



VALENTINA MARASSI, BARBARA RODA, ANDREA ZATTONI, PIERLUIGI RESCHIGLIAN
 LABORATORIO DI SCIENZE DELLE SEPARAZIONI
 DIPARTIMENTO DI CHIMICA "G. CIAMICIAN"
 UNIVERSITÀ DI BOLOGNA
 VALENTINA.MARASSI2@UNIBO.IT

STRATEGIE PER SEMPLIFICARE CAMPIONI ALTAMENTE COMPLESSI E CARATTERIZZARE VESCICOLE EXTRACELLULARI: ACCOPPIAMENTO DI TECNICHE ORTOGONALI E FRAZIONAMENTO IN CAMPO FLUSSO-FLUSSO A FIBRA TUBULARE POROSA

La capacità di arricchire campioni di nanoparticelle biologicamente rilevanti è cruciale per poter investigare meccanismi molecolari e di signaling cellulare: l'inserimento di un'ulteriore dimensione analitica è fondamentale per semplificare e comprendere dinamiche - e campioni- estremamente complessi.

Nel corso della loro vita, le cellule rilasciano nella matrice extracellulare una molteplicità di vescicole, sia spontaneamente che sotto stimolo (come ad esempio una patologia o variazione delle condizioni di coltura *in vitro*). In particolare, le vescicole di dimensioni tra i 30 e i 100 nm (esosomi) sono secrete da diversi tipi di cellule in seguito alla fusione di endosomi e lisosomi con la membrana plasmatica [1, 2]. La funzione biologica di questi sistemi (Fig. 1) è fondamentale ed estremamente varia, anche perché essa è dipendente dalla cellula di origine: tra le funzioni espletate dagli esosomi vi è la comunicazione intercellulare, lo scambio di materiale di membrana tra cellule e la immunomodulazione su cellule target, sia come antigeni che come vettori di proteine, DNA, RNA e frammenti nucleici [3].

La complessità del contesto biologico delle micro- e nanovesicicole le rende un argomento di estremo

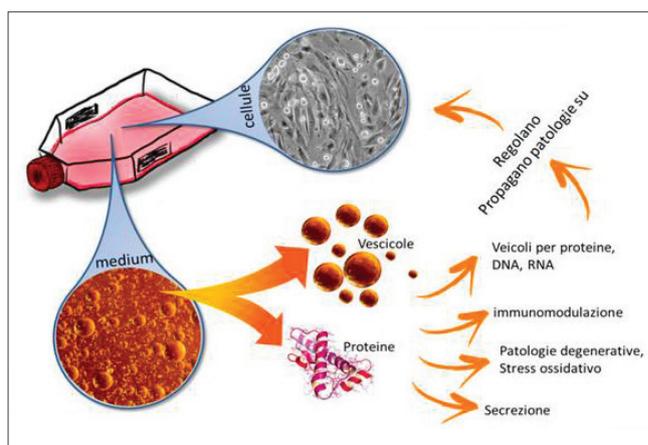


Fig. 1 - Contesto biologico delle particelle extracellulari e loro interazione con l'ambiente cellulare

interesse per la comunità scientifica e per quella chimico bio-analitica in particolare, nei vari aspetti del loro studio: caratterizzazione, quantificazione,

L'articolo è basato sul contributo presentato in occasione delle "Giornate di Chimica Analitica" dedicate alla memoria del prof. Francesco Dondi - Ferrara, 10-11 luglio 2017.

