



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI UDINE

Dipartimento di Area Medica
Corso di Laurea in Biotecnologie
(L-2)

Tesi di Laurea

**Caratterizzazione di vescicole extracellulari
da colture liquide di caffè**

RELATORE:
Prof. Marco Zancani

LAUREANDO:
Riccardo Maccaroni

CORRELATRICI:
Dott.ssa Azzurra Di Bonaventura
Dott.ssa Dora Scarpin

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

Indice

1. Riassunto.....	1
2. Summary.....	2
3. Introduzione.....	3
3. 1. Caffè: proprietà e benefici per la salute	3
3. 2. Colture cellulari	3
3. 2. 1. Colture cellulari vegetali	4
3. 2. 2. Utilizzi delle sospensioni cellulari vegetali.....	5
3. 3. Vescicole extracellulari	6
3. 3. 1. Biogenesi degli esosomi.....	7
3. 3. 2. Funzioni fisiologiche negli organismi vegetali	8
3. 3. 3. Applicazioni degli esosomi vegetali	9
4. Scopo del lavoro	11
5. Materiali e metodi.....	12
5. 1. Sospensioni cellulari	12
5. 2. Isolamento degli esosomi.....	13
5. 3. Determinazione delle dimensioni delle vescicole.....	15
5. 4. 1. TEM	15
5. 4. 2. Analisi delle immagini con <i>software ImageJ</i>	15
5. 4. 3. Saggio di diffusione dinamica della luce (DLS).....	17
5. 4. Quantificazione delle proteine	18
5. 5. Elettroforesi analitica (SDS-PAGE).....	19
5. 6. <i>Western Blot</i>	21
5. 7. Analisi statistica	22
6. Risultati e discussione.....	23
6. 1. Morfologia delle vescicole.....	23
6. 1. 1. Osservazione al TEM e analisi con <i>software ImageJ</i>	23
6. 1. 2. Confronto misurazioni al TEM e al DLS	24
6. 2. Quantificazione delle proteine	26
6. 3. <i>Western blot</i>	27
7. Conclusioni	28
8. Bibliografia	29

1. Riassunto

Gli esosomi sono vescicole extracellulari (EVs) sferiche e di dimensioni generalmente comprese tra 50 e 150 nm, coinvolte nel trasporto di biomolecole e nella comunicazione intercellulare. Soprattutto per quanto riguarda quelli di origine vegetale, sono ancora poco conosciuti e studiati, ma stanno guadagnando crescente attenzione in quanto in futuro potrebbero avere promettenti applicazioni biomediche e agronomiche.

In questo lavoro di tesi sono stati isolati e caratterizzati esosomi prodotti da cellule di caffè. Come materiale di partenza è stato scelto di utilizzare le sospensioni cellulari, in modo tale da poter isolare gli esosomi attraverso centrifugazioni differenziali, in quanto rilasciati dalle cellule nel mezzo colturale. Sono state ottenute due frazioni di esosomi: la prima ricavata da una centrifugazione di 36 minuti a 100'000 g e la seconda isolata in seguito ad un'ulteriore centrifugazione di 6 ore a 125'000 g.

È stata effettuata una caratterizzazione della morfologia e delle dimensioni di queste vescicole attraverso il saggio di diffusione dinamica della luce (DLS) e tramite immagini ricavate al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) e analizzate con il software *ImageJ*. Dai risultati ottenuti è possibile affermare che le EVs di caffè isolate in questo esperimento hanno diametro compreso tra i 30 e i 200 nm, paragonabile alle dimensioni di altri esosomi di origine vegetale indicati in letteratura.

Per una valutazione indiretta della quantità di esosomi presenti nei campioni, è stata misurata la concentrazione di proteine attraverso il saggio di Bradford. I dati indicano un maggiore contenuto proteico nella frazione ottenuta dalla centrifugazione di 6 ore. Ciò potrebbe essere dovuto alla diversa composizione delle vescicole rispetto a quelle contenute nell'altra frazione.

Infine, attraverso il *Western blot* è stato possibile identificare l'origine delle vescicole, individuando componenti proteiche del plasmalemma e del reticolo endoplasmatico. Non si sono evidenziati, invece, marcatori di membrane di vacuolo e del Golgi.

Elenco delle abbreviazioni usate nel testo

Albumina di siero bovino (BSA), deviazione standard (SD), *Endosomal sorting complexes for transport* (ESCRT), endosomi precoci (EE), *Exocyst-positive organelle* (EXPO), Fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF), microscopio elettronico a trasmissione (TEM), *Multivesicular bodies* (MVBs), Murashige & Skoog (MS), Penetration 1 (PEN1), *Phosphate-buffered saline* (PBS), saggio di diffusione dinamica della luce (DLS), sodio dodecilsolfato (SDS), Target of Myb 1 (TOM-1), tetraspanina (TET), *Trans Golgi network* (TGN), *Tris-buffered saline* (TBS), vescicole extracellulari (EVs), vescicole intraluminari (ILVs).

2. Summary

Exosomes are spherical extracellular vesicles (EVs) typically ranging from 50 to 150 nm and involved in the transport of biomolecules and intercellular communication. Although plant-derived exosomes remain relatively underexplored, they are attracting increasing attention due to their potential biomedical and agronomic applications.

In this thesis, exosomes produced by coffee cells were isolated and characterized. Cell suspensions were used as the starting material, allowing exosome isolation via differential centrifugation as they were secreted into the culture medium. Two exosome fractions were obtained: the first following a 36-minutes centrifugation at 100,000 g, and the second after an additional 6-hours centrifugation at 125,000 g.

The morphology and size distribution of the isolated vesicles were characterized using dynamic light scattering (DLS) and transmission electron microscopy (TEM). TEM images were further analysed with *ImageJ* software. The results indicate that the coffee-derived EVs have diameters ranging from 30 to 200 nm, which is consistent with the size of plant-derived exosomes reported in the literature.

To indirectly estimate the quantity of exosomes in the samples, protein concentration was determined using the Bradford assay. The results indicate a higher protein content in the fraction obtained from the 6-hours centrifugation, which may be attributed to differences in vesicle composition compared to those in the other fraction.

Finally, by means of Western blot analysis, it was possible to identify the origin of the vesicles, detecting the presence of protein components from the plasma membrane and endoplasmic reticulum, while markers for the membranes from vacuole and Golgi apparatus were not observed.

3. Introduzione

3.1. Caffè: proprietà e benefici per la salute

Il caffè è una delle bevande più consumate al mondo e la sua produzione si basa principalmente su due specie: *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre ex A.Froehner. Il suo consumo, oltre a fattori culturali e alle sue uniche proprietà organolettiche, è dovuto alla visione sempre più diffusa come alimento funzionale (de Melo Pereira *et al.*, 2020). Infatti, sempre più studi stanno evidenziando una correlazione tra un consumo regolare di caffè ed effetti positivi sulla salute, attribuibili ai composti bioattivi contenuti nei semi di questa pianta e, di conseguenza, presenti anche nel prodotto finale.

