

ANÁLISIS DE LOS MECANISMOS DESCRITOS PARA LA REGULACIÓN
DE LA SECRECIÓN DE LOS EXOSOMAS

JENNY LORENA BRITO HOYOS

MONOGRAFÍA
Presentado como requisito parcial
Para optar al título de

BACTERIÓLOGA

ALFONSO BARRETO
Director

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE BACTERIOLOGIA
Bogotá D.C.
19 de Mayo de 2010

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución No. 13 de julio de 1946 “La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por los alumnos en sus tesis de grado”.

ANALISIS DE LOS MECANISMOS DESCRITOS PARA LA REGULACIÓN
DE LA SECRECIÓN DE EXOSOMAS

JENNY LORENA BRITO HOYOS

APROBADO

ALFONSO BARRETO
DIRECTOR

ADRIANA CUELLAR
JURADO

ANALISIS DE LOS MECANISMOS DESCRITOS PARA LA REGULACIÓN
DE LA SECRECIÓN DE EXOSOMAS

JENNY LORENA BRITO HOYOS

APROBADO

INGRID SCHULER GARCÍA
Decana Académica

LUZ AMPARO MALDONADO
Directora Carrera Bacteriología

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios y a mis padres por darme la oportunidad de avanzar en el camino hacia la realización de mis sueños y metas. Mis más sinceros agradecimientos al Doctor Alfonso Barreto por permitirme trabajar bajo su guía y ayudarme en todo momento a lo largo de este camino para la culminación de este proyecto.

CONTENIDO

| | Pág. |
|--|------|
| INTRODUCCIÓN_____ | 1 |
| 1. EXOSOMAS_____ | 3 |
| 1.1 BIOGENESIS_____ | 3 |
| 1.2 COMPOSICIÓN DE LOS EXOSOMAS_____ | 5 |
| 1.3 FUNCIONES DE LOS EXOSOMAS_____ | 7 |
| 2. MODELO DE REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE EXOSOMAS_____ | 9 |
| 2.1 COMO SE REGULA LA SECRECIÓN CELULAR_____ | 9 |
| 2.1.1 SUPERFAMILIA RAB27_____ | 10 |
| 2.1.2 RAB11_____ | 15 |
| 2.1.3 p53_____ | 18 |
| 2.1.4 ACCIÓN DEL CALCIO EN LA SECRECIÓN DE EXOSOMAS_____ | 21 |
| GLOSARIO_____ | 24 |
| BIBLIOGRAFÍA_____ | 27 |

INDICE DE FIGURAS

| | Pág. |
|---|------|
| FIGURA 1.1 VÍA ENDOCÍTICA_____ | 4 |
| FIGURA 1.2 PROCESO DE TRANS-DISEMINACIÓN EXOSOMAL___ | 8 |
| FIGURA 2.1 DISTRIBUCIÓN DE RAB27A Y RAB27B EN LOS COMPARTIMENTOS CELULARES RELACIONADOS CON LA SECRECIÓN DE EXOSOMAS_____ | 11 |
| FIGURA 2.2 INTERACCIÓN ENTRE LAS MOLECULAS ASOCIADAS A LA SECRECIÓN DE MELANOSOMAS_____ | 12 |
| FIGURA 2.3 INTERACCIÓN ENTRE FIPs Y ORGANELOS SECRRETORES_____ | 17 |
| FIGURA 2.4 RESPUESTA CELULAR ANTE UN ESTRÉS GENOTOXICO_____ | 19 |
| FIGURA 2.5 ESTABILIZACIÓN DE P53 POR ACCIÓN DEL TNF α _____ | 20 |
| FIGURA 2.6 INTERACCIÓN DE LAS SEÑALES PRIMARIAS ACTIVADORAS, EFECTORES Y LAS PROTEÍNAS RAB27, RAB11, P53 Y PAPEL DEL CALCIO EN EL AUMENTO DE LA SECRECIÓN DE EXOSOMAS._____ | 23 |

RESUMEN

Los exosomas son vesículas de membrana originadas en la vía endocítica, cuyo tamaño varía entre 40nm y 100nm, tienen forma de copa y son liberadas de diferentes tipos celulares cuando los cuerpos multivesiculares se fusionan con la membrana plasmática. En la membrana de los exosomas se encuentran diversas proteínas asociadas como integrinas, tetraspaninas y moléculas co-estimuladoras que se relacionan con el estímulo de linfocitos T o con la inducción de tolerancia entre otras funciones.

Estas vesículas se secretan al espacio extracelular de una forma regulada, aunque este mecanismo no se encuentra muy claro, según trabajos recientes se sabe que interactúan varias moléculas como Rab27, Rab11, p53 y el Calcio, las cuales proporcionan ayuda en el transporte vesicular y en la secreción de exosomas. A través de la revisión sistemática de la bibliografía existente, en este trabajo se quiere postular algunas posibles vías que estén asociadas con la regulación de la secreción de exosomas, a través de la interacción de estas moléculas implicadas. Es así como se encontró que la modulación de estas moléculas se podría dar por diferentes señales como TNF α , esta señal podría ser una de las vías que lleve al aumento de la secreción de exosomas por medio de la activación de IKK α para la estabilización de p53, o por otro lado ayudar a la activación de Rab3GEP cuya acción podría activar la proteína G del Rab27 dando un mayor desplazamiento vesicular y un aumento en la fusión de membranas. También se encuentran unas señales moduladoras conocidas como SGSM que participan en la activación de Rab11 ayudando al transporte vesicular. Otra señal activadora relacionada con p53 podría ser la interacción con radicales libres de oxígeno, el cual ayuda a la translocación de IKK α y PKC δ en el núcleo y la posterior transcripción de genes como CHMP4C y TSAP6 por acción de p53. La activación de estos genes aumenta la secreción de exosomas. Por otro lado una señal importante para que haya una secreción adecuada de productos, es el calcio, cuyo sensor de cambios intracelulares ayudan a la abertura del poro exocítico en la membrana plasmática y a la posterior liberación de exosomas.

INTRODUCCIÓN

Los exosomas son vesículas intracelulares secretadas por células tumorales, células epiteliales intestinales, células hematopoyéticas, células dendríticas, y mastocitos, entre otras. Juegan un papel fisiológico importante en la eliminación de proteínas, como lo es el receptor de transferrina y algunas integrinas en células del linaje eritroide (Johnstone et al., 1986). Se les han descrito diferentes tipos de funciones que dependen de su origen celular, entre ellos se encuentra la promoción de una respuesta inmune a través de la transferencia antigénica por medio de células dendríticas o por otro lado la inhibición de la función linfocitaria por medio de las células presentadoras de antígenos profesionales (Mignot G. et al., 2006; Keller S. et al., 2006; Clayton A. et al., 2007; Denzer K. et al., 2000). Adicionalmente ayudan en la comunicación intercelular permitiendo el intercambio de proteínas y lípidos entre células secretoras y células blanco (Segura E. et al., 2005).

Estas vesículas de membrana se han caracterizado extensivamente de acuerdo a su morfología y a sus constituyentes. De acuerdo a estos últimos, se ha propuesto que son derivados de la vía endocítica a partir de la invaginación de la membrana limitante de los cuerpos multivesiculares, que al fusionarse con la membrana plasmática de la célula, libera los exosomas al espacio extracelular (Schorey J. et al., 2008).

El conocimiento sobre los mecanismos de regulación de la secreción de exosomas es muy limitado. Sin embargo, en unos pocos trabajos se han descrito algunos blancos moleculares que podrían estar involucrados en los mecanismos de secreción. Por lo tanto, en esta monografía a través del análisis de estos trabajos se quiere proponer algunas posibles vías de la regulación de estas vesículas. La identificación de algunos mecanismos asociados con la vía de secreción de exosomas, permitirían poder manipular la liberación *in vivo* de estas vesículas, y

de esta forma comprender las funciones fisiológicas de los exosomas *in vivo*; aspecto que no se ha podido abordar en la actualidad.

Para la elaboración de esta monografía se tiene en cuenta las investigaciones sobre exosomas desarrolladas por grupos de investigación como el liderado por el Dr. Sebastian Amigorena. Un grupo francés que ha publicado diferentes artículos sobre biogénesis, función y regulación de exosomas pertenecientes al instituto Curie. De igual forma se revisaron los trabajos de otros autores que también han hecho aportes sobresalientes al entendimiento de la secreción de estas vesículas como el grupo de la Dra. Colombo, quien pertenece al laboratorio de mecanismos moleculares del transporte vesicular de la universidad nacional de Cuyo, Argentina y el grupo del Dr. Levine, norteamericano, dedicado a la investigación en cáncer, estableció el instituto para ciencias biológicas.

1. EXOSOMAS

Los exosomas son pequeñas vesículas de membrana compuestas por proteínas y lípidos (Keller S. et al., 2006), producidas por múltiples tipos celulares, cuyo tamaño determinado por microscopia electrónica varía entre 40nm y 100nm, presentan forma de copa, y una flotación boyante en gradientes de sacarosa entre 1.15 y 1.21mg/mL (Jianghong L. et al., 2009; Segura E. et al., 2005).

