD Biosciences) ed incubate in terreno D-MEM alto glucosio, senza piruvato (Dulbecco's Modified Eagles Medium) (Life Technologies). Le cellule endoteliali ECV304 e GM7373 sono incubate in Medium 199 (Life Technologies). Le cellule Hek293, SKHep1, 3T3-L1, NIH-3T3, LnCap, M1, HT1286, SHSY5Y e Huh7 sono state mantenute in D-MEM alto glucosio, con piruvato (Dulbecco's Modified Eagles Medium) (Life Technologies). I macrofagi Raw264.7, in dipendenza dalla necessità sono stati mantenuti in coltura in D-MEM alto glucosio, con piruvato (Dulbecco's Modified Eagles Medium) (Life Technologies) oppure in RPMI 1640 GLUTAMAX (Life Technologies). Le cellule Jurkat sono state mantenute in RPMI 1640 GLUTAMAX (Life Technologies)

Il mezzo di coltura è supplementato con il 10% di siero bovino fetale (FBS) inattivato al calore (Life Technologies) e l'1% di antibiotico antimicotico (penicillina, streptomina, amfotericina B, Sigma).

Le cellule vengono così mantenute in incubatore a 37°C alla pressione parziale di CO<sub>2</sub> del 5%.

## ***Isolamento di vescicole di membrana***

Il terreno di coltura completo è stato precedentemente ultracentrifugato per rimuovere da questo eventuali esosomi del siero ed evitare che questi si potessero confondere con le vescicole rilasciate dalle cellule.

Si fanno crescere le cellule in piastre da 150 cm<sup>2</sup> e quando queste raggiungono una confluenza del 70-80% si sostituisce il mezzo di coltura con il terreno ultracentrifugato e si incubano le cellule a 37°C per 3h, intervallo di tempo necessario perché avvenga il massimo rilascio di vescicole di membrana da parte delle cellule (Candela et al., 2010). Dopo le 3h di incubazione, il terreno in cui sono state rilasciate le vescicole di membrana è stato recuperato e trasferito in tubi da 50 ml, per essere centrifugato prima a 1500 rpm per 10' e poi a 3000 rpm per 15', allo scopo di eliminare eventuali cellule in sospensione. Al termine delle centrifugazioni il supernatante è stato trasferito in tubi da ultracentrifuga (Beckman) per essere centrifugato a 38000 rpm per 1h e 30' a 4°C (rotore Ti60 o Ti45, Beckman).

Conclusa questa fase il supernatante è stato eliminato ed il pellet è stato risospeso in 10 µl di PBS 1X filtrato per poter recuperare le vescicole rilasciate dalle cellule.

### ***Determinazione proteica: il metodo Bradford***

La determinazione proteica delle vescicole isolate è stata effettuata utilizzando il metodo Bradford che prevede l'utilizzo di uno specifico reagente che forma un complesso con le proteine in soluzione e modifica la propria assorbanza in modo proporzionale alla concentrazione delle proteine presenti nella soluzione.

Per i lisati proteici totali a 5 µl di una diluizione 1:10 del lisato sono stati aggiunti 745 µl di acqua sterile; per le vescicole di membrana invece ad 1 µl di campione sono stati aggiunti 749 µl di acqua sterile.

Allo stesso modo sono stati preparati cinque campioni di BSA a concentrazione nota crescente per allestire una curva di taratura in cui in ascissa è riportata la concentrazione proteica ed in ordinata i valori di assorbanza letti dallo spettrofotometro. Il bianco per la calibrazione dello strumento è stato preparato con 750 µl di acqua sterile. A tutti i campioni (inclusi il bianco e gli standard) sono stati aggiunti 250 µl del reagente di Bradford (Sigma). Dopo 5' è stata effettuata la lettura allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 595 nm.

### ***Attività acetilcolinesterasica***

La valutazione dell'attività acetilcolinesterasica è un saggio che sfrutta la presenza dell'enzima acetilcolinesterasi sulla membrana delle vescicole isolate e permette di quantizzare le vescicole di membrana grazie allo sviluppo di una reazione colorimetrica e di una variazione dell'assorbanza.

Per l'esecuzione del saggio 5 µl di ciascun campione contenente le vescicole di membrana sono stati diluiti in 95 µl di PBS 1X (Life Technologies) e, successivamente, incubati con Acetylthiocholine chloride (1.25 mM) (Sigma) e 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (3,3'-6) (0.1 mM) (Sigma). Parallelamente è stato allestito il bianco, costituito da 100 µl di PBS 1X incubati, anche in questo caso, con Acetylthiocholine chloride (1.25 mM) (Sigma) e 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (3,3'-6) (0.1 mM) (Sigma). Ogni campione è stato poi portato ad un volume finale di 1 ml con PBS 1X (Life Technologies).

La variazione di assorbanza è stata valutata tramite lettura allo spettrofotometro, ogni 5' per 20', alla lunghezza d'onda di 412 nm.

### ***Marcatura vescicole con PKH26***

Le vescicole dei mesoangioblasti A6 sono state marcate con il colorante fluorescente lipofilo PKH26 (Sigma). Dopo ultracentrifugazione il pellet contenente le vescicole è stato risospeso in 100 µl di Diluente C (PKH26 Fluorescent Cell Linker Kit, Sigma). È stata quindi aggiunta una soluzione contenente 100 µl di Diluente C e 0.75 µl della soluzione madre di PKH26. I campioni così costituiti sono stati incubati per 10' a temperatura ambiente e successivamente centrifugati a 20.000 rpm per 30' (Sorvall, rotore SS34). Dopo centrifugazione il surnatante è stato scartato e le vescicole sono state risospese in PBS 1X sterile e filtrato.

### ***Marcatura vescicole con DiI***

Le vescicole dei mesoangioblasti A6 sono state marcate con il colorante fluorescente lipofilo DiI (Molecular Probes). Dopo ultracentrifugazione il pellet contenente le vescicole è stato risospeso in 1 ml di DMEM (Life Technologies) privo di siero, supplementato con 1% glutammina, 1% antibiotico-antimicotico (Life Technologies) al quale sono stati aggiunti 5 µl del colorante lipofilo fluorescente DiI (Molecular Probes). La reazione di marcatura è durata 20' a 37°C, durante i quali il campione è stato periodicamente agitato per inversione. Successivamente è stato ultracentrifugato a 38.000 rpm (Beckman, Ti45) per 40', il surnatante è stato scartato ed il pellet risospeso nuovamente in DMEM privo di siero, e la procedura appena descritta è stata ripetuta, per un totale di due lavaggi. Il terzo ed ultimo lavaggio è stato effettuato utilizzando PBS 1X (Life Technologies) ed il pellet è stato risospeso in 150 µl di PBS 1X filtrato.

### ***Immunofluorescenza***

Per valutare l'internalizzazione delle EVs isolate dai mesoangioblasti A6 da parte degli stessi mesoangioblasti,  $1 \times 10^5$  cellule A6 sono state piastrate su vetrini pretrattati con collagene in una piastra da 3.5 cm di diametro ed incubate, rispettivamente per 1h e per 24h, con  $5 \times 10^4$  vescicole di A6 precedentemente marcate con PKH26.

Dopo 24h è stato applicato il seguente protocollo:

- un prelavaggio dei vetrini di 5' con PBS 1X filtrato;

- fissaggio delle cellule con formaldeide al 3.7%, per 15', e 3 lavaggi con PBS 1X filtrato, da 5' ciascuno;
- permeabilizzazione delle membrane cellulari con una soluzione Triton X-100 0.1%, per 5' seguita da 3 lavaggi con PBS 1X, da 5' ciascuno;
- aggiunta dell'anticorpo primario, anti-desmina, (1:50, Sigma), e incubazione dei vetrini in camera umida a 4°C over night;
- il giorno successivo i vetrini sono stati sottoposti a 5 lavaggi con PBS 1X da 5' ciascuno;
- è stato aggiunto l'anticorpo secondario, anti-mouse fluoresceina-coniugato (1:50, Amersham Biosciences), per 1h a temperatura ambiente e, successivamente, sono stati fatti altri 5 lavaggi con PBS 1X da 5' ciascuno;
- i vetrini sono stati lavati con acqua distillata e sono stati messi ad asciugare su carta assorbente, quindi sono stati montati sui vetrini portaoggetto, su cui sono stati aggiunti precedentemente 10 µl di DABCO.

I vetrini sono stati infine osservati al microscopio confocale, utilizzando laser a diverse lunghezze d'onda: 580 nm (nel verde) e 630 nm (nel rosso).

Al fine di investigare l'internalizzazione delle EVs isolate dai mesoangioblasti A6 da parte di linee cellulari di diversa origine, tra cui carcinoma epatocellulare, neuroblastoma, carcinoma alla prostata, fibroblasti e macrofagi,  $1 \times 10^5$  cellule di ciascuna linea cellulare da saggiare sono state piastrate su vetrini nel pozzetto di una piastra transwell da 12 pozzetti. Ciascun pozzetto della piastra presenta, nella metà superiore, un inserto transwell in poliestere con porosità media di 0.4 µm, e su ciascun inserto sono state piastrate  $0.7 \times 10^5$  cellule A6 precedentemente marcate con il colorante lipofilo fluorescente DiI. In questo modo, per via della porosità media dell'inserto, soltanto le EVs rilasciate dalle cellule possono attraversare l'inserto ed essere catturate dalle rispettive linee cellulari piastrate su vetrino. L'incubazione è durata 24h.

Dopo 24h è stato applicato il seguente protocollo:

- un prelavaggio dei vetrini di 5' con PBS 1X filtrato;
- fissaggio delle cellule con formaldeide al 3.7%, per 15', e 3 lavaggi con PBS 1X filtrato, da 5' ciascuno;
- permeabilizzazione delle membrane cellulari con una soluzione Triton X-100 0.1% per 5', seguita da 3 lavaggi con PBS 1X da 5' ciascuno;
- aggiunta di Falloidina-FITC coniugata (1:100) per 1h a temperatura ambiente;

- Al termine dei 60' di incubazione, i vetrini sono stati sottoposti a 5 lavaggi con PBS 1X da 5' ciascuno;

- i vetrini sono stati lavati con acqua distillata e sono stati messi ad asciugare su carta assorbente, quindi sono stati montati sui vetrini portaoggetto, sui quali sono stati aggiunti precedentemente 10 µl di Fluoromounting con DAPI.

I vetrini sono stati infine osservati al microscopio confocale, utilizzando laser a diverse lunghezze d'onda per il verde (Falloidina-FITC coniugata), per il rosso (EVs marcate con DiI) e per il blu (DAPI) dei nuclei.

### ***Analisi FACS di interazione autocrina e paracrina delle vescicole***

Per valutare l'interazione autocrina e/o paracrina delle vescicole,  $1.5 \times 10^5$  cellule ogni linea cellulare da saggiare sono state incubate per 24h con terreno di coltura addizionato con 50 µg di vescicole isolate dai mesoangioblasti A6 precedentemente marcate con i coloranti lipofili fluorescenti PKH26 o DiI. Per ogni linea cellulare è stato utilizzato un campione di riferimento ottenuto piastrando un pari numero di cellule in terreno privo di EVs marcate. Al termine dell'incubazione il terreno di coltura è stato rimosso, sono stati effettuati due lavaggi in PBS 1X e le cellule sono state staccate dalla piastra mediante tripsinizzazione. Il pellet cellulare è stato risospeso in PBS 1X. Per l'analisi FACS è stata misurata la fluorescenza emessa nel canale rosso (PE) dei campioni così ottenuti.

Ove previsto, come *quencher* della fluorescenza esterna è stato aggiunto ai campioni il cristal violetto (CV) in concentrazione 2ng/ml (Van Amersfoort et al., 1994). La percentuale di quenching della fluorescenza è stata calcolata secondo la formula:

$$Q (\%) = 100 \times [(FL - (FL + CV)) / FL].$$

I risultati sono stati rappresentati graficamente grazie all'utilizzo del software FlowJo V10®.

### ***Analisi FACS del contenuto di acidi nucleici delle vescicole***

Per valutare la presenza di acidi nucleici all'interno delle vescicole di membrana isolate dai mesoangioblasti A6, sono stati utilizzati due coloranti fluorescenti: la *Pironina Y* (PY) per l'identificazione dell'RNA, ed il *Methyl Green* (MG) per l'identificazione del DNA (Pollack et al., 1982).

La PY è una molecola fluorescente che lega in specificatamente solo gli acidi ribonucleici e presenta uno spettro di eccitazione compreso tra i 488 nm ed i 530 nm ed un picco di

emissione, quando legata all'RNA, intorno ai 570 nm (nel giallo). Il MG, invece, lega solo i filamenti di DNA, e presenta un picco di eccitazione intorno ai 488 nm ed un picco di emissione, quando legato al DNA, intorno ai 525 nm (nel verde).

Per effettuare il saggio con la PY 1  $\mu$ l di vescicole è stato incubato per 30' a temperatura ambiente al buio con 2  $\mu$ l di PY (1  $\mu$ g/ $\mu$ l) (Sigma) diluita in PBS 1X filtrato. Al termine dell'incubazione è stata determinata mediante analisi FACS la fluorescenza del campione emessa nel giallo (PE).

Lo stesso protocollo è stato adottato per la lettura dei campioni trattati con il Methyl Green (1  $\mu$ g/ $\mu$ l) (Sigma), ma per l'analisi FACS è stata valutata la fluorescenza emessa dal campione nel verde (FITC).

I risultati sono stati rappresentati graficamente grazie all'utilizzo del software Flowing Software 2® o in alternativa con FlowJo V10®.

### ***Estrazione di RNA totale da cellule A6 e da microvescicole di membrana isolate da cellule A6***

L'estrazione dell'RNA totale è stata effettuata utilizzando il kit *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) come suggerito dal produttore.

Il pellet cellulare fresco di A6 è stato risospeso in un volume appropriato di Buffer di lisi RTL. Per l'estrazione di RNA totale da vescicole di A6 si è proceduto come descritto precedentemente, fatta eccezione per la fase di recupero del pellet dopo ultracentrifugazione, che è stata eseguita utilizzando un volume appropriato di Buffer di lisi RTL.

Come indicato nel protocollo, il lisato così ottenuto viene fatto passare per 5 volte attraverso una siringa da 1 ml con ago 21G. All'omogenato ottenuto si aggiunge un volume di etanolo 70%, per permettere la precipitazione degli acidi nucleici. 700  $\mu$ l del campione, incluso l'eventuale precipitato che si è formato, vengono quindi trasferiti in una colonna RNeasy spin con tubo di raccolta da 2 ml e centrifugati a 13000 rpm in micro centrifuga Eppendorf per 15'' per eliminare il liquido accumulato nel tubo.

La membrana della colonnina viene lavata aggiungendo 700  $\mu$ l di Buffer RW1, si procede quindi ad una centrifugazione a 13000 rpm per 15'' per eliminare il liquido che viene raccolto sul fondo del tubo.

Quindi si lava due volte la membrana aggiungendo 500 µl di Buffer RPE e si centrifuga a 10000 rpm per 2'. Dopo aver cambiato il tubo di raccolta il campione viene nuovamente centrifugato a 13000 rpm per 1', per eliminare l'eventuale Buffer RPE rimasto nel campione.

Si trasferisce la colonnina in un eppendorf da 1.5 ml e, direttamente sulla membrana della colonnina, si aggiungono 30-50 µl di acqua RNasi free e si centrifuga a 13000 rpm per 1' per eluire l'RNA. L'eluato che si ottiene dopo questi passaggi contiene sia il DNA sia l'RNA.

Il campione, successivamente, viene sottoposto al trattamento con DNasi, aggiungendo una miscela costituita da: 10 µl di Buffer per DNasi, 0.5 µl di DNasi (10 U/µl), ed acqua RNasi free fino ad un volume di 100 µl.

Si lascia il campione per 20' a temperatura ambiente e poi, per arrestare l'attività della DNasi, viene aggiunto al campione EDTA pH 8.0, ad una concentrazione finale di 8 mM. Il campione, quindi, è stato incubato per 10' in bagnetto termostato a 75°C.

Si aggiungono quindi 350 µl di Buffer RLT e 250 µl di etanolo assoluto per eliminare la DNasi, quindi si agita al vortex e si trasferiscono 700 µl di campione in una colonnina RNeasy spin; si centrifuga il campione a 13000 rpm per 15'' e si elimina il liquido che si raccoglie nel tubo di raccolta. Si fanno due lavaggi, ognuno aggiungendo 500 µl di Buffer RPE e si centrifuga di nuovo a 13000 rpm per 1'. Si trasferisce la colonnina in un nuovo tubo e si centrifuga di nuovo il campione a 13000 rpm per 1'.

Anche in questo caso, la colonnina si trasferisce in un eppendorf da 1.5 ml, si aggiungono 30-50 µl di acqua RNasi free e si centrifuga a 13000 rpm per eluire l'RNA. Al termine di questi passaggi nell'eluato sarà presente solo RNA.

### ***Quantizzazione ed integrità dell'RNA totale***

Per l'esperimento di *Microarray* la quantizzazione dell'RNA totale estratto dalle cellule A6 e dalle vescicole da queste ottenute è stata effettuata mediante lo spettrofotometro *NanoDrop ND-1000* (NanoDrop Technologies, Inc., Rockland, Del, USA). Un'ulteriore verifica quantitativa e qualitativa dell'RNA è stata eseguita mediante elettroforesi capillare su gel denaturante utilizzando il *bioanalyzer Agilent 2100* con un *RNA 6000 Nano LabChip Kit*.

I risultati dell'elettroforesi capillare sono stati elaborati e visualizzati in forma digitale mediante il software della Agilent 2100 expert che ne consente la quantificazione e l'analisi di parametri, come il RIN (RNA integrity number) che misura il rapporto fra gli RNA ribosomali 28S e 18S.

## *Analisi di microarray*

### *Sintesi di cDNA marcato*

Per l'esperimento di *microarray* l'RNA totale estratto dalle cellule e dalle vescicole è stato marcato con il *Low Input Quick Amp Labeling Kit* (Agilent Technologies). Il kit è in grado di generare cRNA (RNA complementare) fluorescente a partire da un campione contenente RNA, in un range di concentrazione compreso tra 10 ng e 200 ng di RNA totale, con due fluorofori per la successiva elaborazione dei risultati. I due enzimi che caratterizzano le reazioni fondamentali sono la trascrittasi inversa, che a partire da RNA sintetizza cDNA, e la T7 RNA polimerasi, che amplifica il cDNA incorporando al contempo Cianina 3-CTP o Cianina 5-CTP. L'utilizzo di questo kit permette generalmente un'amplificazione dell'RNA di almeno 100 volte.

Alla soluzione di RNA è stata aggiunta una soluzione di *Spike-in A* o *Spike-in B*, nucleotidi esogeni con funzione di controllo positivo. La soluzione di *Spike-in* è stata ottenuta attraverso delle diluizioni seriali (1:20, 1:40, 1:16), utilizzando il *Dilution Buffer* fornito dal kit.

Sono stati utilizzati 200 ng di RNA totale di un campione cellulare di A6 e 130 ng di RNA per ciascuno dei due campioni di vescicole A6, contenuti in un volume di 1.5 µl, ai quali sono stati aggiunti 2 µl di soluzione *spike Mix A* o *Spike Mix B*, 0.8 µl T7 primer e 1 µl di H<sub>2</sub>O nucleas-free, per un volume finale di 5.3 µl.

Per la sintesi del cDNA si è proceduto alla denaturazione dei primer (a 65°C per 10') ed al successivo passaggio in ghiaccio per 5'. È stata quindi preparata la *cDNA Master Mix* contenente (per ogni volume di reazione) 2 µl di 5× *First Strand Buffer*, 1 µl di DTT 0.1 M, 0.5 µl di dNTP Mix 10 mM e 1.2 µl di *Affinity Script RNase Block Mix* (una mix di enzimi), che è stata quindi aggiunta ad ogni campione. I campioni così costituiti sono stati incubati per 2h a 40°C e successivamente per 15' a 70°C.

Per la sintesi del cRNA marcato sono state preparate due *Transcription Master Mixe*, una con Cianina 3-CTP ed una con Cianina 5-CTP, contenenti (per ogni volume di reazione) 0.75 µl di H<sub>2</sub>O *RNase-free*, 3.2 µl di 5× *Transcription Buffer*, 0.6 µl di DTT 0.1M, 1 µl di *NTP mix*, 0.21 µl di *T7 RNA Polymerase Blend* e 0.24 µl di *Cyanine 3-CTP* o *Cyanine 5-CTP*. La mix con Cy3 è stata aggiunta ai campioni contenenti *Spike A Mix* mentre la mix con Cy5 è stata aggiunta ai campioni contenenti *Spike B Mix*. I campioni sono stati quindi incubati per 2h a 40°C.

Per purificare l'RNA amplificato e marcato è stato utilizzato il kit *RNeasy Mini Kit* (Qiagen).

Dopo aver aggiunto 84 µl di H<sub>2</sub>O *RNAse free* e 350 µl di *Buffer RLT*, si è proceduto come descritto nella sezione relativa al protocollo utilizzato per l'estrazione dell'RNA.

La qualità del cRNA marcato, la sua concentrazione e l'efficienza di incorporazione delle due cianine sono state valutate allo spettrofotometro NanoDrop ND-1000.

La quantità di cianina incorporata viene espressa con un'unità di misura definita "attività specifica", calcolata secondo la seguente formula:

$$\frac{\text{concentrazione di Cy-3 o Cy-5 (pmol/}\mu\text{l)}}{\text{concentrazione di cRNA (ng/}\mu\text{l)}} \times 1000 = \text{pmol di Cy-3 o Cy-5 per } \mu\text{g di RNA}$$

Per garantire la buona riuscita dell'ibridazione, i campioni devono avere un'attività specifica superiore a 6.

Al termine di queste operazioni sia il campione di RNA cellulare di A6 sia i due campioni di RNA di vescicole sono stati convertiti in cRNA marcato con entrambi i fluorofori Cy3 e Cy5, al fine di effettuare delle ibridazioni in *dye-swap*.

825 ng di ciascuno dei due campioni di cRNA di vescicole marcati con Cy3 è stato unito ad 825 ng di campione di cRNA cellulare marcato con Cy5 e, viceversa 825 ng di ciascuno dei due campioni di cRNA di vescicole marcati con Cy5 è stato unito ad 825 ng di campione di cRNA cellulare marcato con Cy3, ottenendo un totale di quattro miscele di reazione. Ogni ibridazione è stata quindi condotta in modo da paragonare gli RNA delle vescicole con l'RNA totale.

Queste miscele sono state quindi sottoposte a frammentazione aggiungendo a ciascuna di esse 11 µl di *10X Gene Expression Blocking Agent*, 2.2 µl di *25X Fragmentation Buffer*, portando ad un volume finale di 55 µl con H<sub>2</sub>O *RNAse free* ed incubando per 30' a 60°C. A ciascun campione sono stati quindi aggiunti 55 µl *2X Hi-RPM Hybridization Buffer* che, oltre ad essere il buffer di ibridazione, blocca la reazione di frammentazione.

100 µl di ciascuna delle miscele di ibridazione sono stati quindi dispensati sul chip, il *Mouse Gene Expression 4X44K array* (Agilent), un microarray dell'intero genoma di topo. Il chip è stato quindi inserito in un'apposita "cameretta di ibridazione" ed incubato per 17h a 65°C.

Al termine dell'incubazione il chip è stato sottoposto a due lavaggi, ciascuno della durata di 1' con le soluzioni *Gene Expression Wash Buffer 1* e *2*.

Si è quindi proceduto alla scansione del chip con il dual-laser microarray scanner Agilent B (Agilent Technologies) a 5 µm di risoluzione.

### ***Acquisizione ed analisi dei dati***

I chip sono stati analizzati con il dual-laser microarray scanner Agilent B (Agilent Technologies) a 5 µm di risoluzione. Le immagini ottenute sono state analizzate con il software *Feature Extraction version 9.5* (Agilent Technologies). Questo software è in grado di analizzare le immagini ottenute sottraendo la fluorescenza di background. Feature Extraction 9.5 restituisce inoltre una serie di indicatori della qualità di ciascuno spot, allo scopo di valutare l'affidabilità delle stime di intensità degli stessi. Per ciascun campione infatti il software fornisce un "Quality Control (QC) Report", che ne indica l'affidabilità, ed un file di testo, che riporta i valori di fluorescenza di ciascuna sonda. Dopo aver ottenuto questi primi dati, le intensità degli spike-in di controllo sono state utilizzate per identificare la procedura di normalizzazione. La procedura di normalizzazione è stata eseguita calcolando l'ANOVA.

### ***Analisi funzionale dei geni espressi***

I trascritti isolati dalle vescicole sono stati classificati in gruppi funzionali di processi biologici mediante il software *Gprofiler* (Reimand et al., 2007 e 2011), ed i presunti pathways associati all'espressione degli mRNAs presenti nelle vescicole sono stati individuati utilizzando i tools del database DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery; <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) (Huang et al., 2009 a e b) e mediante il database PANTHER (*Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships*; <http://www.pantherdb.org>) (Mi and Thomas, 2009).

### ***Saggio in vitro di formazione di vasi***

Il *tube formation assay* è un saggio che misura *in vitro* la capacità delle cellule endoteliali di formare strutture simili a vasi, definite *capillary-like structures*, utilizzando un'appropriata matrice extracellulare come supporto.

Per mimare la composizione della matrice extracellulare è stata preparata una soluzione di Matrigel *Growth Factor Reduced* (GFR) (Sigma) diluito 1:1 in DMEM non completo; questa soluzione di Matrigel non permette, senza l'aggiunta di altri fattori, la formazione di *capillary-like structures*. Come controllo positivo è stata anche utilizzata una soluzione di Matrigel completo di fattori di crescita (Sigma) diluito 1:3 in DMEM non completo. Il saggio è stato condotto utilizzando piastre multiwell da 96 pozzetti. Sono stati distribuiti 30 µl di

soluzione di Matrigel in ogni pozzetto, mantenendo la piastra e la soluzione a basse temperature, permettendo successivamente la polimerizzazione del matrigel per 30' a temperatura ambiente. Al termine della polimerizzazione sono state piastrate  $1.5 \times 10^4$  cellule ECV304.

Dopo l'adesione delle cellule sui differenti strati di Matrigel GFR il terreno è stato rimosso ed ai pozzetti sono stati aggiunti 100  $\mu$ l di terreno contenente vescicole di A6 in differenti concentrazioni: 5  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml, 20  $\mu$ g/ml e 40  $\mu$ g/ml. Come controlli sono stati aggiunti FGF-2 (10 ng/ml) (Mylteny), e gli anticorpi neutralizzanti anti-FGF-2 (Millipore) (5  $\mu$ g/ml) e anti-VEGF (Acris Antibodies) (3  $\mu$ g/ml).

Dopo 24 h di incubazione in normali condizioni di crescita, la piastra è stata fotografata al microscopio invertito ad un ingrandimento 10X. Sono state scattate quattro fotografie random per pozzetto. Per quantificare la formazione di vasi è stata calcolata una media del numero dei vasi formatisi.

### ***Scratch test o wound healing assay***

Lo *scratch test* o *wound healing assay* è un test che permette di valutare la capacità migratoria e la motilità delle cellule senza l'utilizzo di alcun chemioattraente (Cory, 2011), considerando il tempo che queste impiegano per richiudere una ferita fatta in un monostrato cellulare.

Il saggio è stato condotto utilizzando piastre multiwell da 6 pozzetti. Per facilitare la localizzazione della ferita, anche dopo la sua eventuale chiusura, esternamente al pozzetto sono state tracciate due linee verticali parallele alla ferita ed due linee perpendicolari. Per ogni pozzetto sono state piastrate  $2.5 \times 10^5$  cellule ECV304. Il giorno successivo, dopo aver verificato la formazione di un monostrato uniforme di cellule, è stato eseguito uno "scratch", cioè una ferita al centro del pozzetto tra le due linee parallele, utilizzando un puntale per micropipette da 20-200  $\mu$ l. È stato quindi rimosso il terreno per rimuovere tutte le cellule staccatesi in seguito alla ferita ed i controlli sono stati trattati con il mezzo di coltura standard (Medium 199, Gibco, Life Technologies) mentre gli altri pozzetti sono stati incubati con mezzo di coltura addizionato con due differenti concentrazioni di vescicole di membrana, 10  $\mu$ g/ml e 40  $\mu$ g/ml rispettivamente.

Sono state scattate, quindi, delle foto relative al tempo 0 e ad intervalli di tempo regolari, cioè dopo 3, 6, 12, 24 e 48 ore, sia per il campione controllo sia per i trattati, utilizzando il programma Image-Pro plus con un ingrandimento 4X, per poter visualizzare entrambi i fronti di ciascuna ferita. Per ciascun intervallo di tempo si è cercato di scattare le fotografie sempre

negli stessi punti dei singoli pozzetti, utilizzando la linea perpendicolare alla ferita come punto di riferimento, per avere un'idea più attendibile dello spostamento delle cellule, ma sono state scattate anche delle fotografie random per avere un quadro rappresentativo di ciascun pozzetto.

A conclusione del test è stata calcolata la percentuale media del numero di cellule che, per ciascun intervallo di tempo, hanno invaso la ferita, riportando in grafico i valori in termini percentuali, assumendo il controllo come 100%.

### ***Elettroforesi monodimensionale e Western blot***

L'elettroforesi monodimensionale è stata condotta utilizzando gel di poliacrilamide pre-assemblati, NuPAGE™ Novex™ 4-12% Bis-Tris Protein Gels (Life Technologies). La corsa elettroforetica è stata fatta a 100 V a temperatura ambiente, in un tampone di scorrimento NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (50 mM MOPS, 50 mM Tris Base, 0.1% SDS, 1 mM EDTA, pH 7.7).

Una volta terminato lo scorrimento, il gel è stato sottoposto a un lavaggio da 5' con T-PBS 1X (PBS 1X + 0.1 % Tween 20) quindi alla fine è stato eseguito il blotting a secco utilizzando l'apparecchio iBlot® 2 Dry Blotting System (Life Technologies). Per questa procedura sono state utilizzate membrane iBlot® 2 PVDF (Life Technologies). Il blotting è stato condotto per 7' a 26V. Al termine della procedura di blotting le membrane sono state incubate per 1h a temperatura ambiente in una soluzione di blocking costituita dal 5% di latte in polvere non grasso sciolto in T-PBS 1X. Dopo la fase di blocking, le membrane sono incubate a 4°C over night in lenta agitazione con l'anticorpo primario, opportunamente diluito in latte in polvere non grasso in T-PBS 1X. Gli anticorpi primari utilizzati sono riportati nella seguente tabella (Tabella 1).

<b>Anti-Adam-10</b>	anti-rabbit monoclonale	1:1000	Abcam
<b>Anti-TSG 101</b>	anti-mouse monoclonale	1:1000	Abcam
<b>Anti-CD81</b>	anti-hamster policlonale	1:1000	Biorad
<b>Anti-Flotillin1</b>	anti-mouse policlonale	1:1000	BD Bioscience
<b>Anti-Alix</b>	anti-mouse policlonale	1:1000	BD Bioscience
<b>Anti-Limp2</b>	anti-rabbit policlonale	1:1000	Abcam
<b>Anti-Rab-11</b>	anti-mouse policlonale	1:1000	BD Bioscience
<b>Anti-Rab-8</b>	anti-rabbit policlonale	1:1000	BD Bioscience
<b>Anti-Syntenin1</b>	anti-rabbit policlonale	1:1000	Genetex

**Tabella 1. Elenco degli anticorpi primari utilizzati nei saggi Western blot.**

### ***Preparazione dei lisati cellulari totali***

Ai pellet ottenuti da  $1 \times 10^6$  cellule è stato aggiunto un volume di 100  $\mu$ l di buffer di lisi (50 mM Tris pH 7.5; 0,1% Triton X-100; 300 mM NaCl) supplementato con 1  $\mu$ l/ml di mix anti proteasi (Protease Inhibitor Cocktail -P8340- Sigma). I pellet sono stati risospesi in questo buffer, e lasciati ad agitare gentilmente a 4°C per 15'. Successivamente i campioni sono stati centrifugati a 4°C a 13.000 rpm per 15'. Al termine è stato recuperato il supernatante contenente il lisato cellulare. Infine, i campioni proteici sono stati determinati, aliquotati e conservati a -80°C.

### ***Profilo Proteomico mediante Array XL di citochine***

$5 \times 10^5$  cellule di macrofagi Raw 264.7 sono stati piastrati in una piastra multiwell da 6 pozzetti. In uno di questi è stato aggiunto DMEM completo addizionato per 24h con 50  $\mu$ g di EVs isolate dai mesoangioblasti A6, un secondo pozzetto è stato utilizzato come campione di riferimento aggiungendo DMEM completo, senza addizionare EVs.

Il giorno successivo i differenti mezzi di coltura sono stati rimossi e sostituiti con DMEM completo per ogni pozzetto e lasciati per ulteriori 24h di modo da permettere la secrezione di citochine.

Per effettuare il profilo proteomico (Mouse XL Cytokine Array Kit- R&D Systems), è stata utilizzata una quantità pari a 500  $\mu$ l di surnatante prelevato da ogni pozzetto.

Il profilo proteomico mediante array XL di citochine è stato condotto con la procedura riportata di seguito:

1. Le differenti membrane di nitrocellulosa sono state incubate, nell'apposita piastra multiwell fornita dal kit, con 2 ml di Array Buffer 6, che serve da soluzione di blocking per 1h a temperatura ambiente.
2. Ciascun campione è stato preparato utilizzando 500  $\mu$ l di supernatante prelevato da ogni pozzetto, previamente centrifugato per 5' a 2000 rpm per eliminare detriti cellulari ed addizionato con 500  $\mu$ l di Array Buffer 4 e 500  $\mu$ l di Array Buffer 6. In questo modo ogni campione raggiunge un volume finale di 1.5 ml, necessario a ricoprire le rispettive membrane.
3. Ciascun campione è addizionato alla rispettiva membrana e incubato over night su una piattaforma basculante a 4°C.

4. Il giorno seguente ciascuna membrana è stata sottoposta a 3 lavaggi in lenta agitazione da 10' ciascuno con Wash Buffer 1X.
5. Al termine dei lavaggi, ogni array è stato incubato con 1.5 ml di Array Buffer 4/6 1X supplementato con 30 µl di Detection Antibody Cocktail, in lenta agitazione per 1h a temperatura ambiente.
6. Al termine dell'incubazione gli array sono stati nuovamente sottoposti a lavaggi come al punto 4.
7. Al termine dei lavaggi, ogni membrana è stata incubata in agitazione per 30' con 2 ml di una soluzione di 1X Streptavidina-HRP diluita 1:2000 in Array buffer 6.
8. Dopo l'incubazione sono stati nuovamente ripetuti i lavaggi come al punto 4.
9. Dopo i lavaggi, ogni membrana è stata ricoperta con 1 ml di soluzione di Chemi Reagent Mix (Chemi Reagent 1 + Chemi Reagent 2 nel rapporto 1:1) per 1', assicurandosi che tutta la superficie della membrana fosse ricoperta dalla soluzione di sviluppo.
10. Avendo cura di eliminare l'eccesso di soluzione di sviluppo, ogni membrana è stata posizionata in una cassetta per sviluppo autoradiografico.
11. Il segnale è stato rilevato per impressione, utilizzando lastre fotografiche Amersham Hyperfilm MP.
12. Sono state effettuate esposizioni multiple in un range di 1-10'.
13. Le lastre impressionate sono state infine acquisite digitalmente mediante scanner a trasmissione di trasparenza.

### ***Profilo Proteomico mediante Array di recettori tirosin-chinasici fosforilati***

$5 \times 10^5$  cellule di macrofagi Raw 264.7 sono stati piastrati in una piastra multiwell da 6 pozzetti. In uno di questi è stato aggiunto DMEM completo addizionato per 24h con 50 µg/ml di EVs isolate dai mesoangioblasti A6, un secondo pozzetto è stato utilizzato come campione di riferimento aggiungendo DMEM completo, senza addizionare EVs.

Il giorno successivo i differenti mezzi di coltura sono stati rimossi e le cellule lisate usando il Lysis Buffer 17 fornito dal kit, addizionando 10 µg/ml di aprotinina, leupeptina e pepstatina. La determinazione proteica dei lisati totali è stata effettuata secondo il metodo Bradford e 200 µg di ciascun campione sono stati utilizzati per la procedura sperimentale.

Il profilo proteomico mediante array di recettori tirosin-chiansici fosforilati (Mouse Phospho-RTK Array Kit- R&D Systems) è stato condotto secondo la procedura riportata di seguito:

- Le differenti membrane di nitrocellulosa sono state incubate nell'apposita piastra multiwell fornita dal kit con 2 ml di Array Buffer 1, che serve da soluzione di blocking per 1h a temperatura ambiente in leggera agitazione.
- Per ciascun campione sono stati utilizzati 200 µg di lisato totale ed i diversi volumi, frutto delle diverse determinazioni proteiche, sono stati portati ad un volume finale di 1.5 ml con Array Buffer 1. In questo modo ogni campione raggiunge un volume tale da permettere di ricoprire le rispettive membrane.
- Ciascun campione è stato addizionato alla rispettiva membrana e incubato over night su una piattaforma basculante a 4°C.
- Il giorno seguente ciascuna membrana è stata sottoposta a 3 lavaggi da 10' ciascuno, in lenta agitazione, con Wash Buffer 1X.
- Al termine dei lavaggi, ogni array è stato incubato con 2 ml di Array Buffer 2 1X supplementato con Anti-Phospho-Tyrosine-HRP Detection Antibody (1:2000), in lenta agitazione per 2h a temperatura ambiente.
- Al termine dell'incubazione gli array sono stati nuovamente sottoposti a lavaggi come al punto 4.
- Dopo i lavaggi, ogni membrana è stata ricoperta con 1 ml di soluzione di Chemi Reagent Mix (Chemi Reagent 1 + Chemi Reagent 2, nel rapporto 1:1) assicurandosi che tutta la superficie della membrana fosse ricoperta dalla soluzione di sviluppo.
- Avendo cura di eliminare l'eccesso di soluzione di sviluppo, ogni membrana è stata posizionata in una cassetta per sviluppo autoradiografico.
- Il segnale è stato rilevato per impressione, utilizzando lastre fotografiche Amersham Hyperfilm MP.
- Sono state effettuate esposizioni multiple in un range di 1-10'.
- Le lastre impressionate sono state infine acquisite digitalmente mediante scanner a trasmissione di trasparenza.

### ***Saggio di attivazione dei linfociti***

3x10<sup>5</sup> cellule Jurkat sono state piastrate in piastre multiwell da 6 pozzetti. Le cellule sono state trattate per 48 o 72h, aggiungendo al mezzo di coltura 50 µg di EVs isolate dai mesoangioblasti A6, oppure sono state mantenute in mezzo di coltura proveniente da macrofagi Raw 264.7 trattati o non trattati per 24h con 50 µg EVs isolate dai mesoangioblasti A6. L'analisi citofluorimetrica dei marcatori di attivazione linfocitaria è stata condotta usando anticorpi direttamente coniugati con differenti fluorocromi, investigando i seguenti marcatori: CD69 dopo 48h dall'inizio del trattamento; CD25, CD26 e CD154 dopo 72h dall'inizio del trattamento.

Ove previsto, è stata indotta l'attivazione dei linfociti aggiungendo al mezzo di coltura 1.5 oppure 5 µg/ml di Leucoagglutinina, una lectina derivata da Phaseolus Vulgaris (PHA-L) (Sigma).

Gli anticorpi coniugati con fluorocromo utilizzati per l'analisi citofluorimetrica sono i seguenti:

<b>Anti-CD3</b>	anti-human	Clone HIT3a	Biolegend®
<b>Anti-CD4</b>	anti-human	Clone A161A1	Biolegend®
<b>Anti-CD69</b>	anti-human	Clone FN-50	Biolegend®
<b>Anti-CD25</b>	anti-human	Clone M-A251	Biolegend®
<b>Anti-CD26</b>	anti-human	Clone BA5b	Biolegend®
<b>Anti-CD154</b>	anti-human	Clone 24-31	Biolegend®

**Tabella 2. Elenco degli anticorpi coniugati con fluorocromo utilizzati nell'indagine citofluorimetrica per il saggio di attivazione dei linfociti.**

### ***Saggio di proliferazione dei linfociti***

1x10<sup>5</sup> cellule Jurkat, precedentemente marcate con il colorante lipofilo fluorescente DiI, sono state piastrate in piastre multiwell da 6 pozzetti. Le cellule sono state trattate aggiungendo al mezzo di coltura 5 µg/ml di Leucoagglutinina, una lectina derivata da Phaseolus Vulgaris (PHA-L) (Sigma), in alternativa sono state trattate con la Leucoagglutinina in presenza di 50 µg/ml di EVs isolate dai mesoangioblasti A6, oppure non hanno subito alcun trattamento al fine di avere un campione di riferimento. Le cellule sono state mantenute in coltura per 6 giorni ed al terzo giorno è stato cambiato il terreno di coltura, rinnovando le condizioni sperimentali di partenza. Al termine dei 6 giorni, è stata condotta l'analisi citofluorimetrica investigando i livelli di

fluorescenza nel canale PE-A per i campioni allestiti. L'analisi dei livelli di proliferazione sui diversi campioni è stata effettuata mediante il software ModFit LT 4.1.7 (Verity House).