I principali metaboliti secondari contenuti nel caffè sono: alcaloidi (*e.g.*, caffeina, trigonellina), composti fenolici (*e.g.*, acidi clorogenici) e diterpeni (*e.g.*, cafestolo, caveolo) (Munyendo *et al.*, 2021). Come riportato nella meta-analisi di Liu *et al.* (2015), il consumo di caffè e in particolare della caffeina sembrerebbe essere associato a un minor rischio di cirrosi e fibrosi epatica. La trigonellina ha effetto antidiabetico; infatti, lo studio di Van Dijk *et al.* (2009) ha dimostrato che l'assunzione di trigonellina e acidi clorogenici contribuisce a controllare i livelli ematici di insulina e glucosio. Gli acidi clorogenici sono stati largamente studiati e sono stati dimostrati molti effetti benefici per la salute, tra cui antiossidanti, antinfiammatori, antimutageni e antitumorali (Munyendo *et al.*, 2021). Cafestolo e caveolo hanno anch'essi attività antinfiammatoria, epatoprotettiva, antitumorale e antidiabetica (Ren *et al.*, 2019). Inoltre, nello studio di Guzzo *et al.* (2016), questi diterpeni si sono rivelati essere in grado di interagire con il sistema adrenergico, inducendo il rilascio di noradrenalina e avendo quindi effetti analgesici.

Infine, il caffè sembra avere anche un'azione protettiva riguardo alcune malattie neurodegenerative: i bevitori abituali di caffè mostrano una minor incidenza di Parkinson e Alzheimer. Tuttavia, a causa della loro complessa patogenesi, è difficile dimostrare e chiarire gli effetti che il caffè ha sulla prevenzione di queste malattie (Wierzejska, 2017).

Oltre a questi metaboliti secondari, anche le EVs potrebbero contribuire agli effetti benefici del caffè. Una conferma a questa ipotesi è data dallo studio di Kantarcioğlu *et al.* (2023), il quale ha evidenziato la presenza di queste nanoparticelle nella bevanda del caffè e ne ha analizzato il contenuto di microRNA, concludendo che potrebbero avere effetti terapeutici su malattie croniche del fegato. Sono quindi necessari ulteriori studi per comprendere pienamente le caratteristiche e le potenzialità delle EVs di caffè.

A tale scopo, le colture cellulari e, in particolare, le sospensioni cellulari, potrebbero rivelarsi un metodo innovativo per una loro produzione controllata e standardizzata.

3.2. Colture cellulari

Le colture cellulari sono ottenute tramite tecniche che da molti anni consentono di far crescere le cellule *in vitro* in un ambiente strettamente controllato, in cui vengono assicurate condizioni adeguate di temperatura e pH, corretta disponibilità di nutrienti e asepsi. Adattando la composizione del mezzo colturale e le condizioni di crescita, si può indurre la proliferazione di svariate tipologie di cellule: umane, animali, vegetali, fungine e batteriche (Salaudinn, 2022).

3. 2. 1. Colture cellulari vegetali

Le piante, essendo organismi sessili, sono costrette a fronteggiare continue pressioni esterne, causate dall'ambiente o da altri organismi viventi. In particolare, in caso di danneggiamenti meccanici, come ferite, hanno sviluppato una notevole capacità rigenerativa che permette loro di riparare e sostituire tessuti e organi compromessi. Ciò ha attratto la curiosità della comunità scientifica già da più di un secolo fa. Nel 1902 Haberlandt fu il primo a ipotizzare la possibilità di sfruttare questa caratteristica per realizzare colture cellulari vegetali *in vitro*. Nonostante non fosse in grado di indurre la divisione cellulare *in vitro*, descrisse il concetto di callo come massa di cellule disorganizzata che si forma in risposta ad una ferita a partire da cellule vegetali differenziate (Eibl *et al.*, 2018; Fehér, 2019). La prova sperimentale della sua ipotesi è arrivata negli anni '30 del secolo scorso, quando sono stati ottenuti con successo la proliferazione e il mantenimento a lungo termine di colture tissutali vegetali (Fehér, 2019). Successivamente è stata dimostrata la fondamentale importanza di fitormoni come auxine e citochinine per indurre la proliferazione cellulare *in vitro*. Generalmente, una concentrazione maggiore di auxine rispetto a quella delle citochinine favorisce lo sviluppo di radici, mentre se prevalgono le citochinine viene favorito lo sviluppo di apici caulinari. Infine, un rapporto bilanciato tra le due categorie di ormoni, determina il mantenimento e la proliferazione della massa cellulare in uno stato indifferenziato (Skoog & Miller, 1957).

Le colture cellulari possono essere realizzate potenzialmente a partire da qualsiasi pianta, isolando una porzione di tessuto, detta espianto, che viene sterilizzato attraverso trattamento chimico, e viene posto sul terreno di coltura solido, contenente i fitormoni e i nutrienti necessari per la crescita. Il materiale così ottenuto viene lasciato in incubazione in condizioni di crescita controllate. Dai margini dell'espianto avviene la crescita del callo formato da cellule indifferenziate. I calli devono essere trasferiti regolarmente in un terreno di coltura fresco per garantire il mantenimento della proliferazione cellulare, evitando l'esaurirsi delle sostanze necessarie a questo scopo. Inoltre, i calli possono fungere da inoculo per la realizzazione di colture cellulari in terreno liquido, dette sospensioni cellulari (Wilson & Roberts, 2012). Generalmente esse sono caratterizzate dalla presenza di aggregati della grandezza massima di alcune centinaia di cellule, una condizione che comporta l'aumento della superficie di contatto delle cellule con il mezzo di crescita e, conseguentemente, una maggiore velocità di crescita rispetto ai calli (Eibl *et al.*, 2018).

Sia per quanto riguarda le colture cellulari su terreno solido che per le sospensioni cellulari, per garantire che le cellule rimangano indifferenziate e in attiva crescita e divisione cellulare, devono essere assicurate una serie di caratteristiche del mezzo di coltura e dell'ambiente. Le cellule vegetali necessitano di sei macronutrienti essenziali (azoto, potassio, calcio, magnesio, fosforo e zolfo) e di vari micronutrienti che devono essere presenti nel mezzo colturale. Inoltre, per la loro crescita *in vitro*, soprattutto se avviene al buio, è necessaria anche una fonte di carbonio. Lo zucchero maggiormente impiegato per le colture cellulari vegetali è il saccarosio, in quanto poco costoso e relativamente resistente a pH e temperatura. Come detto in precedenza, è importante anche la presenza dei fitormoni e in particolare una concentrazione equilibrata di auxine e citochinine. In aggiunta, dev'essere accuratamente regolato il pH del terreno di coltura, in quanto da esso dipende la velocità delle reazioni biochimiche e il trasporto delle sostanze. Infine, devono essere assicurate le corrette condizioni ambientali di incubazione, soprattutto per quanto riguarda la temperatura e la luce. Se si intende mantenere le cellule indifferenziate, le colture cellulari vengono incubate al buio, in quanto la luce può costituire un

fattore di stress o può agire da morfogeno, favorendo il differenziamento tissutale (Pasternak & Steinmacher, 2024).

3. 2. 2. Utilizzi delle sospensioni cellulari vegetali

Le colture cellulari vegetali, e soprattutto le sospensioni cellulari, non vengono sfruttate solo per la ricerca di base, ma stanno guadagnando sempre più importanza anche per la produzione di svariati composti d'interesse, come metaboliti secondari e proteine ricombinanti, utili, ad esempio, nell'industria farmaceutica, cosmetica e agroalimentare (Häkkinen *et al.*, 2024).