1.1 Biogénesis

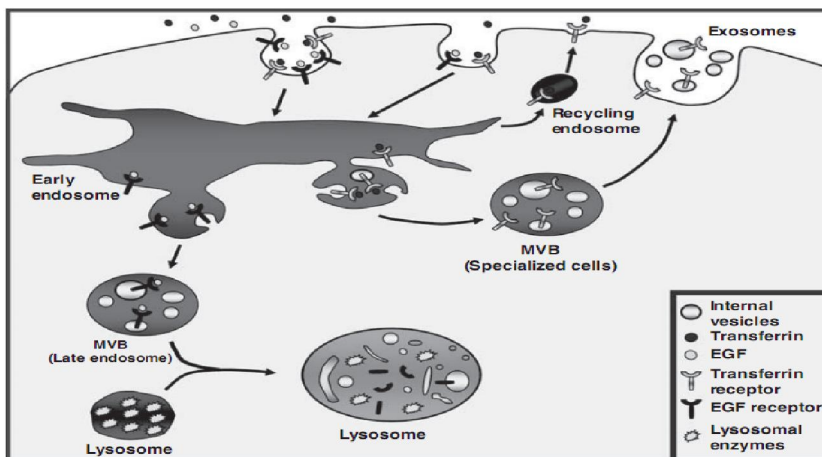
Los exosomas son vesículas de membrana que son liberadas al espacio extracelular tras la fusión de la membrana citoplasmática con los cuerpos multivesiculares (MVBs), formados en la vía endocítica (Schorey J. et al., 2008). Es por lo anterior que comparten características bioquímicas y estructurales con las vesículas intraluminales de los endosomas multivesiculares (Ostrowski M. et al., 2009).

Los exosomas se han encontrado principalmente en células hematopoyéticas (Mignot G. et al., 2006; Keller S. et al., 2006), células del linaje eritroide, mieloide y linfóide (Clayton A. et al., 2000; Clayton A. et al., 2005; Lamparski H. et al., 2002; Raposo G. et al., 1996). Los primeros estudios realizados por Johnstone en 1986 muestran la liberación de exosomas derivados de células inmaduras del linaje eritroide (reticulocitos) que liberan el receptor para transferrina a través de estas vesículas de membrana. Por lo tanto, inicialmente se propuso que la secreción de exosomas era un mecanismo a través del cual la célula se deshacía de proteínas obsoletas. Posteriormente, se han identificado estas vesículas en otros tipos celulares como en células epiteliales (Lin X. et al., 2005), neuronas (Cheruvanky A. et al., 2006), nefronas (Cheruvanky A. et al., 2006), mastocitos (Skokos D. et al., 2003), plaquetas y en células tumorales (André F. et al., 2002; Mears R. et al., 2004), células epiteliales intestinales (Buning J. et al., 2008), células microgliales primarias de murinos (Hill A. 2009) y células dendríticas (Stoorvogel W. et al., 2002). Otras funciones que se les han atribuido a estas vesículas se describirán en el siguiente apartado.

El origen de los exosomas se ha asociado con la vía endocítica (Keller S. et al., 2006), que es un sistema dinámico cuya función es ayudar a internalizar, transportar, clasificar y degradar macromoléculas (Fader C. et al., 2009). De esta forma, en el proceso de degradación de macromoléculas, se encuentran vesículas endocíticas como endosomas tempranos, endosomas tardíos (cuerpos multivesiculares) y lisosomas (Keller S. et al., 2006).

En la ruta endocítica se encuentran endosomas tempranos, que se encuentran cerca a la membrana celular y actúan como primer sitio de encuentro para las vesículas primarias endocitadas. Estas vesículas se pueden reciclar devolviéndolas a la membrana plasmática o pueden seguir el camino de los cuerpos multivesiculares (Hill A, 2009). Después se da una acidificación y se generan los endosomas tardíos, que son clave en la formación de cuerpos multivesiculares (MVBs), ya que regiones de la membrana endosómica se invaginan y se liberan dentro del endosoma tardío formando mini-vesículas internas. Estas pueden seguir dos vías; una directamente al proteasoma al haber una previa poli-ubiquitinación (degradación de proteínas) y otra donde se da la liberación al espacio extracelular al haber una mono-ubiquitinación (secreción de exosomas) (Keller S. et al., 2006; Schorey J. et al., 2008; Buschow S. et al., 2005).

FIGURA 1.1. Vía endocítica. Gráfica tomada del artículo de Fader C. et al., 2009.



1.2 Composición de exosomas

Los exosomas pertenecen a la vía endocítica, encontrándose en ellos principalmente proteínas consistentes con el origen endosomal de las vesículas, pero no proteínas típicas del núcleo, mitocondria o retículo endoplásmico (Keller S. et al., 2006). En los exosomas, derivados de diferentes células, podemos encontrar algunas características comunes como su tamaño (Keller S. et al., 2006; Théry C. et al., 2002; Clayton A. et al., 2000; Lamparski H. et al., 2002), la forma, la densidad y la composición proteica general (proteínas celulares, citosólicas o de membrana generalmente asociadas a la vía endocítica).

Su composición proteica refleja también la célula de origen, y puede incluir tanto proteínas citoplasmáticas como membranales. Es así como tenemos proteínas específicas de células inmunológicas tales como el complejo mayor de histocompatibilidad clase II (CMH-II) (Mignot G. et al., 2006), CMH-I (Mignot G. et al., 2006), y CD86 (Mignot G. et al., 2006), cuyas funciones se ven relacionadas con la activación de la respuesta inmune. Sin embargo la función inmunológica de estos exosomas puede depender del estado funcional de la célula de la que derivan. De esta forma exosomas de células dendríticas maduras presentan una mayor eficiencia en la inducción de la activación de linfocitos T, por ejemplo debido a la presencia en la superficie del exosoma de la molécula de adhesión inter-celular, ICAM-1; mientras que exosomas derivados de células dendríticas inmaduras inducen un mecanismo de tolerancia (Segura E. et al. 2008).

En células tumorales, como cáncer de ovario podemos encontrar marcadores tumorales como claudinas I, II, III, IV (Jianghog L. et al., 2009), proteínas transmembranales que se incorporan a los exosomas y pueden ser detectadas en circulación. Igualmente en diferentes tipos de cáncer encontramos una diferente composición proteica. Por otro lado en células no tumorales podemos encontrar diferentes proteínas dependiendo del origen celular como enzimas intestinales en exosomas derivados de enterocitos (Jianghog L. et al., 2009), y el receptor para

transferrina (TfR) (Johnstone R., et al., 1986) en exosomas derivadas de células eritrocitarias.

Son estructuras compuestas por una bicapa lipídica, y una composición proteica en la superficie o en el lumen, que contienen componentes hidrofílicos solubles derivados del citosol de la célula donadora (Théry C. et al., 2009). La caracterización proteómica de estas estructuras ha sido extensiva. De esta forma se han identificado proteínas que hacen parte del citoesqueleto como actina, tubulina B5 (Keller S. et al., 2006), y la cadena pesada IX de la miosina; proteínas membranales como anexina AV (Mignot G. et al., 2006), syntaxina 7, dinamina 2, Rab 1, 2, 4, 5, 6, 7, 10, 11b, 13, 15, 14, Snap 23 y la cadena pesada de la Clatrina (Segura E. et al., 2005); chaperonas (proteínas de estrés celular) como Hsc70 (Mignot G. et al., 2006), Hsp90 (Keller S. et al., 2006) y Hsp72 (Keller S. et al., 2006); moléculas transmembranales como CD13, CD93, así como Lamp-1 y Lamp-2 (Segura E. et al., 2005), marcadores relacionados con el lisosoma. De igual forma se encuentran moléculas como el receptor de transferrina en exosomas derivados de reticulocitos (Segura E. et al., 2005); moléculas de señalización como fosfolipasa C y Rho (Segura E. et al., 2005); proteínas relacionadas con la formación del cuerpo multivesicular como Alix (AIP1) (Morita E. et al., 2007), TSG 101 (gen de susceptibilidad al tumor) (Mignot G. et al., 2006) Ubiquitina (Buschow S. et al., 2005), Beclin-1 (Fader C. et al., 2009) y GAG (Segura E. et al., 2005); moléculas de adhesión como ICAM-1 (Segura E. et al., 2008). También se han encontrado las tetraspaninas (Keller S. et al., 2006) CD9 (Mignot G. et al., 2006) y CD63 (Mignot G. et al., 2006) y otras moléculas como las integrinas CD11a, CD11b, CD11c, CD18 (Segura E., et al 2005), proteínas G, esfingomielina y fosfatidilserina (Hill A. 2009).

Para su caracterización se han utilizados diferentes técnicas determinando su naturaleza vesicular y morfología (flotación sobre gradiente continuos de sacarosa, microscopia electrónica, inmunoprecipitación con perlas magnéticas) (Lamparsky H. et al., 2002), su composición proteica (análisis unidimensionales acoplado a espectrometrías de masas, Western blot y ELISA) (Clayton A. et al., 2000).