### ***Profilo di legame delle EVs con lectine***

Le vesciole isolate dai mesoangioblasti o  $5 \times 10^5$  cellule A6, sono state incubate con 10  $\mu\text{g/ml}$  di ciascuna lectina, in un volume finale di 200  $\mu\text{l}$  PBS (+  $\text{Ca}^{2+}$  e +  $\text{Mg}^{2+}$ ), per 30' a temperatura ambiente. Al termine dell'incubazione ogni campione è stato centrifugato per 20' a 13000 rpm. Il pellet ottenuto è stato risospeso in 200  $\mu\text{l}$  PBS (+  $\text{Ca}^{2+}$  e +  $\text{Mg}^{2+}$ ) e si è proceduto con l'analisi citofluorimetrica. Per ogni lectina è stato allestito un campione di controllo privo di vescicole o di cellule A6 e sottoposto allo stesso trattamento. È stato utilizzato un kit di lectine coniugate con fluoresceina isotiocianato (Vector Labs ®). Le lectine utilizzate sono riportate nella seguente tabella.

<i>Lectina</i>	<i>Abbreviazione</i>	<i>Sorgente</i>	<i>Specificità</i>
<b>Concanavalin A</b>	CON A	Canavalia ensiformis	$\alpha\text{Man}$ , $\alpha\text{Glc}$
<b>Dolichos Biflorus</b>	DBA	Dolichos biflorus	$\alpha\text{GalNAc}$
<b>Peanut</b>	PNA	Arachis hypogaea peanuts	$\text{Gal-}\beta\text{3-GalNAc}$
<b>Ricinus communis I</b>	RCA 120	Ricinus communis	Gal
<b>Soybean</b>	SBA	Glycin max seeds	$\alpha>\beta$ GalNAc
<b>Sambucus nigra</b>	SNA	Sambucus nigra bark	Neu5Ac- $\alpha\text{6-Gal/GalNAc}$
<b>Ulex europaeus I</b>	UEA I	Ulex europaeus seeds	$\alpha\text{Fuc}$
<b>Wheat germ</b>	WGA	Triticum vulgaris	GlcNAc

**Tabella 3. Elenco delle lectine coniugate con fluorocromo utilizzate nell'indagine citofluorimetrica per profilo di legame con lectine sulle EVs isolate dai mesoangioblasti**

### ***Trattamento delle EVs con glicosidasi***

Due aliquote di EVs isolate dai mesoangioblasti A6 sono state sottoposte a trattamento con una tra due diversi tipi di glicosidasi. Sono state utilizzate la Endoglicosidasi H e la PNGase F (New England BioLabs ®).

Il trattamento delle EVs con Endoglicosidasi H è stato condotto per 1h a 37 °C, in un volume finale di 20  $\mu\text{l}$  così costituito: 13  $\mu\text{l}$  di EVs, 2  $\mu\text{l}$  di G5 Reaction buffer 10X, 5  $\mu\text{l}$  di Endoglicosidasi H 500 U/  $\mu\text{l}$ .

Il trattamento con PNGase F è stato condotto per 1h a 37 °C, in un volume finale di 20 µl così costituito: 13 µl di EVs, 2 µl di G7 Reaction buffer 10X, 2 µl di PNGase F 500 U/ µl, 3 µl di H<sub>2</sub>O distillata sterile.

Al termine dei trattamenti sopracitati, le EVs sono state sottoposte a ultracentrifugazione per 1h30', a 38000 rpm (Beckman, Ti 45), a 4°C. Dopo ultracentrifugazione le EVs sono state marcate con il colorante lipofilo fluorescente DiI (Molecular Probes), per il quale si rimanda il lettore al paragrafo appositamente dedicato. Una volta terminata la procedura di trattamento con le glicosidasi e di marcatura con DiI, 50 µg di EVs sono state utilizzate per condizionare per 24h il mezzo di coltura di differenti linee cellulari, prima di procedere ad analisi citofluorimetrica. Al fine di valutare modifiche di interazione delle EVs con le diverse linee cellulari, le stesse linee sono state parallelamente trattate con EVs marcate con DiI, ma non sottoposte ad alcun trattamento con glicosidasi, di modo da avere un campione di riferimento per l'interazione tra le linee cellulari e le EVs in condizioni di controllo.

# *Scopo del lavoro*

È ormai ampiamente dimostrato che le microvescicole rappresentano un ulteriore meccanismo di cui si servono le cellule per la comunicazione intercellulare. È stato dimostrato anche che diversi tipi cellulari sono in grado di rilasciare vescicole di membrana, e che queste intervengono in processi fisiologici e patologici.

In un nostro precedente lavoro è stato dimostrato che i mesoangioblasti di topo, un particolare tipo di cellule staminali, sono in grado di rilasciare nell'ambiente extracellulare vescicole di membrana (Candela et al., 2010).

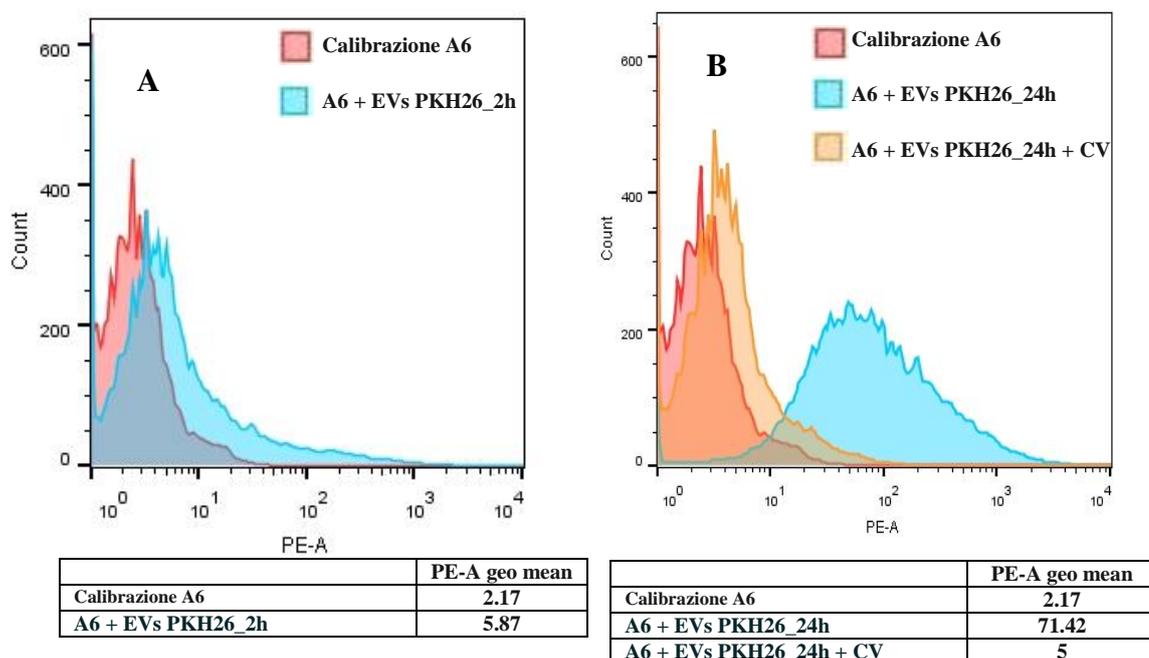
Alla luce di ciò che si sa dalla letteratura lo scopo di questa tesi è la caratterizzazione del contenuto e della superficie di queste vescicole di membrana, ed in termini funzionali la valutazione dell'effetto autocrino e paracrino che queste vescicole riescono a sortire, per far luce su quale ruolo possano svolgere nella biologia delle stesse cellule da cui vengono rilasciate e più in generale, il loro effetto su altre linee cellulari.

# *Risultati*

### *Interazione autocrina delle vescicole*

Dati di letteratura dimostrano che le vescicole rilasciate dalle cellule possono segnalare alle stesse cellule che le hanno rilasciate, oppure entrare in circolo nei fluidi biologici per segnalare a cellule target che si trovano in siti distanti dal sito di generazione (Turturici et al., 2014).

Tenendo conto di questi dati abbiamo effettuato saggi di citofluorimetria e di immunofluorescenza per valutare se vescicole rilasciate dai mesoangioblasti avessero la capacità di interagire con le stesse cellule che le hanno rilasciate. Le vescicole sono state quindi marcate con PKH26 e sono state incubate con le cellule A6 che le hanno rilasciate. Dopo due ore le cellule sono state sottoposte ad analisi citofluorimetrica, e dall'istogramma ottenuto appare evidente che c'è uno spostamento, seppur leggero, nei livelli di fluorescenza, confermato anche dai valori della sua media geometrica: 2.17 per l'autofluorescenza di A6 e 5.87 dopo due ore di incubazione con le vescicole marcate con PKH26 (Figura 8 A).



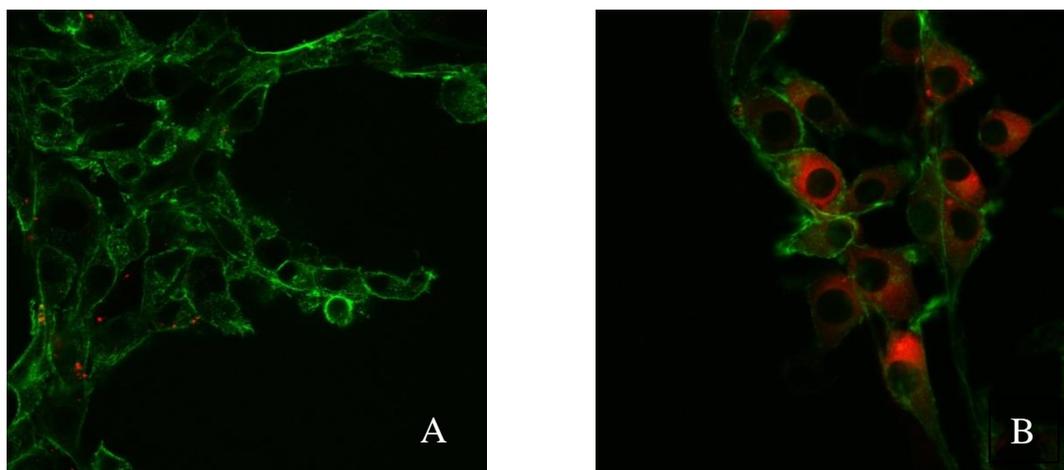
**Figura 8.** Iistogrammi relativi all'analisi citofluorimetrica dei mesoangioblasti A6 con le vescicole da essi rilasciate. Nell'asse verticale è riportato il numero degli eventi registrati e nell'asse orizzontale la fluorescenza PE in scala log. A) In rosso istogramma relativo all'autofluorescenza delle cellule incubate con PBS 1X, in blu istogramma relativo alla fluorescenza delle cellule dopo 2h di incubazione con vescicole di A6 marcate con PKH26. B) In rosso istogramma relativo all'autofluorescenza, in blu istogramma relativo alla fluorescenza delle cellule dopo 24h di incubazione con vescicole di A6 marcate con PKH26, in arancione istogramma relativo alla fluorescenza interna delle cellule dopo l'aggiunta del CV alla sospensione.

Il saggio è stato ripetuto effettuando questa volta l'incubazione per 24h. Lo spostamento del picco di fluorescenza è maggiormente evidente, e la media geometrica calcolata è 71.42, (Figura 8 B).

Per determinare se l'aumento della fluorescenza evidenziato fosse dovuto ad internalizzazione delle vescicole nei mesoangioblasti o ad interazione con la superficie cellulare, i mesoangioblasti incubati con le vescicole sono stati trattati con il cristal violetto (CV), un quencher (a bassi intervalli di tempo) della fluorescenza extracellulare (Edwin et al., 1994) (Figura 8 B).

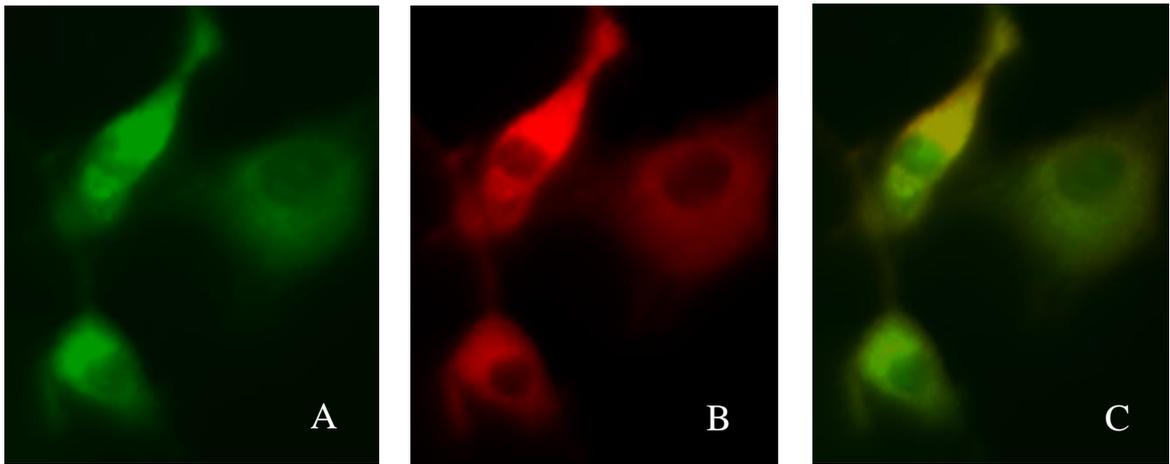
Calcolando la percentuale di quenching come indicato nei materiali e metodi, si evidenzia un quenching del 93%, valore che indica che la maggior parte delle EVs interagisce con le cellule A6 rimanendo in ambiente extracellulare.

L'interazione tra i mesoangioblasti e le vescicole è stata confermata anche da saggi di immunofluorescenza. In questo caso si vede che le cellule acquisiscono una colorazione rossa dovuta all'interazione con le vescicole marcate (Figura 9 A). La colorazione è poco apprezzabile dopo 2h di incubazione, mentre appare più evidente dopo le 24h, dimostrando anche una parziale internalizzazione delle vescicole da parte delle stesse cellule che le hanno rilasciate (Figura 9 B).



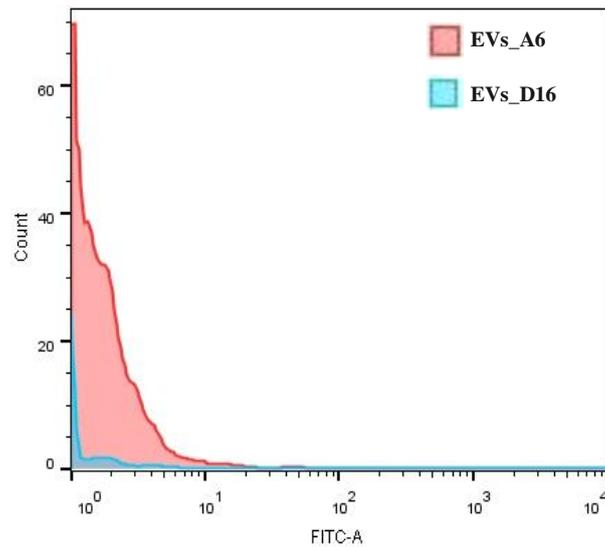
**Figura 9. Immagini di microscopia che mostrano, alle 2h (A) ed alle 24h (B) di incubazione, l'internalizzazione delle vescicole di A6 marcate con PKH26 (rodamina); in verde, anti-desmina + ab II fluoresceina-coniugato (FITC).**

Per confermare l'interazione autocrina tra le vescicole ed i mesoangioblasti, sono state isolate microvescicole di membrana anche dalle cellule D16<sub>GFP</sub>, un clone di mesoangioblasti stabilmente trasfettato con la GFP (Sampaolesi et al., 2003). Queste vescicole sono state incubate con le cellule A6, e dall'analisi microscopica si evidenzia che queste, dopo l'incubazione, acquisiscono una colorazione verde dovuta alla GFP (Figura 10 A).



**Figura 10.** Immagini di microscopia a fluorescenza che mostrano: A) fluorescenza GFP (FITC), B) falloidina rodamina-coniugata (rodamina), C) sovrapposizione delle fluorescenze.

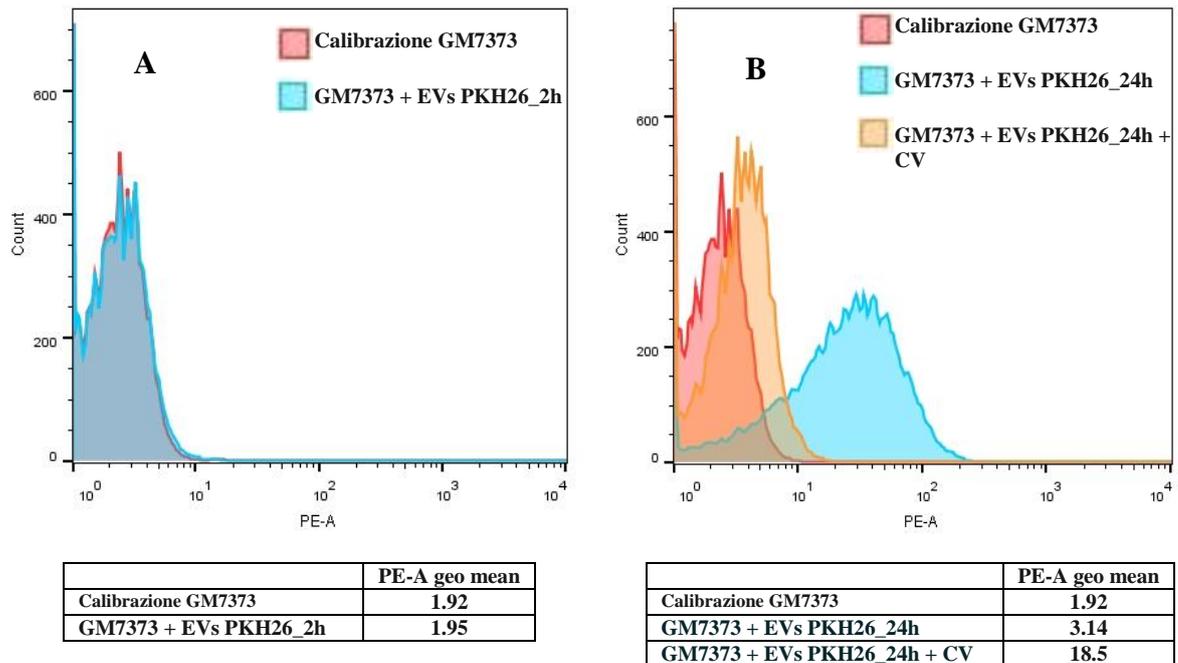
Per valutare se tale colorazione fosse dovuta al trasferimento della proteina GFP o del suo mRNA sono stati effettuati saggi citofluorimetrici da cui si evince che le vescicole isolate dalle cellule D16 non mostrano fluorescenza verde (Figura 11), questo fa quindi ipotizzare che sia l'mRNA della GFP ad essere trasferito all'interno delle cellule A6 dove viene tradotto in proteina.



**Figura 11.** Istogrammi relativi all'analisi citofluorimetrica dell'autofluorescenza delle vescicole di A6 (in rosso) e della fluorescenza delle vescicole D16 (blu). Nell'asse verticale è riportato il numero degli eventi registrati e nell'asse orizzontale la fluorescenza FITC in scala logaritmica.

## *Interazione paracrina delle vescicole*

Per saggiare un'eventuale interazione paracrina delle vescicole rilasciate dai mesoangioblasti A6, queste, dopo essere state marcate, e tenendo conto dell'origine embrionale delle cellule che le hanno rilasciate, sono state aggiunte al mezzo di coltura della linea GM7373, cellule endoteliali di origine bovina.



**Figura 12.** Istogrammi relativi all'analisi citofluorimetrica della linea endoteliale GM7373 con le vescicole rilasciate dai mesoangioblasti A6. Nell'asse verticale è riportato il numero degli eventi registrati e nell'asse orizzontale la fluorescenza PE in scala log. A) In rosso istogramma relativo all'autofluorescenza delle cellule incubate con PBS 1X, in blu istogramma relativo alla fluorescenza delle cellule dopo 2h di incubazione con vescicole di A6 marcate con PKH26. B) In rosso, istogramma relativo all'autofluorescenza delle cellule incubate con PBS 1X, in blu istogramma relativo alla fluorescenza delle cellule dopo 24h di incubazione con vescicole di A6 marcate con PKH26, in arancione istogramma relativo alla fluorescenza interna delle cellule dopo l'aggiunta del CV alla sospensione.

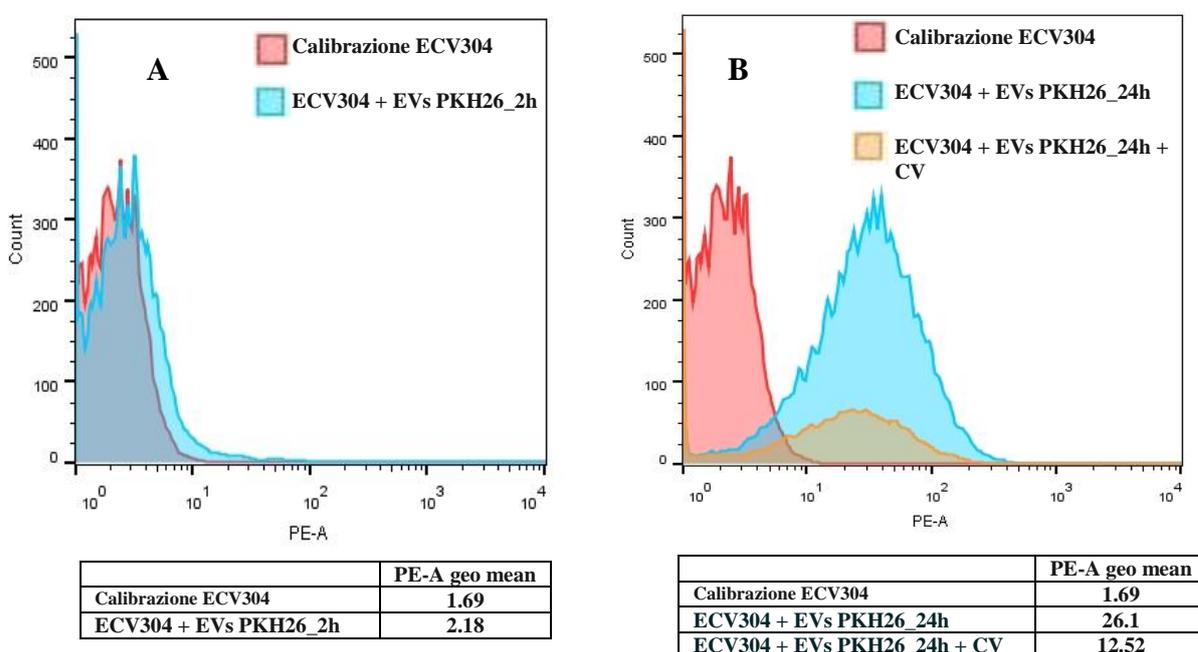
L'indagine citofluorimetrica non ha indicato un aumento della fluorescenza dopo 2h di incubazione, come confermato dai valori della media geometrica: 1.92 per l'autofluorescenza di GM7373 e 1.95 dopo incubazione con le vescicole marcate (Figura 12 A).

L'analisi citofluorimetrica ha confermato invece l'interazione paracrina tra le vescicole isolate dai mesoangioblasti A6 e la linea cellulare GM7373 dopo 24h di incubazione. In questo caso appare un evidente spostamento del picco di fluorescenza che presenta una media geometrica di 18.5 (Figura 12 B). Il cristal violetto aggiunto alla sospensione cellulare ha determinato

anche qui un quenching della fluorescenza esterna attestato intorno all'83%, indicando che gran parte dell'interazione è limitata all'ambiente extracellulare.

L'interazione delle vescicole di membrana rilasciate dai mesoangioblasti è stata saggiata anche con la linea endoteliale ECV304, questa volta di origine umana.

Anche in questo caso, come per le GM7373, non vi è aumento consistente della fluorescenza dopo 2h di incubazione con le vescicole, come confermato dai valori della media geometrica: 1.69 per l'autofluorescenza di ECV304 e 2.18 dopo incubazione con le vescicole marcate (Figura 13 A).



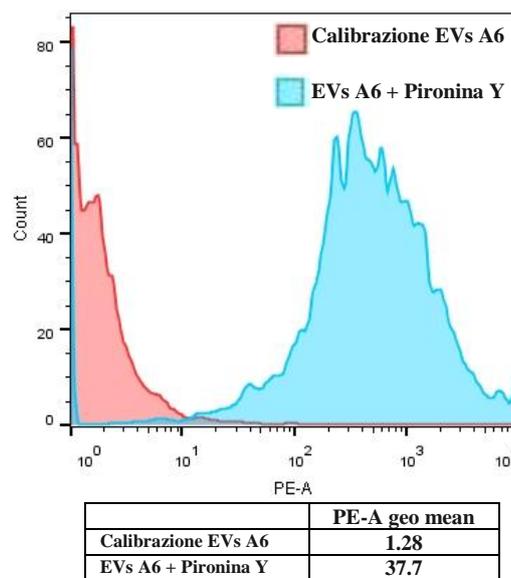
**Figura 13.** Istogrammi relativi all'analisi citofluorimetrica della linea endoteliale ECV304 con le vescicole rilasciate dai mesoangioblasti A6; nell'asse verticale è riportato il numero degli eventi registrati e nell'asse orizzontale la fluorescenza PE in scala log. A) In rosso istogramma relativo all'autofluorescenza delle cellule incubate con PBS 1X, in blu istogramma relativo alla fluorescenza delle cellule dopo 2h di incubazione con vescicole di A6 marcate con PKH26. B) In rosso istogramma relativo all'autofluorescenza delle cellule, in blu, istogramma relativo alla fluorescenza delle cellule dopo 24h di incubazione con vescicole di A6 marcate con PKH26, in arancione, istogramma relativo alla fluorescenza interna delle cellule dopo l'aggiunta del CV alla sospensione.

L'interazione tra le vescicole dei mesoangioblasti e la linea cellulare ECV304 è invece evidente dopo le 24h di incubazione, dove si ha lo spostamento del picco di fluorescenza che presenta una media geometrica di 26.1 (Figura 13 B). Il quenching della fluorescenza dopo l'aggiunta del cristal violetto è del 52%, indice del fatto che in questo caso il fenomeno di internalizzazione delle vescicole avviene in misura maggiore.

### ***Determinazione della presenza di acidi nucleici all'interno delle vescicole***

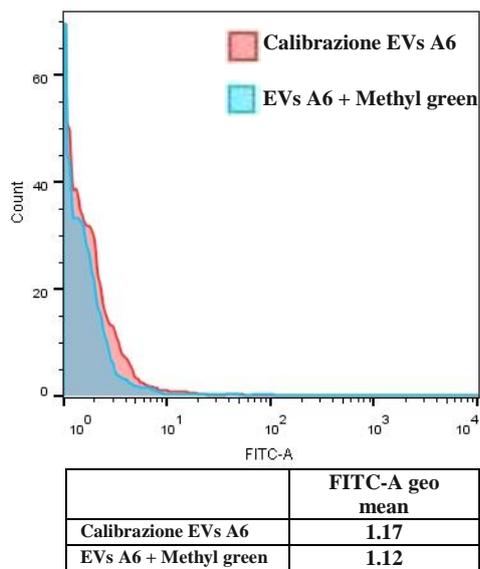
Come discusso nell'introduzione, la comunicazione cellulare mediata dalle vescicole include anche il trasferimento di materiale genetico, DNA ed RNA, sia codificanti che non. Questo trasferimento può regolare e modulare l'espressione genica ed il fenotipo delle cellule target. Per dimostrare quindi se anche nelle vescicole rilasciate dalle cellule A6 fossero presenti acidi nucleici, sono stati condotti saggi di citofluorimetria utilizzando due marcatori fluorescenti, methyl green e pironina Y, specifici rispettivamente per il DNA e per l'RNA.

Come si evince dagli istogrammi di seguito riportati, vi è un rilevante aumento della fluorescenza nelle vescicole A6 trattate con pironina Y rispetto all'autofluorescenza delle stesse (Figura 14). Il dato conferma la presenza di RNA all'interno delle vescicole, come confermano anche i valori della media geometrica (1.28 per il controllo negativo; 37.7 per il campione trattato).



**Figura 14.** Istogrammi relativi all'analisi citofluorimetrica delle vescicole A6 per valutare la presenza di RNA. Nell'asse verticale è riportato il numero degli eventi registrati e nell'asse orizzontale la fluorescenza PE in scala log. In rosso istogramma relativo all'autofluorescenza delle vescicole incubate con PBS 1X, in blu istogramma relativo alla fluorescenza delle vescicole incubate con pironina Y.

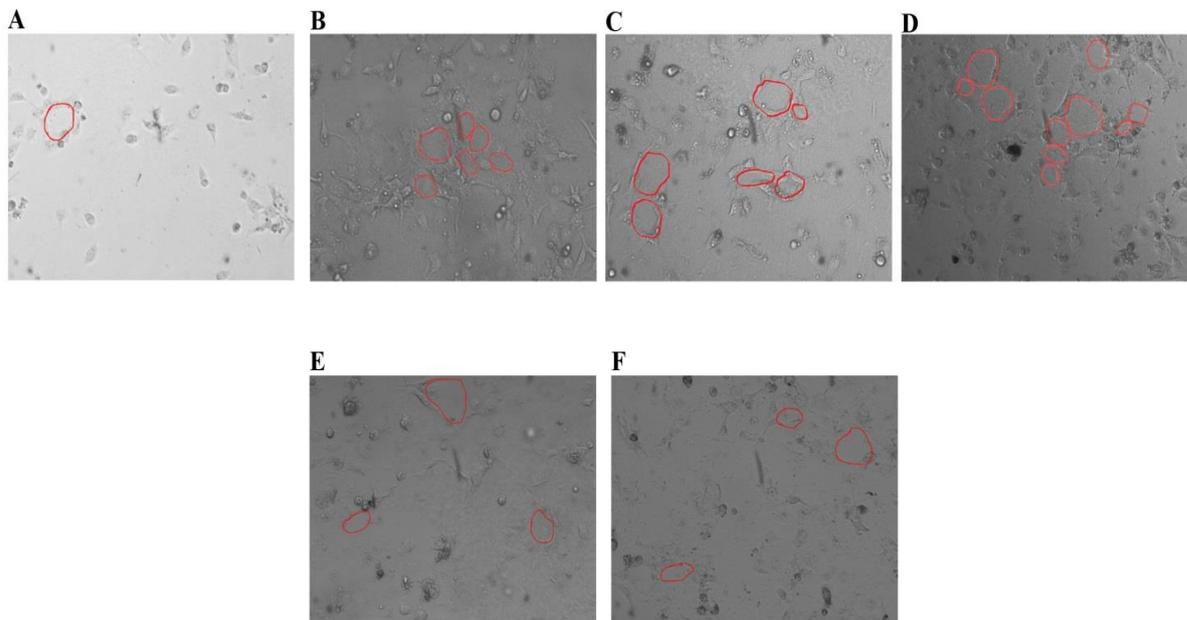
Non è invece evidente nessun aumento della fluorescenza rispetto all'autofluorescenza nel campione sottoposto a trattamento con methyl green (Figura 15), confermato dai vari valori della media geometrica (1.17 per il controllo negativo; 1.12 per il campione trattato), a dimostrazione del fatto che all'interno delle vescicole non è presente DNA, confermando anche che non si tratta di corpi apoptotici.



**Figura 15.** Istogrammi relativi all'analisi citofluorimetrica delle vescicole A6 per valutare la presenza di DNA. Nell'asse verticale è riportato il numero degli eventi registrati e nell'asse orizzontale la fluorescenza PE in scala log. In rosso istogramma relativo all'autofluorescenza delle vescicole incubate con PBS 1X, in blu istogramma relativo alla fluorescenza delle vescicole incubate con methyl green.

### *Formazione di vasi in vitro*

Tenendo conto dell'interazione tra le vescicole rilasciate dai mesoangioblasti e le cellule endoteliali ECV304, è stata valutata la capacità di queste ultime di formare strutture simili a vasi, definite *capillary like structures*, in conseguenza di questa interazione. A questo scopo, come controllo negativo, le cellule ECV304 sono state fatte crescere in una matrice priva di fattori di crescita (ECM-GFR). Come atteso, non si assiste quasi completamente alla formazione di vasi (Figura 16 A). Per confermare l'effettiva capacità di queste cellule endoteliali di formare vasi, queste ultime sono state piastrate in una matrice completa con fattori di crescita (ECM), utilizzata quindi come controllo positivo, dove appare evidente la formazione di queste strutture (Figura 16 B). Avendo confermato la capacità di queste cellule di formare vasi, per valutare il possibile effetto pro-angiogenetico delle vescicole rilasciate dai mesoangioblasti, le cellule ECV304 sono state incubate su matrice priva di fattori di crescita, in presenza di concentrazioni crescenti di EVs (Figura 16 C-F). Quello che appare evidente dalle foto (Figura 16 A-F) e dall'istogramma corrispondente (Figura 17) è che le EVs sono in grado di aumentare rispetto ai due controlli in maniera concentrazione dipendente il numero di vasi che si formano (Figura 16 A, B, C e D, rispettivamente).



**Figura 16. Immagini rappresentative relative ai vasi formati. A) ECM-GFR, B) ECM, C) ECM-GFR + 5 µg/ml EVs, D) ECM-GFR + 10 µg/ml EVs, E) ECM-GFR + 20 µg/ml EVs, F) ECM-GFR + 40 µg/ml EVs. Ingrandimento 10X.**

Aumentando però la concentrazione di vescicole si assiste ad una progressiva riduzione del numero di vasi, facendo ipotizzare che oltre un certo valore di concentrazione, le vescicole possano esercitare un ruolo inibitorio nel processo di formazione di vasi (Figura16 E, F).

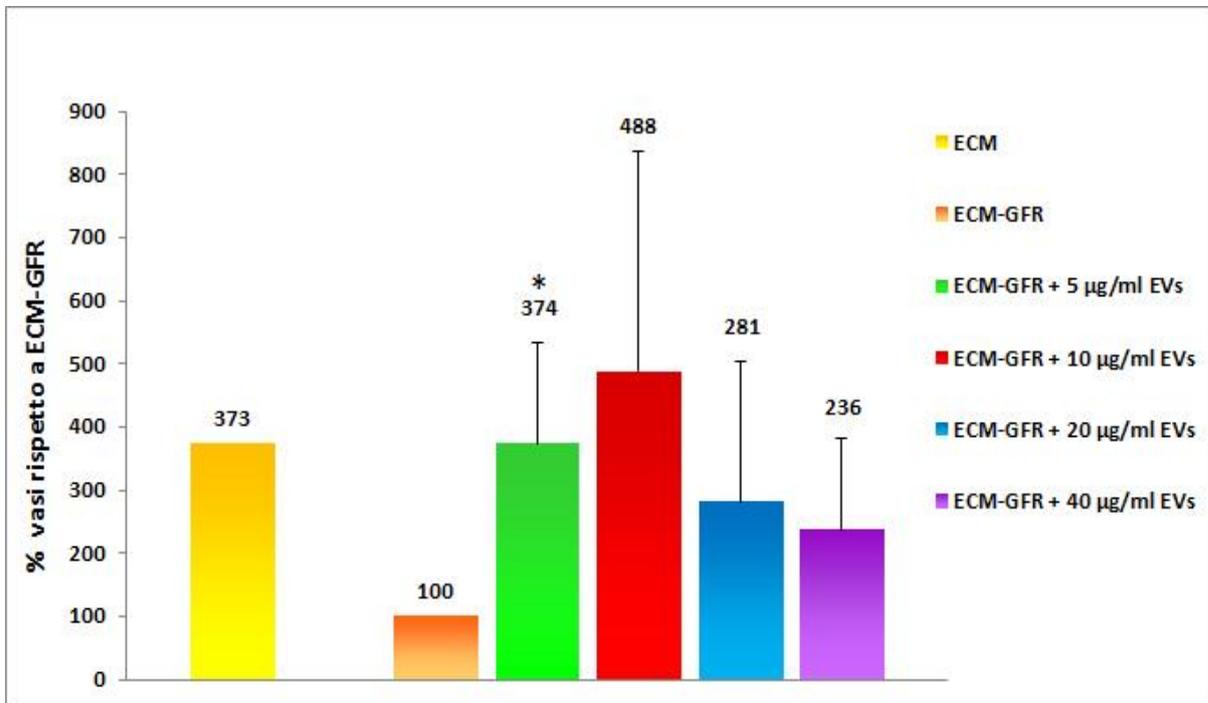
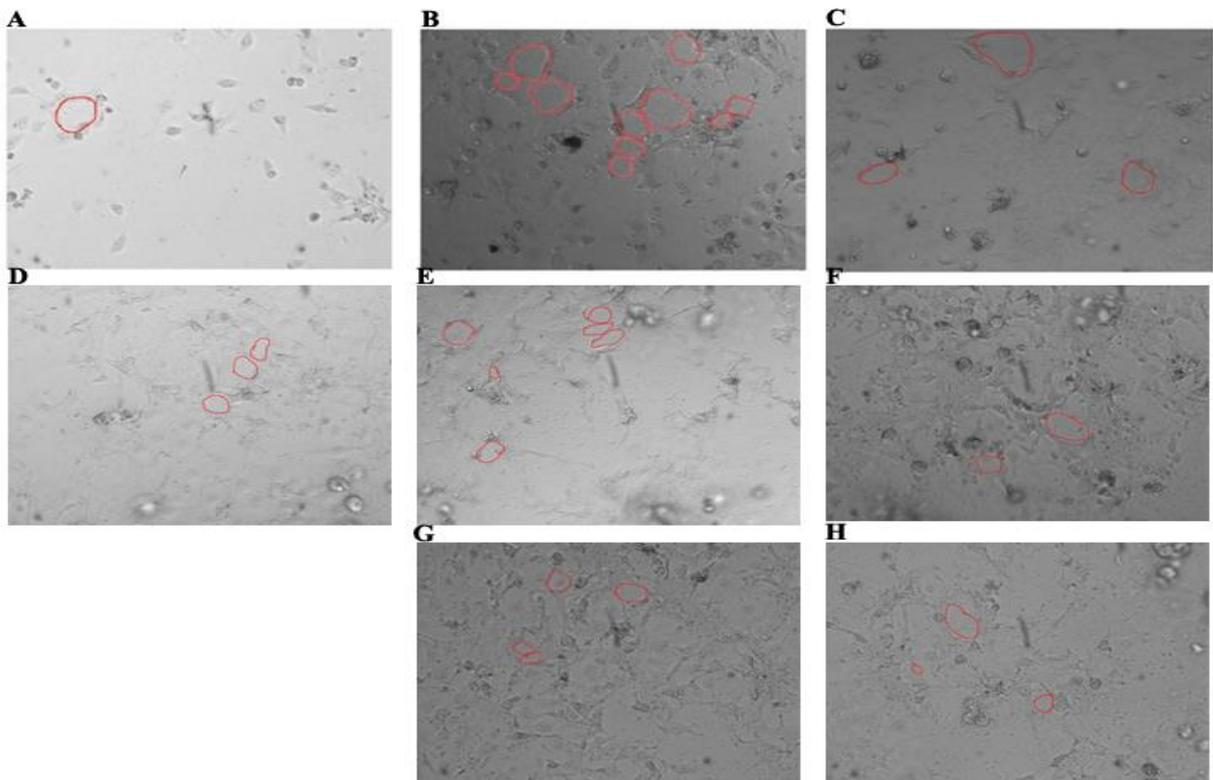


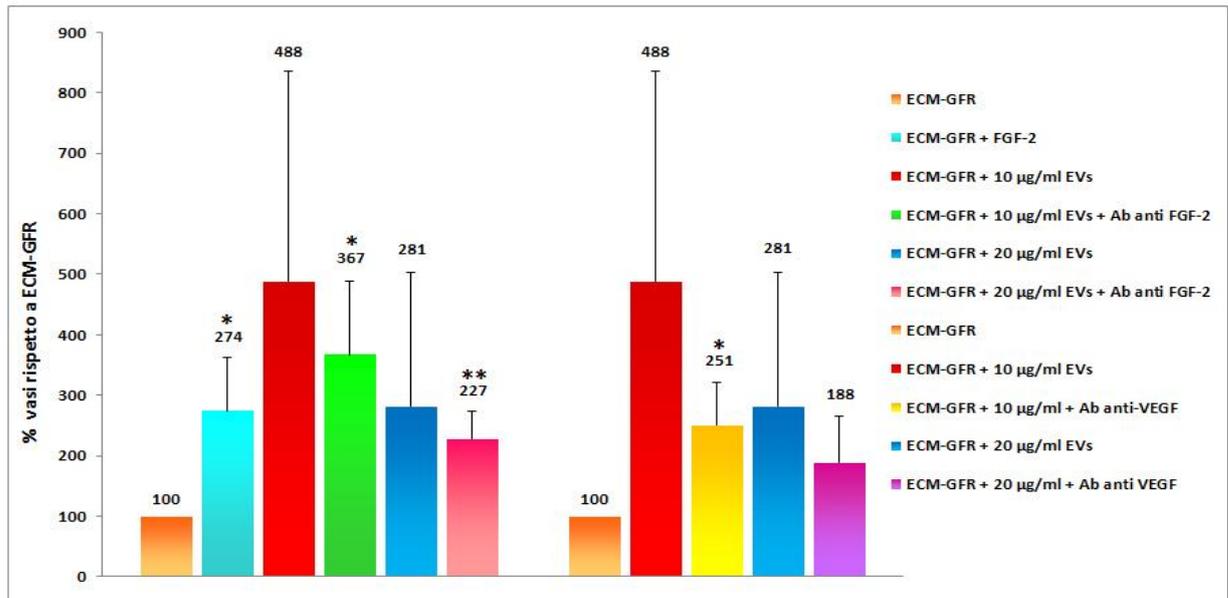
Figura 17. Istogramma relativo al numero medio di *capillary like structures* formati per campo fotografato. \*=  $p < 0.05$ .