Le proteine ricombinanti possono essere prodotte utilizzando colture cellulari derivate da espianti transgenici, oppure trasformando le cellule in sospensione. In genere ciò viene fatto sfruttando la capacità del batterio *Agrobacterium tumefaciens* di trasmettere un plasmide di DNA, che si integra nel genoma delle cellule vegetali (Schillberg *et al.*, 2013). Ad esempio, nello studio di Shaaltiel *et al.* (2007), è stata dimostrata la possibilità di produrre l'enzima glucocerebrosidasi in sospensioni cellulari di carota, utile per il trattamento della malattia di Gaucher. Oltre agli enzimi, le sospensioni cellulari vegetali sono state utilizzate efficacemente per la produzione di altre proteine ricombinanti, come anticorpi, citochine, fattori di crescita, ormoni e vaccini. Inoltre, inserendo peptidi segnale all'estremità N-terminale, le proteine ricombinanti possono essere secrete dalle cellule, rendendo più semplice la loro estrazione e purificazione (Schillberg *et al.*, 2013).

I metaboliti secondari sono definiti come metaboliti non direttamente coinvolti nella crescita e nello sviluppo della cellula vegetale o della pianta (Prashant & Bhawana, 2024). Essi vengono sintetizzati in piccole quantità in risposta a segnali di stress come: mancanza di nutrienti, attacco da parte di patogeni e fattori ambientali (Jalota *et al.*, 2024). La loro diffusione a livello commerciale è spesso scarsa a causa della loro complessa sintesi chimica e dei limiti dell'agricoltura tradizionale, che sarebbe ambientalmente insostenibile per una produzione su larga scala. Molte ricerche si stanno quindi concentrando sul perfezionare nuove tecniche per la sintesi di metaboliti secondari basate sulle sospensioni cellulari (Figura 3.1) (Wilson & Roberts, 2012). Rispetto all'agricoltura tradizionale, l'utilizzo delle colture cellulari vegetali presenta numerosi vantaggi, molti dei quali derivanti dalle condizioni di crescita strettamente controllate *in vitro*, come l'indipendenza dalle stagioni, la minor richiesta di acqua, le minori emissioni di carbonio e nessun utilizzo di pesticidi ed erbicidi (Eibl *et al.*, 2018). Tuttavia, l'utilizzo di cellule indifferenziate presenta il grosso svantaggio di avere una scarsa produzione di metaboliti secondari rispetto alle cellule differenziate (Wilson & Roberts, 2012). Le principali strategie messe in atto per superare questa problematica sono l'ingegneria genetica, che tuttavia è limitata dalla scarsa conoscenza delle complesse vie metaboliche alla base della produzione di queste sostanze, e l'utilizzo di induttori (Wilson & Roberts, 2012). Questi ultimi sono sostanze che possono rappresentare precursori metabolici o, in alternativa, molecole che, costituendo una fonte di stress per le cellule, stimolano una maggiore produzione di metaboliti secondari. I più utilizzati ed efficaci nelle tecniche *in vitro* sono sostanze di origine biologica prodotte da patogeni, rilasciate dalla pianta in seguito all'azione patogena o prodotte dalla pianta stessa in risposta a un'infezione o a condizioni di stress. Possono agire da induttori anche mezzi fisici, come variazioni di temperatura e soprattutto la luce, i quali, modificando le

condizioni di crescita della coltura cellulare, possono determinare una maggiore sintesi di metaboliti secondari (Jalota *et al.*, 2024).

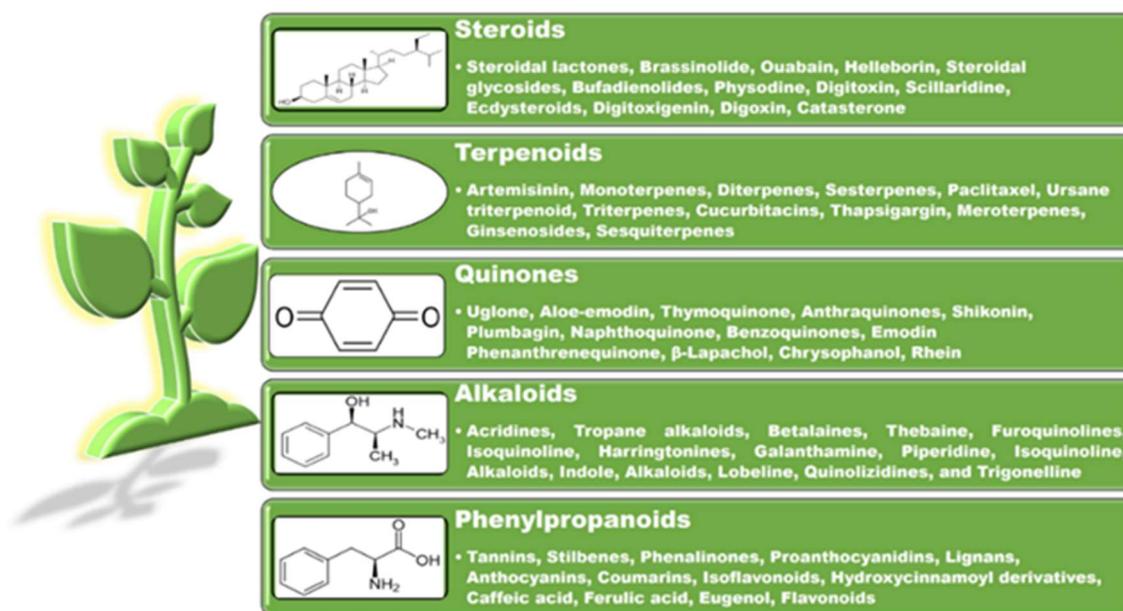


Figura 3.1: Metaboliti secondari che possono potenzialmente essere prodotti utilizzando le colture cellulari vegetali (Prashant & Bhawana, 2024).

Oltre all'ottenimento di composti d'interesse industriale e commerciale, le sospensioni cellulari sono un'ottima tecnica per la produzione e caratterizzazione delle EVs. In quanto, essendo rilasciate all'interno del mezzo di coltura, il loro isolamento è possibile attraverso protocolli relativamente semplici, come ad esempio filtrazione e centrifugazione differenziata (Ambrosone *et al.*, 2023).

3.3. Vescicole extracellulari

Gli esosomi sono EVs di forma sferica e di piccole dimensioni, generalmente comprese tra 50 e 150 nm, che possono essere rilasciate praticamente da tutte le cellule eucariote. A differenza di quanto ritenuto inizialmente, si stanno rivelando essere dei veicoli importanti per il trasporto di biomolecole e per la comunicazione intercellulare. Esistono altre due principali tipologie di EVs: le microvescicole e i corpi apoptotici. Le prime sono una popolazione eterogenea di vescicole generate per gemmazione dalla membrana plasmatica, con una grandezza compresa tra 100 e 1000 nm. I secondi vengono rilasciati dalla membrana plasmatica nelle ultime fasi dell'apoptosi, contengono vari componenti citosolici, compresi organelli e membrane, e hanno dimensioni tra 100 e 5000 nm (Mathieu *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2019).

I primi studi sull'argomento si sono concentrati sull'isolamento e la caratterizzazione degli esosomi di origine animale e hanno rivelato che possono essere ottenuti a partire da cellule, tessuti e fluidi corporei di pressoché qualsiasi specie di mammifero. Negli ultimi anni, invece, stanno guadagnando crescente attenzione gli esosomi di origine vegetale, che in futuro potrebbero avere promettenti applicazioni biomediche e agronomiche, ma necessitano ancora di notevoli attività di ricerca per comprenderne le potenzialità (Mu *et al.*, 2023).