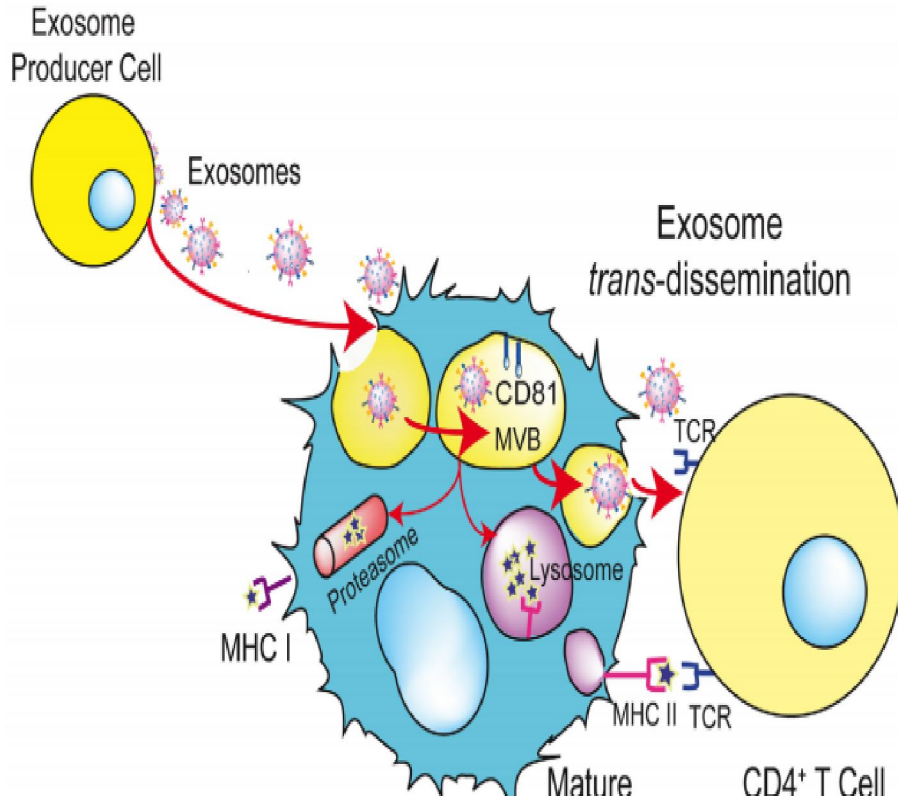
Lamparsky H. et al., 2002). La composición de proteínas de los exosomas claramente resalta su origen endosomal, diferenciándolos así de los cuerpos apoptóticos y de otras micro-vesículas, permitiendo la buena clasificación de estas vesículas extracelulares como exosomas.

1.3 Funciones de los exosomas

Entre las funciones que se le han atribuido a los exosomas se encuentran: la eliminación de proteínas obsoletas, la comunicación intercelular, y la inducción de la activación de células T antígeno específicas (Segura E., et al 2005) *in vivo*, cuando interactúan con células presentadoras de antígeno competentes, como las células dendríticas maduras (Izquierdo N. et al., 2010). De esta forma, algunos trabajos recientes liderados por el doctor Sebastian Amigorena proponen respuestas anti-tumorales mediadas por linfocitos T, de exosomas derivados de células dendríticas. Estas vesículas expresan antígenos tumorales que pueden activar tanto la inmunidad humoral como la celular y que podrían ayudar a la activación de los macrófagos sin necesidad de la interacción directa con el patógeno (Thery C. et al., 2009). Por otro lado, hay modelos en donde los exosomas se pueden asociar con la inmunosupresión en pacientes con cáncer, debido a la expresión de FasL en su superficie membranal (Ichim T. et al., 2008). Por lo tanto al disminuirlos de los líquidos extracelulares se podría generar una forma de tratar el cáncer (Ichim T. et al., 2008; Jianghog L. et al., 2009). Adicionalmente, otros trabajos han reforzado esta función inmunosupresora de los exosomas derivados de tumor a través de su capacidad para inhibir la proliferación de linfocitos T *in vitro* (Clayton A., et al., 2007).

Durante algunos procesos infecciosos virales, los exosomas podrían participar en la regulación de una respuesta inmune como consecuencia de la expresión de moléculas virales con capacidad de inhibir la función del sistema inmune (Middeldorp J. et al., 2008). En otros trabajos se ha propuesto que la asociación virus-exosomas podría constituir un mecanismo de evasión de la respuesta inmune al favorecer la dispersión viral (“hipótesis del caballo de troya”), tal como se ha visto en retrovirus como el VIH (Izquierdo N et al, 2010).

FIGURA 1.2. Proceso de trans-diseminación exosomal, gráfica tomada del artículo de la doctora Nuria Izquierdo et al, del 2010.



2. MODELO DE REGULACION DE LA SECRECIÓN DE EXOSOMAS

La secreción es un proceso celular fundamental, donde se liberan productos intracelulares de manera regulada, y se encuentra altamente desarrollada en los organismos multicelulares como medio de comunicación intercelular, en el cual se coordinan las actividades de sus células constituyentes logrando actuar como una unidad integrada (Isumi T. et al. ,2003). Este proceso presenta tres actividades importantes que envuelven la unión con la membrana, y son la penetración, la fusión y la liberación de material al espacio extracelular (Bhanu J. 2007).

En las células encontramos dos formas de secreción, primero tenemos la constitutiva donde las proteínas están siendo continuamente secretadas dependiendo de la cantidad sintetizada, y después tenemos la secreción regulada en la cual primero se sintetiza la proteína, después se almacena en organelos específicos, posteriormente se presenta un estímulo extracelular apropiado, y finalmente hay un cambio en el nivel de calcio intracelular resultando así en la liberación al espacio extracelular del contenido almacenado (Isumi T. et al.,2003). Como ejemplo de esta segunda forma tenemos la secreción de los gránulos únicos de almacenamiento presentes en el tejido endocrino y exocrino, y de los melanosomas en los melanocitos (Isumi T. et al., 2003). En el proceso de exocitosis de estas estructuras se debe tener en cuenta, que a pesar que la maquinaria para la secreción es altamente conservada en todos los organismos, desde levaduras hasta humanos, la velocidad y la cinética de la secreción varían dependiendo de la función biológica del producto almacenado y de la eficiencia de los componentes adicionales, entre ellos tenemos a un sensor que identifica los cambios en el nivel de calcio intracelular y que amplía o reduce la eficacia de los exocitosis.

2.1 ¿Cómo se regula la secreción celular de exosomas?

En los procesos de secreción de exosomas se han involucrado diferentes moléculas, entre las cuales encontramos varias proteínas que se asocian con la

exocitosis (Subfamilia Rab27, Rab11) o también algunos genes reguladores del ciclo celular (P53, que responden a las diferentes señales de estrés celular, restaurando la homeostasis celular y previniendo la acumulación de errores en las células). Estas proteínas al asociarse con sus respectivas moléculas efectoras conllevan a una secreción eficiente de productos celulares.

Las proteínas Rab son GTPasas monoméricas de la superfamilia RAS y regulan varias vías de transporte de vesículas intracelulares; su distribución y número en la célula indica una mayor complejidad del organismo y una mayor variabilidad de los compartimentos intracelulares, particularmente en los de almacenamiento. Entre estas Rabs que se involucran en la vía secretora regulada, se encuentra Rab3; en estudios anteriores se describió a una proteína con dominio similar a la rafilina3, como una de sus moléculas efectoras. Esta proteína también se encuentra en células beta pancreáticas y tejido pituitario, pero allí se le ha denominado granofilina (Isumi T., et al, 2003). Estudios adicionales han encontrado otras proteínas que comparten características con la granofilina como las secuencias amino acidíacas conservadas en el N-terminal, residuos conservados de cisteína, que es necesario para el acoplamiento de Rab con algunos efectores como las proteínas exofilinas (exocitosis por proteínas de la clase granofilina asociada a Rab3), Slp (proteínas de la clase sinaptotagmina) o Slac2 (homólogo de Slp sin dominio C2)(Isumi T., et al, 2003).

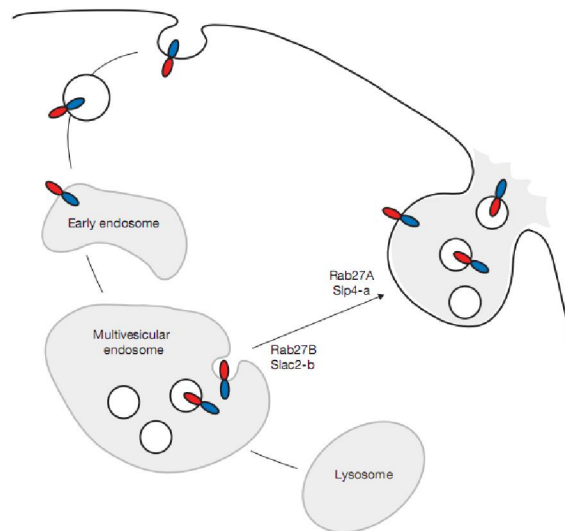
2.1.1 Subfamilia Rab27

Las proteínas Rab son GTPasas monoméricas de la superfamilia RAS y regulan varias vías de transporte de vesículas intracelulares. Esta superfamilia presenta dos subtipos Rab27a y Rab27b.