Come si evince dal grafico sopra riportato, le cellule ECV304 sono in grado di formare *capillary like structures* se supportate da una matrice extracellulare arricchita con fattori di crescita (ECM). Utilizzando una matrice extracellulare priva di fattori di crescita in presenza di una concentrazione pari a 5 µg/ml EVs si assiste alla formazione di un numero di vasi paragonabile al controllo positivo (ECM); con la concentrazione di 10 µg/ml, si ottiene il maggior numero di vasi, mentre con 20 e 40 µg/ml, si può osservare una riduzione del numero di vasi formati, lasciando ipotizzare un potenziale effetto inibitorio oltre determinate concentrazioni.

Poiché nel nostro laboratorio era stato precedentemente dimostrato che le vescicole di membrana rilasciate dai mesoangioblasti contengono al loro interno FGF-2 (Candela et al., 2010), fattore che può indurre effetti angiogenetici (Vlodavsky et al., 1991), per verificare se questo fattore potesse avere un ruolo effettivamente preponderante nella formazione dei vasi, il medium di crescita delle cellule ECV304, cresciute in una matrice priva di fattori di crescita, è stato addizionato col fattore di crescita FGF-2, o con 10 e 20 µg/ml di EVs, in presenza questa volta però di anticorpi neutralizzanti per FGF-2 e VEGF, un altro fattore responsabile dei processi angiogenetici.



**Figura 18.** Immagini rappresentative relative ai vasi formati (contrasto di fase, 10X). A) ECM-GFR, B) ECM-GFR + 10 µg/ml EVs, C) ECM-GFR + 20 µg/ml EVs, D) ECM-GFR + FGF-2 10 ng/ml, E) ECM-GFR + 10 µg/ml EVs + Ab anti-FGF-2, F) ECM-GFR + 20 µg/ml EVs + Ab anti-FGF-2, G) ECM-GFR + 10 µg/ml EVs + Ab anti-VEGF, H) ECM-GFR + 20 µg/ml EVs + Ab anti-VEGF.



**Figura 19.** Istogramma relativo al numero medio di *capillary like structures* formati per campo fotografato, (\*=  $p < 0,05$ ), (\*\*= $p < 0,005$ ).

Come si evince dalle foto delle cellule ECV304 (Figura 18) e dal grafico corrispondente (Figura 19) l'FGF-2 aumenta il numero di vasi rispetto al controllo negativo (Figura 18 D), ma non in misura paragonabile al numero di vasi che si ottiene incubando le cellule con 10 e 20 µg/ml di vescicole (Figura 18 B, C). Per quanto concerne il VEGF, l'utilizzo di un anticorpo neutralizzante, in presenza di 10 e 20 µg/ml di vescicole, non riduce a zero il numero medio di vasi osservati. Questi risultati suggeriscono indirettamente la presenza di VEGF all'interno delle vescicole vista la riduzione del numero di vasi quando viene utilizzato un anticorpo neutralizzante. Inoltre, permettono di affermare che il fattore FGF-2 contenuto nelle EVs delle cellule A6 abbia un ruolo, sebbene non preponderante, nella formazione dei vasi, e che entrambi i fattori FGF-2 e VEGF siano coinvolti nei processi di formazione delle *capillary like structures*, sebbene non siano gli unici responsabili del processo di formazione dei vasi, come suggeriscono i valori riguardanti l'utilizzo degli anticorpi neutralizzanti.

## *Effetto delle vescicole sulla migrazione cellulare*

È stato anche valutato se le vescicole fossero in grado di modificare la capacità migratoria delle cellule ECV304. A questo scopo sono stati effettuati dei saggi di *wound healing*, utilizzando due concentrazioni diverse (10 e 40 µg/ml) di vescicole. Quello che risulta evidente dal grafico (Figura 20) e dal pannello di foto (Figura 21), è che l'aggiunta delle vescicole al mezzo di coltura in entrambe le concentrazioni determina una maggiore capacità migratoria delle cellule ECV304, e quindi la chiusura della ferita indotta in tempi minori.

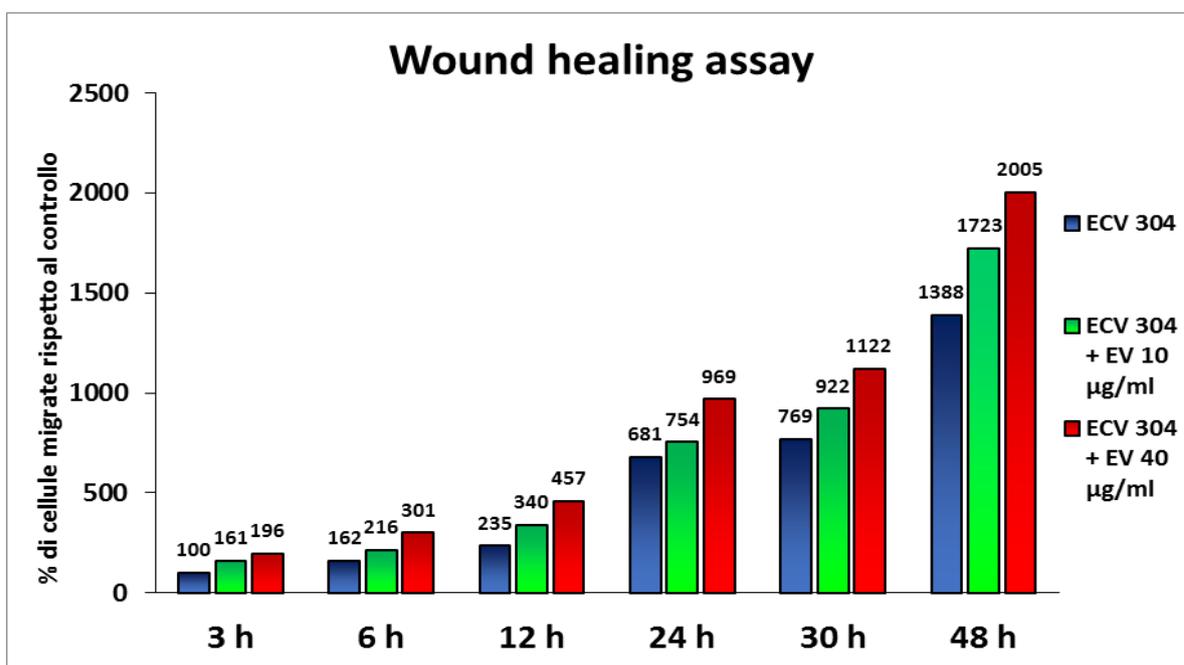


Figura 20. Istogramma relativo al numero di cellule che hanno invaso la ferita a 3, 6, 12, 24, 30 e 48h. Valori riportati al 100% del controllo.

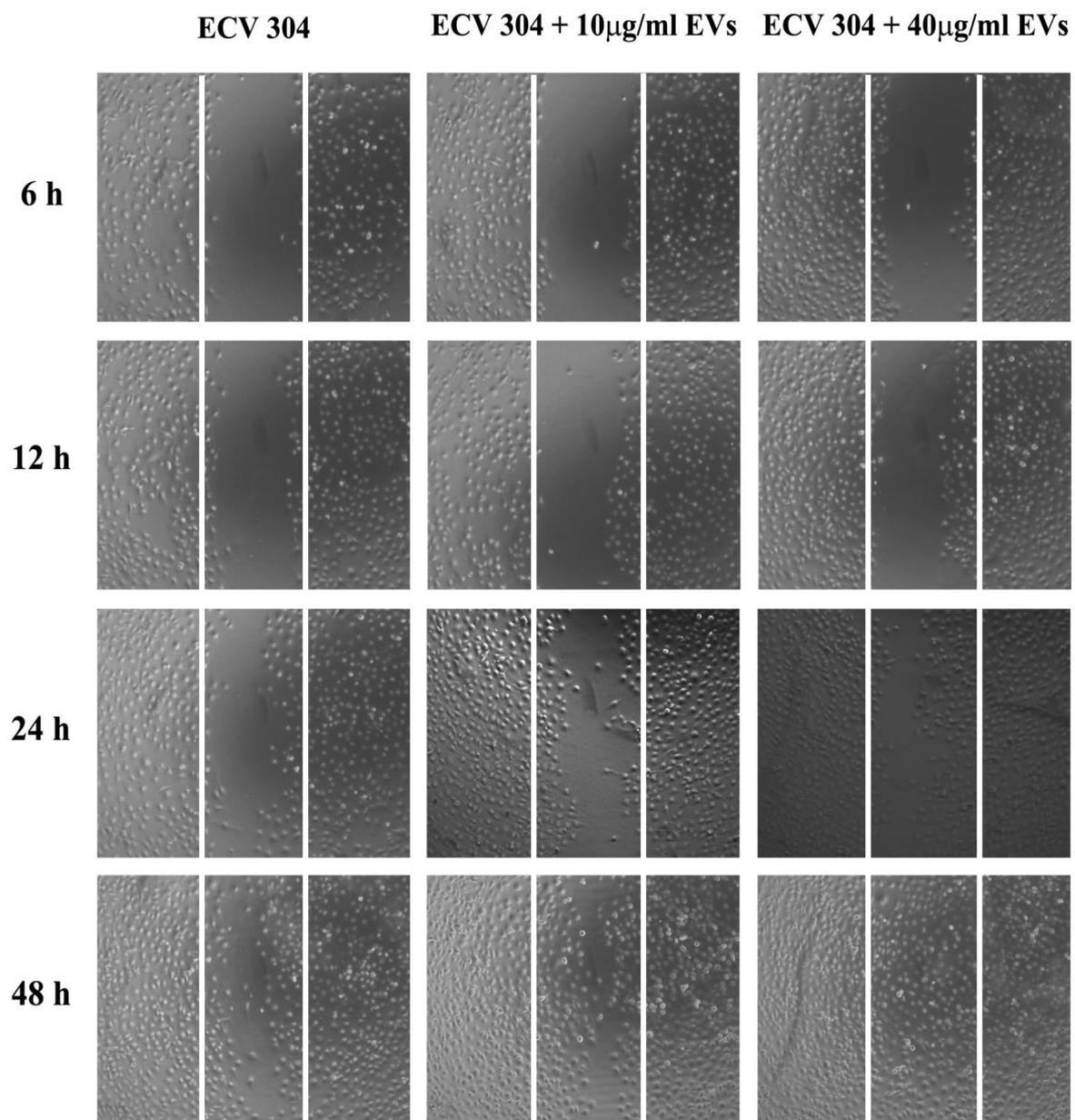


Figura 21. Foto rappresentative dello scratch test per le cellule ECV304, in assenza ed in presenza di mezzo condizionato con 10 e 40  $\mu$ g/ml di vescicole. Fotografie scattate a 6, 12, 24 e 48h. Ingrandimento 10X.

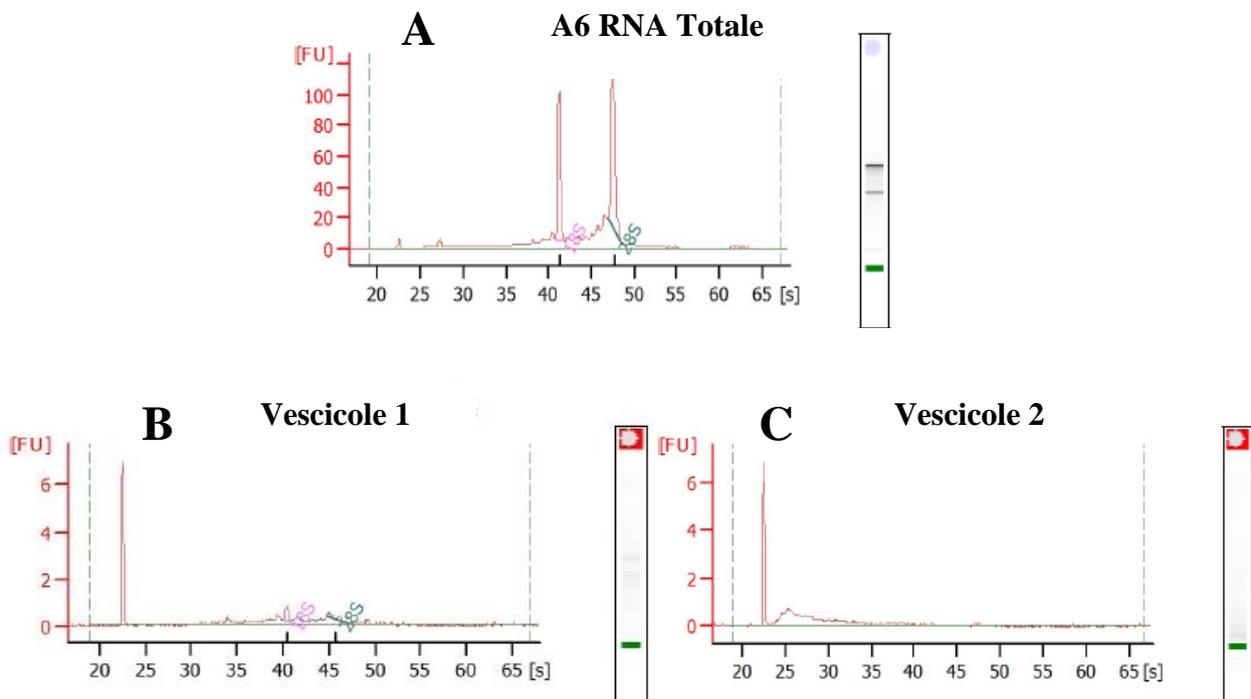
## *Analisi sul trascrittoma delle vescicole*

Tenendo conto della presenza di RNA all'interno delle vescicole di membrana rilasciate dai mesoangioblasti A6 è stata effettuata un'analisi del trascrittoma delle stesse per identificare se vi fosse un arricchimento selettivo di messaggeri rispetto alle cellule da cui derivano. Questo allo scopo di determinare in quali funzioni cellulari e pathway essi potessero essere coinvolti in seguito ad interazione con una cellula target.

### *Analisi qualitativa dell'RNA estratto*

Prima di procedere con l'esperimento di microarray è stata effettuata un'indagine qualitativa dell'RNA totale estratto dalle cellule A6 e da due differenti preparazioni di vescicole. A questo scopo è stata condotta un'elettroforesi capillare su gel denaturante utilizzando il *bioanalyzer Agilent 210*.

Vi sono evidenti differenze tra il contenuto di RNA delle vescicole e quello delle cellule da cui esse derivano (Figura 22).



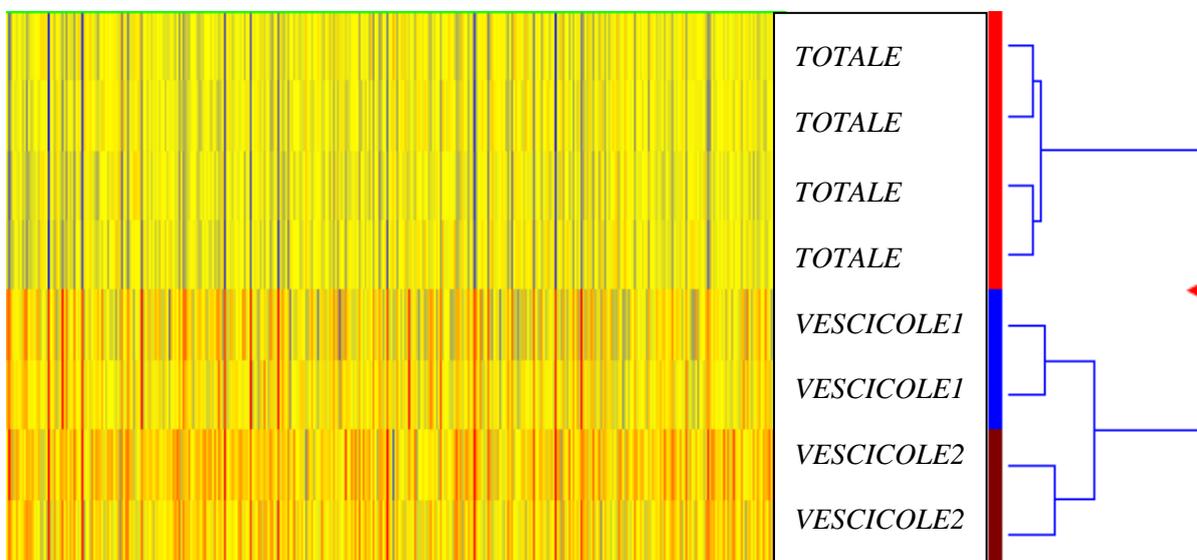
**Figura 22.** Elettroferogrammi relativi all'analisi, mediante bionalyzer, dell'RNA totale estratto da mesoangioblasti A6 (A) e da vescicole di A6 (B e C). Nell'asse verticale è riportata l'intensità della fluorescenza rilevata e nell'asse orizzontale la durata della corsa.

Mettendo a confronto gli elettroferogrammi dell'RNA delle vescicole e delle cellule corrispondenti si evince che all'interno delle vescicole sono presenti RNA di varie dimensioni, e mancano, o sono molto bassi, i picchi relativi all'RNA ribosomale (18S e 28S), presenti invece nell'RNA totale delle cellule e nei corpi apoptotici.

Il profilo riscontrato è perfettamente coerente con altri dati presenti in letteratura (Crescitelli et al., 2010).

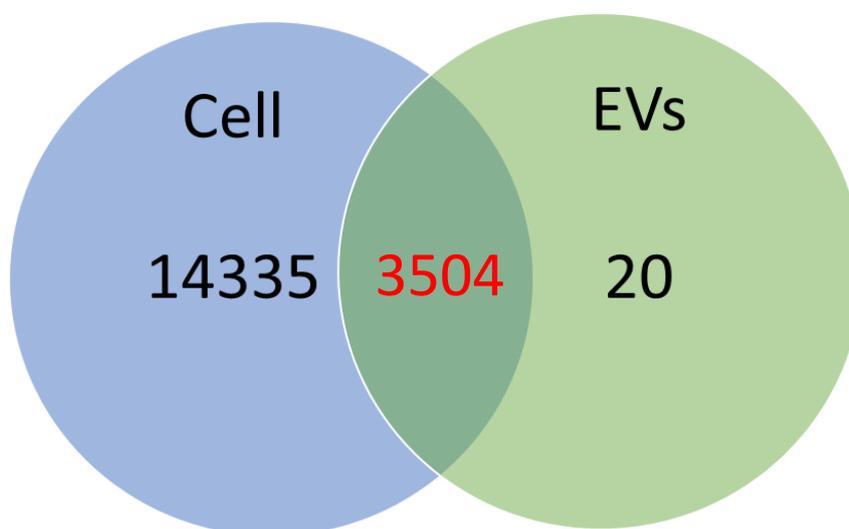
### *Analisi dell'espressione genica mediante microarray*

Una volta verificata la quantità e la qualità dei campioni di RNA estratti dai mesoangioblasti e dalle EVs abbiamo effettuato l'analisi dell'espressione genica mediante microarray. Una prima analisi grezza dei dati è stata effettuata con l'extraction software della Agilent 9.5 partendo dalle scansioni degli arrays, che riporta le analisi fatte nel "QC report". I risultati delle analisi riportati nei *QC report* di ciascun array hanno indicato che dal punto di vista tecnico l'esperimento di microarray è stato condotto correttamente. Si è quindi proseguito con l'analisi dei dati mediante Agilent's Gene Spring software 12.1. I dati sono stati caricati nel programma impostando l'esperimento come "expression single color", in modo da analizzare separatamente i segnali di fluorescenza verde e rossa per ciascun campione. È stata effettuata un'analisi di clusterizzazione per un'ulteriore verifica della qualità dell'esperimento. Le repliche biologiche del campione A6 e dei due campioni di vescicole ottenute da queste cellule sono state indicate nel microarray con *TOTALE*, *VESCICOLE 1* e *VESCICOLE 2*, rispettivamente. Come ci si aspettava vengono clusterizzati *TOTALE* con *TOTALE*, *VESCICOLE 1* con *VESCICOLE 1* e *VESCICOLE 2* con *VESCICOLE 2* (Figura 23).



**Figura 23.** Analisi di cluster.

Dopo avere verificato la qualità dell'array si è proseguita l'analisi per individuare i messaggeri presenti nelle vescicole.



**Figura 24. Rappresentazione grafica mediante diagramma di Venn del numero di trascritti presenti nei mesoangioblasti, nelle EVs isolate dagli stessi mesoangioblasti e di quelli in comune tra i due set di RNA presi in considerazione.**

Si è proceduto alla sottrazione del background e quindi al settaggio di una soglia pari a  $1 \times 10^8$  in termini di segnale di fluorescenza. Circa 3.524 diversi trascritti sono risultati presenti nelle vescicole. Un numero pari a 3504 trascritti è in comune tra le microvescicole e le cellule che le hanno generate, mentre in numero pari a 20 sono risultati essere presenti esclusivamente nelle vescicole (Figura 24).

Si è dunque proceduto con la classificazione dei trascritti comuni alle cellule e alle vescicole di membrana rilasciate dai mesoangioblasti A6, ed alla classificazione dei trascritti esclusivamente presenti nelle vescicole in base alle loro implicazioni nei processi biologici mediante il software *gprofiler* (Reimand et al., 2007 e 2011), applicando test di correzione Benjamini-Hochberg, e settando una soglia di significatività con p-value pari a 0.001.

*Gprofiler* utilizza la *Gene Ontology* per le classificazioni in funzioni molecolari, classi proteiche, processi biologici e componenti cellulari. Nel nostro caso l'attenzione si è concentrata sulle diverse categorie di processi biologici maggiormente rappresentati e di rilevante interesse.

Rappresentativi in questa classificazione sono i trascritti implicati nei processi che includono ad esempio, regolazione dei processi metabolici di composti derivati da carboidrati, regolazione dei fenomeni di trasporto intracellulare, angiogenesi, processi di adesione e migrazione cellulare, differenziamento cellulare, biogenesi, sviluppo e organizzazione dei componenti cellulari, comunicazione cellulare e regolazione del ciclo cellulare (Figura 25).

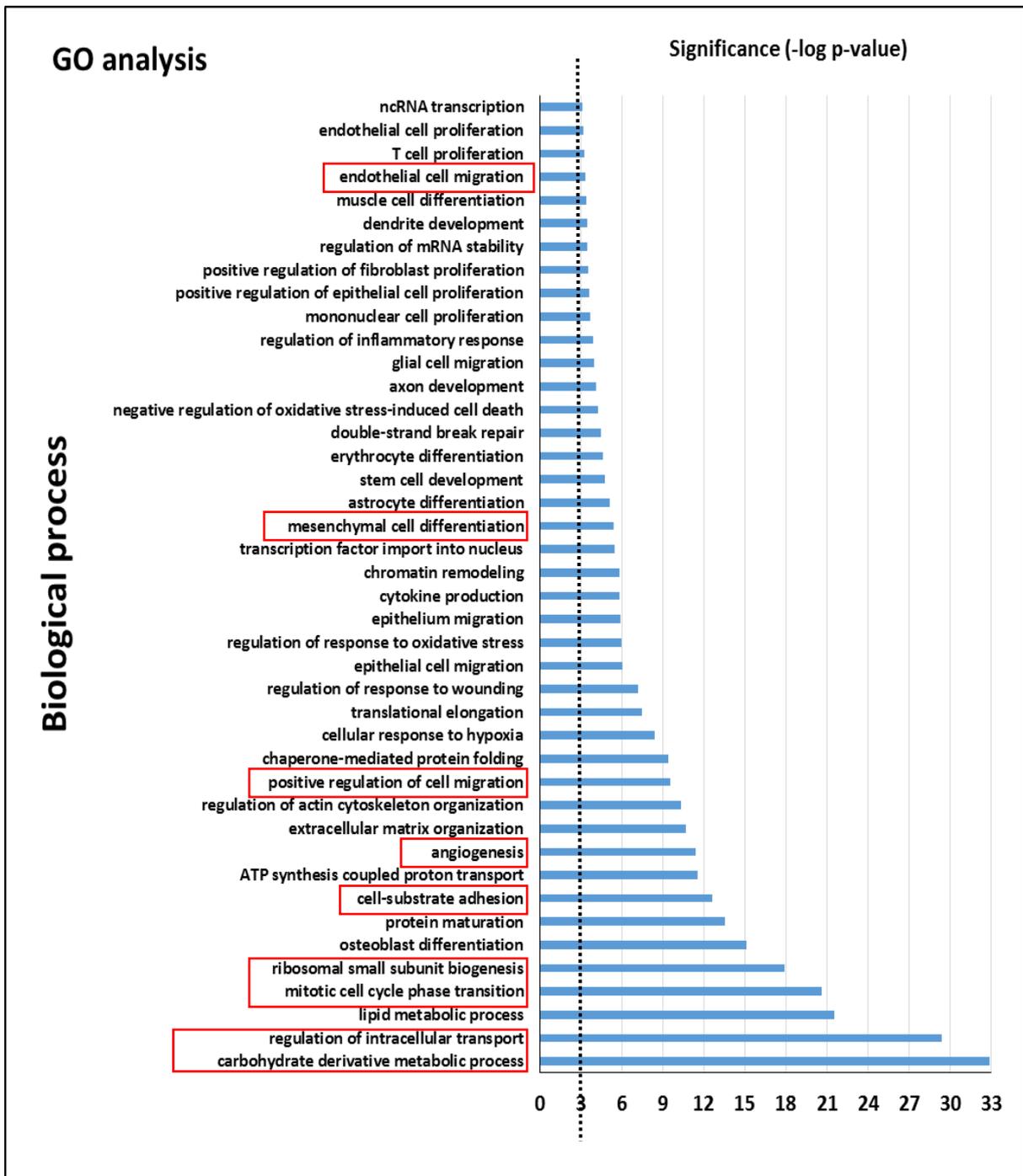


Figura 25. Istogramma relativo ai processi biologici di interesse, ottenuto tramite analisi di Gene Ontology per i trascritti comuni tra i mesoangioblasti A6 e le EVs isolate dagli stessi. La linea tratteggiata rappresenta la soglia di significatività tenuta in considerazione con valore  $3 = 0.001$  p-value.

Poiché i mesoangioblasti sono cellule staminali associate ai vasi e le vescicole di membrana da essi rilasciate interagiscono con cellule endoteliali, si è cercato di individuare se alcuni dei trascritti rappresentati nelle vescicole di membrana fossero implicati nei processi di angiogenesi, o fossero relativi allo sviluppo ed alla morfogenesi di strutture vascolari. A tale scopo, incrociando i dati ottenuti tramite *Gprofiler* (Reimand et al., 2007 e 2011) con quelli ottenuti attraverso il database DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery v6.7) (Huang et al., 2009 A e B) sono stati individuati almeno 7 trascritti correlati con processi pro o anti angiogenetici (Tabella 4).

<i>Abbreviazione</i>	<i>Nome del gene</i>
<b>Ang</b>	angiogenin, ribonuclease 5, RNase A family,
<b>Dll4</b>	delta-like 4 (Drosophila)
<b>Pik3c2g</b>	phosphatidylinositol 3-kinase, C2 domain containing, gamma polypeptide
<b>Sema5a</b>	seven thrombospondin repeats (type 1 and type 1-like), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 5A
<b>Sema4c</b>	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 4C
<b>VEGFb</b>	Vascular Endothelial Growth Factor-b
<b>Vash1</b>	Vasohibin 1
<b>SerpinE1</b>	Serpin Peptidase Inhibitor, Clade F

**Tabella 4. Elenco dei trascritti presenti nelle microvescicole isolate dai mesangioblasti, correlati a processi angiogenetici.**

L'*angiogenina*, conosciuta anche come ribonucleasi 5, appartiene alla superfamiglia delle RNAsi secrete. Identificata originariamente come *tumor angiogenic factor*, induce l'angiogenesi stimolando la trascrizione dell'RNA ribosomiale (Li and Hu, 2010).

*PI3KC2 $\gamma$*  è uno dei tre membri delle PI3K di classe II e la connessione tra il pathway PI3K/AKT-dipendente, l'angiogenesi e la modulazione dell'espressione di altri fattori angiogenetici come il monossido di azoto e le angiopoietine è nota da tempo (Soler et al., 2015).

La *semaforina5A* e la *semaforina 4C* appartengono rispettivamente alle sottofamiglie IV e V delle semaforine. La *semaforina5A* innesca la fosforilazione di AKT, con conseguente aumento della proliferazione nelle cellule endoteliali; inoltre, i dati riportati in letteratura suggeriscono anche che aumenti la migrazione cellulare mediante attivazione del recettore MET ad attività tirosin-chinasica, ed attraverso la MMP-9 (Sadanandam et al., 2010). Per quanto concerne invece la *semaforina4C*, è nota essere in grado di avviare processi di angiogenesi attraverso meccanismi dipendenti dalle proteine chinasi Rho (Neufeld et al., 2012).

*Delta-like 4* e *vasohibin 1* sono invece regolatori negativi dell'angiogenesi. Si pensa che questi due fattori, prodotti dalle stesse cellule endoteliali, inibiscano il processo angiogenetico attraverso un meccanismo autoregolatorio a feed-back negativo. *Dll4* lega il recettore *Notch1* presente sulle cellule endoteliali e mutazioni in questi geni causano un alterato sviluppo vascolare (Krebs et al., 2000). È stato inoltre dimostrato che l'espressione di *Dll4* è indotta da VEGF, il principale tra i fattori pro-angiogenetici (Lobov et al., 2007).

Il *VEGFb* appartiene alla famiglia dei fattori di crescita endotelio-vascolari, che regola la formazione di vasi sanguigni e la fisiologia cellulare delle cellule endoteliali.

Il recettore di *vasohibin 1*, invece, non è ancora conosciuto ma, quando aggiunto al mezzo di coltura, *vasohibin 1* inibisce l'angiogenesi e la migrazione e la proliferazione delle cellule endoteliali (Sato, 2009).

*SerpinF1* costituisce un potente inibitore dei processi angiogenetici, codifica per una glicoproteina, Pigment-epithelium derived factor (PEDF), in grado di downregolare l'espressione del VEGF (Xu et al., 2011).

Considerati i risultati derivati dal *functional annotation clustering* dei trascritti isolati dalle vescicole ed il risultato dello scratch test effettuato addizionando le microvescicole al mezzo di coltura di cellule endoteliali ECV304, ci siamo chiesti se tra i trascritti che risultano essere presenti nelle vescicole, ve ne fossero alcuni coinvolti in processi di migrazione e rimodellamento del citoscheletro e della morfologia cellulare. Sono stati riscontrati almeno 7 trascritti coinvolti in fenomeni di adesione, rimodellamento del citoscheletro actinico e migrazione cellulare (Tabella 5).

<i>Abbreviazione</i>	<i>Nome del gene</i>
<b>Pik3c2g</b>	phosphatidylinositol 3-kinase, C2 domain containing, gamma polypeptide
<b>Pip5k1c</b>	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type 1 gamma
<b>Cdc42ep5</b>	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 5
<b>Sema5a</b>	seven thrombospondin repeats (type 1 and type 1-like), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 5A
<b>Myh9</b>	Non-muscle Myosine Heavy Chain-9
<b>Trip6</b>	thyroid hormone receptor interactor 6
<b>Abl 1-2</b>	v-abl Abelson murine leukemia viral oncogene 1-2 (arg, Abelson-related gene)

**Tabella 5. Elenco dei trascritti presenti nelle microvescicole isolate dai mesangioblasti, correlati a processi adesione e migrazione cellulare.**

*PI3KC2 $\gamma$*  è uno dei tre membri delle PI3K di classe II, molto spesso associati alla riorganizzazione del citoscheletro. Il crosstalk tra *PI3KC2 $\gamma$*  e le GTPasi della famiglia Rho è noto da tempo. Infatti, l'attivazione di queste ultime può avvenire a valle del processo di segnalazione innescato dai fosfoinositidi. (Cain et al., 2009).

*Pip5k1c* è la chinasi responsabile della formazione del PIP<sub>2</sub>, una molecola nota per il suo ruolo nelle adesioni focali. Essa interagisce con la talina e si localizza a livello delle adesioni focali. Inoltre, svolge il suo ruolo modulando il legame integrina-ligando e la forza di

accoppiamento integrina-actina, risultando così essenziale nei fenomeni di migrazione cellulare (Li et al., 2013).

*Myh9* codifica per una catena pesante della miosina non-muscolo specifica e rappresenta uno dei componenti più importanti delle fibre da stress. È coinvolta in processi di organizzazione del citoscheletro di actina, e dati recenti di letteratura riportano la sua colocalizzazione con l'*angiogenina* alle estremità del corpo cellulare per la formazione di fibre da stress ed il rimodellamento dell'actina, fenomeno fondamentale per la formazione di nuove strutture vascolari (Wei et al. 2011).

*Cdc42ep5* è una proteina effettrice che agisce a valle di *cdc42*, una GTPasi che appartiene alla famiglia Rho, i cui membri sono importanti regolatori a monte della polimerizzazione dell'actina, della contrazione dell'actomiosina, e sono coinvolti anche nella congiunzione di segnali e stimoli esterni di adesione con le dinamiche citoscheletriche. La GTPasi *cdc42* controlla in maniera predominante la formazione dei filopodi, piccole protrusioni di membrana caratterizzate da fasci di actina paralleli, inoltre ha un ruolo predominante nella formazione dei lamellipodi, regola la polarizzazione della cellula e ne promuove l'estensione mediante stabilizzazione dei microtubuli citoscheletrici (Zegers et al., 2014). Dati in letteratura riportano infine che *Cdc42* regola l'attività e la localizzazione del complesso aPKC (atypical protein kinase-C) -PAR6 e -PAR3 (partition defective 6/3) che ricopre un ruolo chiave e conservato in molti tipi cellulari eucariotici nei meccanismi alla base della polarità cellulare (Etienne-Manneville and Hall, 2010), motivo per cui *Cdc42* è stato definito come un regolatore fondamentale della polarità della cellula, in grado di coordinare il traffico di membrana e di riorganizzare il network dei microtubuli (Ridley, 2006).

*Abl1* e *Abl2* membri della famiglia Abelson delle proteine tirosin-chinasi non recettoriali rivestono un ruolo importante nella riorganizzazione citoscheletrica grazie alle sequenze di legame per l'F-actina ed i microtubuli (Xing et al., 2014). Inoltre, Li e colleghi hanno recentemente dimostrato che le chinasi della famiglia Abelson vengono attivate a valle del recettore Met, che svolge un ruolo di regolazione nel rimodellamento del citoscheletro actinico di cellule epiteliali mediato dalla chinasi RhoA, e che la loro soppressione diminuisce drasticamente la migrazione cellulare (Li et al., 2015).

*Trip6* è capace di legare l'estremità carbossiterminale del recettore LPA<sub>2</sub> (Lysophosphatidic Acid 2 Receptor), e spesso è associato in maniera agonista-dipendente con componenti dei complessi focali come la paxillina e le FAK (Focal Adhesion Kinases). Dati di letteratura indicano un coinvolgimento di questa proteina in fenomeni di adesione e migrazione, poiché

la soppressione dell'espressione di *Trip6* endogeno, mediante specifica siRNA, causa una riduzione della migrazione cellulare indotta da LPA, suggerendo che *Trip6* abbia un ruolo nelle dinamiche del citoscheletro actinico nonché come componente dei complessi focali coinvolti nell'adesione e nella migrazione cellulare (Xu et al., 2003).

Nella seguente tabella sono riportati i 20 trascritti la cui presenza, secondo i parametri utilizzati per l'analisi, può essere riscontrata esclusivamente all'interno delle EVs.

<i>Abbreviazione</i>	<i>Nome del gene</i>
<b>1700030F18Rik (Fam186A)</b>	Family with sequence similarity, member A
<b>Ankrd45</b>	Ankyrin repeat domain containing 45
<b>Atp1a2</b>	ATP Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting subunit alpha 2
<b>Calr4</b>	Calreticulin 4
<b>Chrna4</b>	Nicotinic cholinergic receptor-subunit alpha 4
<b>Cysltr1</b>	Cysteinyl leukotriene receptor 1
<b>Dbn1</b>	Dysbindin 1 (Dystrobrevin binding protein)
<b>Epha5</b>	Ephrin receptor A5
<b>Fam178b</b>	Family with sequence similarity, member 178b
<b>Lipg</b>	Lipase, Endothelial
<b>Mfsd6l</b>	Major facilitator superfamily domain containing 6-like
<b>Olf113</b>	Olfactory receptor 113
<b>Parvg</b>	Parvin gamma
<b>Pcdh1</b>	Protocadherin-1
<b>Pcsk5</b>	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 5
<b>Plekha2</b>	Plekstrin homology containing domain 2
<b>Tdp1</b>	Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1
<b>Ung</b>	Uracil DNA glycosylase
<b>Vipr1</b>	Vasoactive Intestinal Peptide Receptor 1
<b>Xylt1</b>	Xylosyltransferase I

**Tabella 6.** Elenco dei trascritti presenti nelle microvescicole isolate dai mesoangioblasti e non riscontrati, dopo settaggio della soglia di fluorescenza, nell'RNA totale estratto dai mesoangioblasti stessi.

Tra i trascritti riportati in tabella 6 spicca *EphA5*, il cui prodotto è un recettore per Ephrin appartenente alla famiglia dei recettori tirosin-chinasici. Tra le funzioni svolte a valle dell'attivazione del recettore rientrano la definizione della polarità e la direzionalità assonale durante lo sviluppo del sistema nervoso. Inoltre, la proteina gioca un ruolo nella plasticità sinaptica del cervello adulto attraverso la regolazione della genesi delle sinapsi (Kullander et al., 2002).

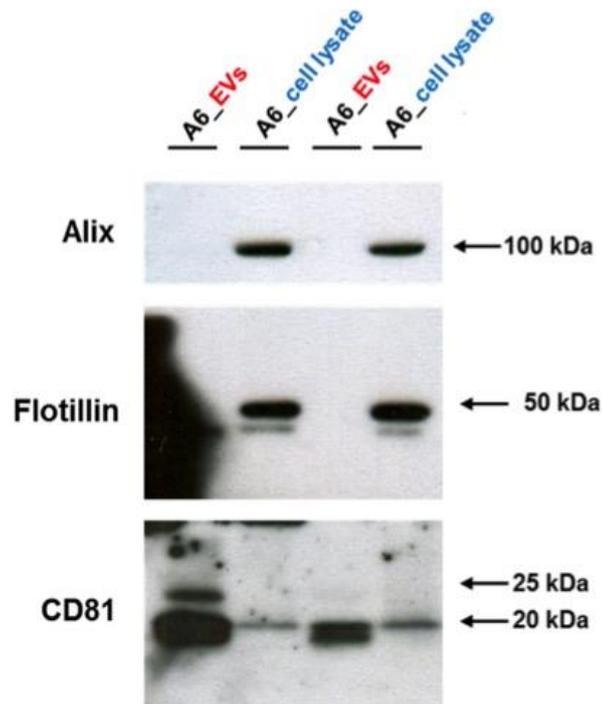
*Calr4*, un trascritto il cui prodotto è la Calreticulina, primariamente localizzata nel reticolo endoplasmatico dove agisce da chaperon in concerto con la calnexina per assistere il folding ed il controllo di qualità delle glicoproteine di neosintesi che entrano nel reticolo endoplasmatico prima di essere inviate a diversi compartimenti sub cellulari. Inoltre, la presenza della calreticulina, oltre che nel reticolo endoplasmatico, è stata riscontrata anche in diverse localizzazioni sub cellulari dove svolge un ruolo in vari processi cellulari relativi alla clearance di cellule apoptotiche, all'adesione ed alla migrazione cellulare, (Michalak et al., 2010; Gardai et al., 2005; Gold et al., 2010; Martins et al., 2010).

*Pcdhl* è un trascritto il cui prodotto appartiene alla sottofamiglia delle protocaderine, all'interno della superfamiglia delle caderine. La proteina prodotta dalla traduzione del trascritto in questione, si ritrova generalmente in siti di adesione cellula-cellula, ed è coinvolta nell'adesione delle cellule neurali, suggerendo un possibile ruolo nello sviluppo neuronale (Redies et al., 2008).

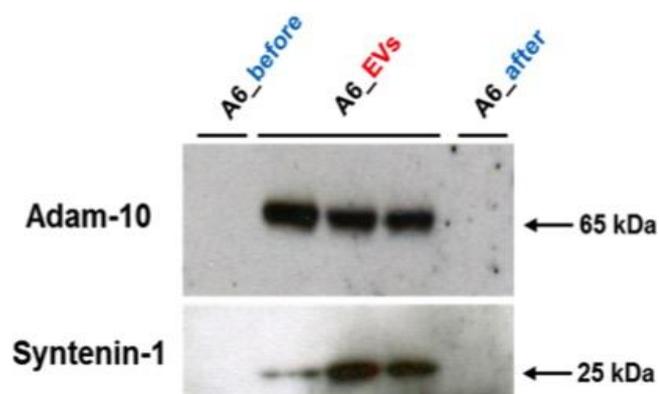
*Parvg* è un trascritto il cui prodotto appartiene alla famiglia parvin, ed i membri di questa famiglia sono proteine associate alle adesioni focali che legano l'actina (Yoshimi et al., 2006). Il prodotto del trascritto *Ung* è una Uracil-DNA glicosilasi. Un compito importante delle Uracil-DNA glicosilasi è quello di prevenire la mutagenesi, eliminando Uracile dalle molecole di DNA, tagliando il legame N-glicosilico e dando avvio al processo di riparazione per excisione di base (Nilsen et al., 2000).