3.3.1. Biogenesi degli esosomi

Le EVs di origine vegetale sono morfologicamente simili a quelle prodotte da cellule animali e anch'esse contengono proteine, acidi nucleici, lipidi e metaboliti primari e secondari, che possono variare in base alla specie e alla tipologia di cellula di provenienza (Lian *et al.*, 2022).

La biosintesi degli esosomi nell'uomo e nei mammiferi in generale è stata largamente studiata e può avvenire seguendo diverse vie, la principale delle quali è basata sui complessi enzimatici ESCRT (*Endosomal Sorting Complexes for Transport*) e sulla formazione dei *MultiVesicular Bodies* (MVBs). L'evento che dà inizio al processo è un'endocitosi e la successiva maturazione dell'endosoma precoce in endosoma tardivo. Entrano quindi in gioco i complessi ESCRT per la formazione di vescicole intraluminali (ILVs, *Intraluminal Vesicles*). ESCRT-0 raggruppa i substrati ubiquitinati che saranno inclusi nelle vescicole, ESCRT-I e ESCRT-II formano un ripiegamento della membrana dell'endosoma verso l'interno e ESCRT-III è responsabile della scissione della membrana dell'endosoma da quella della nuova vescicola che gemma all'interno di esso. L'accumulo di vescicole intraluminali porta alla formazione di un MVB (Mathieu *et al.*, 2019; Dyball & Smales, 2022).

La biogenesi degli esosomi vegetali ricalca per molti tratti quella degli esosomi di origine animale, infatti, anch'essi vengono prodotti principalmente dai complessi ESCRT durante la maturazione dei MVBs. Una conferma a queste similitudini è arrivata dall'identificazione degli omologhi di ESCRT-I, -II e -III nel genoma di *Arabidopsis*, l'attività di ESCRT-0 nelle piante sembra essere effettuata dalla proteina TOM-1 (*Target Of Myb1*). La via endocitica nelle cellule vegetali non è stata caratterizzata in modo preciso come per le cellule animali. Le vescicole formate dalla gemmazione interna della membrana plasmatica prendono il nome di endosomi precoci (EE, *Early Endosomes*) e raggiungono il *Trans Golgi Network* (TGN). Una parte degli endosomi matura a MVBs grazie all'azione dei complessi ESCRT, responsabili dell'accumulo di ILVs, e la fusione dei MVBs con la membrana plasmatica libera gli esosomi all'esterno della cellula (Subha *et al.*, 2023). Le vescicole prodotte seguendo questa via sono caratterizzate dalla presenza di specifici biomarcatori nella loro membrana: le tetraspanine TET8 e TET9 (Ambrosone *et al.*, 2023). Recentemente sono stati identificati esosomi vegetali contenenti un altro biomarcatore, ossia la sintaxina *penetration 1* (PEN1), i quali sembrerebbero anch'essi originare dal sistema TGN/EE, ma la loro biogenesi non coinvolgerebbe i MVBs (Figura 3.2) (Lian *et al.*, 2022).

Inoltre, esistono alcune vie alternative per la biosintesi degli esosomi nei vegetali: una che riguarda degli organelli chiamati EXPO (*EXocyst-Positive Organelle*), una che coinvolge i vacuoli e una gli autofagosomi (Figura 3.2). Gli EXPO sono organelli simili agli autofagosomi, di forma sferica e con una doppia membrana. Essi possono fondersi alla membrana plasmatica rilasciando all'esterno vescicole a membrana singola con caratteristiche simili agli esosomi dei MVB, ma di dimensioni maggiori e con un diverso marcatore proteico, Exo70E2, che ne conferma la diversa origine. Sono state osservate ILV all'interno di piccoli vacuoli, derivanti dalla loro fusione con i MVB. Sembrerebbe quindi che alcune EVs possano essere originate dalla fusione di questi vacuoli con la membrana plasmatica. Infine, anche gli autofagosomi possono fondersi con i MVB e successivamente rilasciare il loro contenuto nello spazio extracellulare (Ambrosone *et al.*, 2023).

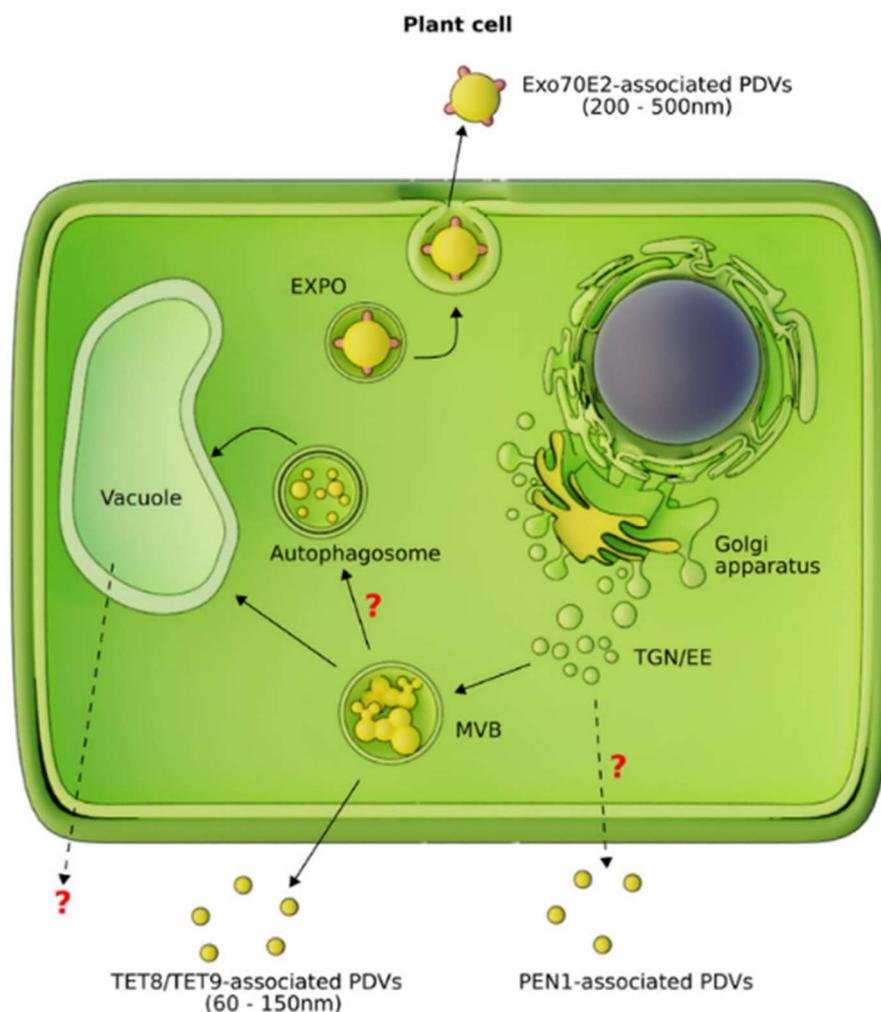


Figura 3.2: Biogenesi degli esosomi nelle cellule vegetali. I punti interrogativi indicano possibili vie non ancora definite con precisione (Lian *et al.*, 2022).

Negli organismi vegetali, le EVs una volta raggiunto l'ambiente extracellulare devono anche attraversare la fitta rete costituita dalla parete cellulare. Gli esosomi contengono diverse idrolasi, che potrebbero essere responsabili di una destabilizzazione temporanea di questa struttura, facilitando il passaggio verso l'esterno (Ambrosone *et al.*, 2023).