En estudios realizados por el grupo de la doctora Théry sobre Rab27 en exosomas, se indica que la pérdida de las proteínas Rabs (27a y 27b), disminuye la cantidad de exosomas recuperados, pero no su composición química, sugiriendo que estos Rabs no participan en la selección de proteínas exosomales. Rab27b une el cuerpo multivesicular con la proteína motora que los dirige hacia la

periferia y Rab27a es necesario para la fusión con la membrana plasmática. Cuando se da una depleción de Rab27b se da un incremento en la velocidad y proporción de vesículas con rápida motilidad; implicando a Rab27b en la regulación de la motilidad vesicular a largo alcance. También participa en la secreción de plaquetas. Tomando a Rab27a, su deleción hace que los cuerpos multivesiculares incrementen su tamaño (Ostrowski M et al, 2009).

FIGURA 2.1. Distribución de Rab27a y Rab27b en los compartimentos celulares relacionados con la secreción de exosomas, gráfica tomada del artículo de Pfeffer S, 2010.



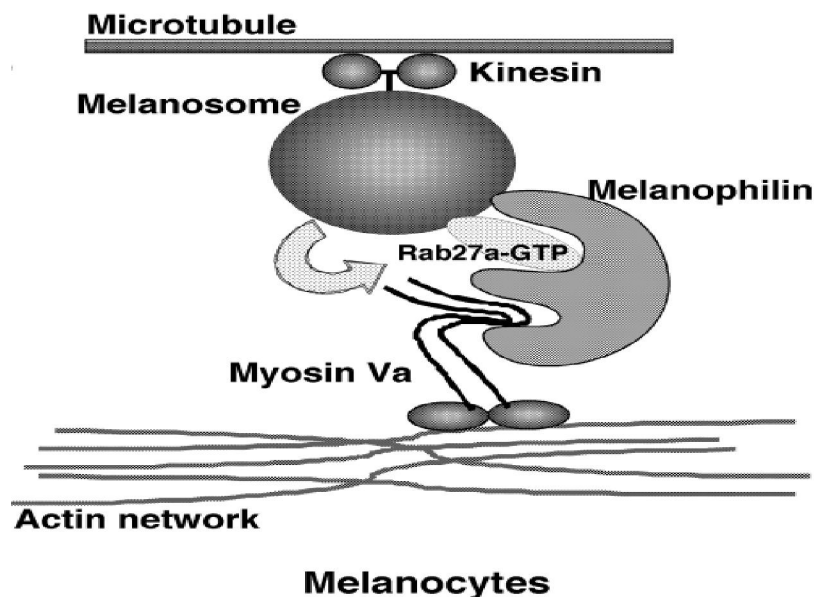
Teniendo en cuenta los estudios realizados con la subfamilia Rab27 (a y b), podemos observar una mayor participación de Rab27a en la secreción celular, debido a que estas proteínas se encuentran principalmente en organelos de almacenamiento y no en citosol.

Se ha descrito que la subfamilia Rab27 (Rab27a y Rab27b) regula la exocitosis de organelos de almacenamiento en la célula como gránulos secretorios y melanosomas, usando diferentes proteínas efectoras específicas del mismo (Isumi T., et al. 2003). Es aquí donde encontramos algunas moléculas como la granofilina (principal efector de Rab27a) y la melanofilina (efector de Rab27 también denominado exofilina3 o Slac2-a) que son los únicos efectores de Rab27 que se

han encontrado fisiológicamente, aunque hay múltiples efectores putativos (exofilinas, que en algunos casos no se han encontrado endógenamente) que conllevan a que el papel de Rab27 varíe en cada célula, dependiendo del efector empleado. Entre los efectores que son importantes en la secreción de exosomas se puede encontrar a Slp4 y Slac2b (Pfeffer S, 2010; Ostrowski M et al, 2009).

La granofilina es una proteína que se une a la syntaxina-1a y a la Munc18-1, las cuales son necesarias para la fusión de membranas y cuya interacción es de vital importancia para atar y fusionar los gránulos a la membrana plasmática. Esta unión entre proteínas se está estudiando todavía ya que no está claro si la granofilina interactúa con el complejo syntaxina-1a/Munc18-1 o con cada una independientemente (Isumi T, et al, 2003). La otra proteína efectora de Rab27 es la melanofilina, descrita en el modelo de secreción de melanosomas (Isumi T, et al, 2003), cuya función se ha determinado genética y bioquímicamente, uniendo Rab27a de los melanosomas con la miosina Va en filamentos de actina.

FIGURA 2.2. Interacción entre las moléculas asociadas a la secreción de melanosomas, gráfica tomada Isumi T, et al, 2003.



Entre otras proteínas efectoras encontramos a los efectores putativos de la proteína Rab27a, que aunque no han sido bien caracterizadas, y se desconoce

mucho de su fisiología, juegan su papel en las vías secretoras de células diferenciadas como linfocitos T citotóxicos, en este grupo tenemos a exofilina 8 (MyRIP (Proteína interactuante con Rab y Miosina VIIa)), exofilina 7 (JFC1 (Slp1, proteína 1 tipo sinaptotagmina)), exofilina 4-6 y Slp5.

En el caso particular de Rab27a varios efectores se han descrito entre ellos tenemos a: JFC1, Slp2, Slp3, Granofilina/Slp4, Slp5, Munc 13-4, Melanofilina (Slac-2a), Slac 2b y Slac2c. Estos efectores participan dependiendo de la célula donde se presenta el Rab27a. En el caso de los neutrófilos, Rab27a regula la secreción de los gránulos azurófilos, y son sus efectores Munc 13-4 y JFC1, los que coordinan la secreción. Munc 13-4 en linfocitos T citotóxicos controlan el mecanismo de fusión de granulos líticos y JFC1 previene la secreción de la mieloperoxidasa. La identificación de estos efectores puede tener implicaciones en el control de enfermedades inflamatorias severas o en enfermedades infecciosas en donde la secreción granulocítica ha estado involucrada (Brzezinska A. et al., 2008).

Uno de los efectores identificados de Rab27a, la melanofilina puede unir Rab27a y Miosina Va (proteína motor de unión a la actina), de manera indirecta para el adecuado movimiento de los melanosomas (Brzezinska A et al, 2008), a través del citoesqueleto de la célula hacia su fusión con la membrana plasmática y la posterior liberación de exosomas al espacio extracelular.

Ya habiendo mencionado las proteínas efectoras de la Rab27, y sus efectos relacionados con el transporte vesicular en melanosomas, secreción de granulos citotóxicos en linfocitos T citotóxicos y la regulación de la exocitosis en células pancreáticas (Figuereido A. et al., 2008); podemos dirigir la mirada a las moléculas que activan a Rab27. Es aquí donde encontramos a los factores intercambiadores de nucleótidos de guanina, que estimulan el intercambio de GDP por GTP, activando a la proteína Rab; entre ellas Rab3GEP, activador de Rab3 principalmente, que puede presentar una acción no-redundante como activador de Rab27 en melanocitos, debido a la relación cercana entre estos dos Rabs (Figuereido A et al, 2008). Rab27 y Rab3 son subfamilias cercanamente

relacionadas, pertenecen al mismo grupo funcional de Rabs exocíticos. En muchos tipos celulares estos Rabs presentan excesivo sobrelapamiento en su distribución subcellular como en melanosomas y en gránulos secretores de células neuroendocrinas (Figuereido A. et al., 2008); es por esto que pueden interactuar con efectores como rapfilina-3, granofilina, Slp4, y Noc2.

Rab3GEP, es una proteína con múltiples dominios funcionales, presenta una acción de intercambiador de nucleótidos de guanina en Rab27a, Rab27b y proteínas de Rab3, pero no ejercen su función en otras subfamilias (Figuereido A. et al., 2008). Su papel más común se asocia con la liberación de neurotransmisores y tráfico de vesículas sinápticas, así como en la estimulación de la secreción de células neuroendocrinas (Figuereido A. et al., 2008). Acorde con la función descrita de Rab27, de regular positivamente la exocitosis de gránulos secretores, Rab3GEP participa en el control del transporte vesicular. De este modo Rab3REP asegura que la exocitosis de los productos almacenados en las vesículas ocurran en una cinética apropiada con la función biológica (Figuereido A. et al., 2008).

Rab3GEP presenta múltiples dominios funcionales, entre ellos podemos encontrar al dominio DENN en ratas (expresado diferencialmente en células normales vs células neoplásicas), y cuya acción es homóloga al dominio MADD en humanos (Levivier E. et al., 2001), interactúa con las GTPasas de la familia RAB, y se ve involucrada con la regulación de la ruta de señalización de las MAPKs (proteínas quinasas activadoras de mitogeno) (Levivier E. et al., 2001). Otro dominio funcional de Rab3GEP es RUN (denominado así por Rpip8, Unc-14, Nesca) que puede funcionar como efector específico de GTPasas tipo RAS (Levivier E. et al., 2001). El dominio DENN tiene la actividad de intercambiador GTP/GDP, que puede interactuar con Rab3a y Rab3c; también participa en la regulación de la exocitosis dependiente de calcio en la liberación de neurotransmisores (Levivier E. et al., 2001). La proteína humana homóloga a DENN, MADD regula la vía de la ERK (Señal extracelular regulada por quinasas), e interactúa con el dominio de

muerte del receptor tipo 1 del factor de necrosis tumoral (TNFR-1), por su parte C-terminal (Levivier E. et al., 2001).