### *Valutazione di markers proteici delle vescicole*

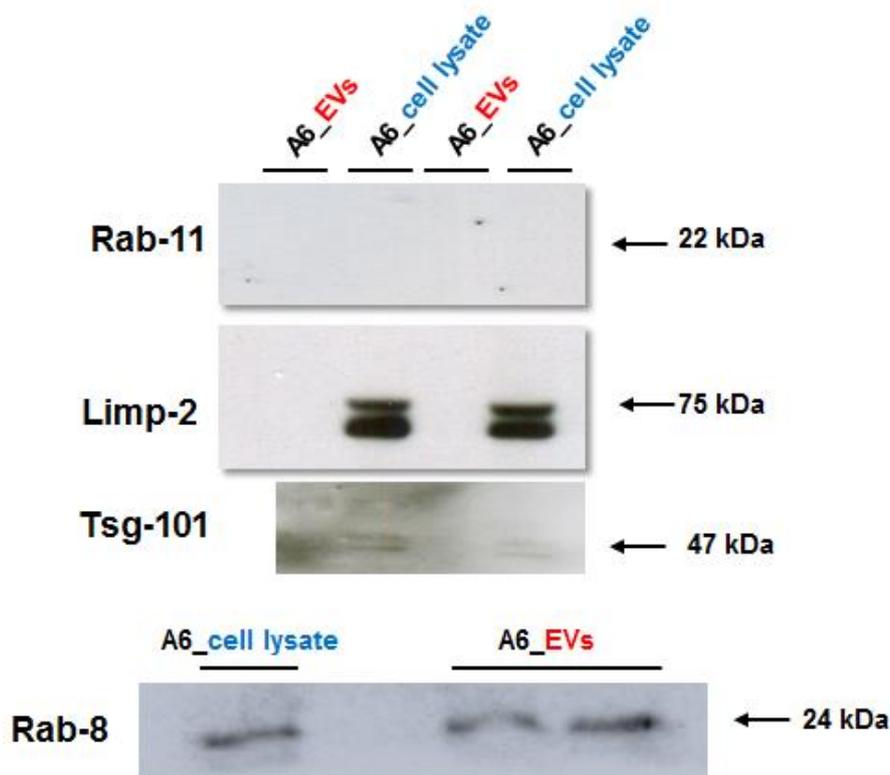
Al fine di caratterizzare meglio il profilo proteico delle EV isolate dalle A6, già iniziato in precedenza (Candela et al., 2010), sono stati testati marcatori comunemente utilizzati nell'identificazione delle vescicole extracellulari: Alix, Flotilina, la tetraspannina CD81 (Figura 26), Adam10, Syntenin-1 (Figura 27), Limp-2, Rab-11, Rab-8 e TSG101 (Figura 28).



**Figura 26.** Immunoblot per identificazione delle proteine Alix, Flotilina e CD81. Per il saggio sono stati utilizzati 10  $\mu$ g di proteine per le EVs e per i lisati cellulari.



**Figura 27.** Immunoblot per identificazione delle proteine Adam-10 e Syntenin-1. Per il saggio sono stati utilizzati 15  $\mu$ l di terreno di coltura prelevati al termine delle 3h di incubazione, prima di effettuare l'ultracentrifugazione, 15  $\mu$ l di terreno di coltura prelevati al termine del processo di ultracentrifugazione e 10  $\mu$ g di proteine per le EVs.



**Figura 28.** Immunoblot per l'identificazione delle proteine Limp-2, Rab-11 e Tsg101. Per il saggio sono stati utilizzati 10 µg di proteine per le EVs e per i lisati cellulari.

Dai saggi effettuati risulta che le EVs isolate dalle cellule A6 contengono:

- la tetraspannina **CD81**, coinvolta nella trasduzione del segnale in processi che riguardano lo sviluppo, l'attivazione, la crescita e la motilità cellulare (Figura 26);
- la metalloproteinasi **Adam10** (Figura 27);
- la **Syntenin-1**, glicoproteina che regola l'adesione cellulare, l'organizzazione citoscheletrica ed il traffico intracellulare di recettori transmembrana (Figura 27).
- **Rab-8**, una GTPasi spesso ritrovata in strutture cellulari dinamiche, come lamellipodi, filopodi e protrusioni. Svolge la sua funzione nel traffico di membrana ed in special modo nel pathway di riciclo delle membrane (Peränen, 2011) (Figura 28).

Non risultano presenti, invece, proteine correlate con ESCRT (Endosomal Sorting Complexes Required for Transport) come **Alix**, **Flotilina** e **Tsg-101**, o le proteine **Limp-2**, importante nella biogenesi lisosomale e coinvolta nella risposta a seguito dell'infiammazione tissutale (García-Hernández et al., 2016), e **Rab 11**, GTPasi associata al Golgi che interviene nel riciclo endosomiale e nel trasporto dal trans-Golgi network alla membrana plasmatica per

l'esocitosi di vescicole di riciclo (Chen et al., 1998; Takahashi et al., 2012), tutte proteine normalmente considerate come marker esosomiali.

### ***Profilo Proteomico mediante Array XL di citochine***

Per determinare se le EVs isolate dai mesoangioblasti A6 sono in grado di modulare la secrezione di citochine da parte di altre cellule, è stato condotto un array di citochine. Le citochine ed i fattori di crescita sono molecole di segnalazione extracellulare che mediano la comunicazione cellulare. Queste molecole sono secrete dalle cellule e giocano un ruolo critico in molti processi biologici come la crescita cellulare, il differenziamento, l'espressione genica, la migrazione, la risposta immunitaria ed i processi infiammatori (Khan, 2008).

Per scegliere il citotipo da utilizzare per questo saggio, abbiamo precedentemente valutato mediante citofluorimetria a flusso e microscopia confocale l'abilità di cattura delle EVs marcate con un colorante lipofilo fluorescente, da parte di 8 linee cellulari di diversa origine, tra cui carcinoma epatocellulare, neuroblastoma, carcinoma alla prostata, fibroblasti e macrofagi murini. La miglior risposta d'interazione in termini di internalizzazione è stata ottenuta da parte dei macrofagi murini Raw 264.7 (Tabelle 7 e 8 e Figure 29 e 30).

<b><i>Linea cellulare</i></b>	<b><i>% di cellule positive per internalizzazione</i></b>
<b>Huh7</b>	9.41%
<b>LnCap</b>	7.14%
<b>M1</b>	8,46%
<b>NIH-3T3</b>	4.20%
<b>RAW 264.7</b>	10.12%
<b>Hek293</b>	9.60%
<b>HT1286</b>	7.92%
<b>SHSY5Y</b>	2.83%

**Tabella 7. Dati relativi alla percentuale di cellule positive per l'internalizzazione delle EV, ottenuti mediante microscopia confocale. Per ciascuna linea cellulare sono stati fotografati 10 campi in maniera casuale e successivamente è stato contato il numero di cellule positive per l'internalizzazione, riportando il dato in termini di percentuale rispetto al numero totale di cellule osservate nei campi presi in esame.**

<i>Linea cellulare</i>	<i>% di eventi positivi nel campione di riferimento</i>	<i>% di eventi positivi dopo trattamento con EVs</i>	<i>% di aumento netto di eventi positivi</i>
<b>Huh7</b>	1.30%	44.82%	43.52%
<b>LnCap</b>	1.24%	24.54%	23.3%
<b>M1</b>	1.33%	33.36%	32.03%
<b>NIH-3T3</b>	1.31%	10.17%	8,86%
<b>RAW 264.7</b>	1.66%	55.94%	54.28%
<b>Hek293</b>	1.16%	23.02%	21.86%
<b>HT1386</b>	1.54%	6.58%	5.08%
<b>SHSY5Y</b>	1.28%	28.06%	26.78%

**Tabella 8.** Dati relativi all'analisi citofluorimetrica per l'internalizzazione delle EVs. Per ciascuna linea cellulare saggiata è stata valutata l'autofluorescenza della linea cellulare, la percentuale di eventi positivi per la fluorescenza nel canale PE-A dopo 24h di incubazione con terreno di coltura condizionato con EVs marcate con il colorante lipofilo fluorescente DiI e il conseguente aumento percentuale netto degli eventi positivi per la fluorescenza nel canale PE-A.

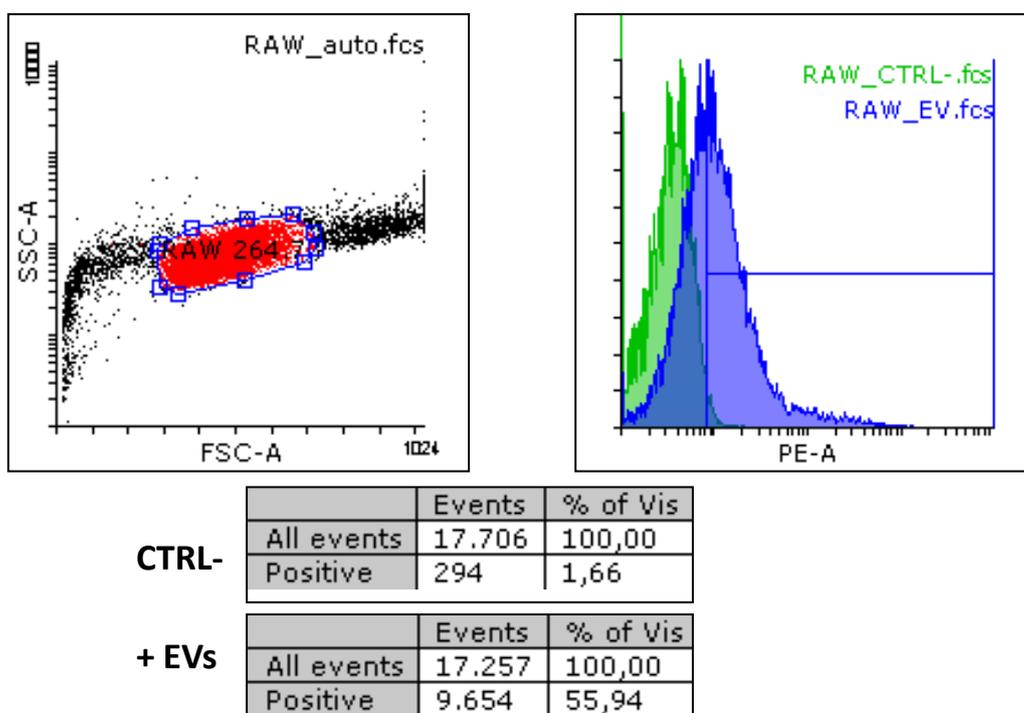
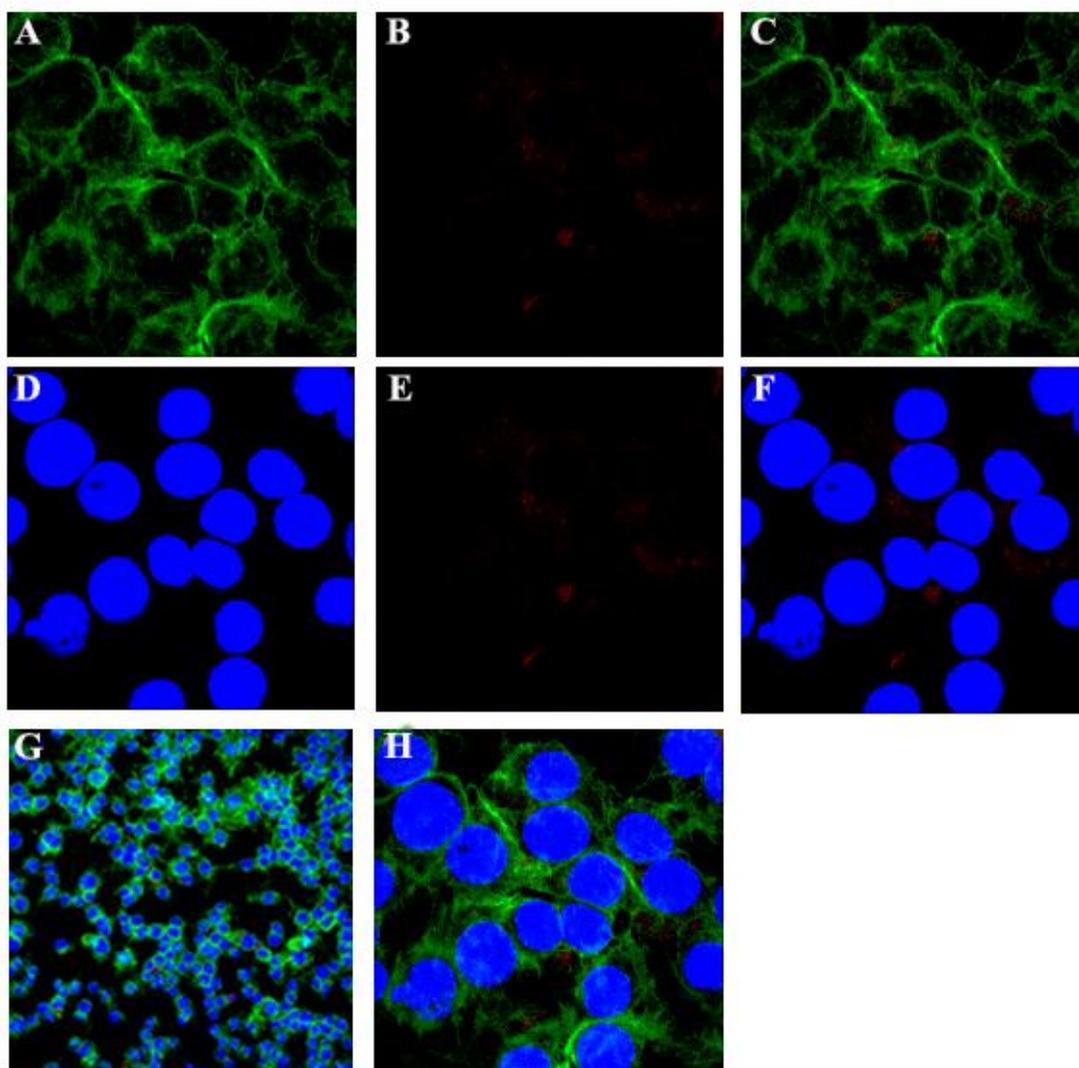


Figura 29. Dot plot e istogramma con relative tabelle di statistica dell'analisi citofluorimetrica per la cattura di EVs marcate con il colorante lipofilo DiI, da parte dei macrofagi Raw 264.7. A sinistra, dot plot con side-scatter e forward scatter per la scelta della popolazione da analizzare. A destra, sovrapposizione degli istogrammi con intensità di fluorescenza per il canale PE-A relativi al campione di riferimento (istogramma verde) ed al campione trattato per 24h con terreno di coltura condizionato con EVs isolate da mesoangioblasti A6 e marcate con il colorante lipofilo DiI (istogramma blu). In tabella, numero di eventi registrati e relativa percentuale della popolazione selezionata come positiva per la fluorescenza nel canale PE-A.

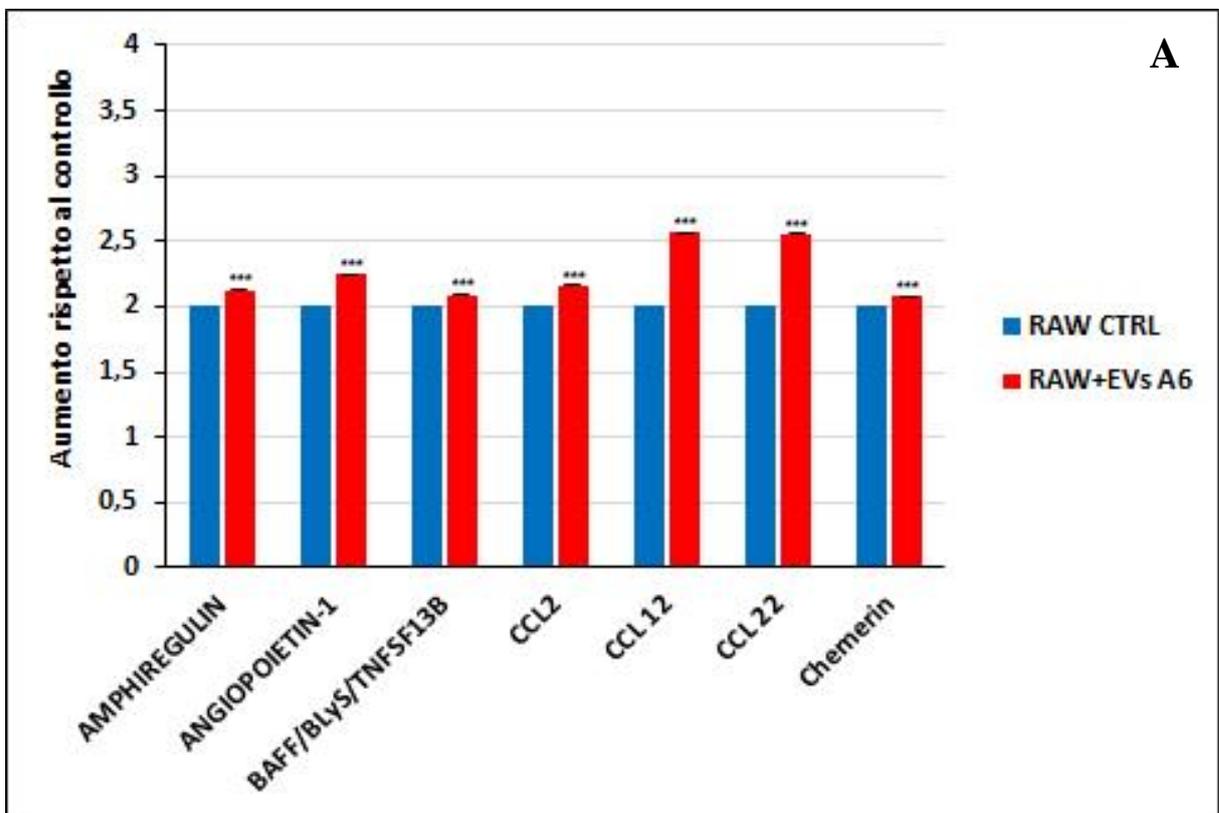


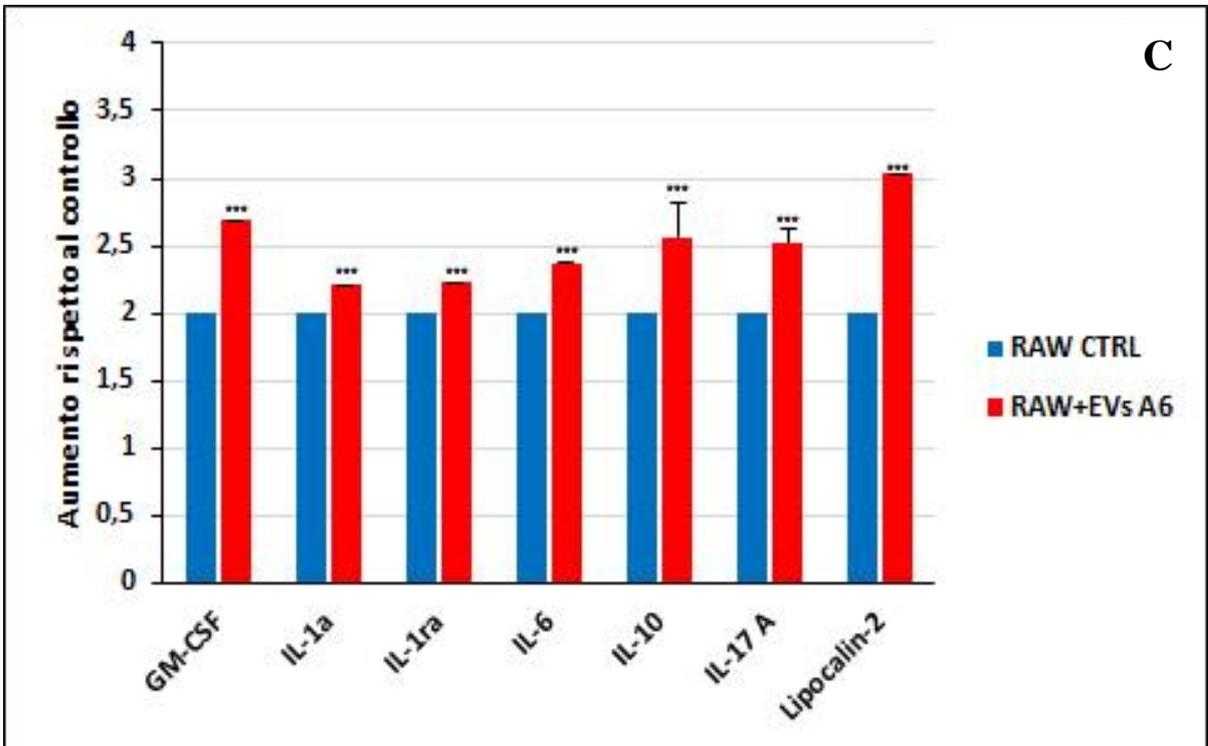
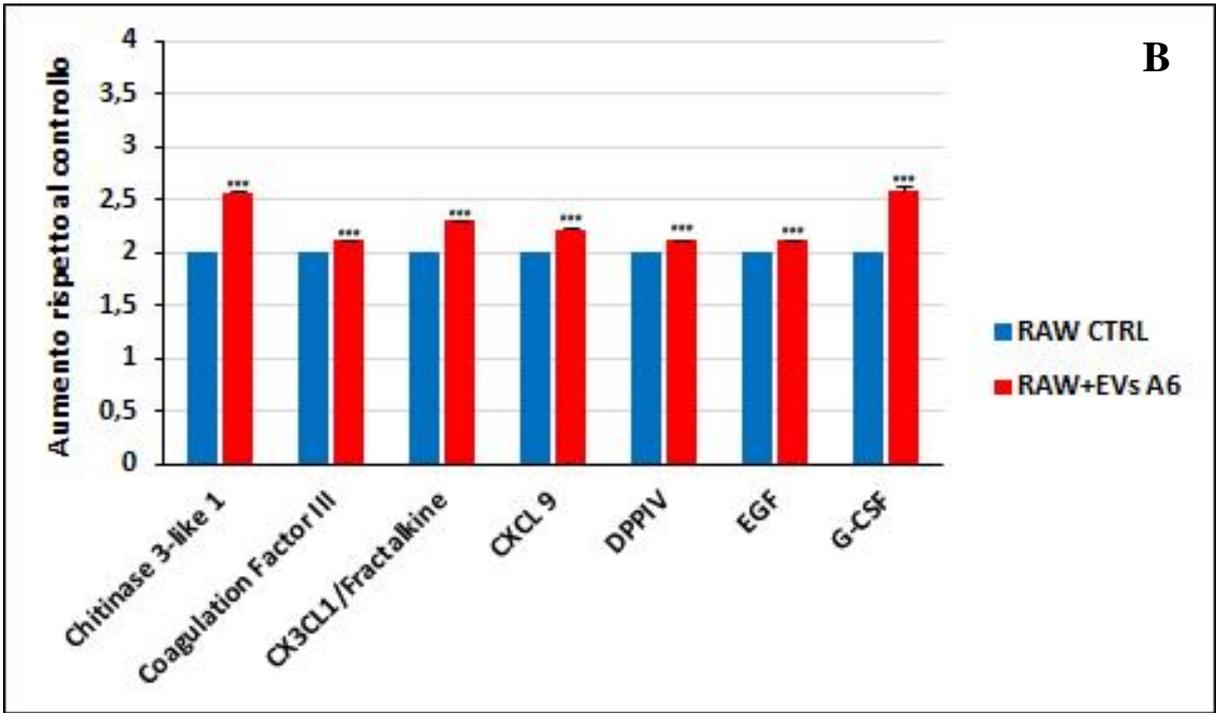
**Figura 30.** Immagini ottenute mediante microscopia confocale. I macrofagi Raw 264.7, sono stati trattati con Falloidina FITC-coniugata. A) zoom digitale di micrografia con obiettivo 40X nel canale di fluorescenza verde; B) zoom digitale di micrografia con obiettivo 40X nel canale di fluorescenza rosso; C) Merge delle micrografie A e B; D) zoom digitale di micrografia con obiettivo 40X nel canale di fluorescenza blu; F) Merge delle micrografie D ed E; G) Micrografia con obiettivo 10X; H) Merge dei canali di fluorescenza rosso, verde e blu. In verde Falloidina FITC-coniugata, in blu colorazione dei nuclei con DAPI, in rosso vescicole da mesoangioblasti A6 marcate con colorante lipofilo fluorescente DiI.

Una volta accertato che i macrofagi Raw 264.7 sono in grado di internalizzare le EVs, abbiamo quindi proceduto con l'array di citochine, al fine di valutare se le vescicole rilasciate dai mesoangioblasti sono in grado di modificare la secrezione delle citochine da parte degli stessi macrofagi.

I macrofagi Raw 264.7 sono stati trattati con DMEM completo addizionato per 24 ore con 50  $\mu$ g di EVs isolate dai mesoangioblasti A6, un secondo pozzetto è stato utilizzato come campione di riferimento aggiungendo DMEM completo, senza addizionare EVs. Il giorno

successivo i differenti mezzi di coltura sono stati rimossi e sostituiti con DMEM completo per ogni pozzetto e i macrofagi sono stati lasciati in coltura per ulteriori 24 ore di modo da permettere la secrezione di citochine. Il principio del saggio prevede l'uso di una membrana di nitrocellulosa sulla quale sono depositati in spot duplicati, 111 diversi anticorpi di cattura, ed anticorpi per le reazioni di controllo. Le membrane in questione sono state incubate con il mezzo di coltura dei macrofagi Raw264.7. In seguito al processo di ibridazione e rivelazione le membrane sono state sottoposte ad analisi quantitativa. Per ogni coppia di spot che rappresenta l'analita in duplicato è stata calcolata la media di intensità in pixel. I valori così ottenuti da ogni analita sono stati poi normalizzati rispetto al controllo e riportati in grafico (Figure 31 e 32).





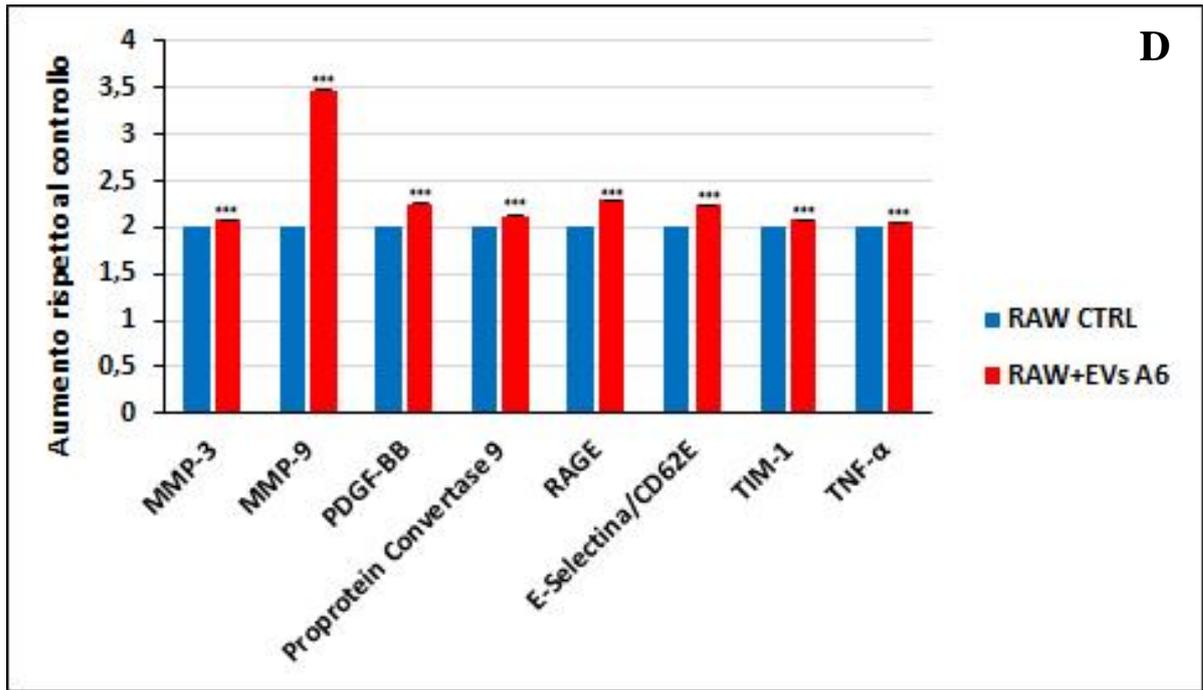
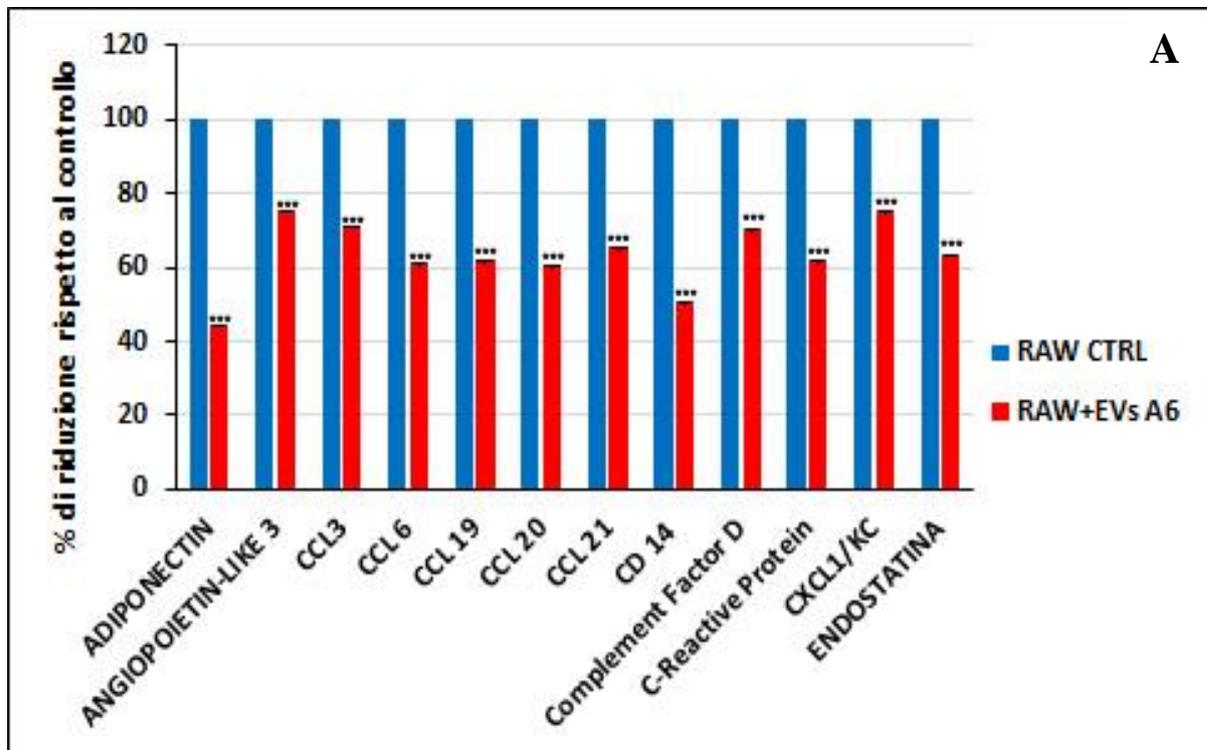
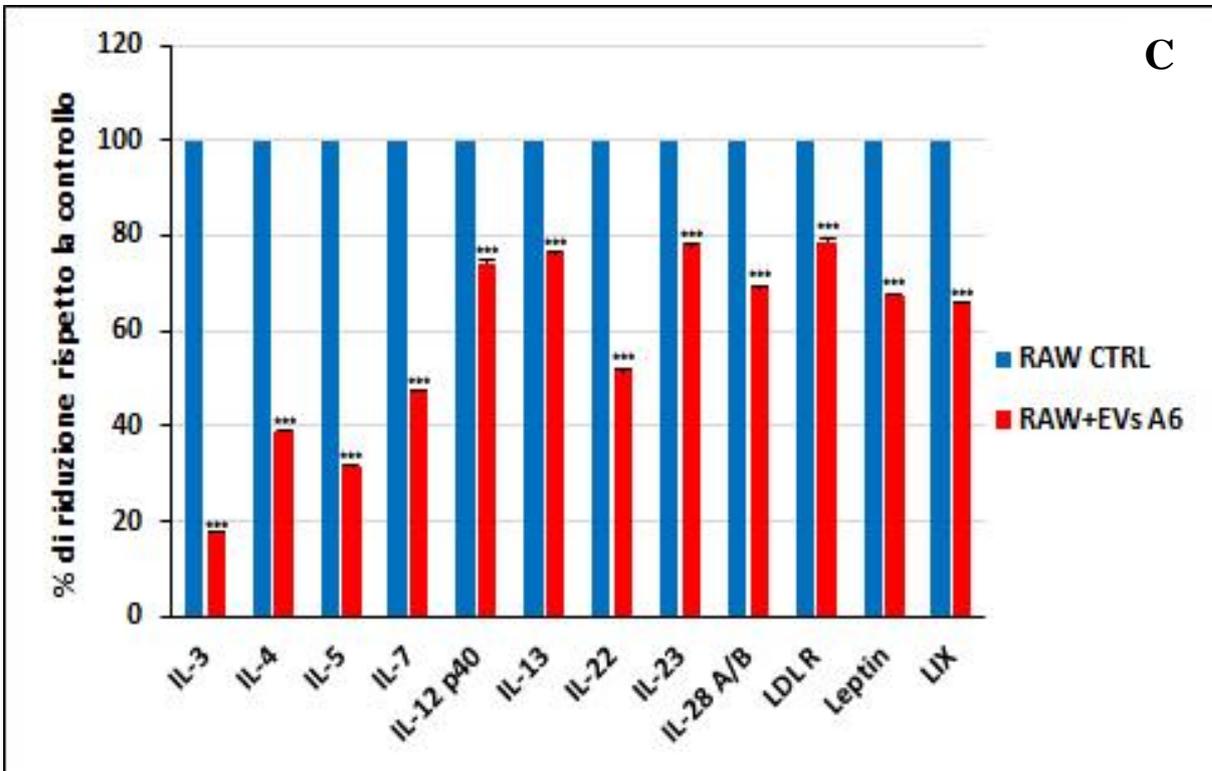
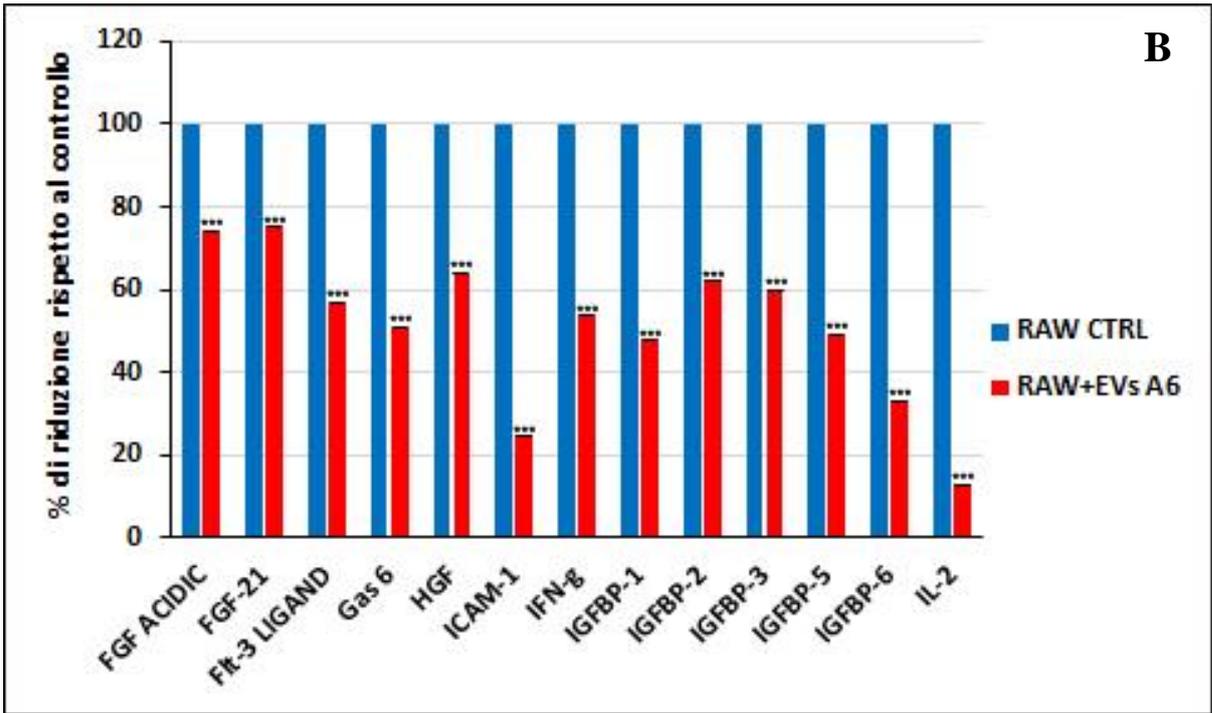


Figure 31 A-B-C-D. Istogrammi rappresentativi dell'analisi quantitativa relativa agli spot delle citochine up regolate. Per ogni coppia di spot che rappresenta l'analita in duplicato è stata calcolata la media di intensità in pixel. I valori così ottenuti sono stati normalizzati rispetto al controllo e riportati in grafico in scala logaritmica. Dall'analisi statistica tutti i campioni risultano avere un p-value  $\leq 0.0001$ .





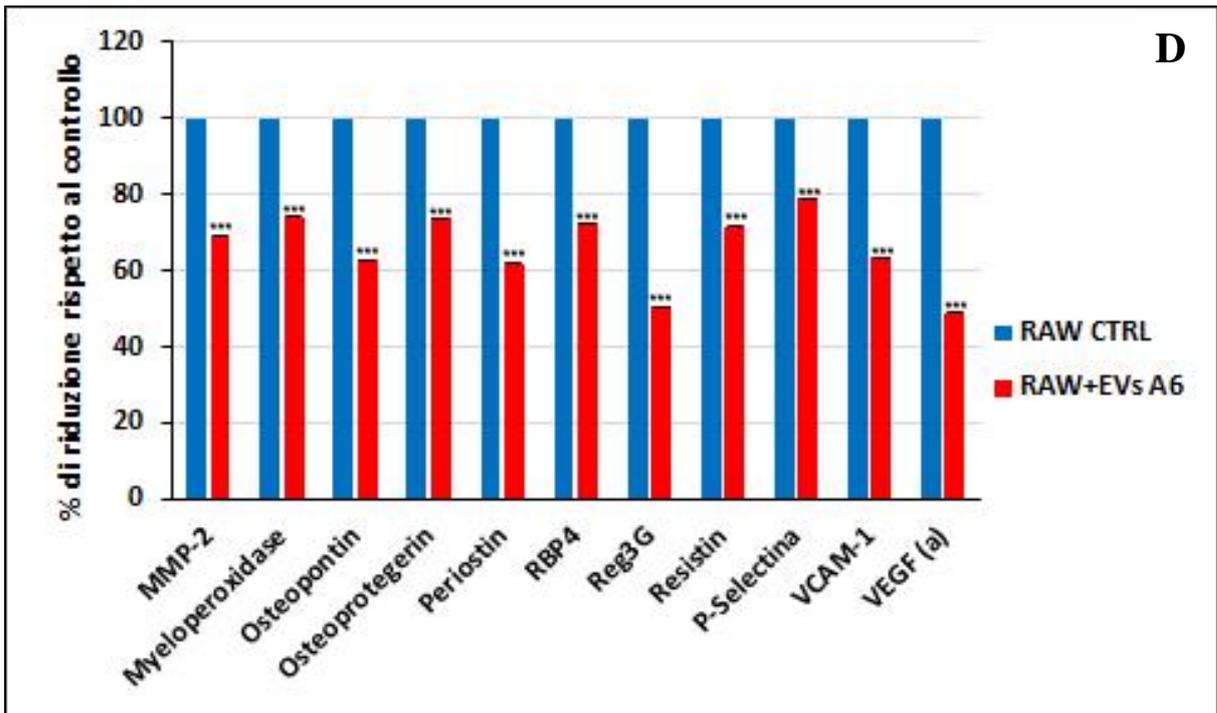


Figure 32 A-B-C-D. Istogrammi rappresentativi dell'analisi quantitativa relativa agli spot delle citochine down regolate. Per ogni coppia di spot che rappresenta l'analita in duplicato è stata calcolata la media di intensità in pixel. I valori così ottenuti sono stati normalizzati rispetto al controllo e riportati in grafico. Dall'analisi statistica tutti i campioni risultano avere un p-value  $\leq 0.0001$ .