3.3.2. Funzioni fisiologiche negli organismi vegetali

Una volta rilasciati nell'ambiente extracellulare, gli esosomi sono in grado di raggiungere cellule anche distanti dalla loro origine e trasportare una varietà di biomolecole operando nella comunicazione intercellulare. Per esempio, grazie al contenuto di miRNA sono in grado di regolare epigeneticamente varie attività cellulari, come la proliferazione, il differenziamento e la risposta a diversi stimoli ambientali o biologici (Figura 3.3) (Yang *et al.*, 2023). Inoltre, contengono molti enzimi, in particolare sono ricchi di idrolasi che potrebbero essere coinvolte in meccanismi di rimodellamento della parete cellulare (Figura 3.3) (Lian *et al.*, 2022). Una delle principali funzioni degli esosomi nelle piante sembrerebbe essere quella di agire nel contesto delle interazioni con i microorganismi. Come dimostrato nello studio di De Palma *et al.* (2020), le EVs rilasciate dalle radici della pianta del pomodoro inibiscono la germinazione di diversi patogeni vegetali in vitro. Questo possibile coinvolgimento nella risposta immunitaria

potrebbe essere dovuto alla presenza di un gran numero di proteine che notoriamente partecipano alla difesa dai patogeni, ma anche al silenziamento genico mediato da RNA (Figura 3.3). Sembrerebbe inoltre che gli esosomi partecipino anche nei processi di simbiosi: la tetraspanina 8-1 del fagiolo comune (omologo del marcatore esosomiale di *A. thaliana* TET8) viene attivata trascrizionalmente durante la formazione delle micorrize arbuscolari e il suo silenziamento riduce il numero di noduli e la fissazione dell'azoto (Parra-Aguilar *et al.*, 2023).

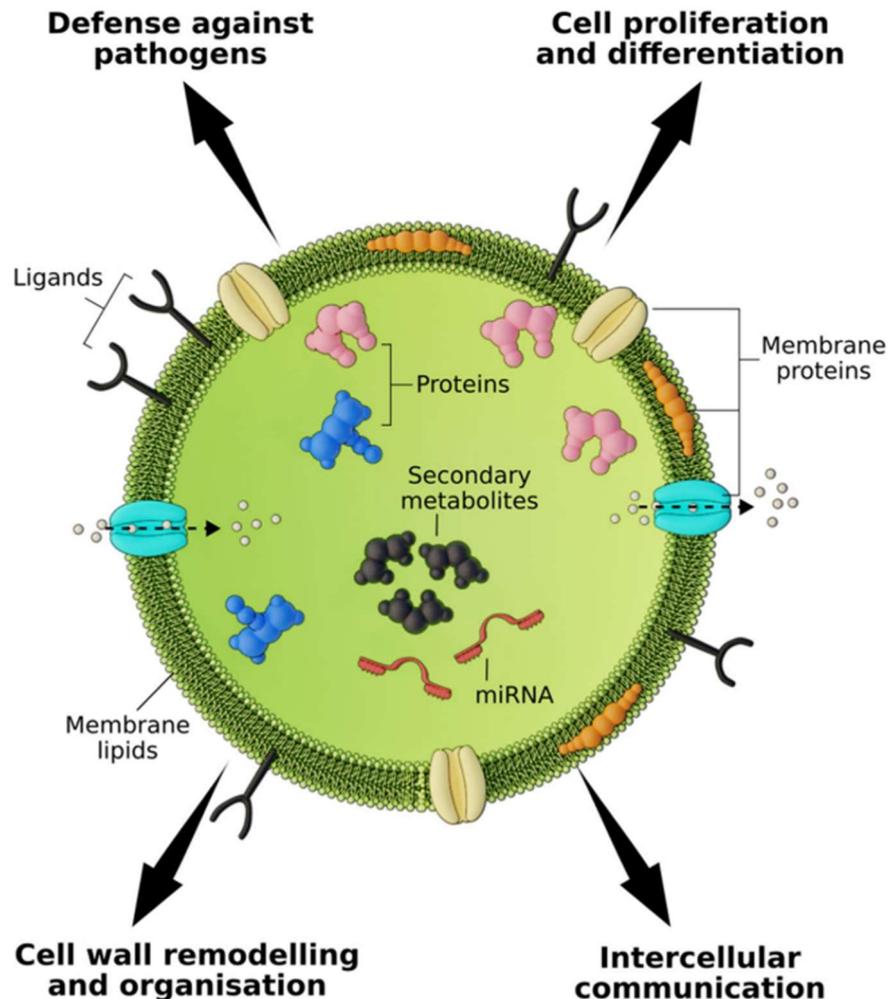


Figura 3.3: Rappresentazione della struttura di un esosoma di origine vegetale, delle diverse categorie di biomolecole che contiene e delle principali funzioni nella fisiologia vegetale (Lian *et al.*, 2022).

3.3.3. Applicazioni degli esosomi vegetali

Come per gli esosomi di origine animale, anche gli esosomi vegetali potrebbero essere utilizzati in futuro per finalità di *drug delivery*, cioè la veicolazione di un farmaco ad uno specifico tessuto o cellula target grazie alla loro stabilità, biocompatibilità e alla capacità di superare le barriere biologiche e di raggiungere specifici tessuti. Potrebbero inoltre essere preferibili a quelli derivati da cellule animali sia per i probabili minori costi di una produzione su larga scala basata su cellule vegetali, sia per quanto riguarda la sicurezza sulla salute (Mu *et al.*, 2023). Infatti, è stato dimostrato che le cellule tumorali secernono più esosomi rispetto a quelle sane e queste vescicole mediano l'iniziazione e la diffusione tumorale. Questi esosomi

possono preconditionare il microambiente tumorale, contribuendo alla creazione della nicchia pre-metastatica e aumentando la probabilità di successo del processo metastatico (Panfoli & Bruschi, 2020). Quindi, l'utilizzo di esosomi animali per scopi terapeutici potrebbe essere associato a potenziali rischi, come la possibile stimolazione della proliferazione tumorale (Ou *et al.*, 2023).

Negli ultimi anni svariati studi stanno evidenziando il naturale potenziale terapeutico degli esosomi vegetali in moltissimi ambiti diversi, conferito dalla varietà di biomolecole che trasportano. Hanno infatti attività antiossidante, antinfiammatoria, antitumorale, antimicrobica e rigenerativa nei confronti di tessuti danneggiati (Subha *et al.*, 2023).

Per esempio, nell'interessante studio di Raimondo *et al.* (2015), esosomi estratti dal succo di *Citrus limon* si sono rivelati essere in grado di inibire la crescita di diverse tipologie di cellule tumorali *in vitro*, senza intaccare le cellule normali. Essi hanno indotto l'apoptosi selettivamente nelle cellule tumorali e questi risultati sono stati confermati anche su un modello di *xenograft in vivo*, provando la capacità di queste vescicole di raggiungere il sito tumorale. Gli esosomi vegetali alleviano anche l'infiammazione indotta dai farmaci chemioterapici, che spesso è associata a farmacoresistenza e metastasi (Lian *et al.*, 2022). Infatti, nello studio di Ou *et al.* (2023) è stata dimostrata la capacità di esosomi isolati da foglie di *Catharanthus roseus* di raggiungere gli organi del sistema immunitario, in seguito a iniezione intraperitoneale in modelli murini, e di alleviare l'immunosoppressione indotta dal chemioterapico ciclofosfamide.