Las características generales del dominio DENN, presenta tres regiones *d*DENN, DENN y *u*DENN, que tienen diferentes patrones de secuencias conservadas y separadas por secuencias variables. Estos comparten varios aminoácidos conservados además de los aquellos involucrados en la formación del “core” de la proteína, dando a conocer su actividad enzimática. Otra participación de DENN es en la vía de señalización de quinasas inductoras de crecimiento, donde se ve activado por la proteína SFB1 (Dominio Set de unión al factor 1) (Levivier E. et al., 2001). SFB1 pertenece a las fosfatasa de la miotubularina, aumentan la regulación de señales de mitógenas, presenta un dominio GRAM, el cual esta presente en varias proteínas asociadas a procesos unidos a membranas, varios en los cuales los dominios TBC (motivo comúnmente encontrado en Tre-2, Bup2p, Cdc16p) actúan como activadores de las GTPasa tipo Rabs (Yang H. et al., 2007).

Por esto, se indica que los dominios DENN juegan un papel importante en la señalización celular, específicamente media los procesos relacionados con Rab y regula la cascada de la MAPK. Es así como la asociación de estos dominios DENN con el receptor tipo 1 del factor de necrosis tumoral (Levivier E. et al., 2001; Miyoshi J. et al., 2004) nos hace postular un mecanismo impulsado por la acción del TNF α para poder regular la secreción de exosomas en las células.

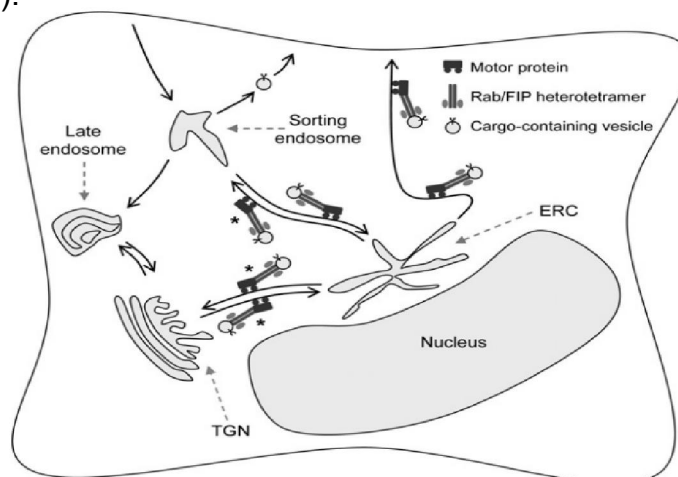
2.1.2. Rab11

La Rab11 GTPasa es un importante regulador del tráfico de membranas endocítico, incluyendo fagocitosis, transporte epitelial polarizado y entrega del transportador de glucosa dependiente de insulina (Peden A. et al., 2004). También se cree que conecta las vías secretoras y endocíticas, por su función reguladora de endosomas tempranos a la parte trans del aparato de Golgi (Savina A. et al., 2002), involucrándolo en la secreción de exosomas acorde con el modelo estudiado en células K562 (linaje tumoral eritroide) (Savina A. et al., 2002).

Como toda molécula Rab, la Rab11 presenta proteínas efectoras que se han identificado como Rabfilina11/Rab11BP, miosina Vp, quinasa β del fosfoinosítido 4, Sec16 (Horgan C., et al, 2009) y en estudios recientes se han identificado unas proteínas denominadas FIPs (proteínas que interactúan con miembros de la familia Rab11) (Peden A. et al., 2004; Horgan C. et al., 2009). Estas FIPs se pueden clasificar en tres clases; FIPs I entre los cuales se encuentra RCP, que se une tanto a Rab11GTPasa *in vivo* como a Rab4GTPasa *in vitro*, Rip11 y FIP2/nRip11 (Peden A., et al, 2004). También tenemos a FIP II con FIP3/eferina y FIP4, y FIP III que tiene solo un miembro FIP1 (Peden A. et al., 2004).

Cabe mencionar que estos FIPs, principalmente Rip11 y RCP compiten entre sí por la unión a Rab11, esto se debe a que Rab11 no es muy abundante (Peden A. et al., 2004). También de RCP se puede decir que es una proteína efectora de Rab11 que participa en el reciclaje del receptor de transferrina (TfR) y de Rip11 que se puede unir a las membranas en ausencia de Rab11, pero esta es necesaria para su correcta localización (Peden A. et al., 2004). Rip11 es responsable por la traslocación de vesículas que contiene el transportador GLUT-4 a la superficie de la membrana de adipocitos en respuesta a un tratamiento de insulina (Horgan C. et al., 2009). Las funciones de los FIPs se pueden clasificar en tres categorías, reciclaje del contenido de las vesículas a la superficie celular, entrega de membranas durante la división celular y de unión entre Rab11 y proteínas motoras (Horgan C. et al., 2009).

FIGURA 2.3 Interacción entre los FIPs y organelos secretores. Gráfica tomada del artículo de Connor Horgan, TGN (Golgi parte Trans) y ERC (retículo endoplasmático).



Como ejemplo de una manera de regulación del efector Rip11 tenemos su fosforilación y la unión de fosfolípidos dependiente de magnesio en el C-terminal de la proteína (Horgan C. et al., 2009).

Las proteínas Rab funcionan por un ciclo entre la forma biológicamente activa de unión, GTP y la inactiva GDP. Las moléculas que lo regula son los GEF y las GAP, que promueven la inactivación de las GTPasas estimulando la hidrólisis de GTP. Estas GAPs en su conformación molecular presentan un dominio TBC, que contiene aproximadamente 200 aminoácidos, y que es el encargado de reconocer a los Rabs. Al entrar a considerar este dominio se puede encontrar una proteína humana EV15, que lo presenta, y esta identificada tanto en centrosomas de células en interface como en etapas terminales de la citocinesis. Por medio de análisis proteómicos se identificó a Rab11 como la proteína que interactúa con EV15, ya que en la interface las dos proteínas están presentes en la región pericentriolar. Es por lo anterior que tomando a EV15 como un regulador de Rab11, se puede encontrar aumentada la inherente baja actividad de las GTPasas de las proteínas G, causando su inactivación y modulando todas las funciones en las cuales se involucra la proteína G (Dabbeek J. et al., 2007).

Dada la importancia del tráfico vesicular hacia el sitio de clivaje en la etapa de citocinesis del ciclo celular, se puede decir que el complejo EV15/Rab11 puede ser importante en los eventos de transporte de proteínas que facilitan este proceso (Dabbeek J. et al., 2007).

Por otro lado también se han identificado varios moduladores de señal de la proteína G (SGSM), que consisten en tres miembros: SGSM1 (expresado en cerebro), SGSM2 y SGSM3 (Yang H. et al., 2007). Con dos dominios principales RUN (de unión a proteínas RAP), involucrado en señalización celular en sistemas animales multicelulares y TBC (unión a RAB) (Yang H. et al., 2007; Dabbeek J., et al, 2007), involucrado en las funciones fundamentales de células animales y vegetales (Yang H. et al., 2007). Todos los SGSM pueden interactuar tanto con

Rab4 como con Rab11 debido a su localización citoplasmática y por tanto modulan las señales nerviosas mediadas por la proteína G y el transporte de vesículas intracelular (Yang H. et al., 2007).

Por lo anterior se puede determinar que hay dos maneras de regular la secreción de exosomas, si se toma como modelo a Rab11. Una es por medio de la acción de la EV15, cuya acción se relaciona con la Rab11GAP e inactiva la Rab11. Y la segunda, se encuentra en las señales cerebrales SGSN que funcionan como activador de la Rab11 y con el se aumenta el transporte vesicular y por ende la secreción de exosomas.

2.1.3. P53

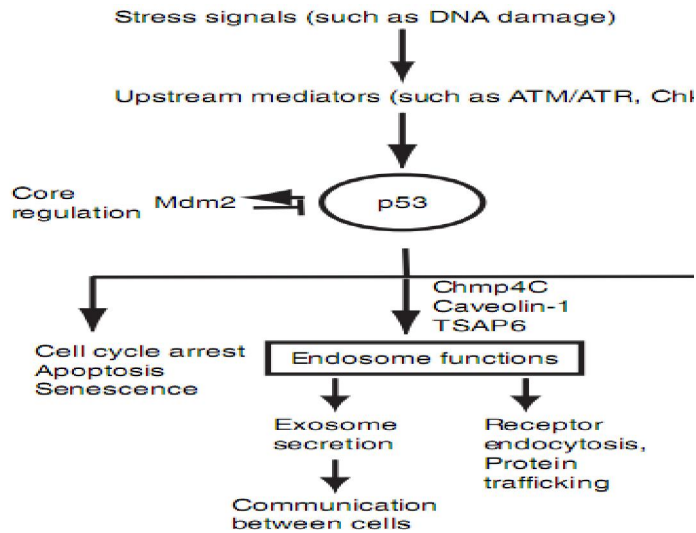
La proteína p53 es un transcrito del gen p53 que regula el ciclo celular, manteniendo la homeostasis. Su vía de señalización responde a una variedad de señales de estrés como estrés genotóxico, hipoxia, expresión de oncogenes activados (Yu X. et al., 2006), estrés oxidativo y a algunas interleuquinas como TNF α (Yamayuchi T. et al., 2007).