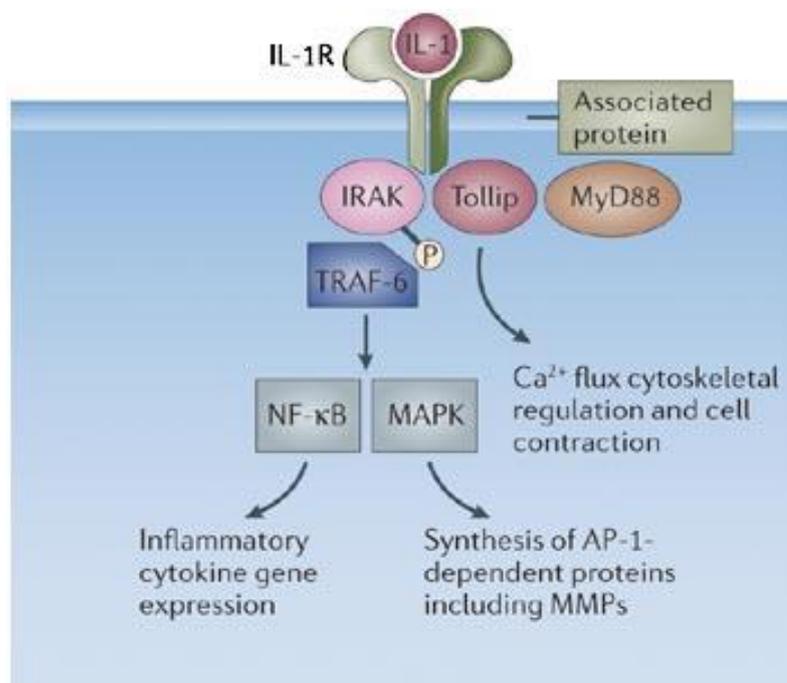
Dall'analisi dei dati riportati negli istogrammi presenti nelle pagine precedenti risulta evidente che le EVs isolate dai mesoangioblasti sono in grado di indurre considerevoli modifiche nel rilascio delle citochine da parte dei macrofagi Raw 264.7. In particolare, risulta evidente che la secrezione di alcune citochine sia maggiore rispetto ai macrofagi non trattati. Al contrario, la secrezione di altre risulta down regolata rispetto alle cellule non trattate.

Tra le citochine/chemochine la cui secrezione da parte dei macrofagi è up regolata, in seguito al trattamento con le vescicole di membrana rilasciate dalle cellule A6, si evidenziano proteine coinvolte nella migrazione/invasione cellulare, come per esempio la E selectina, proteina di membrana in grado di riconoscere i carboidrati, coinvolta nella extravasazione leucocitaria, la gelatinasi MMP9, a differenza della gelatinasi MMP2 invece downregolata, e la MMP3, responsabili della degradazione di diverse componenti della matrice, e nel caso della MMP3 implicata anche nella conversione dello zimogeno della MMP9 nella forma attiva. Risultano essere anche maggiormente secreti alcuni membri delle famiglie delle proteine chemiotattiche dei monociti (CCL), quali CCL12 e CCL22, responsabili del reclutamento di cellule del sistema immunitario nei siti di infiammazione (Gobert et al., 2009).

In seguito ad induzione con le vescicole rilasciate dai mesoangioblasti, i macrofagi Raw 264.7 aumentano anche la secrezione di fattori di crescita come GM-CSF e G-CSF. Il primo può andare ad agire sugli stessi macrofagi tramite l'attivazione di STAT3. Entrambi invece sono in grado di mobilizzare le cellule staminali del midollo osseo ed indurne l'ingresso in circolo (Lieschke et al., 1992).

Vengono anche up regolate alcune interleuchine coinvolte nello sviluppo e mantenimento di processi pro o anti-infiammatori, come ad esempio le interleuchine 1 $\alpha$ , 1Ra, 6, 10 e 17.

L'IL-1 $\alpha$  è sintetizzata *de novo* in macrofagi attivati e può essere attivamente secreta. Svolge un ruolo pro-infiammatorio e può andare ad agire come fattore di trascrizione per geni di altre citochine infiammatorie (Figura 33). L'IL-1Ra, invece, compete con lo stesso recettore delle IL-1 $\alpha$  e  $\beta$  per ridurre l'azione pro-infiammatoria indotta proprio dalle IL-1 $\alpha$  e  $\beta$  (Ben-Sasson et al., 2009; Carmi et al., 2009).

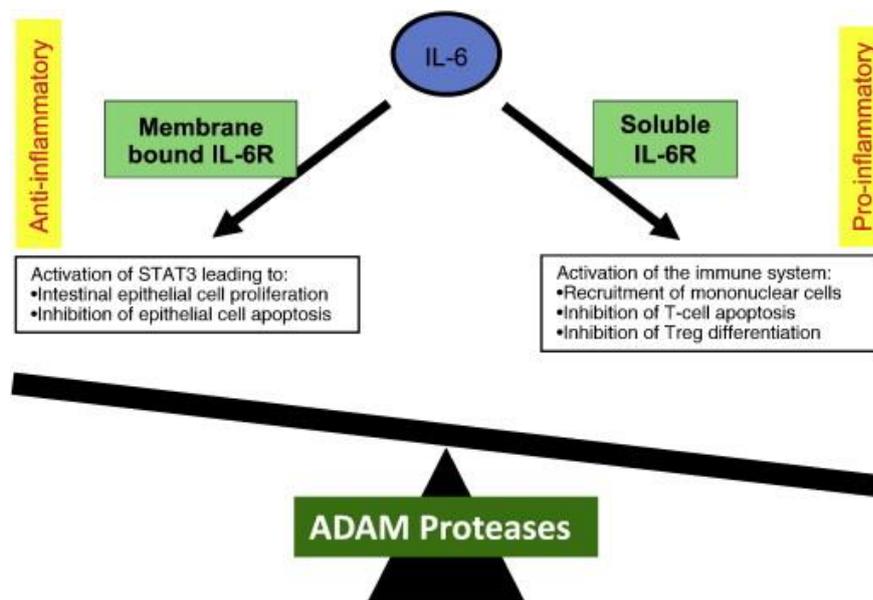


Copyright © 2006 Nature Publishing Group  
Nature Reviews | Drug Discovery

Figura 33. Schema del pathway di azione della IL-1 (McCulloch et al., 2006).

L'IL-6, anch'essa up regolata, è un'interleuchina pleiotropica in grado di svolgere funzioni sia pro sia anti-infiammatorie (Figura 34). La funzione pro-infiammatoria si manifesta quando la stessa IL-6 avvia un processo di segnalazione in *trans* tramite il recettore solubile per l'IL-6,

legando la glicoproteina 130 (gp130) che è espressa in maniera quasi ubiquitaria in tutti i tipi cellulari (Barkhausen et al., 2011). Questo si traduce in un forte richiamo per i monociti, nel mantenimento dei linfociti T-helper 17, nell'inibizione dello sviluppo dei linfociti T-regolatori e nell'inibizione dell'apoptosi dei linfociti T (Hurst et al., 2001; Scheller et al. 2011). Diversamente, la funzione anti-infiammatoria viene esercitata nel momento in cui, secondo la via classica, l'IL-6 lega il recettore di membrana, peraltro espresso da pochi citotipi, portando, tra le altre sue funzioni, alla rigenerazione e all'inibizione dell'apoptosi di cellule dell'epitelio intestinale (Matthews et al., 2010; Scheller et al. 2011).



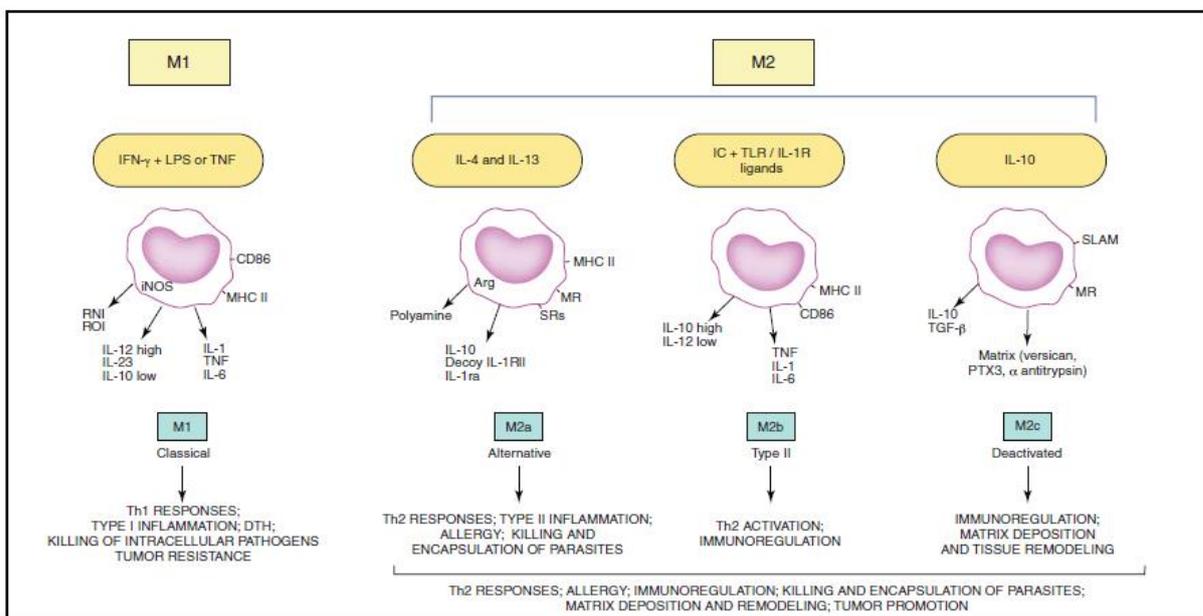
**Figura 34. Proprietà pro ed anti-infiammatorie della citochina IL-6 (Scheller et al., 2011).**

L'IL-10 è annoverata tra le citochine con funzione anti-infiammatoria e svolge la principale funzione di regolatore negativo dell'attivazione dei macrofagi e della loro produzione di  $TNF\alpha$ ,  $IL-1\beta$ ,  $IL-6$ ,  $IL-8$ ,  $IL-12$ . Inoltre, sembra avere un ruolo di potente inibitore dell'attività di presentazione dell'antigene da parte dei macrofagi attivati, attraverso l'inibizione dell'espressione di molecole MHC-II (Fiorentino et al., 1991).

L'osservazione dei risultati ottenuti mediante array di citochine mostra un profilo di secrezione sicuramente piuttosto complesso. Analizzando in maniera più approfondita la secrezione di citochine, è possibile notare come il profilo ottenuto dai macrofagi Raw 264.7,

dopo trattamento con EVs isolate dai mesoangioplasti A6, condivide punti in comuni con il profilo di secrezione che si riscontra in macrofagi classicamente e alternativamente attivati, noti rispettivamente come M1 e M2. I macrofagi di tipo M1 svolgono la loro funzione in siti infiammati con attività contro patogeni intracellulari e coadiuvano la risposta dei linfociti Th1, mentre i macrofagi di tipo M2 possono essere suddivisi in tre differenti sottotipi con attività immunoregolatoria nel promuovere la risposta e l'attivazione dei linfociti Th2 e svolgere attività antiparassitaria, o rimodellare e riparare i tessuti (Mantovani et al., 2004; Duque et al., 2014; Manabu et al., 2016).

Come è stato fatto in passato per il sistema linfocitario, anche per l'attivazione dei macrofagi è stato proposto un modello di dicotomia funzionale.



**Figura 35. Modello di dicotomia fenotipica e funzionale tra i macrofagi M1 e M2 (Martinez and Gordon, 2014).**

Il trattamento dei macrofagi Raw 264.7 con le EVs isolate dai mesoangioplasti A6 comporta, come si riscontra nei grafici in figura 31 A-B-C-D, livelli di secrezione up regolata delle chemochine CCL 2, CCL 12 e CCL 22, CXCL9, delle interleuchine IL-1 $\alpha$ , IL-1Ra, IL-6, IL-10 e del TNF- $\alpha$ . Invece, come si può osservare dai grafici in figura 32 C, risulta down regolata la secrezione delle IL-12 e IL-23. Questo può portarci a concludere che il trattamento con le EVs sembra portare ad attivazione dei macrofagi, con un profilo di secrezione che condivide punti in comune con i tipi M1 e M2, ma di certo più tendenti verso il tipo M2. Di fatto, l'aumento di secrezione di IL-10 e IL-1Ra è riscontrabile nel sottotipo alternativo M2a, la secrezione di IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  è caratteristica dei sottotipi M2b e M1, nonostante questi ultimi di norma rilascino bassi livelli di IL-10 e alti livelli di IL-12 e IL-23, la cui secrezione

dopo trattamento con le EVs risulta invece rispettivamente aumentata per quanto concerne la IL-10 e diminuita per quanto riguarda le IL-12 e IL-23.

Evidenze sperimentali hanno dimostrato una correlazione funzionale tra i macrofagi di tipo M2 e fenomeni di rigenerazione tissutale o riduzione del danno in casi di infarto al miocardio o danno renale dovuto ad ischemia e successiva ri-perfusione (Wise et al., 2014; Song et al., 2015; Manabu et al., 2016). Il fatto che le EVs isolate dai mesoangioblasti siano in grado di innescare un fenotipo M2 nei macrofagi, permette di ipotizzare un utilizzo concreto nel campo della medicina rigenerativa.

### ***Profilo Proteomico mediante Array di recettori tirosin-chinasici fosforilati***

I recettori a tirosin chinasi, RTK, sono proteine transmembrana in grado di trasdurre i segnali provenienti dall'ambiente extracellulare nel citoplasma e nel nucleo. Sono, quindi, in grado di regolare la sopravvivenza, la crescita, il differenziamento, l'adesione o la motilità cellulare. Negli ultimi anni sono notevolmente aumentati gli studi riguardo questi recettori perché un aumento della loro espressione è correlato con lo sviluppo di numerose forme tumorali; infatti sta aumentando lo studio di inibitori per le tirosin chinasi da utilizzare a scopo terapeutico (Linger et al., 2008).

Anche in questo caso è stato condotto un array per verificare, a seguito del trattamento con le EVs rilasciate dalle cellule A6, il livello di fosforilazione di un set di recettori a tirosin chinasi. Per condurre l'esperimento i macrofagi Raw 264.7 sono stati incubati con le vescicole rilasciate per 24h, e, successivamente, le cellule sono state lisate. Parallelamente è stato condotto un esperimento di riferimento piastrando i macrofagi Raw 264.7 senza aggiungere le EVs. I risultati ottenuti sono stati riportati in grafico (Figure 36 e 37).

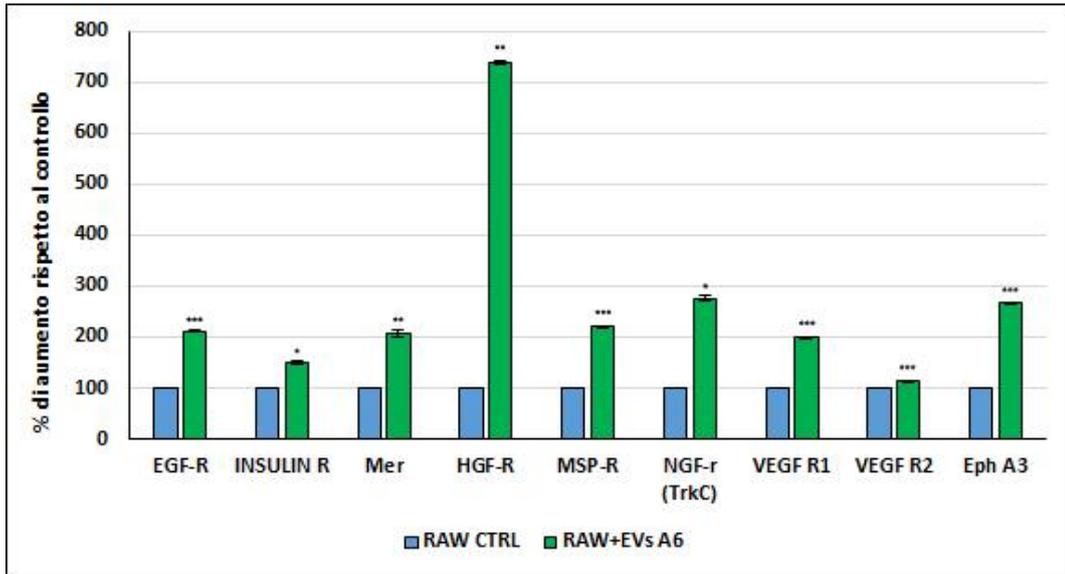
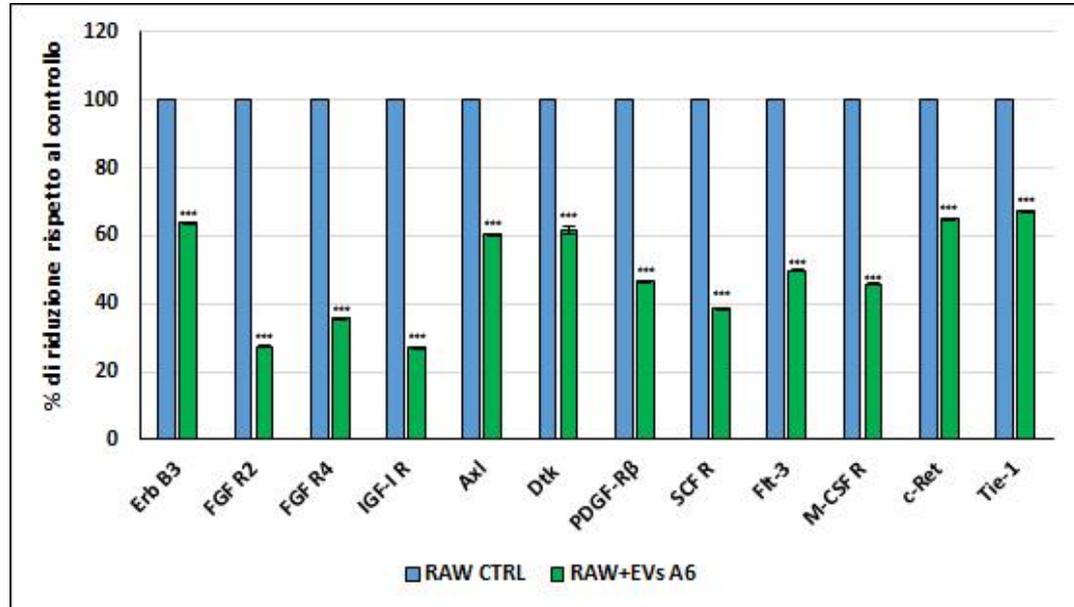


Figura 36. Istogramma rappresentativo dell'analisi quantitativa relativa agli spot dei recettori tirosin chinasi up regolati. Per ogni coppia di spot che rappresenta l'analisi in duplicato è stata calcolata la media di intensità in pixel. I valori così ottenuti sono stati normalizzati rispetto al controllo e riportati in grafico. \*\*\*=  $p \leq 0.0001$ , \*\*=  $p \leq 0.001$ , \*=  $p \leq 0.01$ .



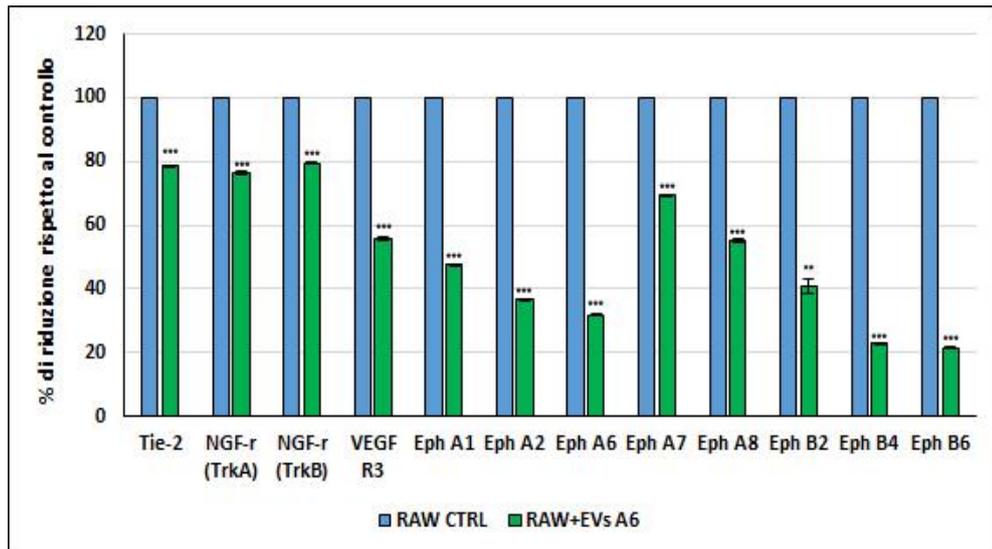


Figura 37. Istogramma rappresentativo dell'analisi quantitativa relativa agli spot dei recettori tirosin chinasi up regolati. Per ogni coppia di spot che rappresenta l'analisi in duplicato è stata calcolata la media di intensità in pixel. I valori così ottenuti sono stati normalizzati rispetto al controllo e riportati in grafico. \*\*\*=  $p \leq 0.0001$ , \*\*=  $p \leq 0.001$ , \*=  $p \leq 0.01$ .

Dall'analisi dei dati appare evidente che alcuni recettori risultano up fosforilati ed altri, invece, mostrano dei livelli di fosforilazione inferiori al controllo. In modo particolare, tra i recettori che mostrano livelli di fosforilazione maggiori rispetto al controllo (Figura 36) si evidenzia HGF-R, recettore del fattore di crescita degli epatociti, in grado di regolare la crescita cellulare, la motilità e la morfogenesi in numerosi tipi di cellule e tessuti (Bussolino et al., 1992), inoltre, sembra essere responsabile per la secrezione di citochine anti-infiammatorie da parte dei macrofagi (Kusunoki et al., 2014). Il pathway di HGF è associato con quelli di altri recettori correlati con la proliferazione cellulare (Figura 38), tra questi abbiamo VEGF-R1, VEGF-R2 ed EGF-R1 che risultano anch'essi up fosforilati.

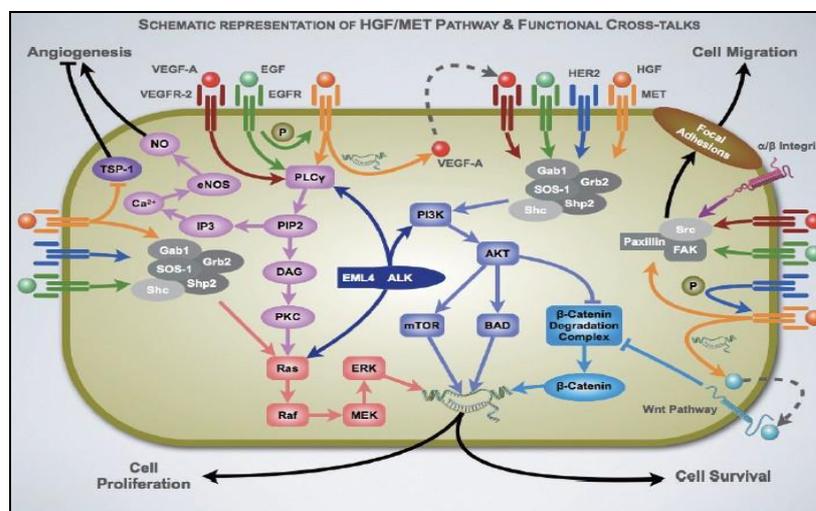
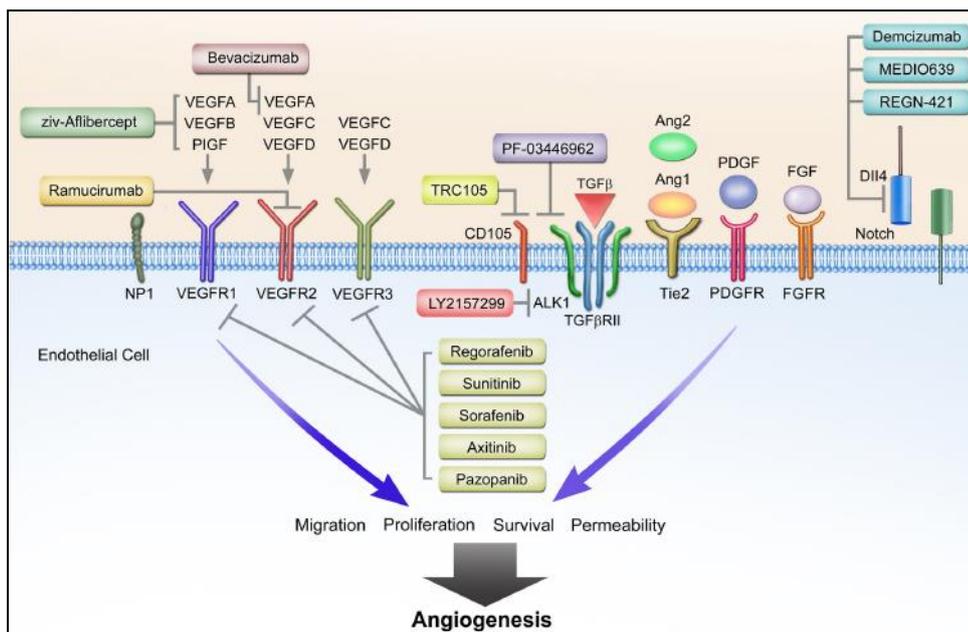


Figura 38. Rappresentazione schematica del pathway di HGF e crosstalk con altri pathway (Raghav et al., 2012).

Anche il recettore per la proteina stimolante i macrofagi (MSP-R) rientra tra i recettori con un livello di fosforilazione maggiore rispetto al controllo. Questo recettore svolge la sua funzione promuovendo l'attività fagocitica e la chemiotassi dei macrofagi guidata dalle proteine del complemento (Skeel et al., 1991).

EPH-A3 risulta essere l'unico dei recettori della famiglia Ephrin la cui fosforilazione è positivamente regolata dal trattamento con le microvescicole isolate dai mesoangioblasti. Stephen e colleghi hanno dimostrato che questo recettore svolge una funzione critica nello sviluppo cardiaco, mostrando che il knockout di questo recettore porta ad anomalie nella formazione dei setti e delle valvole atrio-ventricolari (Stephen et al., 2007).

Tra i recettori che invece mostrano livelli di fosforilazione minori rispetto al controllo troviamo i recettori Tie-1 e Tie-2, recettori delle angiopoietine, i recettori per il fattore di crescita dei fibroblasti FGF-R, il recettore PDGF, fattore di crescita derivato dalle piastrine, tutti attivamente coinvolti nell'angiogenesi (Figura 39).



**Figura 39. Recettori coinvolti in processi di angiogenesi (Clarke et al., 2013).**

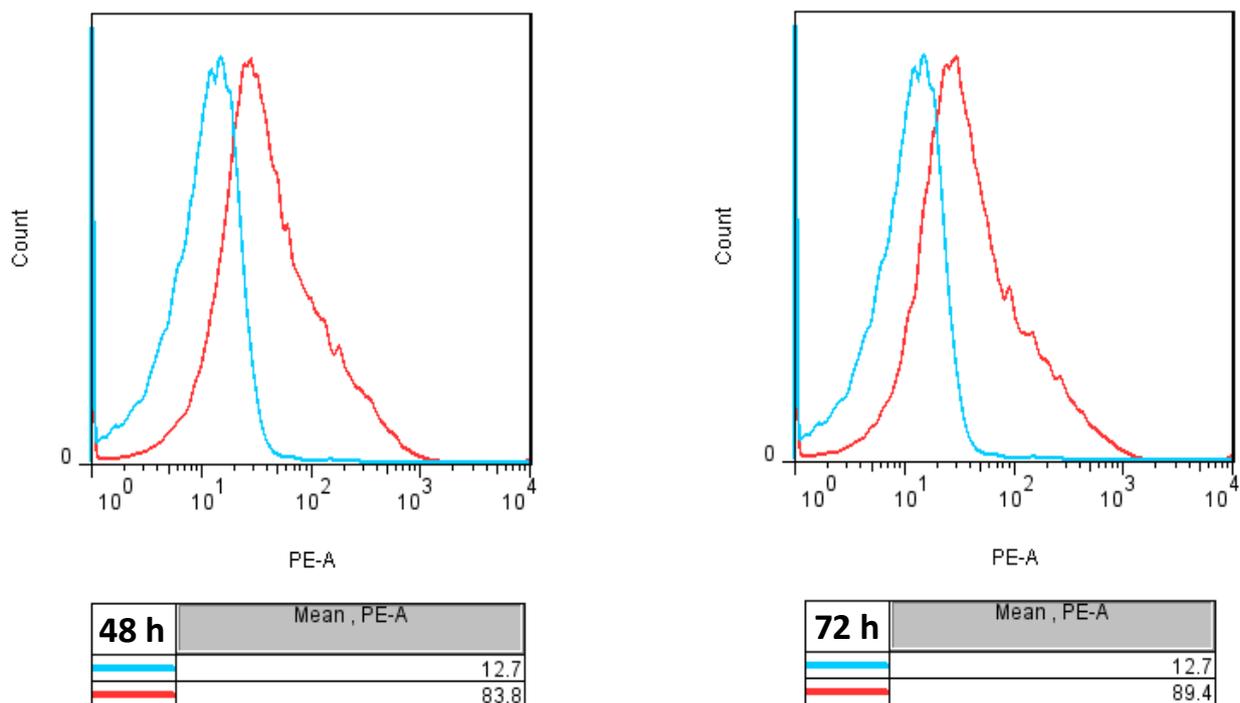
## *Valutazione dell'attività immunomodulatoria delle EVs*

Dati di letteratura hanno mostrato che le EVs isolate da diverse sorgenti cellulari sono in grado di sortire un effetto su cellule del sistema immunitario sebbene i risultati fino ad oggi ottenuti non risultino essere sempre concordi.

Thèry e colleghi hanno dimostrato che esosomi derivati da cellule dendritiche sono in grado di causare l'attivazione indiretta di linfociti nativi CD4<sup>+</sup> (Thèry et al., 2002). Diversamente, è stato dimostrato che esosomi derivati da cellule staminali di tessuto adiposo umano esercitano un effetto inibitorio sull'attivazione e sul differenziamento di linfociti CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, così come sulla proliferazione ed il rilascio di IFN $\gamma$  (Blazquez et al., 2014). Di Trapani e colleghi, hanno recentemente dimostrato che le vescicole extracellulari isolate da cellule mesenchimali stromali non sono in grado di inibire la proliferazione di cellule mononucleate isolate da sangue periferico, precedentemente stimulate con la leucoagglutinina PHA-L. Le stesse vescicole extracellulari non hanno alcun effetto sulla proliferazione di popolazioni pure di linfociti T, mentre riescono ad inibire la proliferazione di linfociti B e NK, in special modo se questi vengono precedentemente sottoposti a stimolo infiammatorio (Di Trapani et al., 2016). Tenendo in considerazione l'effetto che le EVs isolate dai mesoangioblasti sortiscono sui macrofagi, causando attivazione degli stessi verso un fenotipo M2-like, il passo successivo è stato quello di valutare una loro possibile attività immunomodulatoria diretta o indiretta.

A questo scopo abbiamo usato la linea Jurkat di linfociti CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>, condizionando il mezzo di coltura con 50  $\mu$ g di EVs, oppure mantenendole in mezzo di coltura proveniente da macrofagi Raw 264.7 trattati o meno per 24h con 50  $\mu$ g di EVs isolate dai mesoangioblasti A6. Parallelamente sono stati condotti esperimenti di controllo con cellule Jurkat trattate o non trattate con con la leucoagglutinina PHA-L.

Prima di procedere con la valutazione di una possibile attivazione dei linfociti da parte delle EVs, abbiamo verificato se gli stessi linfociti fossero effettivamente in grado di interagire con le vescicole extracellulari dei mesoangioblasti, utilizzando vescicole marcate con il colorante lipofilo fluorescente DiI. Come è possibile notare dagli istogrammi riportati in figura 40, le cellule Jurkat sono in grado di interagire con le vescicole dei mesoangioblasti, mostrando, rispetto alle cellule non trattate, un aumento dell'intensità della fluorescenza nel canale PE-A, sia dopo 48, sia dopo 72h di trattamento.



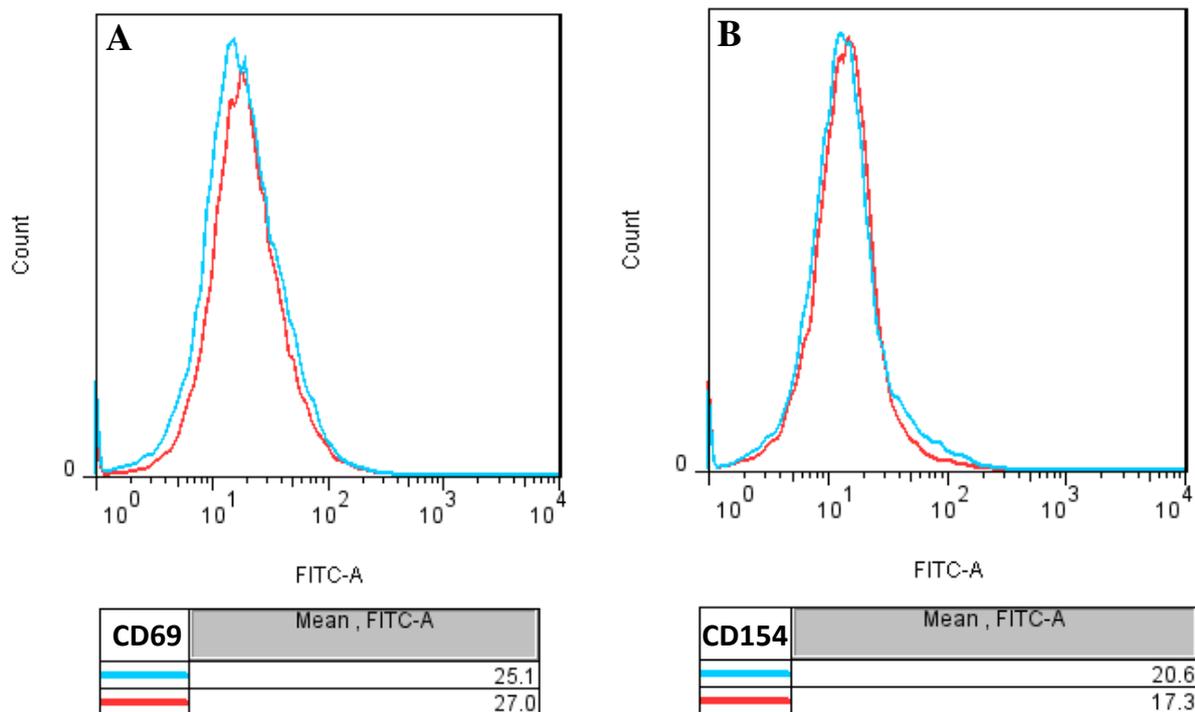
**Figura 40. Istogrammi relativi all'analisi citofluorimetrica dell'intensità di fluorescenza nel canale PE-A, per valutare, dopo 48 o 72h, l'interazione delle cellule Jurkat con vescicole extracellulari di mesoangioblasti A6 marcate con il colorante lipofilo fluorescente DiI. In blu istogrammi relativi al controllo, costituito da cellule Jurkat non trattate con vescicole. In rosso istogrammi relativi a cellule Jurkat trattate per 48 o 72h con vescicole extracellulari marcate con DiI.**

Una volta constatato che le vescicole dei mesoangioblasti sono in grado di interagire con le cellule Jurkat, abbiamo quindi proceduto con la valutazione del loro possibile effetto immunomodulatorio. Per far questo, abbiamo preso in considerazione l'utilizzo dei differenti marcatori di attivazione linfocitaria elencati in figura 42. Si tratta di molecole proteiche di superficie, di natura recettoriale o con attività co-stimolatoria, la cui espressione è upregolata, e con livelli di espressione massimi generalmente rilevabili entro le prime 72-96h, in caso di attivazione dei linfociti (Caruso et al.,1997; Shipkova et Wieland, 2011; Levring et al., 2012).

CD number	Alternate name	Expression	Function
CD 25	Interleukin 2 receptor, alpha chain, IL2RA	Activated T cells, B cells, monocytes/macrophages	The interleukin 2 (IL2) receptor alpha (IL2RA) and beta (IL2RB) chains, together with the common gamma chain (IL2RG), constitute the high-affinity IL2 receptor.
CD 26	Dipeptidyl peptidase IV, EC 3.4.14.5	Mature thymocytes, activated T cells, B cells NK cells, macrophages, renal and small intestinal epithelium, biliary canaliculae, and splenic sinus lining cells etc.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Dipeptidyl peptidase IV activity. Regulates various physiological processes by cleaving peptides (chemokines, mitogenic growth factors, neuropeptides, peptide hormones) in the circulation.</li> <li>- Co-stimulatory molecule in T cell activation. Involved in induction of T cell proliferation and NF-kappa-B activation in a T cell receptor/CD3-dependent manner.</li> <li>- Binds adenosine deaminase (ADA) thus regulating lymphocyte-epithelial cell adhesion.</li> <li>- Involved in the pericellular proteolysis of the extracellular matrix (ECM), the migration and invasion of endothelial cells into the ECM.</li> </ul>
CD 69	Early activation antigen CD69	Activated T cells, B-cells, NK cells, neutrophils, eosinophils, epidermal Langerhans cells and platelets	Appears to be the earliest inducible cell surface glycoprotein acquired during lymphoid activation. Involved in lymphocyte proliferation and functions as a signal-transmitting receptor in lymphocytes, natural killer (NK) cells, and platelets.
CD 154	CD40 ligand	Predominantly on mature, activated CD4+ T cells, but also in a small population of activated CD8+ T cells, platelets, mast cells, macrophages, basophils, NK cells, B lymphocytes, smooth muscle cells.	Co-stimulatory molecule involved in antigen-presenting cell (APC) activation, CD4+ and CD8+ T cell priming, and effector T cell maturation. Regulates B cell function by engaging CD40 on the B cell surface.

DC = Dendritic Cells; NK = Natural Killer. Data sources: <http://prowww.nci.nih.gov/>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>; <http://expasy.org/sprot/>.

**Figura 41. Elenco dei marcatori di attivazione linfocitaria oggetto di studio. (Shipkova et Wieland, 2011)**



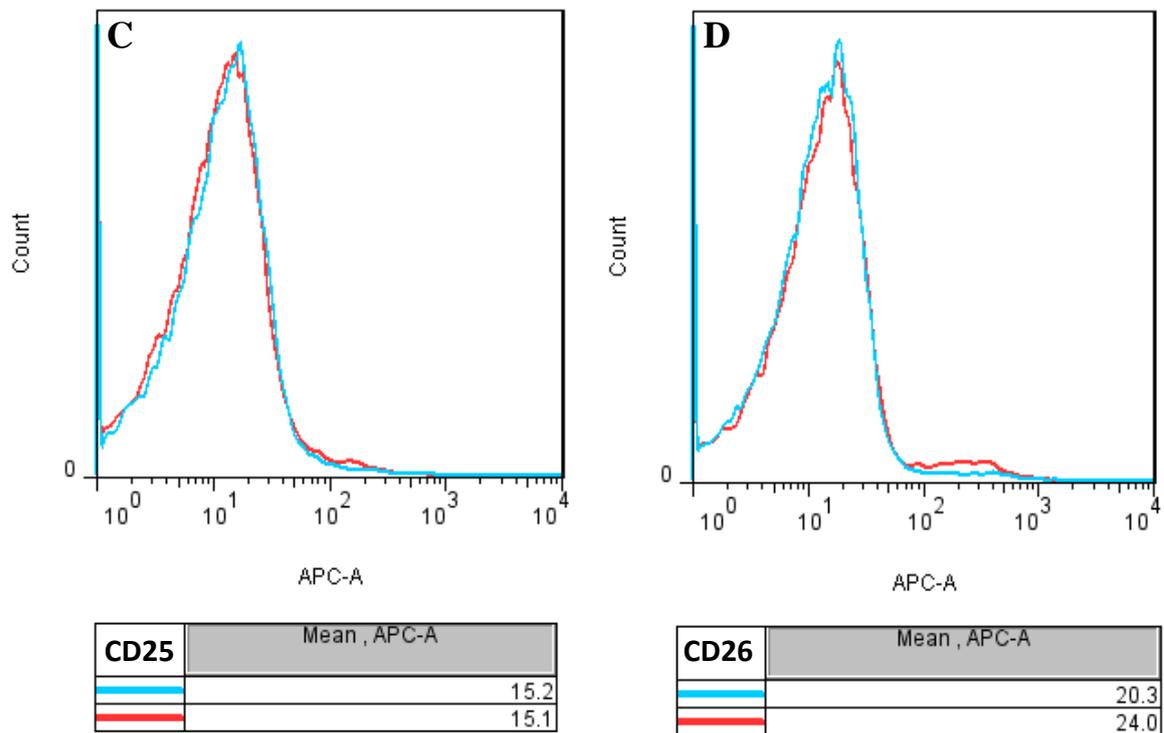
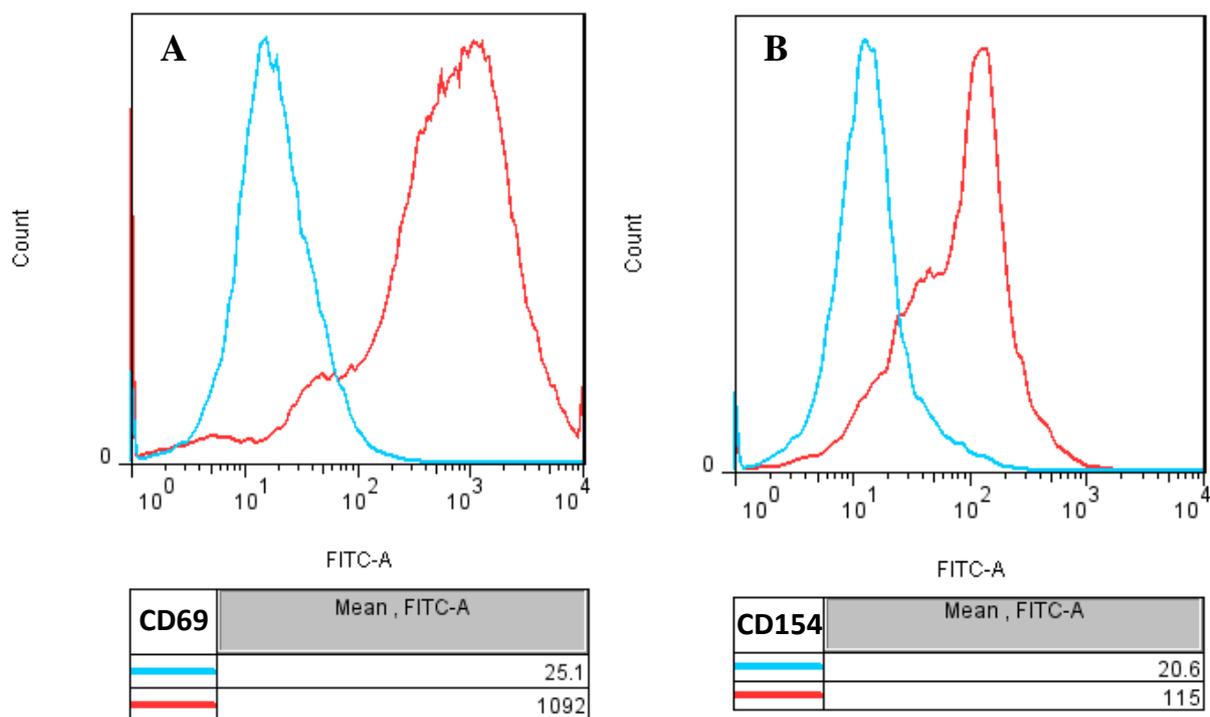


Figura 42. Istogrammi relativi all'analisi citofluorimetrica dell'intensità di fluorescenza nel canale FITC o APC-A, per valutare, dopo 48 o 72h, l'attivazione delle cellule Jurkat mediante trattamento diretto con vescicole extracellulari di mesoangioblasti A6. In blu istogrammi relativi al controllo, costituito da cellule Jurkat non trattate con vescicole. In rosso istogrammi relativi a cellule Jurkat trattate per 48 o 72h con vescicole extracellulari. A) Analisi citofluorimetrica per il marcatore CD69, effettuata dopo 48h di trattamento. B-C-D) Analisi citofluorimetrica per i marcatori CD154, CD25 e CD26 rispettivamente, effettuata dopo 72h di trattamento.