Gli esosomi di mirtillo hanno capacità epatoprotettive soprattutto grazie alle loro proprietà antiossidanti. In un esperimento che ha riguardato topi alimentati con una dieta ricca di grassi, queste EV hanno limitato le disfunzioni del fegato e l'accumulo di grasso viscerale a livello del fegato (Zhao *et al.*, 2022).

Esosomi estratti da frumento sembrerebbero avere proprietà rigenerative, in quanto in un modello *in vitro* hanno incrementato l'espressione di geni legati alla guarigione delle ferite, stimolato la risposta di fibroblasti e coordinato l'angiogenesi (Şahin *et al.*, 2019).

Gli esosomi vegetali, oltre ad essere in grado di proteggere le piante da patogeni, possono proteggere anche i mammiferi dalle infezioni. Inoltre, come riportato dallo studio di Teng *et al.* (2018), vescicole isolate dallo zenzero contengono RNA che possono alterare la composizione del microbiota intestinale e la fisiologia dell'ospite, determinando effetti positivi sulle coliti in modelli murini.

Infine, gli esosomi vegetali potrebbero avere molti impieghi in ambito agronomico, per esempio sfruttando la loro capacità di agire da mediatori nella comunicazione intercellulare e di intervenire nei processi immunitari delle piante per proteggere le colture dalle infezioni (Ambrosone *et al.*, 2023).

In futuro, quindi, gli esosomi vegetali potrebbero avere svariate applicazioni terapeutiche e in ambito agricolo, sia grazie alle loro naturali proprietà benefiche sia come strumento per veicolare i farmaci. Inoltre, grazie alle loro caratteristiche antinfiammatorie, antiossidanti e alle attività benefiche anche nei confronti della flora batterica intestinale, potrebbero essere utilizzati per la realizzazione di formulazioni nutraceutiche.

4. Scopo del lavoro

Lo scopo di questa attività di tesi consisteva nell'individuazione di un metodo relativamente semplice e ripetibile per l'isolamento di esosomi da sospensioni cellulari di caffè, che assicurino l'ottenimento di una popolazione di vescicole di dimensioni e morfologia omogenee, derivanti da un'origine spontanea e non dovuta ad alterazioni meccaniche delle cellule.

Gli esosomi ottenuti sono stati sottoposti sia ad una caratterizzazione morfometrica che all'analisi della composizione proteica, allo scopo di identificarne le possibili vie di biogenesi. Infatti, dal momento che la membrana di queste vescicole contiene molte proteine intrinseche, l'analisi attraverso tecniche immunologiche permette l'individuazione di marcatori proteici del plasmalemma e dei diversi organelli e sistemi endomembranosi, consentendo di identificare la loro possibile origine intracellulare.

5. Materiali e metodi

5. 1. Sospensioni cellulari

Le sospensioni cellulari di *C. arabica* cv. Castillo sono state ottenute inoculando frammenti di callo friabile precedentemente ottenuto da espianti fogliari.

In entrambi i casi è stato impiegato il terreno di coltura Murashige & Skoog (MS), ampiamente utilizzato per la crescita *in vitro* di cellule vegetali. Ad esso sono stati aggiunti zuccheri, in particolare 30 g/L saccarosio e 100 mg/L mioinositolo, e agar come agente gelificante per quanto riguarda il terreno solido. Come ormoni di crescita sono stati utilizzati l'acido 2,4,5-triclorofenossiacetico, come auxina, e la chinetina, come citochinina, entrambi alla concentrazione di 1 mg/L. Essi avevano lo scopo di favorire la crescita e la divisione cellulare, per l'induzione della callogenesi e il successivo mantenimento delle cellule in uno stato indifferenziato.

Le colture cellulari liquide sono state allevate in beute Corning con il tappo ventilato e il fondo con alette (Figura 5.1). Per ogni beuta, l'inoculo è stato eseguito trasferendo 2 g di callo friabile (peso fresco) e 50 mL di terreno MS. Le sospensioni cellulari così ottenute sono state poste nell'incubatore Thermo Fisher Scientific MaxQ6000 (Figura 5.1) a 26°C e 90 rpm, al buio.

Ogni 10-12 giorni è stata effettuata una subcoltura prelevando da ogni beuta 10 mL di sospensione cellulare e trasferendoli in una nuova beuta con 40 mL di terreno MS fresco, ottenendo sempre un totale di 50 mL. Ciò ha permesso di evitare l'esaurimento dei nutrienti, mantenendo le cellule in attiva crescita e divisione cellulare.

Per prevenire possibili contaminazioni da parte di microrganismi, gli inoculi e le subcolture sono stati effettuati lavorando sotto cappa a flusso laminare e utilizzando strumentazione opportunamente sterilizzata o monouso.



Figura 5.1: incubatore-agitatore orbitale Thermo Fisher Scientific MaxQ6000 e beute Corning con sospensioni cellulari.

5. 2. Isolamento degli esosomi

L'isolamento degli esosomi è stato effettuato a partire da sospensioni cellulari di 15-17 giorni. Il processo consta di due fasi principali: la prima è una filtrazione e la seconda è composta da una serie di centrifugazioni e ultracentrifugazioni.

La filtrazione ha lo scopo di rimuovere dalla fase liquida le componenti più grossolane, come cellule e frammenti cellulari. È stato utilizzato un filtro di vetro sinterizzato Schott Duran 3 con pori di dimensione di 16-40 μm . Esso viene inserito in una beuta codata, collegata ad una pompa a vuoto in modo tale da creare una leggera depressione, che renda più rapida ed efficace la filtrazione (Figura 5.2).



Figura 5.2: sistema di filtraggio.

La fase liquida ottenuta dalla filtrazione è stata sottoposta a centrifugazione differenziale, tecnica caratterizzata da una serie di centrifugazioni di velocità e durata progressivamente crescenti. Ciò determina la sedimentazione delle particelle in sospensione e rende possibile la loro separazione in base alle diverse dimensioni. Le prime sono centrifugazioni preparative, utili alla rimozione di frammenti cellulari e corpi apoptotici eventualmente ancora presenti in sospensione, e sono state realizzate utilizzando una centrifuga Beckman Coulter Avanti J-26S XP con rotore Beckman Coulter JA-25.50 (Figura 5.3). La prima è stata effettuata a 3000 g per 6 minuti. Il pellet è stato eliminato e il surnatante sottoposto a una seconda centrifugazione a 12'000 g per 12 minuti. Anche in questo caso è stato conservato solamente il surnatante.

Sono state infine effettuate le centrifugazioni che permettono la sedimentazione e quindi l'isolamento delle vescicole più piccole, gli esosomi. È stata utilizzata un'ultracentrifuga Beckman Optima LE-80k con un rotore ad angolo fisso Beckman TYPE 70 Ti (Figura 5.4).



Figura 5.3: centrifuga Beckman Coulter Avanti J-26S XP e rotore Beckman Coulter JA-25.50.



Figura 5.4: ultracentrifuga Beckman Optima LE-80k e rotore ad angolo fisso Beckman TYPE 70 Ti.