Parte de la respuesta de p53 al estrés es producir proteínas que se puedan comunicar con células adyacentes sin tener ningún daño estructural y así poder producir una respuesta coordinada por un grupo de células o por un tejido (Yu X. et al., 2006). Estas proteínas pueden ser de dos tipos: el primero y más conocido, como proteínas solubles, que se liberan al espacio extracelular por la fusión de vesículas originadas en la vía retículo endoplasmático/ aparato de Golgi. Y la segunda clase de proteínas secretas es como se ha demostrado en trabajos recientes a través de exosomas.

El daño al DNA producido por las señales de estrés (radiación gamma), ocasiona la transcripción de dos genes CHMP4C (Yu X. et al., 2009) y TSAP6 (Yu X. et al., 2006; Yu X. et al., 2009). Cuyas proteínas participan en el transporte selectivo de proteínas a los exosomas o en la regulación de exosomas (Yu X. et al., 2006).

Por lo anterior se encuentra que la activación de p53, regula el aumento de la producción de exosomas (Yu X. et al., 2006).

FIGURA 2.4 Respuesta celular ante un estrés genotoxico. Gráfica tomada de Yu X. et al., 2009.

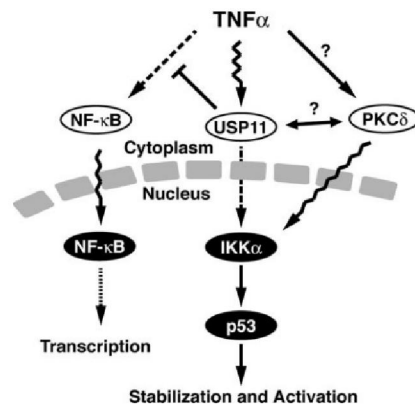


A diferencia de los mediadores como ATM/ATR (Yang J. et al. 2004), que pueden regular la activación de p53 cuando hay un daño en el DNA por radiación gamma, se puede encontrar a Sec2 fosforilado unido a p53 en presencia de un estrés oxidativo causado por peróxido de hidrogeno (Yamayuchi T. et al., 2007).

Para poder observar como se da la estabilización de la p53 cuando hay un estrés oxidativo, se puede tomar a la proteína quinasa C delta (PKC delta), que es la proteína que media la respuesta celular ante esta señal de estrés (Yamayuchi T. et al., 2007). La PKC delta, puede actuar fragmentando el DNA por su parte catalítica o actuando con la molécula tirosina quinasa c-Abl, proteína proapoptotica cuya blanco es el nucleo (Yamayuchi T. et al., 2007). Cuando se activa la PKC delta por medio de su fosforilación se da una traslocación al nucleo no solo de PKC delta sino de inhibidores de NF-kB (molécula que se activa ante la presencia de radicales de oxígeno) (IKK α) (Yamayuchi T. et al., 2007). PKC delta activa a IKK α en el núcleo y esta activación regula la transcripción de p53 (Yamayuchi T. et al., 2007).

Por otra parte se puede encontrar una respuesta de p53 debido al estrés originado por interleuquinas como TNF α (Yamayuchi T. et al., 2007), interleuquina 1, endotoxinas bacterianas o ésteres de forbol entre otros que activan NF- κ B (Yamayuchi T. et al., 2007). En esta vía controlada por ubiquitinación y deubiquitinación, encontramos a USP11 que regula la expresión de IKK α en un nivel transcripcional, y funciona como un controlador de la transcripción de p53 (Yamayuchi T. et al., 2007).

FIGURA 2.5. Estabilización de p53 por acción del TNF α . Gráfica tomada de Yamayuchi T. et al., 2007.



Por lo anterior se puede decir que la estabilidad de la p53 se puede dar por acción de IKK α y PKC cuando la señal de estrés es la presencia de radicales de oxígeno. También se puede dar activación de p53 por medio de USP11 que actúa en presencia de un estímulo por TNF α .

2.1.4. Acción del calcio en la secreción de exosomas

El calcio es una molécula que ayuda a la secreción vesicular principalmente en células sinápticas con la liberación de neurotransmisores y en las células pancreáticas con la liberación de gránulos de insulina (Shibasaki T. et al., 2004). Esta acción se da gracias a que participa en la apertura el poro exocítico en la superficie celular (Oberhauser A. et al., 1992).

El aumento del calcio intracelular (Savina A. et al., 2003), unido a la acción de las proteínas Rab27a, Rab27b (Ostrowski M. et al., 2009) y Rab11 (Savina A. et al. 2005), participa en la adecuada forma y desplazamiento normal de los cuerpos multivesiculares, ayudando a una mayor secreción de exosomas. Adicionalmente se han descrito algunos experimentos que tienen como base las células tumorales K562, en los cuales se demuestra que variaciones en las concentraciones intracelulares de calcio afectan el desarrollo de los cuerpos multivesiculares, y como consecuencia se modifica la liberación de exosomas al espacio extracelular (Savina A. et al., 2003).

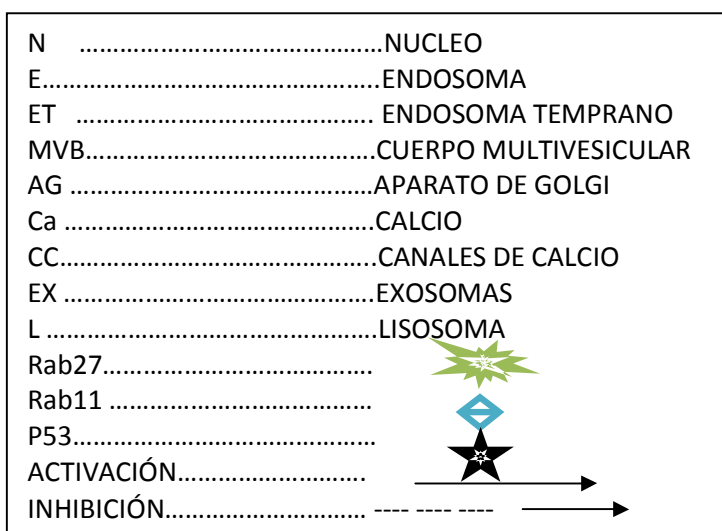
Para la adecuada secreción de exosomas y productos celulares es necesario el calcio. Es por esto que la célula es equipada con sensores que detectan los cambios de concentración intracelular de calcio, este un paso fundamental para una buena exocitosis. Entre estos sensores se puede encontrar a la sinaptotagmina que puede operar como un sensor de calcio bimodal, que cambia las uniones a lípidos durante la exocitosis, y se encuentra en contacto cercano con los canales de calcio tipo N. Tomando en cuenta los diferentes trabajos en los que el calcio sobresale como molécula importante en la exocitosis de proteínas, se puede decir que en la secreción de exosomas también juega un papel importante. El calcio interactúa con diferentes proteínas G para que se de una mayor liberación de exosomas al espacio extracelular.