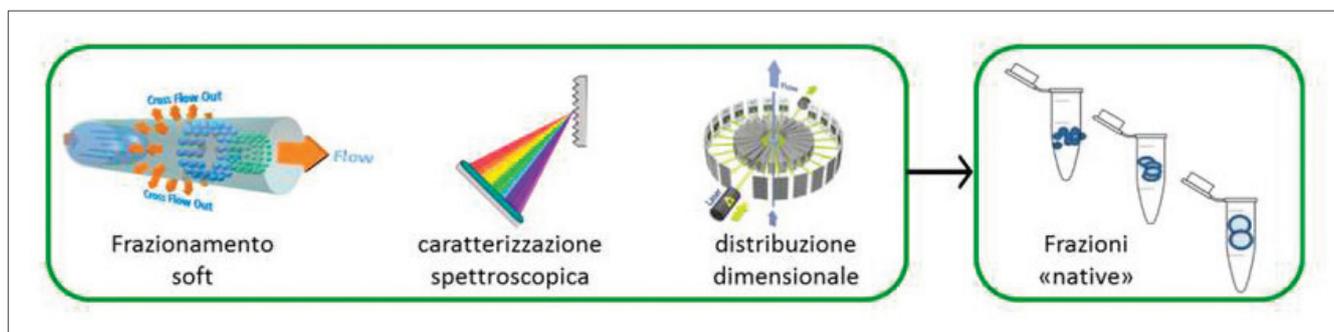


Fig. 2 - Contributo della piattaforma analitica HF5-UV-MALS

composizione chimica ed effetto biologico. Singole popolazioni hanno contenuto e ruolo differente, e la comprensione dei vari meccanismi in gioco permette lo studio approfondito di dinamiche come la carcinogenesi; inoltre, la versatilità e la completa integrabilità nei sistemi biologici rende queste vescicole interessanti candidati per applicazioni in nanomedicina, ad esempio come sistemi per drug-delivery. Una delle questioni principali per quanto riguarda la caratterizzazione di vescicole extracellulari (extracellular vesicles, EVs), però, è la difficoltà di separarle dalla restante matrice extracellulare, unita alla mancanza di metodi efficaci e rapidi di determinarne le dimensioni. L'isolamento delle EVs è un procedimento lungo e che comporta perdita di campione, come sequenze di ultrafiltrazione, ultracentrifugazione, centrifugazione a gradiente di densità e citofluorimetria, che presentano numerosi svantaggi economici e pratici, tra cui la non omogeneità del campione selezionato [4]. Nel corso della mia ricerca, presso il laboratorio di Scienze delle Separazioni del Dipartimento di Chimica G. Ciamician (Università di Bologna), il punto focale è lo sviluppo di metodi analitici che possano semplificare campioni complessi come quelli biologici in maniera rapida, selettiva ma soprattutto nativa, senza alterare le proprietà di un campione così delicato. La tecnica di elezione nel mio lavoro è il frazionamento in campo flusso-flusso (flow field-flow fractionation, FFFF), che permette di effettuare analisi di campioni nanostrutturati in condizioni native. Infatti, la separazione avviene all'interno di un canale capillare vuoto, in assenza di fase stazionaria, per effetto di un flusso idrodinamico (campo) generato ortogonalmente rispetto al flusso principale

di fase mobile [5]. Gli analiti interagiscono con il campo in base al loro coefficiente di diffusione e, di conseguenza, vengono eluiti in base alla propria dimensione idrodinamica (raggio idrodinamico, r_h). L'assenza di fase stazionaria elimina le limitazioni generalmente presenti nella scelta delle fasi mobili, e rende la tecnica facilmente accoppiabile a un sistema di multidetection (Fig. 2): l'utilizzo in serie di detector UV e laser scattering multiangolo (MALS) fornisce sia informazioni spettroscopiche, come la valutazione della purezza proteica/nucleica e del contenuto delle vescicole, sia informazioni morfologico-dimensionali, come il raggio di girazione e il fattore di forma; non da ultimo, è possibile lavorare in condizioni fisiologiche simulando l'ambiente biologico da cui il campione proviene [6]. Un altro vantaggio di questa tecnica, e in particolare della sua versione miniaturizzata (hollow-fiber flow field-flow fractionation, HF5), che permette di ridurre la diluizione del campione in analisi, è la possibilità di raccogliere frazioni ulteriormente lavorabili [7]. Come menzionato, nell'ambito della caratterizzazione delle vescicole extracellulari vi è necessità di ideare nuove strategie per purificare o sottofrazionare popolazioni esosomali, garantire un controllo qualità delle frazioni ottenute e integrare le tecnologie utili a determinare dimensioni e composizione delle particelle. In questo contesto, l'obiettivo della nostra corrente ricerca è di integrare la tecnica HF5 a quelle già usate per la caratterizzazione di EVs, e progettare metodi analitici *ad hoc* per massimizzare l'output analitico, permettendo di ottenere in una singola analisi: 1) sorting, 2) quantificazione, 3) caratterizzazione