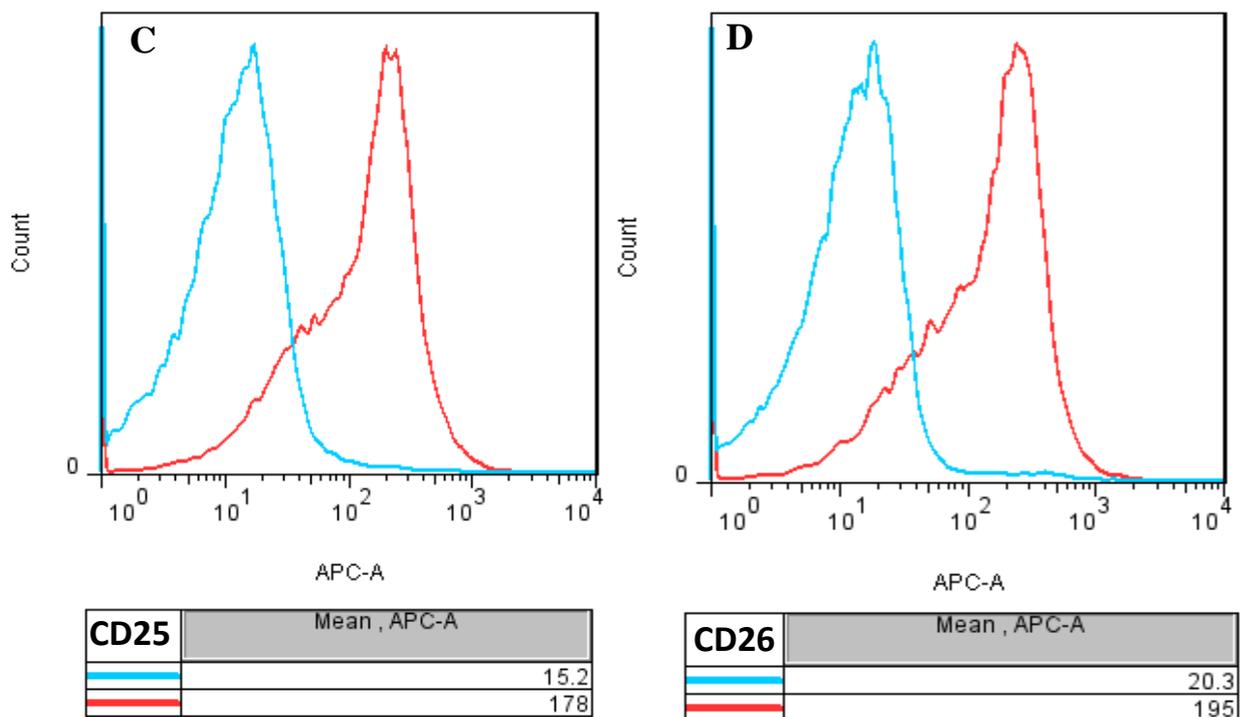
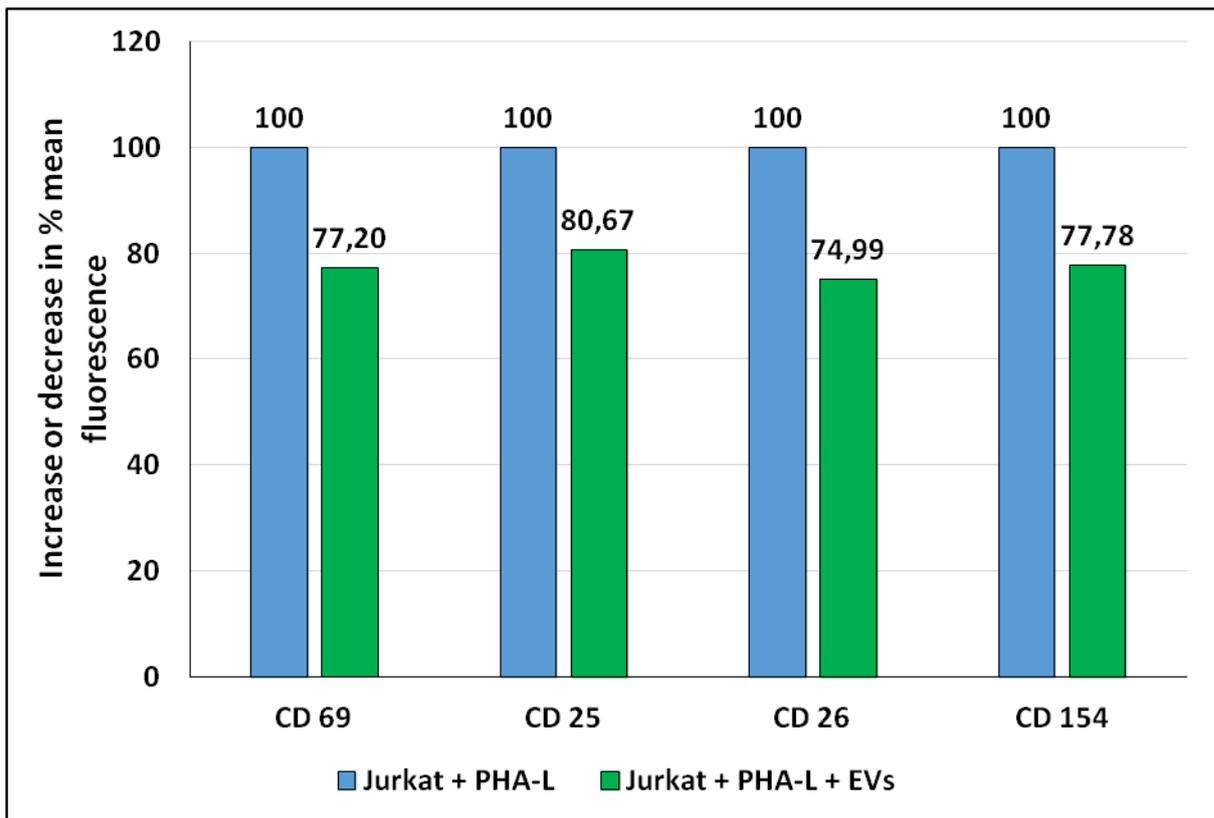


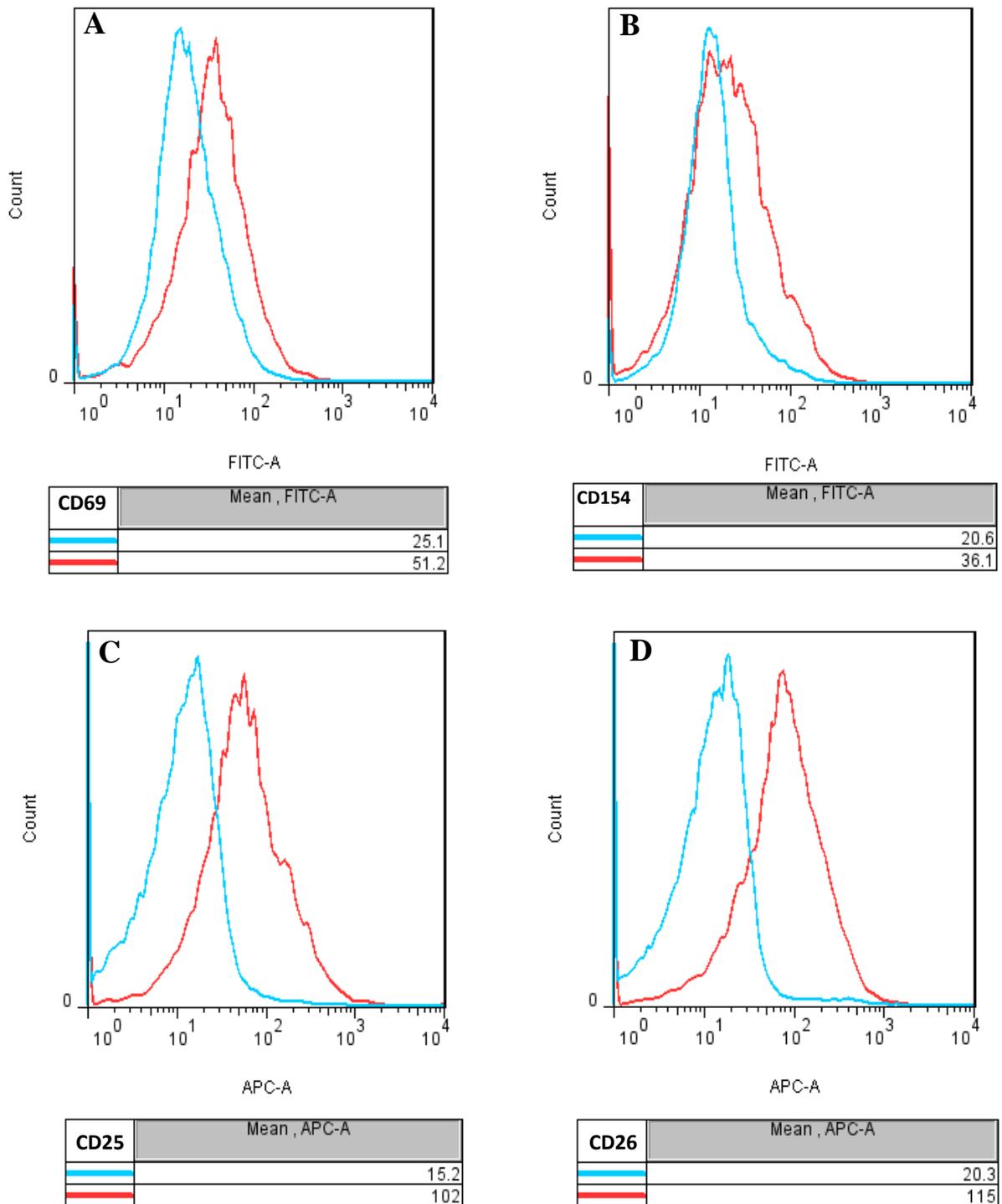
Figura 43. Istogrammi relativi all'analisi citofluorimetrica dell'intensità di fluorescenza nel canale FITC o APC-A, per valutare, dopo 48 o 72h, l'attivazione delle cellule Jurkat mediante trattamento con 5  $\mu\text{g/ml}$  della leucoagglutinina PHA-L. In blu istogrammi relativi al controllo, costituito da cellule Jurkat non trattate. In rosso istogrammi relativi a cellule Jurkat trattate per 48 o 72h con PHA-L. A) Analisi citofluorimetrica per il marcatore CD69, effettuata dopo 48h di trattamento. B-C-D) Analisi citofluorimetrica per i marcatori CD154, CD25 e CD26, effettuata dopo 72h di trattamento.

Dall'analisi degli istogrammi riportati in figura 42 A-D, il trattamento diretto delle cellule Jurkat con 50  $\mu\text{g/ml}$  di vescicole extracellulari isolate dai mesoangioblasti, per 48 o 72h, non induce alcun tipo di attivazione dei linfociti. Di fatto, per nessuno dei marcatori si assiste ad un aumento dell'intensità di fluorescenza nel canale FITC o APC, rispetto al campione di riferimento non sottoposto ad alcun trattamento. Il risultato appare ancor più evidente se si osservano gli istogrammi della figura 43 A-D, che mostrano come l'attivazione dei linfociti indotta dal trattamento con la leucoagglutinina PHA-L per 48 o 72h, comporti un significativo aumento dei segnali di fluorescenza per tutti e quattro i marcatori oggetto di studio; rispettivamente, CD69 in figura 43 A, CD154 in figura 43 B, CD25 in figura 43 C e CD26 in figura 43 D. Ci siamo quindi chiesti se l'uso diretto delle EVs fosse invece in grado di inibire l'attivazione dei linfociti. A questo scopo abbiamo stimolato con 1.5  $\mu\text{g/ml}$  di leucoagglutinina PHA-L, linfociti trattati o non trattati con 50  $\mu\text{g/ml}$  di vescicole extracellulari isolate dai mesoangioblasti.

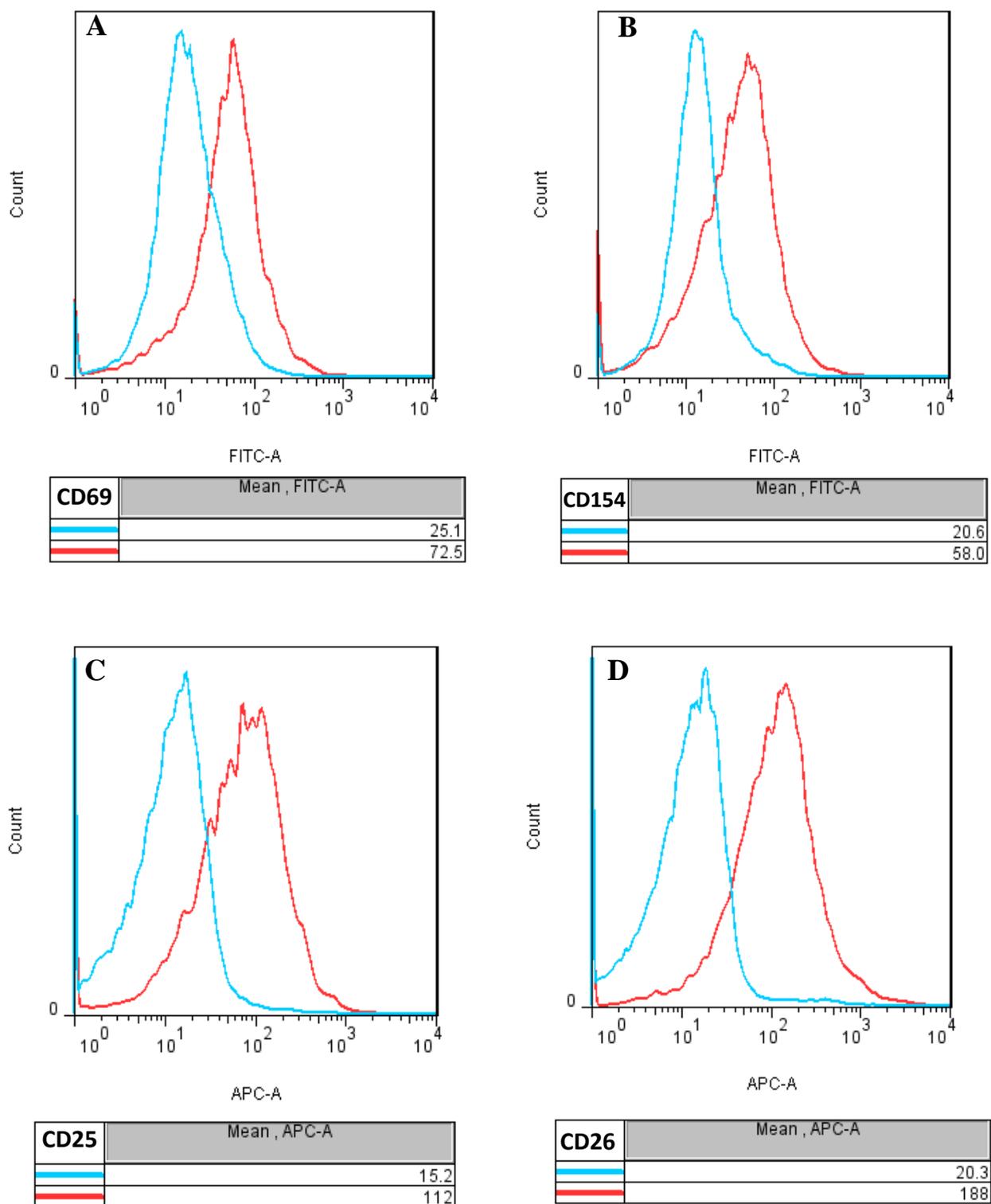


**Figura 44.** Istogrammi relativi alla variazione percentuale dell'intensità di fluorescenza nel canale FITC o APC degli esperimenti di citofluorimetria per valutare la possibile attività inibitoria delle vescicole extracellulari su linfociti stimolati con la leucoagglutinina PHA-L. In blu istogrammi relativi ai livelli di fluorescenza ottenuti per ogni marcatore, stimolando i linfociti con PHA-L. In verde istogrammi relativi ai livelli di fluorescenza ottenuti per i differenti marcatori, stimolando i linfociti con PHA-L e condizionando il mezzo di coltura con 50 µg/ml di vescicole. I valori di fluorescenza ottenuti dopo stimolazione con PHA-L e aggiunta di EVs sono stati normalizzati rispetto ai valori ottenuti dopo stimolazione con la sola PHA-L, arbitrariamente impostati a 100.

Come si evince dal grafico ad istogrammi riportato in figura 44, l'aggiunta delle EVs al mezzo di coltura di linfociti stimolati con PHA-L, comporta la riduzione dei livelli di fluorescenza rilevati rispetto a quelli ottenuti quando i linfociti vengono stimolati con la leucoagglutinina in assenza di EVs. Constatato che il trattamento diretto dei linfociti con le vescicole derivate dai mesoangioblasti non induce alcun tipo di attivazione, anzi sortisce un effetto inibitorio, abbiamo infine voluto valutare se le vescicole fossero in grado di causare l'attivazione dei linfociti per via indiretta. A questo scopo abbiamo mantenuto i linfociti in coltura per 48 o 72h, in mezzo di coltura proveniente da macrofagi Raw 264.7 trattati o non trattati per 24h con 50 µg/ml di EVs isolate dalle cellule A6.



**Figura 45.** Istogrammi relativi all'analisi citofluorimetrica dell'intensità di fluorescenza nel canale FITC o APC, per valutare, dopo 48 o 72h, l'attivazione delle cellule Jurkat mediante trattamento con mezzo di coltura proveniente da macrofagi non trattati con vescicole. In blu istogrammi relativi al controllo, costituito da cellule Jurkat in terreno di coltura originale. In rosso istogrammi relativi a cellule Jurkat trattate con mezzo di coltura proveniente da macrofagi non trattati con vescicole. A) Analisi citofluorimetrica per il marcatore CD69, effettuata dopo 48h di trattamento. B-C-D) Analisi citofluorimetrica per i marcatori CD154, CD25 e CD26, effettuata dopo 72h di trattamento.



**Figura 46.** Istogrammi relativi all'analisi citofluorimetrica dell'intensità di fluorescenza nel canale FITC o APC, per valutare, dopo 48 o 72h, l'attivazione delle cellule Jurkat mediante trattamento con mezzo di coltura proveniente da macrofagi trattati con 50 µg/ml di vescicole. In blu istogrammi relativi al controllo, costituito da cellule Jurkat in terreno di coltura originale. In rosso istogrammi relativi a cellule Jurkat trattate con mezzo di coltura proveniente da macrofagi trattati con 50 µg/ml di vescicole. A) Analisi citofluorimetrica per il marcatore CD69, effettuata dopo 48h di trattamento. B-C-D) Analisi citofluorimetrica per i marcatori CD154, CD25 e CD26, effettuata dopo 72h di trattamento.

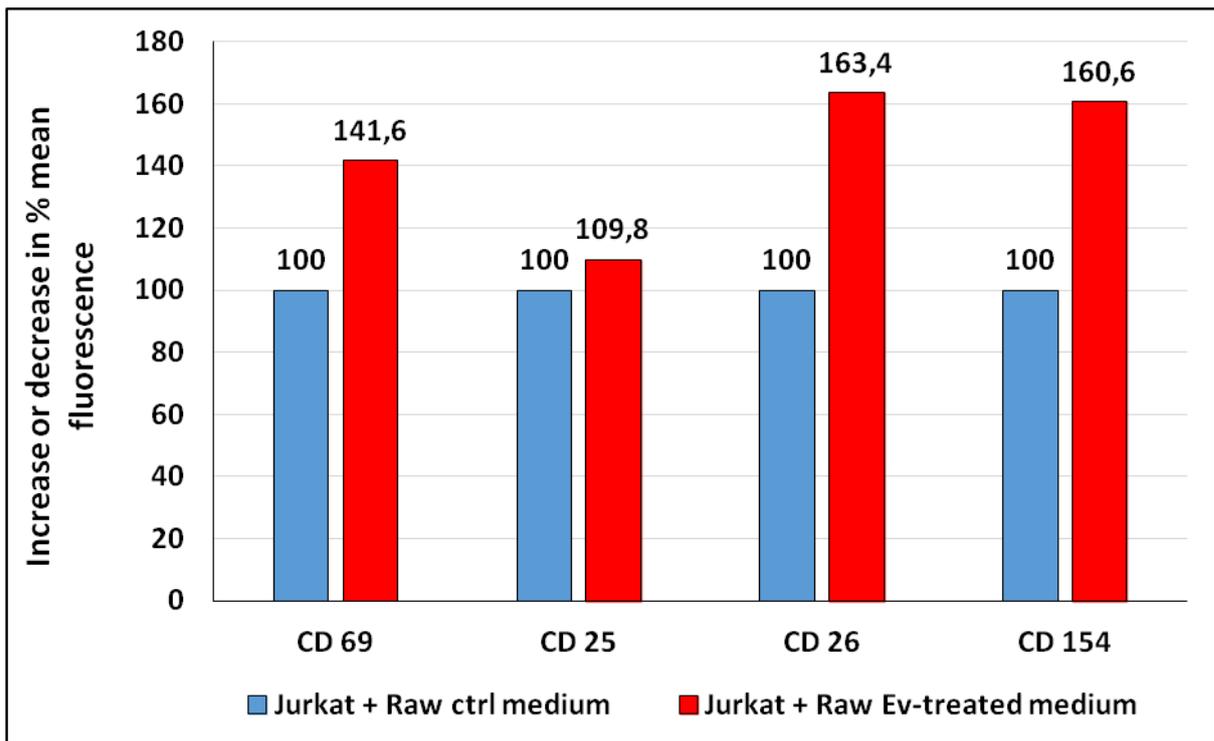


Figura 47. Istogrammi relativi alla variazione percentuale dell'intensità di fluorescenza nel canale FITC o APC degli esperimenti di citofluorimetria per l'attivazione delle cellule Jurkat mediante trattamento con mezzo di coltura proveniente da macrofagi trattati o non trattati con 50 µg/ml di vescicole. In blu istogrammi relativi ai livelli di fluorescenza ottenuti per i differenti marcatori, mantenendo le Jurkat in mezzo di coltura proveniente da macrofagi non trattati. In rosso istogrammi relativi ai livelli di fluorescenza ottenuti per i differenti marcatori, mantenendo le Jurkat in mezzo di coltura proveniente da macrofagi trattati con 50 µg/ml di vescicole. I valori di fluorescenza ottenuti dalle Jurkat in mezzo di coltura proveniente da macrofagi trattati con 50 µg/ml di vescicole sono stati normalizzati rispetto ai valori ottenuti dalle Jurkat in mezzo di coltura proveniente da macrofagi non trattati, arbitrariamente impostati a 100.

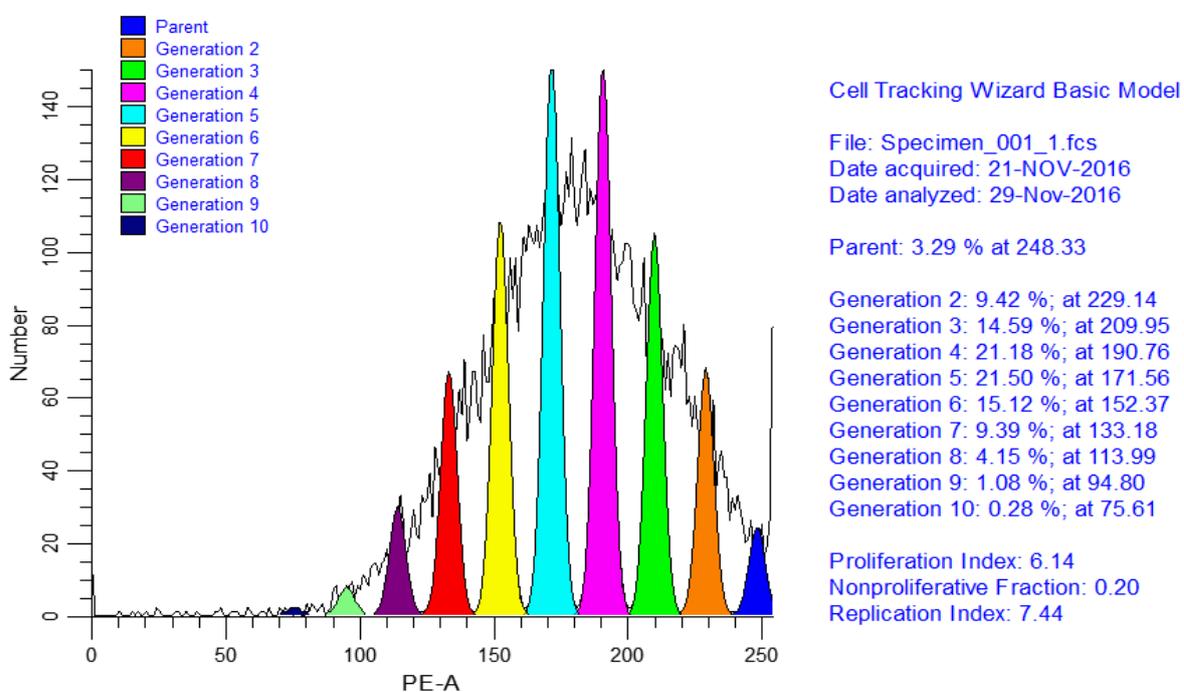
Gli istogrammi A-D rappresentati in figura 45 e 46 mostrano come l'incubazione dei linfociti con terreno di coltura derivato da macrofagi Raw 264.7 trattati o non trattati con 50 µg/ml di EVs isolate dai mesoangioblasti, sia in grado di causare l'attivazione dei linfociti e il conseguente aumento della fluorescenza per i marcatori oggetto dell'investigazione. Tuttavia, dall'interpretazione dei dati riportati in figura 47, appare evidente che l'incubazione dei linfociti con il mezzo di coltura derivato dai macrofagi trattati con le vescicole extracellulari, comporti un maggiore livello di attivazione dei linfociti se paragonato ai livelli di attivazione ottenuti dal trattamento con mezzo di coltura di macrofagi non trattati. Come si può osservare la variazione positiva in termini percentuali appare più netta per i marcatori CD69, CD26 e CD154, ed in misura minore per CD25.

Alla luce dei risultati ottenuti, possiamo concludere asserendo che il trattamento diretto di linfociti con le vescicole extracellulari, comporta un fenomeno inibitorio dell'attivazione linfocitaria. Diversamente, per via indiretta, sembra che le vescicole siano in grado di

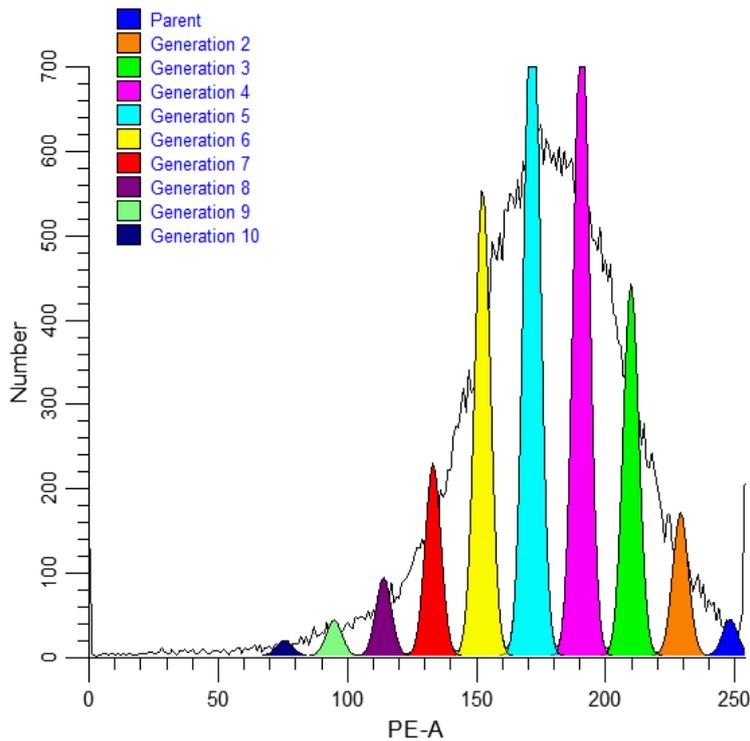
potenziare l'effetto stimolante già osservato dopo il trattamento dei linfociti con mezzo di coltura derivato dai macrofagi Raw 264.7.

Infine, dopo aver valutato l'effetto che il trattamento con EVs sortisce sullo stato di attivazione dei linfociti, abbiamo deciso di condurre degli esperimenti volti a investigare se un simile fenomeno si osservasse anche sui livelli di proliferazione dei linfociti.

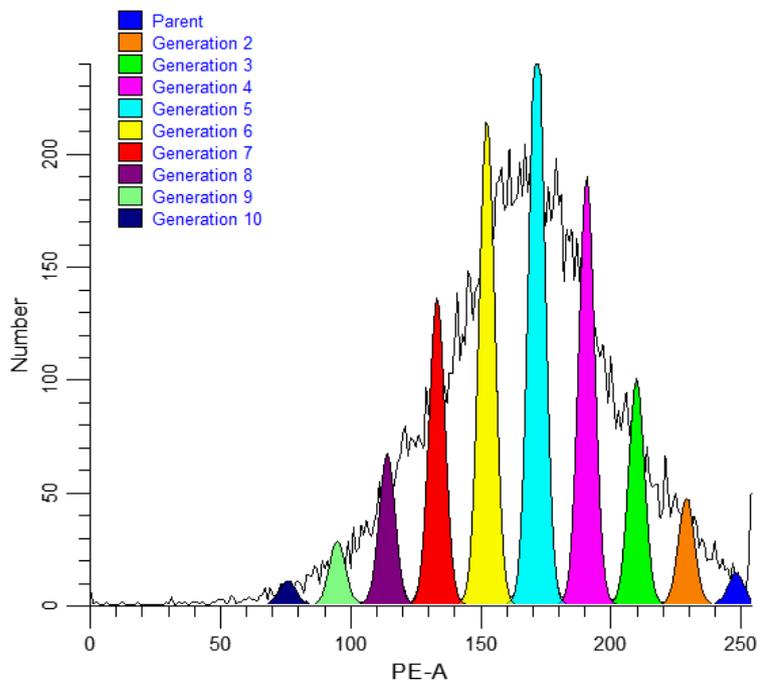
A questo scopo le cellule Jurkat sono state marcate con il colorante lipofilo fluorescente DiI e trattate per 6 giorni con 5 µg/ml di Leucoagglutinina mitogena PHA-L, oppure con 5 µg/ml di Leucoagglutinina mitogena PHA-L in presenza di 50 µg/ml di EVs isolate dalle cellule A6, oppure non trattate in alcun modo, per avere un campione di riferimento.



**Figura 48.** Istogramma relativo al campione di riferimento e alla variazione percentuale delle generazioni di linfociti originatesi durante i 6 giorni di coltura senza stimoli mitogenici.



**Figura 49.** Istogramma relativo al campione trattato con 5 µg/ml di PHA-L in presenza di 50 µg/ml di EVs isolate dalle cellule A6 e alla variazione percentuale delle generazioni di linfociti originatesi durante i 6 giorni di cultura.



**Figura 50.** Istogrammi relativo al campione trattato unicamente con 5 µg/ml di PHA-L e alla variazione percentuale delle generazioni di linfociti originatesi durante i 6 giorni di cultura.

Come si evince dagli istogrammi riportati nelle figure 49 e 50, il trattamento dei linfociti con le EVs derivate dai mesoangioblasti (Figura 49) comporta una riduzione dei livelli di proliferazione degli stessi linfociti, nonostante la presenza della lectina mitogena PHA-L. Di fatto, è possibile notare che gli indici di replicazione e proliferazione sono concordi con un minore spostamento dei valori percentuali più alti verso le generazioni successive, rispetto a quanto è possibile osservare nel campione trattato con la sola PHA-L.

Come atteso, il campione di riferimento (Figura 48), non sottoposto ad alcun trattamento, mostra valori di indice di proliferazione minore e valori percentuali delle generazioni figlie minori rispetto a quanto non succeda quando le stesse cellule vengono trattate con la lectina PHA-L, in presenza o in assenza delle EVs derivate dalle cellule A6.

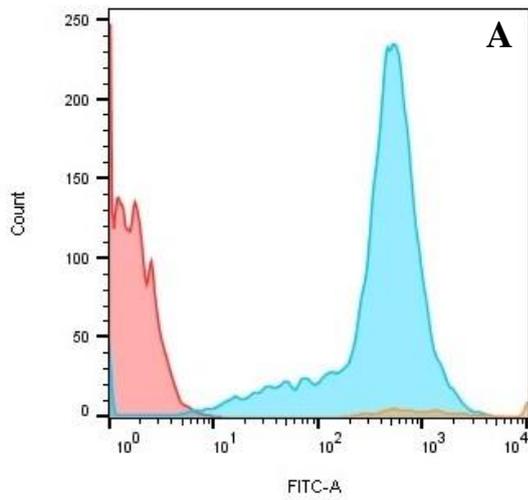
Alla luce dei risultati ottenuti, è possibile affermare che le EVs isolate dai mesoangioblasti, sono in grado di sortire un effetto inibitorio sulla proliferazione dei linfociti.

## ***Profilo di legame delle EVs con lectine e valutazione di interazione dopo rimozione enzimatica di glicani N-linked***

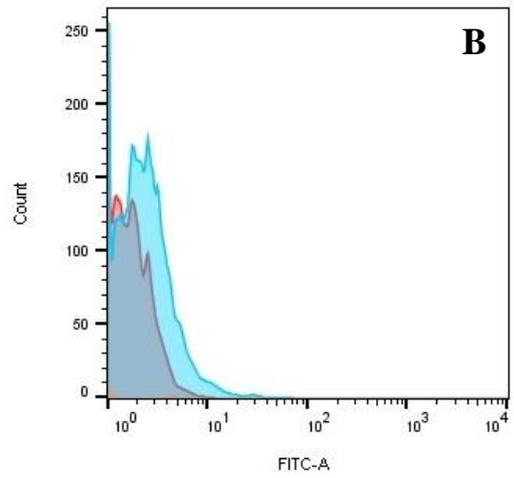
L'interazione funzionale e la conseguente internalizzazione delle vescicole da parte delle cellule riceventi è un argomento che negli ultimi anni ha aperto non pochi dibattiti nel panorama scientifico internazionale. Ci si chiede sempre più se esista un meccanismo specifico o preferenziale nel fenomeno di interazione delle vescicole con le cellule riceventi. Per quanto le vescicole possano essere in grado di interagire teoricamente con gran parte di tipi cellulari, esistono alcune evidenze sperimentali di interazioni più specifiche per certi citotipi a discapito di altri (Rana et al., 2012; Zech et al., 2012; Näslund et al., 2014).

Sono diversi i meccanismi mediante i quali può avvenire interazione tra vescicole extracellulari e cellule riceventi. Tra questi rientrano le interazioni recettoriali di tipo proteina-proteina, che possono essere mediate da tetraspannine ed integrine e che possono condurre a fagocitosi. Possono verificarsi fenomeni di endocitosi mediata da clatrina o mediata da caveolae, suggerendo anche un possibile coinvolgimento dei rafts lipidici. Infine, possono anche verificarsi interazioni mediate dalle lectine con residui glucidici di glicoproteine o proteoglicani (Mulcahy et al., 2014). Alcuni studi hanno dimostrato che le vescicole extracellulari possono possedere residui glucidici specifici rispetto alle cellule parentali, suggerendo la presenza di un meccanismo di sorting specifico per tali residui nelle microvescicole (Gomes et al., 2015) o che la rimozione di specifici residui glucidici dalla superficie delle vescicole è in grado di modulare la qualità dell'interazione delle stesse vescicole con le cellule riceventi (Hao et al., 2007; Barrès et al., 2010; Escrevente et al., 2011; Inder et al., 2014).

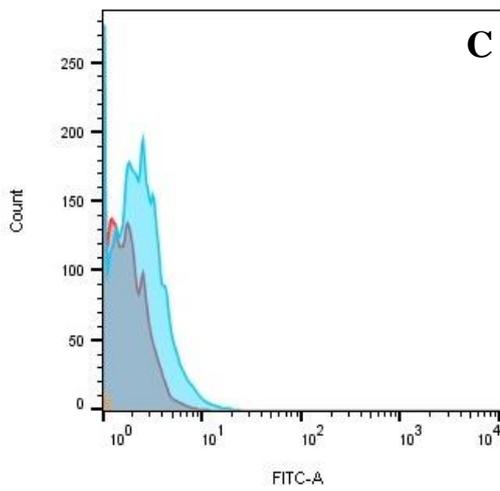
È stata condotta un'indagine citofluorimetrica, utilizzando delle lectine coniugate con fluoresceina isotiocianato, per esaminare la presenza o assenza di specifici residui glucidici sulle cellule A6 e sulle vescicole extracellulari isolate dalle stesse cellule, nonché per valutare un possibile arricchimento selettivo delle EVs con specifici residui glucidici.