Il surnatante è stato quindi sottoposto a un'ultracentrifugazione a $100'000\text{ g}$ per 36 minuti. Il pellet rappresenta la prima frazione di esosomi su cui saranno effettuate le successive analisi e viene indicato con la sigla 36C. Il surnatante ha subito un'ultima ultracentrifugazione a $125'000\text{ g}$ per 6 ore e il pellet costituisce il secondo campione di esosomi, indicato con 6C. Nelle sigle di entrambi i campioni il numero indica la durata della centrifugazione e la lettera C la cultivar Castillo. In entrambi i casi il pellet è stato risospeso in un tampone composto da PBS (*Phosphate-buffered saline*) e 25 mM trealosio, utilizzando un omogeneizzatore Potter-Elvehjem, per separare le vescicole che in seguito alle ultracentrifugazioni formano aggregati grossolani.

Questa metodica di isolamento degli esosomi è stata ripetuta 3 volte per ottenere 3 repliche biologiche dei campioni 36C e 6C.

I campioni così ottenuti vengono conservati in congelatore a -20°C . Il trealosio contenuto nel tampone di risospensione è un componente fondamentale per la corretta conservazione delle vescicole. Infatti, esso è uno zucchero naturale e non tossico, frequentemente utilizzato come agente disperdente e crioprotettore. Come riportato nello studio di Bosch *et al.* (2016), l'aggiunta di 25 mM trealosio al PBS si è dimostrata essere efficace nel prevenire l'aggregazione di vescicole in sospensioni altamente concentrate, nel preservare la loro integrità in seguito a congelamenti e scongelamenti ripetuti e ad evitare che aumenti l'ampiezza della distribuzione delle loro dimensioni.

5.3. Determinazione delle dimensioni delle vescicole

Alcune delle informazioni principali che consentono il riconoscimento e la caratterizzazione degli esosomi sono le dimensioni, la morfologia e la carica superficiale delle vescicole. Per una valutazione precisa della morfologia, i campioni 36C e 6C sono stati osservati al TEM. Le immagini ottenute sono state poi analizzate con *software ImageJ*, con il quale è possibile misurare l'area delle particelle. Infine, come metodo aggiuntivo per ottenere una stima delle dimensioni, è stato utilizzato il saggio di diffusione dinamica della luce (DLS, *Dynamic Light Scattering*), il quale ha il vantaggio di permettere anche la misurazione del potenziale Zeta (ζ *potential*) e quindi della carica superficiale delle vescicole.

5.4.1. TEM

L'osservazione è stata effettuata con un microscopio elettronico a trasmissione FEI Tecnai G2 e ha riguardato campioni 36C e 6C derivanti da tre diverse estrazioni. Per ogni campione è stata utilizzata una goccia di soluzione, circa 25 μ L, posta su un retino con *mesh* 400 e fissata con acetato di uranile per due minuti. Durante l'osservazione al microscopio è stato possibile acquisire delle immagini grazie ad una fotocamera digitale Olympus Veleta (Figura 5.5).

5.4.2. Analisi delle immagini con *software ImageJ*

ImageJ è il programma informatico di elaborazione digitale di immagini che è stato utilizzato per ricavare informazioni sulle dimensioni delle vescicole nelle fotografie realizzate al TEM. L'analisi è stata realizzata rispettando la seguente scaletta di azioni:

- Si carica l'immagine con il programma *ImageJ* e si imposta la scala di misura ricalcando con una linea la scala riportata in figura e nella sezione *Analyze - Set scale* è possibile riportare la grandezza e l'unità di misura.
- Si selezionano le misurazioni che si intende far svolgere al *software* in *Analyze - Set measurement*, spuntando *area*, *perimetro* e *Shape descriptors*. Questi ultimi comprendono una serie di parametri quali: *Circularity* ($4\pi \times [\text{Area}] / [\text{Perimetro}]^2$), *Aspect Ratio* ($[\text{Asse maggiore}] / [\text{Asse minore}]$), *Roundness* ($4 \times [\text{Area}] / \{\pi \times [\text{Asse maggiore}]^2\}$) e *Solidity* ($[\text{Area}] / [\text{Convex area}]$) (Chitwood *et al.*, 2015).
- A questo punto si carica l'immagine nell'estensione *Labkit*, *plugin* di *ImageJ*, con cui è possibile creare e "istruire" un *Classifier*. Si tratta di uno strumento che può essere utilizzato per riconoscere gli oggetti presenti nell'immagine (nel nostro caso gli esosomi) ed etichettarli con un colore diverso rispetto allo sfondo. Questa tecnica è chiamata "segmentazione" (Figura 5.5).
- Attraverso la funzione *Show Probability Map in ImageJ* viene creata un'immagine in scala di grigi, nella quale bit più scuri corrispondono ad una maggiore probabilità di appartenere a vescicole.
- Utilizzando lo strumento *Magic Wand* vengono selezionate le vescicole, escludendo quelle che toccano i lati dell'immagine e gli oggetti anomali. È possibile regolare la tolleranza della selezione in modo tale da renderla più precisa possibile.
- Il comando *Edit - Selection - Create Mask* permette di generare un'immagine binaria, nella quale gli oggetti selezionati in precedenza sono bianchi su sfondo nero.

- Confrontando l'immagine ottenuta con quella originale, è possibile correggere le vescicole che risultano essere unite oppure con buchi all'interno, utilizzando il pennello oppure le opzioni *Erode*, *Dilate*, *Open*, *Close* e *Fill Holes* nella sezione *Process - Binary*.
- Una volta raggiunto un risultato accettabile, si seleziona *Analyze - Analyze Particles* per ottenere le misurazioni delle vescicole. Si spunta l'opzione *Show-Overlay masks* che associa ogni misurazione alla particella corrispondente nell'immagine, permettendo di escludere dai dati eventuali misurazioni errate.
- I dati ottenuti vengono infine raccolti su un foglio Excel.

Il protocollo descritto, in caso di immagini più difficoltose da analizzare, è stato leggermente adattato per ottenere misurazioni più precise.

Sono state analizzate immagini fino ad ottenere un numero di misurazioni adeguato ai fini statistici; infatti, sono state misurate le dimensioni di almeno 100 vescicole per ogni replica di entrambi i campioni.

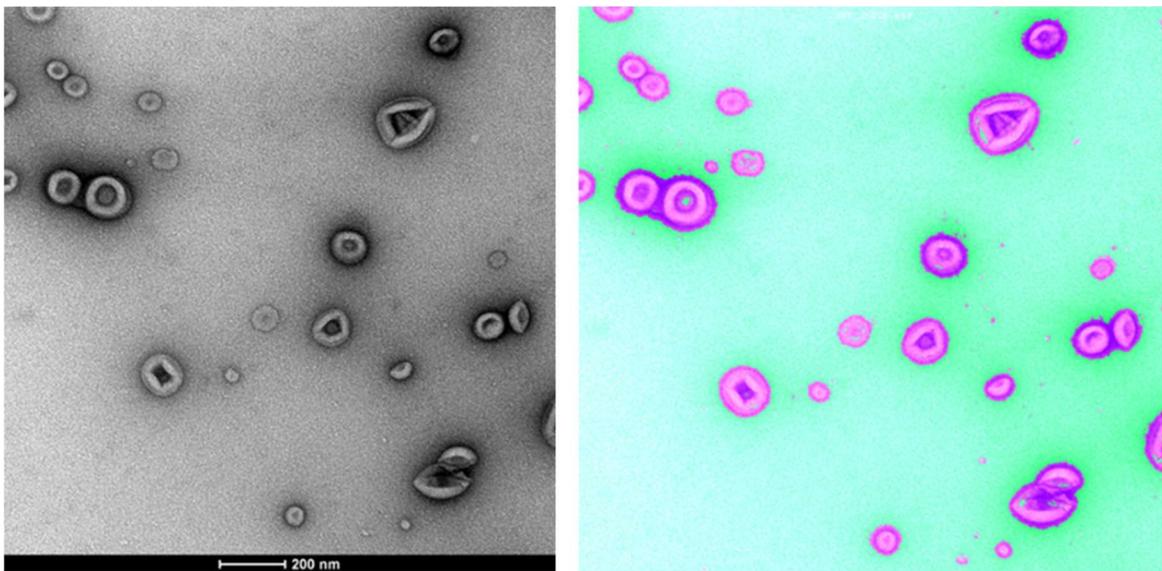


Figura 5.5: immagine di vescicole acquisita al TEM (a sinistra) e relativa segmentazione ottenuta dall'estensione Labkit (a destra), in cui sono osservabili gli esosomi evidenziati in viola su sfondo verde.