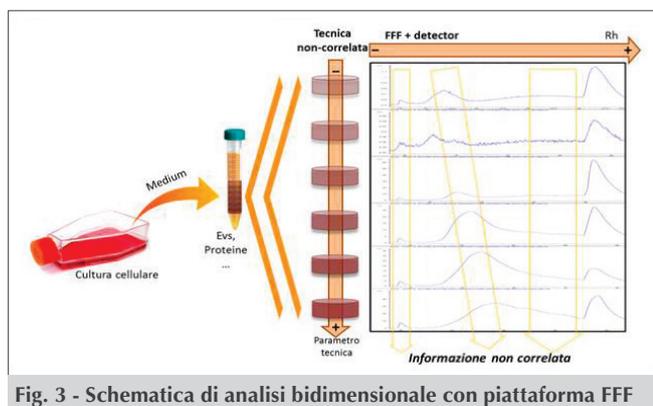


Fig. 3 - Schematica di analisi bidimensionale con piattaforma FFF

dimensionale e 4) caratterizzazione morfologica. Ciò può avvenire partendo da un campione complesso come un medium di coltura, o da campioni più raffinati già sottoposti a centrifugazione, per i quali si possa sviluppare una separazione bidimensionale frutto di principi separativi differenti (Fig. 3). Un altro auspicabile utilizzo della piattaforma fluidica è quello del riconoscimento di determinati gruppi esosomali attraverso l'uso di marker, studio ad ora impossibile per l'impraticità della procedura di tag. In collaborazione con il gruppo di Scienze Biomolecolari dell'Università di Urbino, stiamo focalizzando l'attenzione su medium di coltura derivanti da mioblasti. Essi, se condizionati, secernono due tipi di vescicole derivanti dalle membrane: nanovesicole aventi le proprietà tipiche degli esosomi, e specie più grandi, morfologicamente distinte [8]. Mediante l'analisi in condizioni fisiologiche, è stato possibile caratterizzare queste sottopopolazioni (derivanti da centrifugazione differenziale) ed evidenziare sia l'effettivo arricchimento (ma non isolamento) di esosomi e microvescicole, sia la presenza di una popolazione macroaggregata che rappresenta una porzione significativa del campione. Inoltre, è stato possibile descrivere le differenze tra le varie popolazioni in termini di contenuto (prettamente proteico per quanto riguarda gli esosomi, parzialmente nucleico per le microvescicole), dimensione e abbondanza relativa di queste specie. Inoltre, le sottofrazioni di partenza, in un mix simulato, possono essere ri-separate nelle loro componenti, dimostrando la validità e l'efficacia della piattaforma HF5-UV-MALS anche come potenziale sostituto di pretrattamenti del campione. Esperimenti promettenti sono in corso riguardo l'accoppiamento della

piattaforma HF5 con la centrifugazione a gradiente di densità che, separando secondo un principio non-correlato, permette una piena ortogonalità tra le tecniche. In conclusione, l'attività di ricerca del nostro laboratorio permette di fornire informazioni riguardo alla popolazioni e sottopopolazioni di esosomi e - più in generale - campioni di bioparticelle, per effettuare screening di diverse fonti *in vitro* ed *ex vivo*, con lo scopo di selezionare le popolazioni con maggiore carattere diagnostico, e di purificare le frazioni contenenti le informazioni ricercate (DNA/RNA, markers in seguito a marcatura...).

BIBLIOGRAFIA

- [1] F. Praticchizzo, A. Giuliani, V. De Nigris *et al.*, *Diabetes Obes. Metab.*, 2016, 855.
- [2] S. Ohno, G.P. Drummen, M. Kuroda, *Int. J. Mol. Sci.*, 2016, **27**, 172.
- [3] M. Guescini, S. Genedani, V. Stocchi *et al.*, *J. Neural Transm.*, 2010, **117**, 1.
- [4] R. Szatanek, J. Baran *et al.*, *Int. J. of Mol. Med.*, 2015, **36**(1), 2015.
- [5] V. Marassi, B. Roda, S. Casolari *et al.*, *Microc. J.*, 2018, **136**, 149.
- [6] A. Zattoni, B. Roda, F. Borghi *et al.*, *JPBA*, 2014, **87**, 53.
- [7] V. Marassi, L. Di Cristo *et al.*, *RSOS*, 2018, **5**(1), 171113.
- [8] M. Guescini, D. Guidolin, L. Vallorani *et al.*, *Exp. Cell Res.*, 2010, **316**(12), 1977.

Tools to Simplify Highly Complex Biological Media and Characterize Extracellular Vesicles: Hyphenation of Orthogonal Techniques to Hollow-Fiber Flow Field-Flow Fractionation

The ability of separating and enriching biologically relevant nanoparticles, such as exosomes, is crucial to better investigate specific molecular and signaling patterns: a soft separation step such as flow field-flow fractionation, coupled with a multidetection platform, can add another dimension and provide uncorrelated information to the existing characterisation techniques and give insight to unravel such complex dynamics.