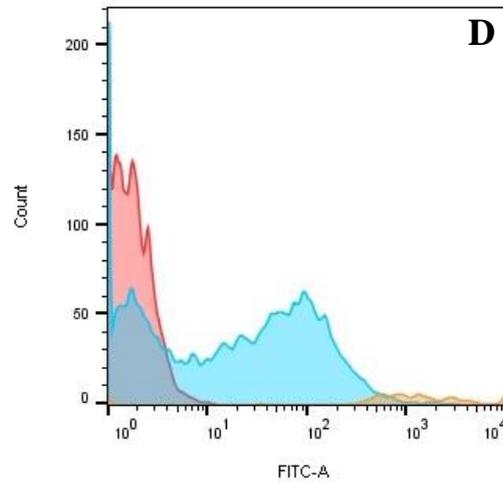
	Sample Name	Subset Name	Count
	Specimen_001_ConA.fcs	Ungated	500
	LECTINE 04-10-16_ConA.fcs	Ungated	10000
	LECTINE 04-10-16_A6 ctrl.fcs	Ungated	10000



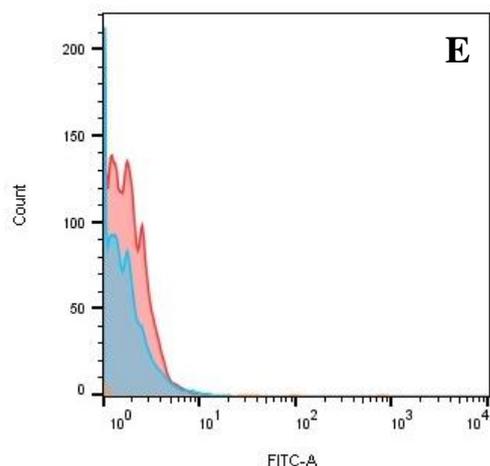
	Sample Name	Subset Name	Count
	Specimen_001_DBA.fcs	Ungated	111
	LECTINE 04-10-16_DBA.fcs	Ungated	10000
	LECTINE 04-10-16_A6 ctrl.fcs	Ungated	10000



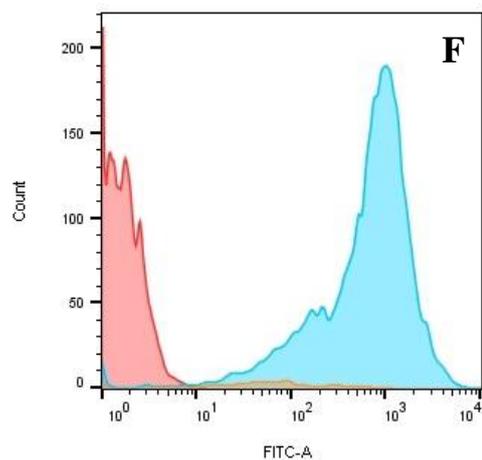
	Sample Name	Subset Name	Count
	Specimen_001_PNA.fcs	Ungated	169
	LECTINE 04-10-16_PNA.fcs	Ungated	10000
	LECTINE 04-10-16_A6 ctrl.fcs	Ungated	10000



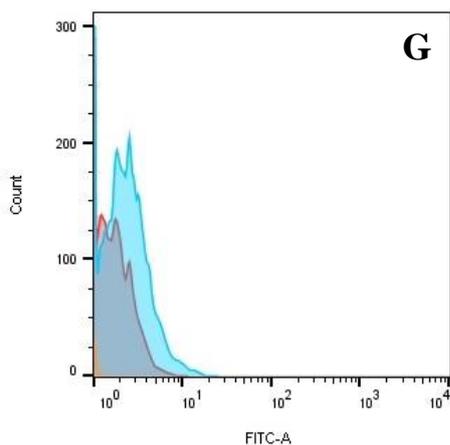
	Sample Name	Subset Name	Count
	Specimen_001_RCA.fcs	Ungated	500
	LECTINE 29-9-16_RCA.fcs	Ungated	10000
	LECTINE 04-10-16_A6 ctrl.fcs	Ungated	10000



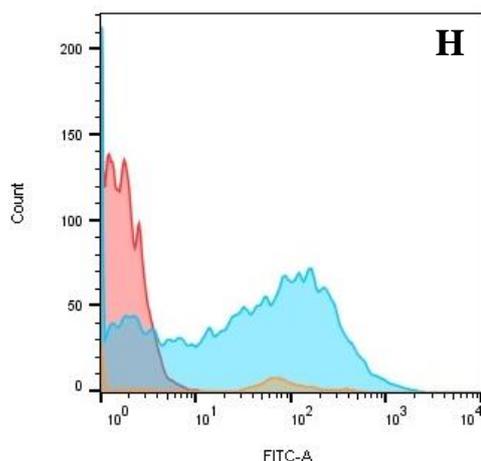
	Sample Name	Subset Name	Count
	Specimen_001_SBA.fcs	Ungated	149
	LECTINE 29-9-16_SBA.fcs	Ungated	10000
	LECTINE 04-10-16_A6 ctrl.fcs	Ungated	10000



	Sample Name	Subset Name	Count
	Specimen_001_SNA.fcs	Ungated	500
	LECTINE 04-10-16_SNA.fcs	Ungated	10000
	LECTINE 04-10-16_A6 ctrl.fcs	Ungated	10000

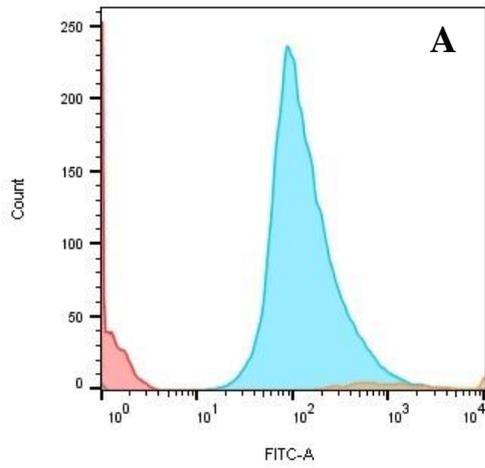


	Sample Name	Subset Name	Count
	Specimen_001_UEA.fcs	Ungated	227
	LECTINE 04-10-16_UEA I.fcs	Ungated	10000
	LECTINE 04-10-16_A6 ctrl.fcs	Ungated	10000

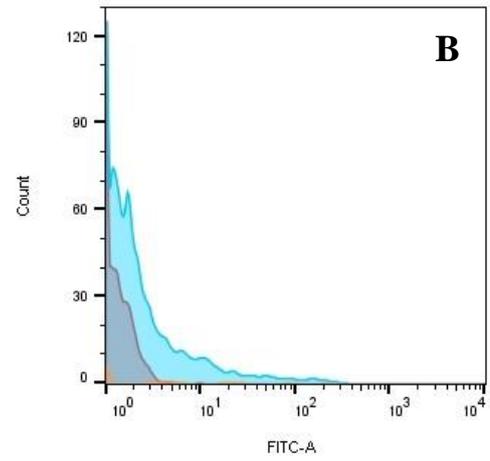


	Sample Name	Subset Name	Count
	Specimen_001_WGA.fcs	Ungated	600
	LECTINE 29-9-16_WGA.fcs	Ungated	10000
	LECTINE 04-10-16_A6 ctrl.fcs	Ungated	10000

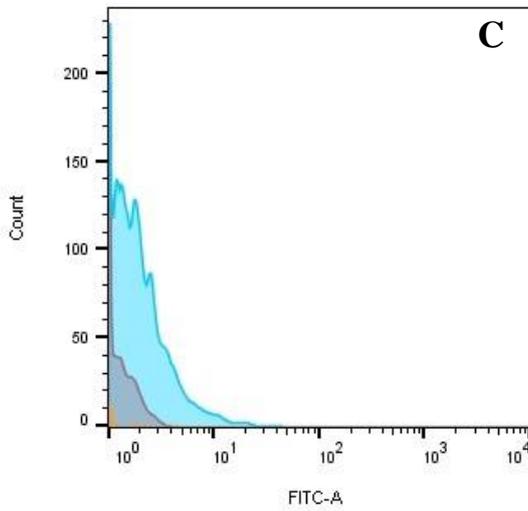
**Figura 51. Istogrammi relativi all'analisi citofluorimetrica dei mesoangioblasti A6 con lectine coniugate con FITC; nell'asse verticale è riportato il numero degli eventi registrati e nell'asse orizzontale la fluorescenza FITC-A in scala log. In rosso istogramma relativo all'autofluorescenza delle cellule incubate con PBS 1X, in blu istogramma relativo alla fluorescenza delle cellule dopo incubazione con lectine marcate, in giallo, istogramma relativo alla fluorescenza del campione di controllo con le sole lectine. A) analisi relativa alla lectina CON A; B) analisi relativa alla lectina DBA; C) analisi relativa alla lectina PNA; D) analisi relativa alla lectina RCA I; E) analisi relativa alla lectina SBA; F) analisi relativa alla lectina SNA; G) analisi relativa alla lectina UEA I; H) analisi relativa alla lectina WGA.**



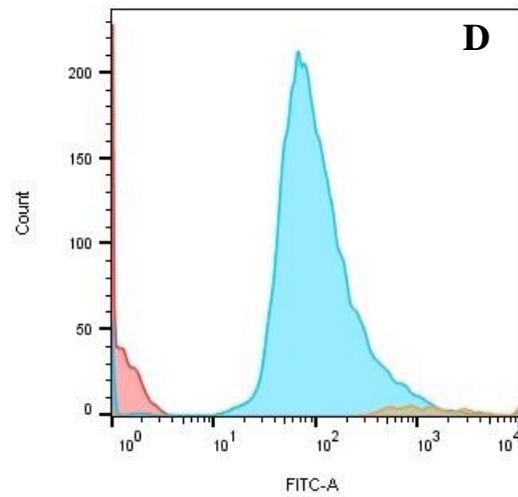
	Sample Name	Subset Name	Count
Orange	Specimen_001_ConA.fcs	Ungated	500
Red	11-04-16_Autofluorescenza Evs.fcs	Ungated	5233
Cyan	11-04-16_Con A.fcs	Ungated	10000



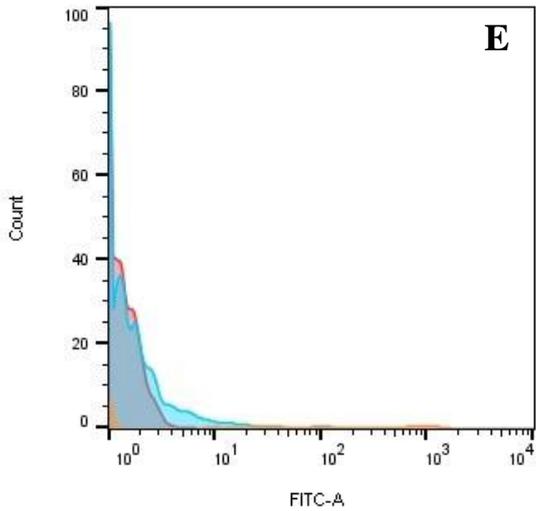
	Sample Name	Subset Name	Count
Orange	Specimen_001_DBA.fcs	Ungated	111
Cyan	11-04-16_DBA.fcs	Ungated	7016
Red	11-04-16_Autofluorescenza Evs.fcs	Ungated	5233



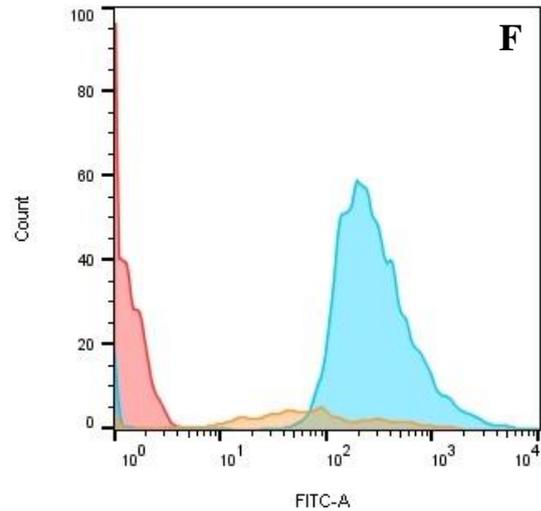
	Sample Name	Subset Name	Count
Orange	Specimen_001_PNA.fcs	Ungated	169
Cyan	11-04-16_PNA.fcs	Ungated	10000
Red	11-04-16_Autofluorescenza Evs.fcs	Ungated	5233



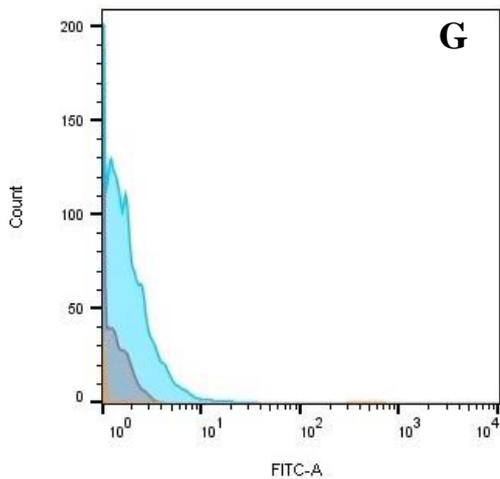
	Sample Name	Subset Name	Count
Orange	Specimen_001_RCA.fcs	Ungated	500
Cyan	11-04-16_RCA 120.fcs	Ungated	10000
Red	11-04-16_Autofluorescenza Evs.fcs	Ungated	5233



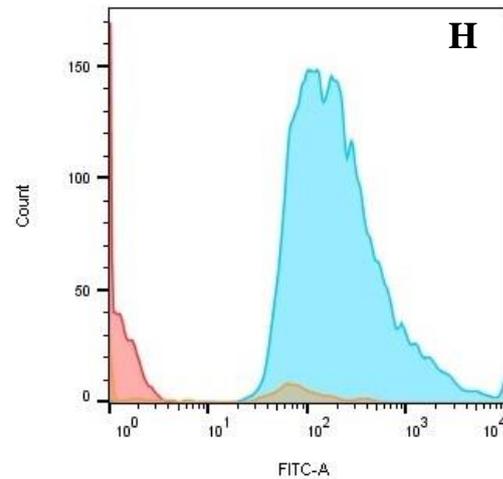
	Sample Name	Subset Name	Count
■	Specimen_001_SBA.fcs	Ungated	149
■	11-04-16_SBA.fcs	Ungated	3018
■	11-04-16_Autofluorescenza EVs.fcs	Ungated	5233



	Sample Name	Subset Name	Count
■	Specimen_001_SNA.fcs	Ungated	500
■	11-04-16_SNA.fcs	Ungated	3023
■	11-04-16_Autofluorescenza EVs.fcs	Ungated	5233



	Sample Name	Subset Name	Count
■	Specimen_001_UEA.fcs	Ungated	227
■	11-04-16_UEA I.fcs	Ungated	10000
■	11-04-16_Autofluorescenza EVs.fcs	Ungated	5233



	Sample Name	Subset Name	Count
■	Specimen_001_WGA.fcs	Ungated	600
■	11-04-16_WGA.fcs	Ungated	10000
■	11-04-16_Autofluorescenza EVs.fcs	Ungated	5233

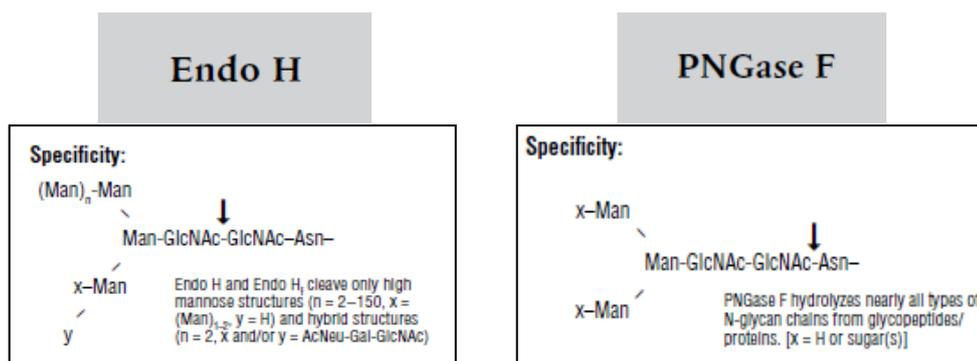
**Figura 52.** Istogrammi relativi all'analisi citofluorimetrica delle EVs dei mesoangioblasti A6, con lectine coniugate con FITC; nell'asse verticale è riportato il numero degli eventi registrati e nell'asse orizzontale la fluorescenza FITC-A in scala log. In rosso istogramma relativo all'autofluorescenza delle EVs incubate con PBS 1X, in blu istogramma relativo alla fluorescenza delle EVs dopo incubazione con lectine marcate, in giallo, istogramma relativo alla fluorescenza del campione di controllo con le sole lectine. A) analisi relativa alla lectina CON A; B) analisi relativa alla lectina DBA; C) analisi relativa alla lectina PNA; D) analisi relativa alla lectina RCA I; E) analisi relativa alla lectina SBA; F) analisi relativa alla lectina SNA; G) analisi relativa alla lectina UEA I; H) analisi relativa alla lectina WGA.

Come è possibile notare dagli istogrammi riportati nella figura 51, i livelli di fluorescenza ottenuti dopo analisi citofluorimetrica condotta mediante l'uso di lectine coniugate con fluorocromo, ci consentono di affermare che i mesoangioblasti possiedono sulla loro superficie residui glucidici di Mannosio, Glucosio, Galattosio, Acido sialico ed N-acetilglucosammina, rispettivamente riconosciuti e legati dalle lectine CON-A, RCA I, SNA e WGA (Figura 51 A, D, F, H). Per quanto concerne l'analisi con le lectine DBA, PNA, SBA e UEA I (Figura 51 B, C, E, G), non si assiste ad aumento di fluorescenza, indice del fatto che i mesoangioblasti non espongono rispettivamente residui di N-acetilgalattosammina, Galattosio legato ad N-acetilgalattosammina con legame  $\beta$ 3, e Fucosio.

L'analisi condotta sulle EVs isolate dalle cellule A6 (figura 52 A-H) ha dato un risultato identico a quello ottenuto sui mesoangioblasti e rileva quindi quali residui sono presenti sulle vescicole, e contemporaneamente permette di dire che non esiste arricchimento selettivo per specifici residui glucidici.

Una volta ottenuto il profilo dei residui glucidici esposti dalle EVs, abbiamo preso in considerazione l'idea di usare degli enzimi per modificare in maniera specifica la superficie delle EVs, tagliando le catene oligosaccaridiche dei glicani N-linked in siti specifici. Tutto ciò allo scopo di valutare se il trattamento delle EVs con questi enzimi, fosse in grado di modificare l'uptake delle stesse da parte di diverse linee cellulari.

A questo scopo abbiamo utilizzato due diversi enzimi (figura 53). Il primo è la Endoglicosidasi H, in grado di tagliare nel *core* del chitobiosio costituito dai primi due residui di N-acetilglucosammina legati all'amminoacido Asparagina, soltanto in strutture ad alto contenuto di mannosio e glicani ibridi. Il secondo è la PNGase F, che idrolizza il legame tra l'amminoacido Asparagina e il primo residuo di N-acetilglucosammina del chitobiosio in tutti i glicani N-linked.



**Figura 53. Specificità di taglio dei due enzimi, Endoglicosidasi H e PNGase F (New England Biolabs®)**

Una volta compiuto il trattamento delle EVs con i due diversi enzimi, abbiamo proceduto con la marcatura delle stesse vescicole al fine di avere informazioni sulle eventuali modifiche nell'interazione delle EVs con le linee cellulari prese in considerazione.

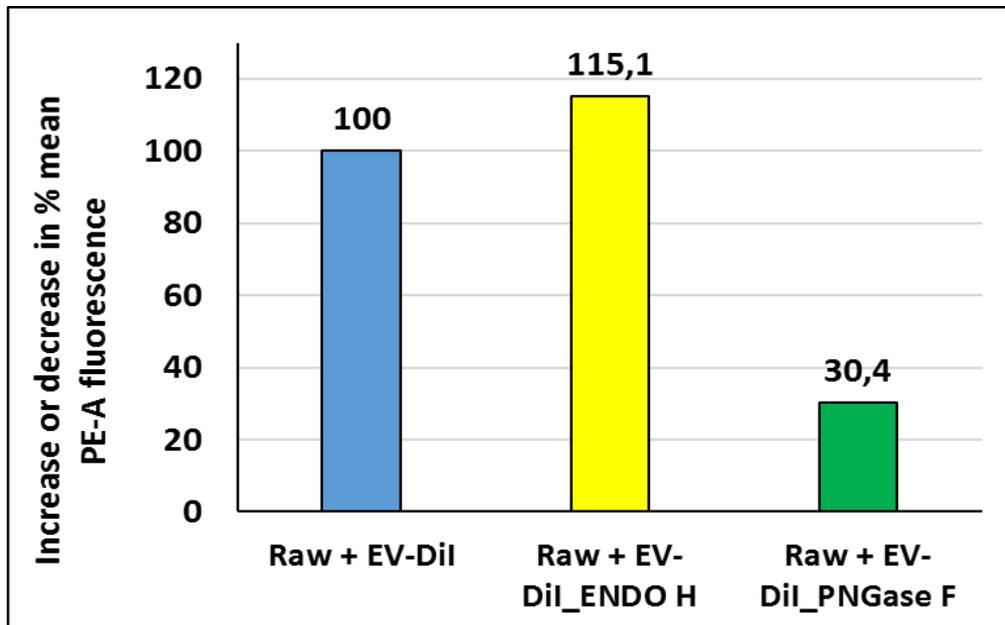


Figura 54. Istogrammi delle analisi citofluorimetriche relative alla variazione percentuale di cellule di macrofagi Raw 264.7 positive all'interazione dopo trattamento con EVs marcate con DiI (istogramma blu), con EVs marcate con DiI e trattate con Endoglicosidasi H (istogramma giallo) e con EVs marcate con DiI e trattate con PNGase F (istogramma verde). I valori ottenuti sono stati normalizzati rispetto a quelli ottenuti usando EVs non trattate con alcun enzima, arbitrariamente impostati a 100.

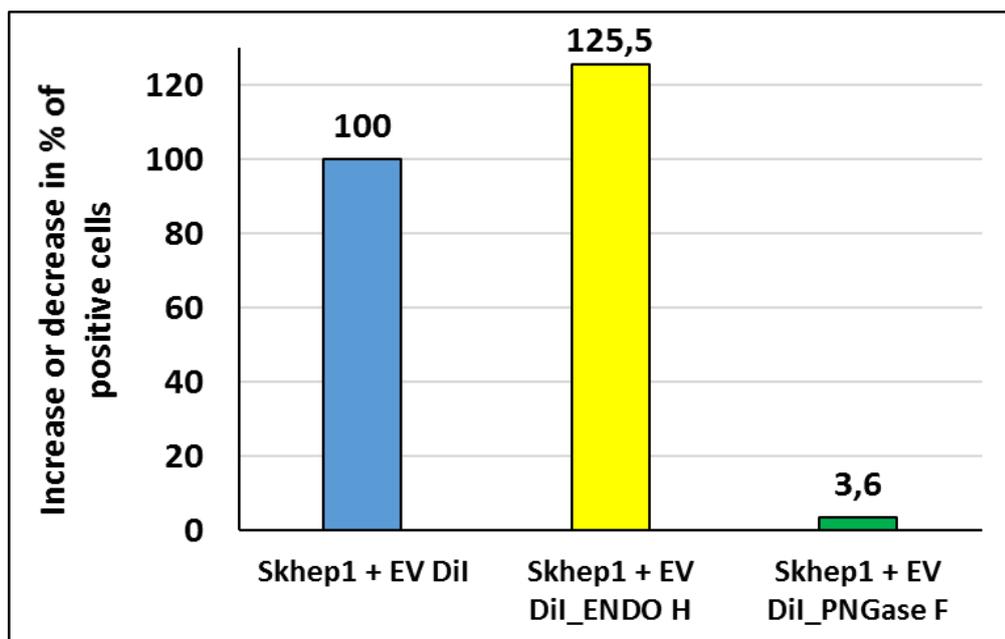


Figura 55. Istogrammi delle analisi citofluorimetriche relative alla variazione percentuale di cellule SKHep1 positive all'interazione dopo trattamento con EVs marcate con DiI (istogramma blu), con EVs marcate con DiI e trattate con Endoglicosidasi H (istogramma giallo) e con EVs marcate con DiI e trattate con PNGase F (istogramma verde). I valori ottenuti sono stati normalizzati rispetto a quelli ottenuti usando EVs non trattate con alcun enzima, arbitrariamente impostati a 100.

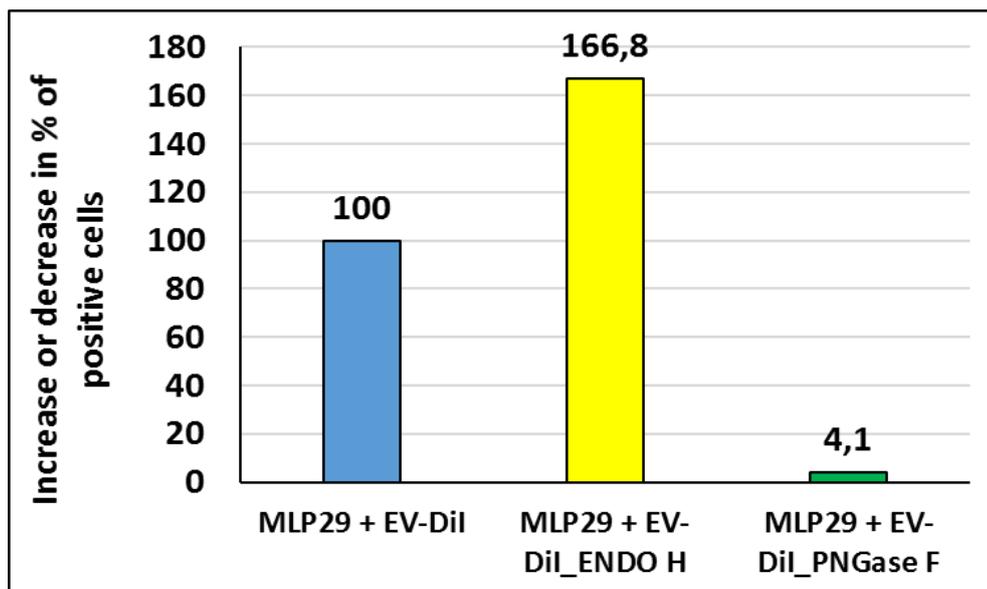


Figura 56. Istogrammi delle analisi citofluorimetriche relative alla variazione percentuale di cellule MLP29 positive all'interazione dopo trattamento con EVs marcate con DiI (istogramma blu), con EVs marcate con DiI e trattate con Endoglicosidasi H (istogramma giallo) e con EVs marcate con DiI e trattate con PNGase F (istogramma verde). I valori ottenuti sono stati normalizzati rispetto a quelli ottenuti usando EVs non trattate con alcun enzima, arbitrariamente impostati a 100.

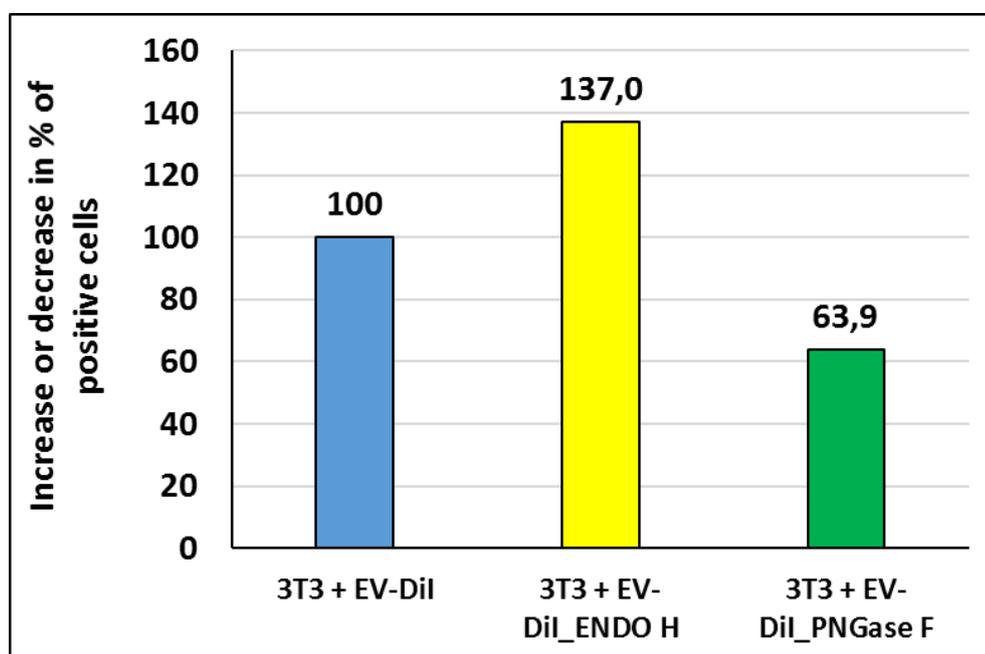


Figura 57. Istogrammi delle analisi citofluorimetriche relative alla variazione percentuale di cellule 3T3 positive all'interazione dopo trattamento con EVs marcate con DiI (istogramma blu), con EVs marcate con DiI e trattate con Endoglicosidasi H (istogramma giallo) e con EVs marcate con DiI e trattate con PNGase F (istogramma verde). I valori ottenuti sono stati normalizzati rispetto a quelli ottenuti usando EVs non trattate con alcun enzima, arbitrariamente impostati a 100.

Come è possibile osservare dai grafici riportati nelle figure 54, 55, 56 e 57, l'uso degli enzimi ha effettivamente comportato delle modifiche nei livelli di interazione delle vescicole con le linee cellulari oggetto di studio. Il trend generale dell'effetto indotto dal trattamento con gli enzimi è identico con tutte e quattro le linee testate. In particolar modo, il trattamento con Endoglicosidasi H produce un generale miglioramento dell'interazione tra le vescicole e le cellule riceventi, in maniera più marcata per la linea MLP29 di progenitori epatici (Figura 56). Al contrario, il trattamento delle vescicole con l'enzima PNGase F comporta una notevole riduzione della percentuale di cellule in grado di interagire con le vescicole, abrogando quasi del tutto l'interazione nel caso delle cellule endoteliali SKHep1 da carcinoma epatico e dei progenitori epatici MLP-29, rispettivamente in figura 55 e 56. È possibile ipotizzare che il diverso effetto sia legato alla differente specificità dei due enzimi. Di fatto, la Endoglicosidasi H è un'enzima meno aggressivo rispetto alla PNGase F, e tagliando il chitobiosio dei glicani N-linked, smaschera il primo dei due residui di N-acetilglucosamina che legano l'asparagina nei glicani ad alto contenuto di mannosio. Inoltre il trattamento con questo enzima non influenza i glicani di tipo complesso, bi-tri o tetra-antennari, ma agisce solamente sui glicani semplici o ibridi, ad alto contenuto di mannosio. Diversamente, la PNGase F agisce in maniera più radicale tagliando proprio a livello del legame tra l'asparagina ed il primo residuo di N-acetilglucosamina del chitobiosio, ed è inoltre in grado di tagliare in questa posizione, tutti i tipi di glicani N-linked. Questo potrebbe spiegare il diverso grado di interazione delle EVs con le differenti linee cellulari, in seguito ai trattamenti effettuati.

# *Conclusioni*

I dati ottenuti hanno dimostrato che le microvescicole di membrana rilasciate dai mesoangioblasti di topo sono in grado di interagire in maniera autocrina con le stesse cellule che le hanno rilasciate, ma soprattutto sono in grado di interagire con altre linee cellulari. È stato quindi possibile comprendere, tramite analisi citofluorimetriche e di fluorescenza, se avviene una semplice interazione superficiale o internalizzazione delle microvescicole di membrana da parte delle cellule target.

Sono stati condotti saggi di formazione di vasi *in vitro* che hanno dimostrato che le cellule endoteliali umane utilizzate sono in grado di formare vasi, e che questa capacità viene potenziata grazie al mezzo condizionato con EVs, fenomeno che sembra essere concentrazione dipendente, con effetti inibitori a concentrazioni più alte di EVs. Inoltre, l'uso di anticorpi neutralizzanti per i principali fattori di crescita con potere angiogenetico, VEGF e FGF-2, permette di supporre che questi non siano gli unici fattori coinvolti nei fenomeni di formazione di strutture *capillary like*, in quanto il loro utilizzo non riduce completamente il numero di strutture osservate. Questo risultato concorda con lo studio dell'analisi condotta mediante microarray, che ha rivelato la presenza all'interno delle EVs di trascritti sia con funzione pro-angiogenetica sia con funzione anti-angiogenetica, lasciando ipotizzare una sorta di equilibrio tra i fattori coinvolti.

Esperimenti di *wound healing* hanno permesso di evidenziare che il mezzo condizionato con le EVs è in grado di aumentare la capacità migratoria delle cellule riceventi in maniera concentrazione dipendente.

Lo studio del functional annotation clustering dei trascritti identificati mediante analisi di microarray ha evidenziato la presenza di trascritti i cui prodotti sono attivamente coinvolti in pathways di regolazione della polarità cellulare, di rimodellamento e organizzazione del citoscheletro actinico e tubulinico, strettamente connessi a fenomeni di adesione e migrazione cellulare.

L'uso delle EVs per condizionare il mezzo di coltura di macrofagi Raw 264.7 ha dimostrato che le vescicole sono in grado di indurre profondi cambiamenti nello stato di fosforilazione dei recettori tirosin-chinasici e nel profilo di secrezione di citochine, che permette di ipotizzare un fenomeno di attivazione dei macrofagi verso un fenotipo M2-like, indotto dal condizionamento del mezzo di coltura con le EVs. Dal momento che è stata dimostrata una correlazione tra i macrofagi di tipo M2 e fenomeni di rigenerazione tissutale e riparo del danno, l'effetto indotto dalle EVs permette di ipotizzare un pragmatico utilizzo nel campo della medicina rigenerativa.

Esperimenti condotti su una linea cellulare linfocitaria hanno dimostrato che il trattamento diretto con le EVs è in grado di ridurre i livelli di proliferazione e di espressione di marcatori di attivazione precoce dei linfociti, mostrando quindi un effetto inibitorio. Diversamente, il trattamento dei linfociti con mezzo di coltura proveniente da macrofagi trattati con EVs è in grado di rafforzare l'attivazione linfocitaria rispetto a quanto non accade quando gli stessi linfociti sono trattati con mezzo di coltura derivato da macrofagi non sottoposti ad alcun condizionamento.

Infine, è stato dimostrato che l'uso di enzimi per la modifica della componente glucidica della superficie cellulare, comporta modifiche nella qualità dell'interazione delle EVs con le cellule riceventi, causandone l'aumento o la riduzione in funzione del trattamento utilizzato.

Alla luce dei risultati ottenuti, è quindi chiaro che le EVs rappresentano un potente mezzo di comunicazione, in grado di indurre sostanziali modifiche fenotipiche e funzionali sulle cellule riceventi, anche qualora si tratti di esperimenti interspecie. Per quanto gli studi fin qui condotti necessitino di ulteriori conferme mediante esperimenti condotti *in vivo*, è auspicabile con cauto ottimismo, un potenziale utilizzo delle vescicole isolate dai mesoangioblasti a scopo terapeutico in medicina rigenerativa o in terapie mirate verso specifiche patologie.

## *Ringraziamenti*

Eccomi giunto alla fine di questa tesi e alla fine di questi tre anni. Una strana commistione di sentimenti e ricordi mi assale mentre scrivo queste parole.

Vorrei innanzitutto ringraziare i miei genitori e i miei parenti per avermi sostenuto in maniera incondizionata sempre, per essere stati un esempio e avermi spinto a seguire la mia strada; senza loro questa tesi non esisterebbe. Un ringraziamento speciale per Silvia e la mia “seconda” famiglia per avermi incoraggiato nei momenti più difficili, per aver sempre avuto la parola di conforto e la pazienza di sopportarmi in tutti gli anni vissuti insieme, specialmente questi ultimi tre; probabilmente senza il loro aiuto non sarei arrivato dove sono adesso.

Vorrei ringraziare la mia tutor, Dott.ssa Geraci, per la sua guida in questo percorso, la professionalità, le critiche stimolanti e gli insegnamenti di cui ha saputo farmi dono in questi anni. Voglio ringraziare anche Marilena, Emanuele, Simona, Rossella e Chiara per aver condiviso con me larga parte delle giornate in laboratorio ed essere diventati buoni amici allo stesso tempo.

Un grazie di cuore al Prof. JuanMa Falcòn del CICbioGUNE di Bilbao, e a tutto il suo team composto da Felix, Espe, Justyna, Pedro, Diana e Sebastian, per avermi ospitato, insegnato tanto, per le mille idee e per avermi spinto a sviluppare spirito critico e autocritico e ringrazio anche i colleghi della Postgrad Society; è stata un’esperienza indimenticabile e che auguro ad ogni mio collega.

Voglio ringraziare le Dott.sse Turturici e Tinnirello, per le mille conversazioni costruttive, i break durante le giornate, le risate insieme, ma soprattutto per essere state dei fari di riferimento ed amici sinceri quando il mio percorso era solo all’inizio.

Sento il dovere di ringraziare i “ragazzi dell’altro lato del laboratorio”, il Dott. Chiarelli e la Dott. Martino; sempre presenti e sempre pronti a condividere esperienze e conoscenza, in loro ho trovato amicizia e professionalità. Vorrei ringraziare il mio referee, la Prof.ssa Roccheri, per il compito che ha svolto e per la professionalità mostrata in questi anni.

Ringrazio la Prof.ssa Sconzo per i consigli e la saggezza nel giudizio che mi ha mostrato durante il percorso; è stata un guida importante.

Infine, desidero ringraziare gli amici e colleghi con i quali ho condiviso la vita nel dipartimento STEBICEF; la Dott.ssa Campora, il Dott. Volpe, le Dott.sse Rigogliuso, Adamo, Saladino, Fricano, Catania e il Dott. Rimini; con loro ho condiviso ogni singolo giorno,

pranzo e coffee break, avventure e disavventure capitate in questo percorso che mi ha condotto sin qui.

Sono cresciuto e maturato dal punto di vista emotivo e professionale e ogni singola persona, a suo modo, ha contribuito a questa crescita.

# *Bibliografia*

- Abid-Hussein MN, Böing AN, Sturk A, Hau CM, Nieuwland R. **Inhibition of microparticle release triggers endothelial cell apoptosis and detachment.** *Thromb Haemost.* 98:1096–107. 2007.
- Albi E, Viola Magni MP. **The role of intranuclear lipids.** *Biol Cell.* 96: 657-667. 2004.
- Aliotta JM, Pereira M, Johnson KW, de Paz N, Dooner MS, Puente N, Ayala C, Brilliant K, Berz D, Lee D, Ramratnam B, McMillan PN, Hixson DC, Josic D, Quesenberry PJ. **Microvesicle entry into marrow cells mediates tissue-specific changes in mRNA by direct delivery of mRNA and induction of transcription.** *Exp Hematol.* 38: 233-245. 2010.
- Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, Betts C, Lakhali S, Wood MJ. **Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes.** *Nat Biotechnol* 29: 341-345. 2011.
- Andreola G, Rivoltini L, Castelli C, Huber V, Perego P, Deho P, Squarcina P, Accornero P, Lozupone F, Lugini L, Stringaro A, Molinari A, Arancia G, Gentile M, Parmiani G, Fais S. **Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles.** *J Exp Med.* 195: 1303-1316. 2002.
- Angelucci A, D'Ascenzo S, Festuccia C, Gravina GL, Bologna M, Dolo V, Pavan A. **Vesicle-associated urokinase plasminogen activator promotes invasion in prostate cancer cell lines.** *Clin Exp Metastasis.* 18: 163-170. 2000.
- Barrès C, Blanc L, Bette-Bobillo P, André S, Mamoun R, Gabius HJ, Vidal M. **Galectin-5 is bound onto the surface of rat reticulocyte exosomes and modulates vesicle uptake by macrophages.** *Blood.* 21; 115: 696-705. 2010.
- Bellingham SA, Coleman BM, Hill AF. **Small RNA deep sequencing reveals a distinct miRNA signature released in exosomes from prion-infected neuronal cells.** *Nucleic Acids Res.* 40: 10937-10949. 2012.
- Berda-Haddad Y, Robert S, Salers P, Zekraoui L, Farnarier C, Dinarello CA, Dignat-George F, Kaplanski G. **Sterile inflammation of endothelial cell-derived apoptotic bodies is mediated by interleukin-1 $\alpha$ .** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108: 20684-20689. 2011.
- Baj-Krzyworzeka M, Majka M, Pratico D, Ratajczak J, Vilaire G, Kijowski J, Reca R, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. **Platelet-derived microparticles stimulate**

**proliferation, survival, adhesion, and chemotaxis of hematopoietic cells.** *Exp Hematol* 30: 450-459. 2002.

- Baj-Krzyworzeka M, Szatanek R, Weglarczyk K, Baran J, Urbanowicz B, Brański P, Ratajczak MZ, Zembala M. **Tumour-derived microvesicles carry several surface determinants and mRNA of tumour cells and transfer some of these determinants to monocytes.** *Cancer Immunol Immunother* 55: 808-18. 2006.
- Barkhausen T, Tschernig T, Rosenstiel P, van Griensven M, Vonberg RP, Dorsch M. **Selective blockade of interleukin-6 trans-signaling improves survival in a murine polymicrobial sepsis model.** *CritCareMed.* 39: 1407–13. 2011.
- Ben-Sasson SZ, Hu-Li J, Quiel J, Cauchetaux S, Ratner M, Shapira I. **IL-1acts directly on CD4 T cells to enhance their antigen-driven expansion and differentiation.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 106: 7119–24. 2009.
- Blazquez R, Sanchez-Margallo FM, de la Rosa O, Dalemans W, Alvarez V, Tarazona R, Casado JG. **Immunomodulatory Potential of Human Adipose Mesenchymal Stem Cells Derived Exosomes on in vitro Stimulated T Cells.** *Front Immunol.* 5: n°556, 1-9. 2014.
- Borlongan CV. **Bone marrow stem cell mobilization in stroke: a 'bonehead' may be good after all!** *Leukemia.* 25: 1674-1686. 2011
- Bruno S, Bussolati B, Grange C, Collino F, di Cantogno LV, Herrera MB, Biancone L, Tetta C, Segoloni G, Camussi G. **Isolation and characterization of resident mesenchymal stem cells in human glomeruli.** *Stem Cells Dev.* 18 : 867-880. 2009a.
- Bruno S, Grange C, Deregibus MC, Calogero RA, Saviozzi S, Collino F, Morando L, Busca A, Falda M, Bussolati B, Tetta C, Camussi G. **Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury.** *J Am Soc Nephrol.* 20: 1053-1067. 2009b.
- Burger D, Montezano AC, Nishigaki N, He Y, Carter A, Touyz RM. **Endothelial microparticle formation by angiotensin II is mediated via Ang II receptor type I/NADPH oxidase/ Rho kinase pathways targeted to lipid rafts.** *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31: 1898-1907. 2011.
- Bussolino F, Di Renzo MF, Ziche M, Bocchietto E, Olivero M, Naldini L, Gaudino G, Tamagnone L, Coffier A, Comoglio PM. **Hepatocyte growth factor is a potent**

- angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth.** *J Cell Biol.* 119: 629-41. 1992.
- Cain RJ, Ridley AJ. **Phosphoinositide 3-kinases in cell migration.** *Biol Cell.* 101: 13-29. 2009.
  - Camussi G, Deregibus MC, Bruno S, Cantaluppi V, Biancone L. **Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication.** *Kidney Int.* 78: 838-848. 2010, a.
  - Camussi G, Deregibus MC, Tetta C. **Paracrine/ endocrine mechanism of stem cells on kidney repair: role of microvesicle-mediated transfer of genetic information.** *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 19: 7-12. 2010, b.
  - Camussi G, Deregibus MC, Bruno S, Grange C, Fonsato V, Tetta C. **Exosome/microvesicle-mediated epigenetic reprogramming of cells.** *Am. J. Cancer. Res.* 1: 98-110. 2011.
  - Camussi G, Deregibus MC, Quesenberry PJ. **Role of Stem Cell-derived Extracellular RNA-carrying Vesicles in Cell Reprogramming.** *Austin J Clin Pathol.* 1: 1-10 2014.
  - Candela ME, Geraci F, Turturici G, Taverna S, Albanese I, Sconzo G. **Membrane vesicles containing matrix metalloproteinase-9 and fibroblast growth factor-2 are released into the extracellular space from mouse mesoangioblast stem cells.** *J Cell Physiol.* 224: 144-151. 2010.
  - Cantley LG. **Adult stem cells in the repair of the injured renal tubule.** *Nat. Clin. Pract. Nephrol.* 1: 22-32. 2005.
  - Carmi Y, Voronov E, Dotan S, Lahat N, Rahat MA, Fogel M. **The role of macrophage-derived IL-1 in induction and maintenance of angiogenesis.** *J Immunol.* 183: 4705-14. 2009.
  - Caruso A, Licenziati S, Corulli M, Canaris AD, De Francesco MA, Fiorentini S, Peroni L, Fallacara F, Dima F, Balsari A, Turano A. **Flow Cytometric Analysis of Activation Markers on Stimulated T Cells and Their Correlation With Cell Proliferation.** *Cytometry.* 27: 71-76. 1997.
  - Cauwenberghs S, Feijge MA, Harper AG, Sage SO, Curvers J, Heemskerk JW. **Shedding of procoagulant microparticles from unstimulated platelets by integrin-mediated destabilization of actin cytoskeleton.** *FEBS Lett* 580: 5313-5320. 2006.
  - Chargaff E, West R. **The biological significance of the thromboplastic protein of blood.** *J Biol Chem* 166: 189-197. 1946.