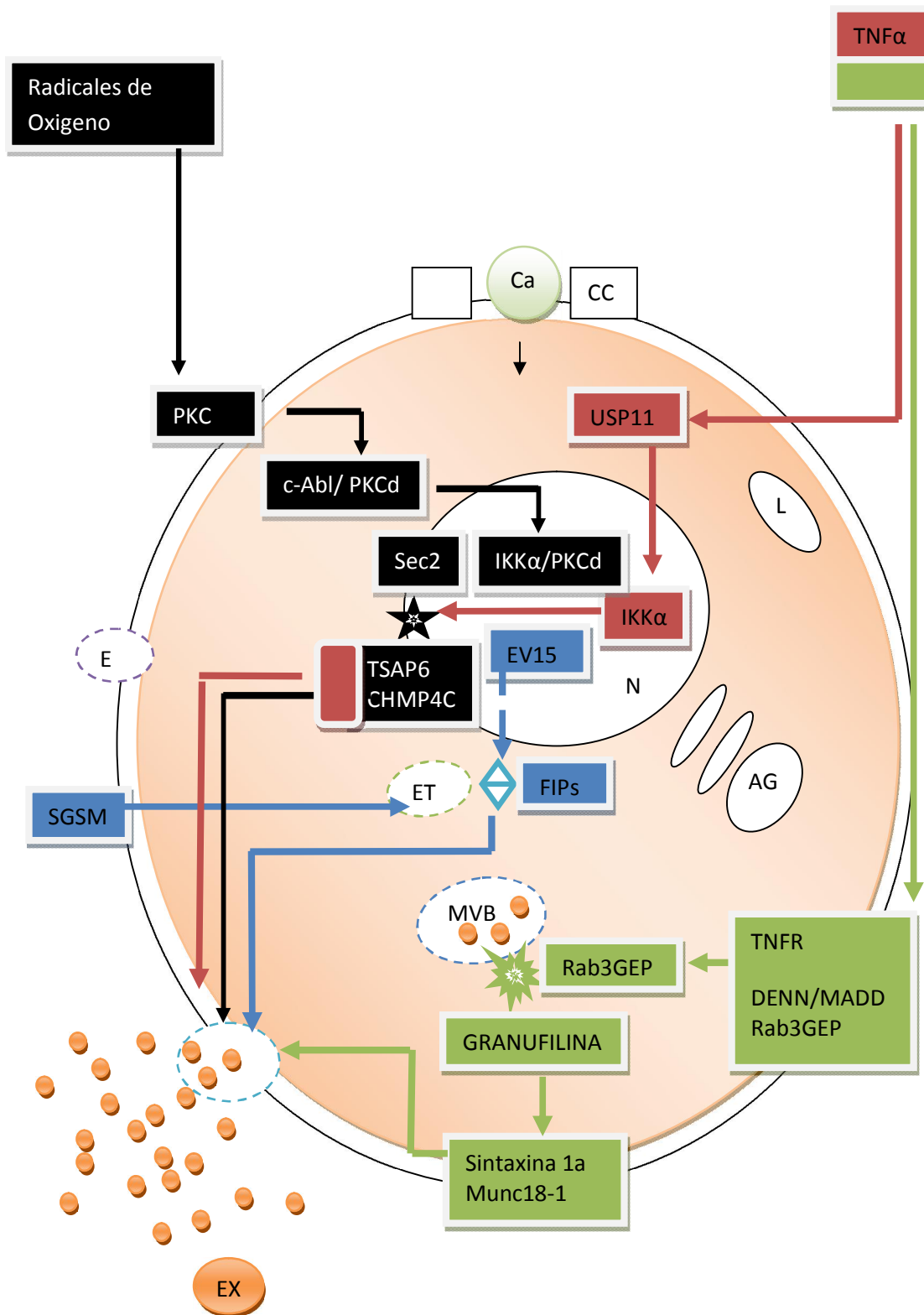
Teniendo en cuenta los mecanismos anteriormente descritos se presenta a continuación un modelo general donde se relacionan los diferentes proteínas, efectores y señales activadoras, que al interactuar podrían ayudar al incremento del transporte vesicular en los diferentes tipos celulares y a un aumento en la secreción de productos como los exosomas.

En la vía secretora de la célula tenemos diferentes proteínas, que interactúan y ayudan a la regulación de la salida de productos endosomales (exosomas) al espacio extracelular. Es aquí donde presentamos a la P53 cuyas señales activadoras (de estrés), TNF α o radicales de oxígeno regulan la transcripción de los genes TSAP6 y CHMP4C que aumentan la producción de exosomas (Yu X. et

al., 2009). Otras proteínas tienen una participación relevante en la regulación de la secreción de exosomas como Rab27a y Rab27b, cuya distribución en las vesículas secretoras ayuda a un mayor secreción de exosomas, se puede activar principalmente por acción del TNF α (estimulo primario). Adicionalmente, se encuentra el Rab11 que participa en el tráfico vesicular y por ende a una mayor secreción de exosomas ante la presencia de la señal activadora SGSM.

FIGURA 2.6. Interacción, de las señales primarias activadoras, efectores y las proteínas Rab27 (verde), Rab11 (azul), P53 (rojo y negro) y papel del calcio en el aumento de la secreción de exosomas.





GLOSARIO

ERK: Cascada de traducción de señales. Contiene ERK1 y ERK2 pertenece a un tipo de MAPK, su cascada de fosforilación se compara con el ciclo de Krebs. Tiene acción en proliferación, diferenciación, y sobrevivencia. Adicionalmente su inapropiada activación se puede per en Cáncer humano

MVB: Siglas de Multivesicular bodies, son un tipo especial de lisosoma ya que presentan actividad fosfatasa acida, también se encuentran rodeados por una membrana de 0.5-2 micras que contiene en su interior un variable número de vesículas de tamaños entre los 50nm.

PROTEINAS ASOCIADAS A EXOSOMAS

Claudinas: conjunto de proteínas transmembranales cruciales en la formación y función de fuerte ensamblaje de la mayoría de contactos apicales en células polarizadas.

Clatrina: Proteína oligomérica formada por tres cadenas pesadas y tres cadenas ligeras ordenada en forma de tres pies. Su función principal es recubrir las vesículas en el proceso de transporte entre membranas.

Dinamina 2: Es una proteína que promueve la endocitosis de células con modificaciones postranscripcionales, como fosforilaciones de residuos de Tirosina, es por esto que también se trata de una molécula apoptótica.

Rho: Es una proteína que interviene en el proceso de señalización celular. Se une a pequeñas GTP y regula una fosfatidilinositol-4-fosfato-5-quinasa en células de mamíferos.

Snap23: proteína 23 asociada con el sinaptosoma. Regula la especificidad del transporte vesicular. Hace parte del complejo sinaptobrevina/VAMP y Snap25 que sirve como sitio de unión para la maquinaria de fusión de membranas.

PROTEINAS CON ACCIONES EFECTORAS DE LA SECRECIÓN DE EXOSOMAS

JFC1: proteína que contiene el dominio C2. Puede estar involucrada en el tráfico celular unido a 3"-fosfoinositido. Se asocia con la membrana plasmática de las células vivas cuando el Calcio lo modula.

Munc13-4: proteína efectora localizada en tejido no neural como el bazo. Media la función de GTP-Rab27a para promover la secreción de gránulos.

Noc2: proteína putativa de dedos de Zinc, homologa a Rabfilina 3. Identificada originalmente en el páncreas endocrino, es esencial en la regulación de la exocitosis en estas células.

Rabfilina3: molécula blanco efectora de Rab3, tiene dos dominios C2 en su C-terminal. Está involucrada en la liberación de neurotransmisores de manera dependiente de Calcio.

PROTEINAS CON ACCIONES ACTIVADORAS DE LA SECRECIÓN DE EXOSOMAS

ATM/ATR; Sensores potenciales de daño de DNA. Proteínas que fosforilan la P53 en la serina 15 aumentando así su actividad trans-activadora.

RCP: proteína componente del receptor. Es una proteína intracelular con 148 aminoácidos que es necesario para unir la señal transductora acoplada a la proteína G con el receptor. Proteína efectora de Rab11.

Rip11: proteína efectora de Rab11, participa en la exocitosis de gránulos de insulina en células β pancreáticas. Puede actuar como sustrato de la proteína quinasa A y potencia la exocitosis por AMP cíclico en células pancreáticas.

Sec2: proteína liberadora de nucleótidos de guanina, se relaciona con transporte y se localizada en vesículas citoplasmáticas. Identificada por primera vez en *Saccharomyces cerevisiae*.

Sec16: proteína hidrofílica grande encontrada en retículo endoplasmático y superficie de vesículas, es necesaria para el transporte de vesículas desde el retículo endoplasmático. Identificada por primera vez en *Saccharomyces cerevisiae*.

USP11: Hidrolasa 11 de ubiquitina carboxi-terminal. Controla muchos procesos intracelulares como progresión del ciclo celular, activación transcripcional, y traducción de señales. En los cuales se involucra una adición y remoción de ubiquitinas.

BIBLIOGRAFÍA

- André F., Scharzt N., Chaput N., Flament C., Raposo G., Amigorena S., Angevin E., and Zitvogel L., Tumor-derived exosomes: a new source of tumor rejection antigens. *Vaccine*. 2002. 20: A28-A31.
- Bhanu J. Secretion machinery at the cell plasma membrane. *Current opinion in structural biology*. 2007. 17: 437-443.
- Büning J., Smolinski D., Taffazoli K., Zimmer K., Strobel S., Apostolaki M., Kollias G., Heath J., Ludwin D., and Gebert A. Multivesicular bodies in intestinal epithelial cells: responsible for MHC class II- restricted antigen processing and origin of exosomes. *Immunology the journal of cells, molecules, systems and technologies*. 2008. 125: 510-521.
- Buschow S., Liefhebber J., Wubbolts R., Stoorvergel W., Exosomes contains ubiquitinated proteins. *Blood cells, molecules and diseases*. 2005. 12: 221-230.
- Brzezinska A., Johnson J., Munafo D., Crozat K., Beutler B., Kiosses W., Ellis B., and Catz S. The Rab27a effectors JFC1/Slp1 and Munc13-4 regulate exocytosis of neutrophil granules. *Traffic*. 2008. 9:2151-2164.
- Cheruvanky A., Zhou H., Pisitkun T., Kopp J., Knepper M., Yuen Peter., and Star R., Rapid isolation of urinary exosomal biomarkers using a nanomembraneultrafiltration concentrator. *Journal Physiology Renal*. 2006. 292: 1657-1661.
- Clayton A., Court J., Navabi H., Adams M., Mason M., Hobot J., Newman g., and Jasani B., Analysis of antigen presenting cell derived exosomes, based on immunomagnetic isolation and flow cytometry. *Journal of immunological methods*. 2000. 247: 163-174.
- Clayton A., Turkes A., Navabi H., Mason M., and Tabi Z., Induction of heat shock proteins in B-cells exosomes. *Journal of cell science*. 2005. 118: 3631-3638.
- Clayton, A., Mitchell, J. P., Court, J., Mason, M. D., and Tabi, Z. Human Tumor-derived exosomes selectively impair lymphocyte responses to interleukin-2. *Cancer Research*. 2007. 67: 7458-7466.
- Dabbeek J., Faitar S., Dufresne C., and Cowel J. The EV15 TBC domain provides the GTPase-activating protein motif for RAB11. *Oncogene*. 2007. 26: 2804-2808.
- Denzer K., Kleijmeer M., Heijnen H., Stoorvogel W., and Geuze H. Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *Journal of Cell Science*. 2000. 113: 3365-3374.
- Fader C and Colombo M. Autophagy and multivesicular bodies: two closely related partners. *Cell death and differentiation*. 2009. 16: 70-78.
- Figueiredo A., Wasmeir C., Tarafder A., Ramalho J., Baron R., and Seabra M. Rab3GEP is the non-redundant guanine nucleotide exchange factor for Rab27a in melanocytes. *The journal of biology chemistry*. 2008. 283: 23209-23216.