- Clarke JM, Hurwitz HI. **Understanding and targeting resistance to anti-angiogenic therapies.** *J Gastrointest Oncol.* 4: 253-63. 2013.
- Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. **Shedding microvesicles: artefacts no more.** *Trends Cell Biol.* 19: 43-51. 2009.
- Collino F, Deregibus MC, Bruno S, Sterpone L, Aghemo G, Viltono L, Tetta C, Camussi G. **Microvesicles derived from adult human bone marrow and tissue specific mesenchymal stem cells shuttle selected pattern of miRNAs.** *PLoS One.* 5: e11803. 2010.
- Cory G. **Scratch-wound assay.** *Methods Mol. Biol.* 769: 25-30. 2011.
- Cossu G, Bianco P. **Mesoangioblasts-vascular progenitors for extravascular mesodermal tissues.** *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13: 537-542. 2003.
- Crescitelli R, Lässer C, Szabó TG, Kittel A, Eldh M, Dianzani I, Buzás EI, Lötvall J. **Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes.** *J. Extracell. Vesicles.* 2: 1-10. 2013.
- D'Souza-Schorey C, Chavrier P. **ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond.** *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 347-358. 2006.
- De Angelis L, Berghella L, Coletta M, Lattanzi L, Zanchi M, Cusella-De Angelis MG, Ponzetto C, Cossu G. **Skeletal myogenic progenitors originating from embryonic dorsal aorta coexpress endothelial and myogenic markers and contribute to postnatal muscle growth and regeneration.** *J. Cell Biol.* 147: 869-878. 1999.
- De Broe ME, Wieme RJ, Logghe GN, Roels F. **Spontaneous shedding of plasma membrane fragments by human cells in vivo and in vitro.** *Clin Chim Acta.* 81: 237-245. 1977.
- Del Conde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P, López JA. **Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation.** *Blood.* 106: 1604-1611. 2005.
- Dellavalle A, Sampaolesi M, Tonlorenzi R, Tagliafico E, Sacchetti B, Perani L, Innocenzi A, Galvez BG, Messina G, Morosetti R, Li S, Belicchi M, Peretti G, Chamberlain JS, Wright WE, Torrente Y, Ferrari S, Bianco P, Cossu G. **Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells.** *Nat. Cell Biol.* 9: 255-267. 2007.
- Deregibus MC, Cantaluppi V, Calogero R, Lo Iacono M, Tetta C, Biancone L, Bruno S, Bussolati B, Camussi G. **Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an**

- angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA.** *Blood*. 110: 2440-2448. 2007.
- **Deregibus MC, Tetta C, Camussi G. The dynamic stem cell microenvironment is orchestrated by microvesicle-mediated transfer of genetic information.** *Histol. Histopathol.* 25: 397-404. 2010.
  - **Di Trapani M, Bassi G, Midolo M, Gatti A, Kamga PT, Cassaro A, Carusone R, Adamo A, Krampera M. Differential and transferable modulatory effects of mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles on T, B and NK cell functions.** *Sci Rep.* 6: 1-13. 2016.
  - **Diamant M, Tushuizen ME, Sturk A, Nieuwland R. Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease?** *Eur J Clin Invest.* 34: 392-401. 2004.
  - **Díaz-Manera J, Touvier T, Dellavalle A, Tonlorenzi R, Tedesco FS, Messina G, Meregalli M, Navarro C, Perani L, Bonfanti C, Illa I, Torrente Y, Cossu G. Partial dysferlin reconstitution by adult murine mesoangioblasts is sufficient for full functional recovery in a murine model of dysferlinopathy.** *Cell Death Dis.* 5: 1-11. 2010.
  - **Dignat-George F, Boulanger CM. The many faces of endothelial microparticles.** *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31: 27–33. 2011.
  - **Distler JH, Huber LC, Hueber AJ, Reich CF 3rd, Gay S, Distler O, Pisetsky DS. The release of microparticles by apoptotic cells and their effects on macrophages.** *Apoptosis* 10: 731-741. 2005.
  - **Dolo V, Ginestra A, Cassarà D, Violini S, Lucania G, Torrisi MR, Nagase H, Canevari S, Pavan A, Vittorelli ML. Selective localization of matrix metalloproteinase 9, beta1 integrins, and human lymphocyte antigen class I molecules on membrane vesicles shed by 8701-BC breast carcinoma cells.** *Cancer Res.* 58: 4468-4474. 1998.
  - **Drago D, Cossetti C, Iraci N, Gaude E, Musco G, Bachi A, Pluchino S. The stem cell secretome and its role in brain repair.** *Biochimie.* 95: 2271–2285. 2013.
  - **Duque GA, Descoteaux A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious disease.** *Frontiers in Immunology.* 5: n° 491, 1-12. 2014.
  - **Escrevente C, Keller S, Altevogt P, Costa J. Interaction and uptake of exosomes by ovarian cancer cells.** *BMC Cancer.* 11: 1-10. 2011.

- Escudier B, Dorval T, Chaput N, Andre F, Caby MP, Novault S, et al. **Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: results of the first phase I clinical trial.** *J Transl Med.* 3: 1-13. 2005.
- Etienne-Manneville S, Hall A. **Cell polarity: Par6, aPKC and cytoskeletal crosstalk.** *Curr Opin Cell Biol.* 15: 67-72. 2003..
- Fiegel HC, Lange C, Kneser U, Lambrecht W, Zander AR, Rogiers X, Kluth D. **Fetal and adult liver stem cells for liver regeneration and tissue engineering.** *J. Cell Mol. Med.* 10: 577-587. 2006.
- Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. **IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages.** *J Immunol.* 147: 3815–22. 1991.
- Flaumenhaft R, Dilks JR, Richardson J, Alden E, Patel-Hett SR, Battinelli E, Klement GL, Sola-Visner M, Italiano JE Jr. **Megakaryocyte-derived microparticles: direct visualization and distinction from platelet-derived microparticles.** *Blood* 113: 1112-1121. 2009.
- García-Hernández V, Sarmiento N, Sánchez-Bernal C, Coveñas R, Hernández-Hernández A, Calvo JJ, Sánchez-Yagüe J. **Changes in the expression of LIMP-2 during cerulein-induced pancreatitis in rats: Effect of inhibition of leukocyte infiltration, cAMP and MAPKs early on in its development.** *Int J Biochem Cell Biol.* 79: 109-117. 2016.
- Gardai S.J., McPhillips K.A., Frasn S.C., Janssen W.J., Starefeldt A., Murphy-Ullrich J.E., Bratton D.L., Oldenborg P.A., Michalak M., Henson P.M. **Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of Irf on the phagocyte.** *Cell.* 123:321–334. 2005.
- Gasser O, Hess C, Miot S, Deon C, Sanchez JC, Schifferli JA. **Characterisation and properties of ectosomes released by human polymorphonuclear neutrophils.** *Exp. Cell Res.* 285: 243-257. 2003.
- Gatti S, Bruno S, Deregibus MC, Sordi A, Cantaluppi V, Tetta C, Camussi G. **Microvesicles derived from human adult mesenchymal stem cells protect against ischaemia-reperfusion-induced acute and chronic kidney injury.** *Nephrol Dial Transplant.* 26: 1474-1483. 2011.
- George JN, Thoi LL, McManus LM, Reimann TA. **Isolation of human platelet membrane microparticles from plasma and serum.** *Blood.* 60: 834-840. 1982.

- Giannotta M, Benedetti S, Tedesco FS, Corada M, Trani M, D'Antuono R, Millet Q, Orsenigo F, Gálvez BG, Cossu G, Dejana E. **Targeting endothelial junctional adhesion molecule-A/ EPAC/ Rap-1 axis as a novel strategy to increase stem cell engraftment in dystrophic muscles.** *EMBO Mol. Med.* 6: 239-258. 2014
- Ginestra A, La Placa MD, Saladino F, Cassarà D, Nagase H, Vittorelli ML. **The amount and proteolytic content of vesicles shed by human cancer cell lines correlates with their in vitro invasiveness.** *Anticancer Res.* 18: 3433-3437. 1998.
- Ginestra A, Miceli D, Dolo V, Romano FM, Vittorelli ML. **Membrane vesicles in ovarian cancer fluids: a new potential marker.** *Anticancer Res.* 19: 3439-3445. 1999.
- Gobert M, Treilleux I, Bendriss-Vermare N, Bachelot T, Goddard-Leon S, Arfi V. **Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome.** *Cancer Res.* 69: 2000–2009. 2009.
- Gold L.I., Eggleton P., Sweetwyne M.T., Van Duyn L.B., Greives M.R., Naylor S.M., Michalak M., Murphy-Ullrich J.E. Calreticulin: **Non-endoplasmic reticulum functions in physiology and disease.** *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 24: 665–683. 2010.
- Goodenough DA, Paul DL. **Gap junctions.** *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1: 1-19. 2009.
- Gomes J, Gomes-Alves P, Carvalho SB, Peixoto C, Alves PM, Altevogt P, Costa J. **Extracellular Vesicles from Ovarian Carcinoma Cells Display Specific Glycosignatures.** *Biomolecules.* 5: 1741-61. 2015.
- György B, Szabó TG, Pásztói M, Pál Z, Misják P, Aradi B, László V, Pállinger E, Pap E, Kittel A, Nagy G, Falus A, Buzás EI. **Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles.** *Cell Mol. Life Sci.* 68: 2667-2688. 2011.
- Greco V, Hannus M, Eaton S. **Argosomes: a potential vehicle for the spread of morphogens through epithelia.** *Cell.* 06: 633-645. 2011.
- Hao S, Bai O, Li F, Yuan J, Laferte S, Xiang J. **Mature dendritic cells pulsed with exosomes stimulate efficient cytotoxic T-lymphocyte responses and antitumor immunity.** *Immunology.* 120: 90-102. 2007.
- Heijnen HF, Schiel AE, Fijnheer R, Geuze HJ, Sixma JJ. **Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules.** *Blood* 94: 3791-3799. 1999.

- Herrera MB, Bussolati B, Bruno S, Morando L, Mauriello-Romanazzi G, Sanavio F, Stamenkovic I, Biancone L, Camussi G. **Exogenous mesenchymal stem cells localize to the kidney by means of CD44 following acute tubular injury.** *Kidney Int.* 72: 430–441. 2007.
- Herrera MB, Fonsato V, Gatti S, Deregibus MC, Sordi A, Cantarella D, Calogero R, Bussolati B, Tetta C, Camussi G. **Human liver stem cell-derived microvesicles accelerate hepatic regeneration in hepatectomized rats.** *J Cell Mol Med.* 14: 1605-1618. 2010.
- Hess C, Sadallah S, Hefti A, Landmann R, Schifferli JA. **Ectosomes released by human neutrophils are specialized functional units.** *J Immunol.* 163: 4564-4573. 1999.
- Hirokawa N, Tanaka Y, Okada Y. **Left-right determination: involvement of molecular motor KIF3, cilia, and nodal flow.** *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1: 1-16. 2009.
- Howe AJ, Shand JA, Menown IB. **Advances in cardiology: clinical trial update.** *Future Cardiol.* 7: 299-310. 2011.
- Hristov M, Erl W, Linder S, Weber PC. **Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro.** *Blood.* 104: 2761-2766. 2004.
- Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. **Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists.** *Nucleic Acids Res.* 37: 1-13. 2009a.
- Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. **Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources.** *Nat. Protoc.* 4: 44-57. 2009b.
- Hugel B, Martínez MC, Kunzelmann C, Freyssinet JM. **Membrane microparticles: two sides of the coin.** *Physiology (Bethesda)* 20: 22-27. 2005.
- Humphreys BD, Valerius MT, Kobayashi A, Mugford JW, Soeung S, Duffield JS, McMahon AP, Bonventre JV. **Intrinsic epithelial cells repair the kidney after injury.** *Cell Stem Cell.* 2: 284–291. 2008.
- Hurley JH, Odorizzi G. **Get on the exosome bus with ALIX.** *Nat. Cell Biol.* 14: 654–655. 2012.
- Hurst SM, Wilkinson TS, Mc Loughlin RM, Jones S, Horiuchi S, Yamamoto N. **IL-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation.** *Immunity.* 14: 705–14. 2001.

- Iero M, Valenti R, Huber V, Filipazzi P, Parmiani G, Fais S, Rivoltini L. **Tumour-released exosomes and their implications in cancer immunity.** *Cell Death Differ.* 15: 80-88. 2008.
- Inder KL, Ruelcke JE, Petelin L, Moon H, Choi E, Rae J, Blumenthal A, Hutmacher D, Saunders NA, Stow JL, Parton RG, Hill MM. **Cavin-1/PTRF alters prostate cancer cell-derived extracellular vesicle content and internalization to attenuate extracellular vesicle-mediated osteoclastogenesis and osteoblast proliferation.** *J Extracell Vesicles.* 25; 1-14. 2014.
- Janowska-Wieczorek A, Majka M, Kijowski J, Baj-Krzyworzeka M, Reza R, Turner AR, Ratajczak J, Emerson SG, Kowalska MA, Ratajczak MZ. **Platelet-derived microparticles bind to hematopoietic stem/progenitor cells and enhance their engraftment.** *Blood* 98: 3143-9314. 2001.
- Jones DL, Wagers AJ. **No place like home: anatomy and function of the stem cell niche.** *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9: 11-21. 2008.
- Katsuda T, Kosaka N, Takeshita F, Ochiya T. **The therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles.** *Proteomics.* 13: 1637-1653. 2013.
- Köppler B, Cohen C, Schlöndorff D, Mack M. **Differential mechanisms of microparticle transfer to B cells and monocytes: anti-inflammatory properties of microparticles.** *Eur J Immunol.* 36: 648-660. 2006.
- Krebs LT, Xue Y, Norton CR, Shutter JR, Maguire M, Sundberg JP, Gallahan D, Closson V, Kitajewski J, Callahan R, Smith GH, Stark KL, Gridley T. **Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice.** *Genes Dev.* 14: 1343-52. 2000.
- Krol J, Loedige I, Filipowicz W. **The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay.** *Nat. Rev. Genet.* 11: 597-610. 2010.
- Kullander K, Klein R. **Mechanisms and functions of eph and ephrin signaling.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 3: 475-486. 2002.
- Kusunoki H, Taniyama Y, Otsu R, Rakugi H, Morishita R. **Anti-inflammatory effects of hepatocyte growth factor on the vicious cycle of macrophages and adipocytes.** *Hypertens Res.* 37: 500-6. 2014.
- Levine SJ. **Mechanisms of soluble cytokine receptor generation.** *J Immunol.* 173: 5343-5348. 2004.

- Levring TB, Hansen AK, Nielsen BL, Kongsbak M, von Essen MR, Woetmann A, Odum N, Bonefeld CM, Geisler C. **Activated human CD4+ T cells express transporters for both cysteine and cystine.** *Sci Rep* 2: 1-6. 2012.
- Li CC, Eaton SA, Young PE, Lee M, Shuttleworth R, Humphreys DT, Grau GE, Combes V, Bebawy M, Gong J, Brammah S, Buckland ME, Suter CM. **Glioma microvesicles carry selectively packaged coding and non-coding RNAs which alter gene expression in recipient cells.** *RNA Biol* 10: 1333-1344. 2013.
- Li L, Xie T. **Stem cell niche: structure and function.** *Annu Rev Cell Dev Biol.* 21: 605-631. 2005.
- Li R, Knight JF, Park M, Pendergast AM. **Abl Kinases Regulate HGF/Met Signaling Required for Epithelial Cell Scattering, Tubulogenesis and Motility.** *PLoS One.* 5: 6-10. 2015.
- Li S, Hu GF. **Angiogenin-mediated rRNA transcription in cancer and neurodegeneration.** *Int J Biochem Mol Biol.* 1: 26-35. 2010.
- Li X, Zhou Q, Sunkara M, Kutys ML, Wu Z, Rychahou P, Morris AJ, Zhu H, Evers BM, Huang C. **Ubiquitylation of phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase type I by HECTD1 regulates focal adhesion dynamics and cell migration.** *J Cell Sci.* 126: 2617-28. 2013.
- Lieschke GJ, Burgess AW. **Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.** *N Engl J Med.* 327: 28-35. 1992.
- Linger RM, Keating AK, Earp HS, Graham DK. **TAM receptor tyrosine kinases: biologic functions, signaling, and potential therapeutic targeting in human cancer.** *Adv Cancer Res.* 100: 35-83. 2008.
- Lobov IB, Renard RA, Papadopoulos N, Gale NW, Thurston G, Yancopoulos GD, Wiegand SJ. **Delta-like ligand 4 (Dll4) is induced by VEGF as a negative regulator of angiogenic sprouting.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104: 3219-24. 2007.
- Lösche W, Scholz T, Temmler U, Oberle V, Claus RA. **Platelet-derived microvesicles transfer tissue factor to monocytes but not to neutrophils.** *Platelets.* 15: 109-115. 2004.
- Lucas WJ, Yoo BC, Kragler F. **RNA as a long-distance information macromolecule in plants.** *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2: 849-857. 2001.
- MacKenzie A, Wilson HL, Kiss-Toth E, Dower SK, North RA, Surprenant A. **Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding.** *Immunity* 15: 825-835. 2001.

- Majka M, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J, Ehrenman K, Pietrkowski Z, Kowalska MA, Gewirtz AM, Emerson SG, Ratajczak MZ. **Numerous growth factors, cytokines, and chemokines are secreted by human CD34 cells, myeloblasts, erythroblasts, and megakaryoblasts and regulate normal hematopoiesis in an autocrine/paracrine manner.** *Blood.* 97: 3075–3085. 2001.
- Manabu S, Yasunori S, Yusuke S, Hidekazu I, Rie S, Atsushi Y, Hideo A, Kenta Y, Ken S. **Alternatively activated macrophages determine repair of the infarcted adult murine heart.** *J Clin Invest.* 126: 2151–2166. 2016.
- Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. **The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization.** *Trends Immunol.* 25: 677-86. 2004.
- Martinez FO, Gordon S. **The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment.** *F1000 Prime Reports.* 6: 1-13. 2014.
- Martins I., Kepp O., Galluzzi L., Senovilla L., Schlemmer F., Adjemian S., Menger L., Michaud M., Zitvogel L., Kroemer G. **Surface-exposed calreticulin in the interaction between dying cells and phagocytes.** *Ann NY Acad Sci* 1209: 77–82. 2010.
- Matthews VB, Allen TL, Risis S, Chan MHS, Henstridge DC, Watson N. **Interleukin-6-deficient mice develop hepatic inflammation and systemic insulin resistance.** *Diabetologia.* 53: 2431–41. 2010.
- McCulloch CA, Downey GP, El-Gabalawy H. **Signalling platforms that modulate the inflammatory response: new targets for drug development.** *Nat Rev Drug Discov.* 5: 864-76. 2006.
- Mi H, Thomas P. **PANTHER pathway: an ontology-based pathway database coupled with data analysis tools.** *Methods Mol Biol.* 563: 123-40. 2009.
- Michalak M., Groenendyk J., Szabo E., Gold L.I., Opas M. **Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum.** *Biochem J.* 417: 651–666. 2009.
- Mignatti P, Morimoto T, Rifkin DB. **Basic fibroblast growth factor, a protein devoid of secretory signal sequence, is released by cells via a pathway independent of the endoplasmic reticulum-Golgi complex.** *J Cell Physiol.* 151: 81-93. 1992.

- Mignatti P, Rifkin DB. **Release of basic fibroblast growth factor, an angiogenic factor devoid of secretory signal sequence: a trivial phenomenon or a novel secretion mechanism?** *J Cell Biochem.* 47: 201-207. 1991.
- Minasi MG, Riminucci M, De Angelis L, Borello U, Berarducci B, Innocenzi A, Caprioli A, Sirabella D, Baiocchi M, De Maria R, Boratto R, Jaffredo T, Broccoli V, Bianco P, Cossu G. **The meso-angioblast: a multipotent, self-renewing cell that originates from the dorsal aorta and differentiates into most mesodermal tissues.** *Development* 129: 2773-2783. 2002.
- Moore KA, Lemischka IR. **Stem cells and their niches.** *Science.* 311: 1880-1885. 2006.
- Moskovich O, Fishelson Z. **Live cell imaging of outward and inward vesiculation induced by the complement c5b-9 complex.** *J Biol Chem* 282: 29977-29986. 2007.
- Mulcahy LA, Pink RC, Carter DR. **Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake.** *J Extracell Vesicles.* 3: 1-14. 2014.
- Nabhan JF, Hu R, Oh RS, Cohen SN, Lu Q. **Formation and release of arrestin domain-containing protein 1-mediated microvesicles (ARMMs) at plasma membrane by recruitment of TSG101 protein.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109: 4146-4151. 2012.
- Näslund TI, Paquin-Proulx D, Paredes PT, Vallhov H, Sandberg JK, Gabrielsson S. **Exosomes from breast milk inhibit HIV-1 infection of dendritic cells and subsequent viral transfer to CD4+ T cells.** *AIDS.* 28: 171-180.2014.
- Neufeld G, Sabag AD, Rabinovicz N, Kessler O. **Semaphorins in angiogenesis and tumor progression.** *Cold Spring Harb Perspect Med.* Review. 2: 1-13. 2012.
- Nieuwland R, Sturk A. **Why do cells release vesicles?** *Thromb Res.* 125: S49-51. 2010.
- Nilsen H, Rosewell I, Robins P, Skjelbred CF, Andersen S, Slupphaug G, Daly G, Krokan HE, Lindahl T, Barnes DE. **Uracil-DNA Glycosylase (UNG)-deficient mice reveal a primary role of the enzyme during DNA replication.** *Molecular Cell.* 5: 1059-1065. 2000.
- Nolte-'t Hoen EN, Buermans HP, Waasdorp M, Stoorvogel W, Wauben MH, 't Hoen PA. **Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions.** *Nucleic Acids Res.* 40: 9272-9285. 2012.

- Palumbo R, Sampaolesi M, De Marchis F, Tonlorenzi R, Colombetti S, Mondino A, Cossu G, Bianchi ME. **Extracellular HMGB1, a signal of tissue damage, induces mesoangioblast migration and proliferation.** *J. Cell Biol.* 164: 441-449. 2004.
- Pant S, Hilton H, Burczynski ME. **The multifaceted exosome: biogenesis, role in normal and aberrant cellular function, and frontiers for pharmacological and biomarker opportunities.** *Biochem Pharmacol.* 83: 1484–1494. 2012.
- Peerani R, Zandstra PW. **Enabling stem cell therapies through synthetic stem cell-niche engineering.** *J Clin Invest.* 120: 60-70. 2010.
- Pellegrini G, Rama P, Mavilio F, De Luca M. **Epithelial stem cells in corneal regeneration and epidermal gene therapy.** *J Pathol.* 217: 217-228. 2009.
- Peränen J. **Rab8 GTPase as a regulator of cell shape.** *Cytoskeleton.* 10: 527-39. 2011.
- Pike LJ. **Lipid rafts: bringing order to chaos.** *J. Lipid. Res.* 44: 655-667. 2003.
- Pilzer D, Gasser O, Moskovich O, Schifferli JA, Fishelson Z. **Emission of membrane vesicles: roles in complement resistance, immunity and cancer.** *Springer Semin Immunopathol.* 27: 375-387. 2005.
- Pizzirani C, Ferrari D, Chiozzi P, Adinolfi E, Sandonà D, Savaglio E, Di Virgilio F. **Stimulation of P2 receptors causes release of IL-1beta-loaded microvesicles from human dendritic cells.** *Blood.* 109: 3856-3864. 2007.
- Pollack A, Prudhomme DL, Greenstein DB, Irvin GL 3rd, Clafflin AJ, Block NL. **Flow cytometric analysis of RNA content in different cell populations using pyronin Y and methyl green.** *Cytometry.* 3: 28-35. 1982.
- Quah BJ, Barlow VP, McPhun V, Matthaei KI, Hulett MD, Parish CR. **Bystander. B cells rapidly acquire antigen receptors from activated B cells by membrane transfer.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105: 4259-4264. 2008.
- Quesenberry PJ, Aliotta JM. **The paradoxical dynamism of marrow stem cells: considerations of stem cells, niches, and microvesicles.** *Stem Cell Rev.* 4: 137-147. 2008.
- Raghav KP, Gonzalez-Angulo AM, Blumenschein GR Jr. **Role of HGF/MET axis in resistance of lung cancer to contemporary management.** *Transl Lung Cancer Res.* 1: 179-93. 2012.
- Raposo G, Stoorvogel W. **Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends.** *J Cell Biol.* 200: 373–383. 2013.

- Rana S, Yue S, Stadel D, Zöller M. **Toward tailored exosomes: the exosomal tetraspanin web contributes to target cell selection.** *Int J Biochem Cell Biol.* 44: 1574-1584. 2012.
- Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, Zhang J, Reca R, Dvorak P, Ratajczak MZ. **Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery.** *Leukemia.* 20: 847-856. 2006.a.
- Ratajczak J, Wysoczynski M, Hayek F, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. **Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication.** *Leukemia.* 20: 1487-1495. 2006 b.
- Ratajczak MZ, Zuba-Surma EK, Wysoczynski M, Wan W, Ratajczak J, Wojakowski W, Kucia M. **Hunt for pluripotent stem cell-regenerative medicine search for almighty cell.** *J Autoimmun.* 30: 151-162. 2008.
- Redies C, Heyder J, Kohoutek T, Staes K, Van Roy F. **Expression of Protocadherin-1 (Pcdh1) During Mouse Development.** *Developmental Dynamics.* 237: 2496–2505. 2008.
- Reimand J, Kull M, Peterson H, Hansen J, Vilo J. **g: Profiler—a web-based toolset for functional profiling of gene lists from large-scale experiments.** *Nucleic Acids Research.* 226: 1-8. 2007.
- Reimand J, Arak T, Vilo J. **g: Profiler—a web server for functional interpretation of gene lists.** *Nucleic Acids Research.* 378: 1-9. 2011.
- Ridley AJ. **Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking.** *Trends Cell Biol. Review.* 16: 522-9. 2006.
- Rubartelli A, Cozzolino F, Talio M, Sitia R. **A novel secretory pathway for interleukin-1 beta, a protein lacking a signal sequence.** *EMBO J.* 9: 1503-1510. 1990.
- Rubartelli A, Sitia R. **Secretion of mammalian proteins that lack a signal sequence. In: Unusual Secretory Pathways: From Bacteria to Man.** edited by Kuchler K, Rubartelli A, and Holland BI. Austin, TX: Landes, 1997.
- Sadanandam A, Rosenbaugh EG, Singh S, Varney M, Singh RK. **Semaphorin 5A promotes angiogenesis by increasing endothelial cell proliferation, migration, and decreasing apoptosis.** *Microvasc Res.* 79: 1-9. 2010.

- Safaei R, Larson BJ, Cheng TC, Gibson MA, Otani S, Naerdemann W, Howell SB. **Abnormal lysosomal trafficking and enhanced exosomal export of cisplatin in drug-resistant human ovarian carcinoma cells.** *Mol Cancer Ther* 4: 1595-1604. 2005.
- Sampaolesi M, Torrente Y, Innocenzi A, Tonlorenzi R, D'Antona G, Pellegrino MA, Barresi R, Bresolin N, De Angelis MG, Campbell KP, Bottinelli R, Cossu G. **Cell therapy of alpha-sarcoglycan null dystrophic mice through intra-arterial delivery of mesoangioblasts.** *Science*. 301: 487-492. 2003.
- Sampaolesi M, Blot S, D'Antona G, Granger N, Tonlorenzi R, Innocenzi A, Mognol P, Thibaud JL, Galvez BG, Barthélémy I, Perani L, Mantero S, Guttinger M, Pansarasa O, Rinaldi C, Cusella De Angelis MG, Torrente Y, Bordignon C, Bottinelli R, Cossu G. **Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs.** *Nature* 444: 574-579. 2006.
- Sato Y. **Delta-like 4 and vasohibin 1: two endothelium-produced negative regulators of angiogenesis with distinctive roles.** *Eur Cytokine Netw*. 20: 220-4. 2009.
- Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. **Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation.** *Nature*. 418: 191-195. 2002.
- Schofield R. **The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell.** *Blood Cells*. 4: 7-25. 1978.
- Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. **The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6.** *Biochim Biophys Acta*. 1813: 878-88. 2011.
- Shedden K, Xie XT, Chandaroy P, Chang YT, Rosania GR. **Expulsion of small molecules in vesicles shed by cancer cells: association with gene expression and chemosensitivity profiles.** *Cancer Res*. 63: 433-437. 2003.
- Shipkova M, Wieland E. **Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation.** *Clinica Chimica Acta*. 413: 1338-1349. 2012.
- Sidhu SS, Mengistab AT, Tauscher AN, LaVail J, Basbaum C. **The microvesicle as a vehicle for EMMPRIN in tumor-stromal interactions.** *Oncogene* 23: 956-963. 2004.
- Siekevitz P. **Biological membranes: the dynamics of their organization.** *Annu Rev Physiol*. 34: 117-140. 1972.
- Simons K, Ikonen E. **Functional rafts in cell membranes.** *Nature* 387: 569-572. 1997.
- Sims PJ, Faioni EM, Wiedmer T, Shattil SJ. **Complement proteins C5b-9 cause release of membrane vesicles from the platelet surface that are enriched in the membrane**

**receptor for coagulation factor Va and express prothrombinase activity.** *J Biol Chem.* 263: 18205–18212. 1988.

- Skeel A, Yoshimura T, Showalter SD, Tanaka S, Appella E, Leonard EJ. **Macrophage Stimulating Protein: Purification, Partial Amino Acid Sequence, and Cellular Activity.** *The Journal of Experimental Medicine.* 173: 1227-1234. 1991.
- Skog J, Würdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, Curry WT Jr, Carter BS, Krichevsky AM, Breakefield XO. **Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers.** *Nat Cell Biol.* 10: 1470-1476. 2008.
- Soler A, Angulo-Urarte A, Graupera M. **PI3K at the crossroads of tumor angiogenesis signaling pathways.** *Molecular & Cellular Oncology.* 2: 1-10. 2015.
- Song X, Xie S, Lu K, Wang C. **Mesenchymal stem cells alleviate experimental asthma by inducing polarization of alveolar macrophages.** *Inflammation.* 38 :485-92. 2015.
- Staal FJ, Baum C, Cowan C, Dzierzak E, Hacey-Bey-Abina S, Karlsson S, Lapidot T, Lemischka I, Mendez-Ferrer S, Mikkers H, Moore K, Moreno E, Mummery CL, Robin C, Suda T, Van Pel M, Vanden Brink G, Zwaginga JJ, Fibbe WE. **Stem cell self-renewal: lessons from bone marrow, gut and iPS toward clinical applications.** *Leukemia.* 25: 1095-1102. 2011.
- **A critical role for the EphA3 receptor tyrosine kinase in heart development** Stephen JL, Fawkes AL, Verhoeve A, Lemke G, Brown A. *Developmental Biology.* 302: 66–79. 2007.
- Taback B, Hoon DS. **Circulating nucleic acids and proteomics of plasma/serum: clinical utility.** *Ann N Y Acad. Sci.* 1022: 1-8. 2004.
- Tagliafico E, Brunelli S, Bergamaschi A, De Angelis L, Scardigli R, Galli D, Battini R, Bianco P, Ferrari S, Cossu G, Ferrari S. **TGFbeta/BMP activate the smooth muscle/bone differentiation programs in mesoangioblasts.** *J Cell Sci.* 117: 4377-4388. 2004.
- Takahashi S, Kubo K, Waguri S, Yabashi A, Shin H.W, Katoh Y, Nakayama K. **Rab11 regulates exocytosis of recycling vesicles at the plasma membrane.** *J Cell Sci.* 125: 4049-4057. 2012.
- Taverna S, Rigogliuso S, Salamone M, Vittorelli ML. **Intracellular trafficking of endogenous fibroblast growth factor-2.** *FEBS J.* 275: 1579-1592. 2008.

- Taylor DD, Gercel-Taylor C. **MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer.** *Gynecol Oncol.* 110: 13-21. 2008.
- Tendera M, Wojakowski W, Rużyłło W, Chojnowska L, Kepka C, Tracz W, Musiałek P, Piwowarska W, Nessler J, Buszman P, Grajek S, Breborowicz P, Majka M, Ratajczak MZ. **Intracoronary infusion of bone marrow-derived selected CD34+CXCR4+ cells and non-selected mononuclear cells in patients with acute STEMI and reduced left ventricular ejection fraction: results of randomized, multicentre Myocardial Regeneration by Intracoronary Infusion of Selected Population of Stem Cells in Acute Myocardial Infarction.** *Eur Heart J.* 30: 1313-1321. 2009.
- Tetta C, Ghigo E, Silengo L, Deregibus MC, Camussi G. **Extracellular vesicles as an emerging mechanism of cell-to-cell communication.** *Endocrine* 44: 11–19. 2013.
- Théry C, Duban L, Segura E, Véron P, Lantz O, Amigorena S. **Indirect activation of naïve CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes.** *Nat Immunol.* 3: 1156-1162. 2002.
- Théry C. **Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications.** *Biol. Rep.* 3: 1-8 2011.
- Thomas PD, Kejariwal A, Campbell MJ, Mi H, Diemer K, Guo N, Ladunga I, Ulitsky-Lazareva B, Muruganujan A, Rabkin S, Vandergriff JA, Doremieux O. **PANTHER: a browsable database of gene products organized by biological function, using curated protein family and subfamily classification.** *Nucleic Acids Res.* 31: 334-341. 2003.
- Turturici G, Tinnirello R, Sconzo G, Geraci F. **Extracellular membrane vesicles as a mechanism of cell-to-cell communication: advantages and disadvantages.** *Am. Physiol Cell Physiol.* 306: 621-633. 2014.
- Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. **Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells.** *Nat Cell Biol.* 9: 654-659. 2007.
- Valenti R, Huber V, Filipazzi P, Pilla L, Sovena G, Villa A, Corbelli A, Fais S, Parmiani G, Rivoltini L. **Human tumor-released microvesicles promote the differentiation of myeloid cells with transforming growth factor-beta-mediated suppressive activity on T lymphocytes.** *Cancer Res.* 66: 9290-9298. 2006.

- Van Amersfoort ES, Van Strijp JA. **Evaluation of a flow cytometric fluorescence quenching assay of phagocytosis of sensitized sheep erythrocytes by polymorphonuclear leukocytes.** *Cytometry*. 17: 294-301. 1994.
- van Niel G, Porto-Carreiro I, Simoes S, Raposo G. **Exosomes: a common pathway for a specialized function.** *J Biochem*. 140: 13-21. 2006.
- Vlodavsky I, Fuks Z, Ishai-Michaeli R, Bashkin P, Levi E, Korner G, Bar-Shavit R, Klagsbrun M. **Extracellular matrix-resident basic fibroblast growth factor: implication for the control of angiogenesis.** *J Cell Biochem*. 45: 167-176. 1991.
- Voog J, Jones DL. **Stem cells and the niche: a dynamic duo.** *Cell Stem Cell*. 6: 103-115. 2010.
- Wang L, Kamath A, Frye J, Iwamoto JA, Chun JL, Berry SE. **Aorta-derived mesoangioblasts differentiate into the oligodendrocytes by inhibition of the Rho kinase signaling pathway.** *Stem cells and Development*. 21: 1069-1089. 2012.
- Watt FM, Hogan BL. **Out of Eden: stem cells and their niches.** *Science*. 287: 1427-1430. 2000.
- Wei S, Gao X, Du J, Su J, Xu Z. **Angiogenin Enhances Cell Migration by Regulating Stress Fiber Assembly and Focal Adhesion Dynamics.** *PLoS ONE*. 6: 1-10. 2011.
- Wilson HL, Francis SE, Dower SK, Crossman DC. **Secretion of intracellular IL-1 receptor antagonist (type 1) is dependent on P2X7 receptor activation.** *J Immunol*. 173: 1202-1208. 2004.
- Wise AF, Williams TM, Kiewiet MB, Payne NL, Siatskas C, Samuel CS, Ricardo SD. **Human mesenchymal stem cells alter macrophage phenotype and promote regeneration via homing to the kidney following ischemia-reperfusion injury.** *Am J Physiol Renal Physiol*. 306: 1222-35. 2014.
- Wollert KC, Drexler H. **Mesenchymal stem cells for myocardial infarction: promises and pitfalls.** *Circulation*. 112: 151-153. 2005.
- Wong RC, Pera MF, Pébay A. **Role of gap junctions in embryonic and somatic stem cells.** *Stem Cell Rev* 4: 283-292. 2008.
- Xing QT, Qu CM, Wang G. **Overexpression of Abl2 predicts poor prognosis in hepatocellular carcinomas and is associated with cancer cell migration and invasion.** *Onco Targets Ther*. 7: 881-885. 2014.

- Xu J, Lai YJ, Lin WC, Lin FT. **TRIP6 enhances lysophosphatidic acid-induced cell migration by interacting with the lysophosphatidic acid 2 receptor.** *J Biol Chem.* 279: 10459-10468. 2004.
- Xu Z, Fang S, Zuo Y, Zhang Y, Cheng R, Wang Q, Yang Z, Cai W, Ma J, Yang X, Gao G. **Combination of pigment epithelium-derived factor with radiotherapy enhances the antitumor effects on nasopharyngeal carcinoma by downregulating vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis.** *Cancer Science.* 102: 1789-1798. 2011.
- Yoshimi R, Yamaji S, Suzuki A, Mishima W, Okamura M, Obana T, Matsuda C, Miwa Y, Ohno S, Ishigatsubo Y. **The g-Parvin-Integrin-Linked Kinase Complex Is Critically Involved in Leukocyte-Substrate Interaction.** *J Immunol.* 176: 3611-3624. 2006.
- Yu X, Harris SL, Levine AJ. **The regulation of exosome secretion: a novel function of the p53 protein.** *Cancer Res.* 66: 4795-4801. 2006.
- Yuan A, Farber EL, Rapoport AL, Tejada D, Deniskin R, Akhmedov NB, Farber DB. **Transfer of microRNAs by embryonic stem cell microvesicles.** *PLoS One* 4: 1-10. 2009.
- Zech D, Rana S, Büchler MW, Zöller M. **Tumor-exosomes and leukocyte activation: an ambivalent crosstalk.** *Cell Commun Signal.* 10: 1-17. 2012.
- Zegers MM, Friedl P. **Rho GTPases in collective cell migration.** *Small GTPases.* 5: 1-10. 2014.
- Zhuang X, Xiang X, Grizzle W, Sun D, Zhang S, Axtell RC, Ju S, Mu J, Zhang L, Steinman L, Miller D, Zhang HG. **Treatment of brain inflammatory diseases by delivering exosome encapsulated anti-inflammatory drugs from the nasal region to the brain.** *Mol Ther* 19: 1769-1779. 2011.