- Hill A. Exosomes in neurological disease. *Neurology*. 2009. 2: 27-32.
- Horgan C., and Mccaffrey M. The dynamic Rab11-FIPs. *Biochemical Society transaction*. 2009. 37: 1032-1036.
- Ichim T., Zhong Z., Kaushal S., Zheng X., Ren X., Hao X., Joyce J., Hanley H., Riordan N., Koropatnick J., Bogin V., Minev B., Min W., and Tullis R. Exosomes as a tumor immune escape mechanism: possible therapeutic implications. *Biomedcentral*. 2008. 6: 37-44.
- Isumi T., Gomi H., Kasai K., Mizutani S., and Torii S. The roles of Rab27 and its effectors in the regulated secretory pathways. *Cell Structure and Function*. 2003. 28: 465-474.
- Izquierdo N., Naranjo M., Erkizia I., Puertas M., Borrás F., Blanco J and Martinez J. HIV and mature dendritic cells: trojan exosomes riding the Trojan horse?. *PLOS pathogens*. 2010. 6: 1-13.
- Jianghong L., Sherman S., Tsai M., Bristow R., Roden R., and Morin P. Claudin-containing exosomes in the peripheral circulation of women with ovarian cancer. *BMC cancer*. 2009. 9: 244-255.
- Johnstone R., Adam M., Hammond J., Orr L., and Turbide C., Vesicle formation during reticulocyte maturation. *The journal of biological chemistry*. 1986. 262: 9412-9420.
- Keller S., Sanderson M., Stoeck A., and Altevogt P., Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function. *Immunology letters*. 2006. 107:102-108.
- Lamparski H., Metha-Damani A., Yao J., Patel S., Hsu D., Ruegg C., and Le pecq J., Production and characterization of clinical grade exosomes derived from dendritic cells. *Journal of immunological methods*. 2002. 270:211-226.
- Levivier E., Goud B., Souchet M., Calmels T., Mornon J and Callebaut I. Udenn, DENN, and Ddenn:Indissociable domains in Rab and Map kinases signaling pathway. *Biochemical and Biophysical research communication*. 2001. 287: 688-695.
- Lin X., Zhang Z., Schluesener H., and Xu S. Role of exosomes in immune regulation. *JCMM*. 2005. 10: 364-375.
- Mears R., Craven R., Hanrahan S., Totty N., Upton C., Young S., Patel P., Selby P., and Banks R. Proteomic analysis of melanoma-derived exosomes by two-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics*. 2004. 4:4019-4031.
- Middeldorp J., and Pegtel D. Multiple roles of LMP1 in Epstein Barr virus induced immune escape. *Seminars in Cancer biology*. 2008. 18:388-396.
- Mignot G., Roux C., Théry C., Segura E., and Zitvogel L. Prospects for exosomes in immunotherapy of cancer. *JCMM*. 2006. 10: 376-388.
- Miyoshi J., and Takai Y. Dual role of DENN/MADD (Rab3GEP) in neurotransmission and neuroprotection. *TRENDS in Molecular Medicine*. 2004. 10: 476-480.

Morita E., Sandrin V., Chung H., Morham S., Gygi S.P., Rodesch C.K., and Sundquist W., Human ESCRT and ALIX proteins interact with proteins of the midbody and function in cytokinesis. *The EMBO journal*. 2007. 28: 4215-4227.

Oberhauser A., Monck J., and Fernandez J. Events leading to the opening and closing of the exocytic fusion pore markedly different temperature differences. *Biophysical Journal*. 1992. 61: 800-809.

Ostrowski M., Carmo N., Krumiech S., Fanget I., Raposo G., Savina A., Moita C., Schauer K., Hume A., Freitas R., Goud B., Amigorena S., Moita L., Thery C., Rab27a and Rab27b control different steps of the exosomes secretion pathway. *Nature Cell Biology*. 2009. 12: 19-44.

Peden A., Schonteich E., Chun J., Junutula J., Scheller R., and Prekeris R. The RCP-Rab11 complex regulates endocytic protein sorting. *Molecular biology of the cell*. 2004. 15: 3530-3541.

Pfeffer S. Two Rabs for exosome release. *Nature Cell Biology*. 2010. 12:1.

Raposo G., Nijman H., Stoorvogel W., Leijendekker R., Harding C., Melief C., and Geuze H., B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *Journal Experimental Medicine*. 1996. 183:1161-1172.

Savina A., Fader C., Damiani M., and Colombo M., Rab11 promotes docking and fusion of multivesicular bodies in a Calcium –dependent manner. *Traffic*. 2005. 6: 132-143.

Savina A., Furlan M., Vidal M., and Colombo M., Exosome released is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells. *The Journal of biological chemistry*. 2003. 278: 20083-20090.

Savina A., Vidal M., and Colombo M. The exosome pathway in K562 cells is regulated by Rab11. *Journal of cell science*. 2002. 115: 2505-2515.

Segura E., Amigorena S., and Thery C., Mature dendritic cells secrete exosomes with strong ability to induce antigen-specific effector immune responses. *Blood cells, molecules and diseases*. 2005. 35: 89-93.

Segura E., Nioco C., Lombard B., Véron P., Raposo G., Batteux F., Amigorena S., and Thery C., ICAM-1 on exosomes from mature dendritic cells is critical for efficient naïve T-cell priming. *Blood Journal*. 2008. 106: 216-223.

Schorey J., and Bhatnagar S., Exosome function: from tumor immunology to pathogen biology. *Journal Compilation*. 2008. 9:871-881.

Skokos D., Goubran H., Demeure C., Morin J., Peronet R., Birkenmeier G., Boudaly S., and Mécheri S. mast cell-derived exosomes induce phenotypic and functional maturation of dendritic cells and elicit specific immune responses in vivo. *The Journal of immunology*. 2003. 22: 1767-1776.

Shibasaki T., Sunaga Y., Fujimoto K., Kashima Y., and Seino S. interaction of ATP sensor, cAMP sensor, Ca sensor and voltage-dependent Ca channel in insulin granule exocytosis. *The Journal of biological chemistry*. 2004. 279: 7956-7961.

Stoorvogel W., Kleijmeer M., Geuze Hans and Raposo G. The biogenesis and functions of exosomes. *Traffic*. 2002. 3: 321-330.

- Thery C., Ostrowsky M and Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nature reviews of immunology*. 2009. 1-13.
- Thery C., Zitvogel L., and Amigorena S. Exosome: composition, biogénesis and function. *Nature Reviews*. 2002. 2: 569-579.
- Yamayuchi T., Kimiru J., Miki Y., and Yoshida K. The deubiquitinating enzyme USP11 controls and IKB kinase α - p53 signaling pathway in response to tumor necrosis factor α (TNF α). *The journal of biological chemistry*. 2007. 47: 33943-33948.
- Yamayuchi T., Miki Y., and Yoshida K. Protein kinase Cdelta activates IKB-kinase α to induce the p53 tumor suppressor in response to oxidative stress. *Cellular signaling*. 2007. 19: 2088-2097.
- Yang H., Sasaki T., Minoshima S., and Shimizu N. Identification the three novel proteins (SGSM1,2,3)wich modulate small G protein (RAP and RAB)-mediated signaling pathway. *Genomics*.2007. 90: 259-260.
- Yang J., Xu Z., Huang Y., Hammrick H., Duerksen P., and Yu Y. ATM and ARM: Sensing DNA damage . *World Journal of Gastroenterology*. 2004. 10: 155-160.
- Yu X., Harris S., and Levine A. The regulation of exosome secretion: a novel function of the p53 protein. *American Association for Cancer Research*. 2006. 66: 4795-4801.
- Yu X., Riley T., and Levine A. The regulation of the endosomal compartment by p53 the tumor suppressor gene. *The FEBS journal*. 2009. 276: 2201-2212.