5. 4. 3. Saggio di diffusione dinamica della luce (DLS)

Il saggio di diffusione dinamica della luce (DLS) è stato effettuato utilizzando lo strumento Nicomp 380 ZLS *Particle Sizer* (Figura 5.6). Esso è in grado di misurare il diametro idrodinamico medio delle particelle presenti in sospensione e il potenziale ζ .

La misurazione è basata sulla dispersione della luce di un raggio laser quando colpisce le particelle, la quale permette allo strumento di ricavare informazioni sulla loro velocità. Le particelle si muovono secondo il moto Browniano e di conseguenza la loro velocità sarà inversamente proporzionale alla loro dimensione. In base alla relazione di Stokes-Einstein, conoscendo la temperatura e la viscosità del solvente, è possibile determinare il diametro idrodinamico di una particella misurandone la velocità. Il potenziale ζ , invece, è una misura della carica superficiale delle particelle in sospensione. Lo strumento è in grado di determinarlo applicando un campo elettrico al campione, per poter misurare la mobilità elettroforetica delle particelle. Attraverso l'equazione di Henry calcola poi il potenziale ζ , che è direttamente proporzionale alla mobilità elettroforetica (Bhattacharjee, 2016).

Per entrambe le frazioni, 36C e 6C, l'analisi è stata effettuata in triplicato, ponendo in una cuvetta trasparente 100 μL di campione e 2,9 mL di acqua bidistillata. La cuvetta viene quindi inserita nello strumento per la misurazione delle dimensioni e del potenziale ζ .



Figura 5.6: Nicomp 380 ZLS Particle Sizer.

5. 4. Quantificazione delle proteine

Per ottenere una quantificazione indiretta delle vescicole contenute nell'estratto, è stato utilizzato il saggio di Bradford, che permette di stimare la concentrazione di proteine in soluzione. Questa tecnica è basata sul colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 e sulla sua capacità di formare complessi con le proteine tramite interazioni elettrostatiche con amminoacidi basici e idrofobiche con amminoacidi aromatici. Inizialmente la sua colorazione è ramata ed è caratterizzato da un picco di assorbimento a 465 nm. A seguito dell'interazione con le proteine la colorazione vira a blu e il picco di assorbimento si sposta a 595 nm. Quindi, misurando l'assorbanza a questa lunghezza d'onda, è possibile ricavare il contenuto proteico della soluzione analizzata (Bradford, 1976).

La misurazione dell'assorbanza è stata effettuata utilizzando micropiastre da 96 pozzetti trasparenti e a fondo piatto. Sono stati caricati 20 μ L dei campioni 36C e 6C e 20 μ L del tampone di risospensione (PBS e 25 mM trealosio), che rappresenta il bianco, la cui assorbanza viene sottratta a quella dei campioni. Sono state effettuate 3 repliche per ciascun campione e per il bianco, per poter calcolare la media delle assorbanze. Sono stati aggiunti 180 μ L di Coomassie Brilliant Blue, ottenendo un volume totale di 200 μ L per ogni pozzetto. La piastra viene quindi posta in un lettore di micropiastre Perkin Elmer Victor 3 (Figura 5.7) per la misurazione dell'assorbanza a 595 nm.

A questo punto, avendo sottratto il valore del bianco e conoscendo la media delle assorbanze delle repliche dei campioni, è stato possibile calcolare la concentrazione proteica utilizzando una retta di taratura. Quest'ultima è stata costruita utilizzando soluzioni a concentrazione nota di BSA. Ponendo i valori di concentrazione in mg/mL sull'asse delle ascisse e i valori di assorbanza su quello delle ordinate, è stata ottenuta l'equazione della retta di taratura utilizzata per i calcoli:

$$y = 0,8821x - 0,0103$$

La y è stata sostituita con l'assorbanza media e calcolando la x attraverso l'equazione inversa è stata determinata la concentrazione di proteina contenuta nel campione in mg/mL.

Il risultato è stato moltiplicato per il corrispondente volume di risospensione del pellet, ottenendo la quantità totale di proteine contenute nel campione. Questo dato è stato rapportato al volume totale del filtrato di partenza.



Figura 5.7: lettore di micropiastre Perkin Elmer Victor 3.

5. 5. Elettroforesi analitica (SDS-PAGE)

La caratterizzazione proteica degli esosomi di caffè è stata effettuata tramite la tecnica SDS-PAGE e successivo *Western blot*. Si tratta di un'elettroforesi verticale su gel di poliacrilamide che permette la separazione delle proteine presenti nei campioni, grazie all'applicazione di un campo elettrico. Il trattamento con il sodio dodecilsolfato (SDS) denatura e carica negativamente le proteine, che vengono quindi separate esclusivamente sulla base delle loro dimensioni.

Per poter effettuare la corsa elettroforetica sono necessarie una serie di soluzioni:

- Tris-glicina: 7,2 g di glicina e 1,5 g di Tris in 500 mL; 150 mL dei quali sono stati utilizzati per realizzare la soluzione Tris-glicina-SDS, aggiungendo 0,15 g di SDS (0,1% p/v).
- Tampone R: 75% (p/v) Glicerolo al.
- Tampone M: 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) e 0,4% (p/v) SDS.
- Tampone L: 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) e 0,4% (p/v) SDS.
- NPS: soluzione di ammonio persolfato 1 g in 5 mL.

Il gel è stato realizzato preparando innanzitutto il *running gel*, miscelando 5 mL di tampone L, 8,9 mL di acqua bidistillata, 6 mL di Acrilogel al 40% (rapporto acrilammide/bisacrilammide di 29/1), 100 μ L di soluzione di NPS e 6 μ L Temed. Circa 6,5 mL di *running gel* sono stati trasferiti all'interno dello stampo per elettroforesi e sopra di esso sono state poste alcune gocce di alcol isobutilico per livellarne il lato superiore. In seguito alla gelificazione, è stato rimosso l'alcol attraverso dei lavaggi con acqua bidistillata, che è stata poi asciugata con carta assorbente. A questo punto è stato versato sopra lo *stacking gel*, composto da 2 mL tampone M, 1 mL tampone R, 4,2 mL acqua bidistillata, 0,8 mL Acrilogel al 5% (rapporto acrilammide/bisacrilammide di 19/1), 40 μ L di soluzione di NPS e 6 μ L Temed. È stato inserito il pettine per la formazione dei pozzetti di caricamento dei campioni, che viene rimosso una volta avvenuta la gelificazione.

I campioni che sono stati sottoposti a questa analisi sono: un controllo realizzato a partire da cellule di caffè (ottenute tramite filtrazione nella prima fase di estrazione degli esosomi descritta in precedenza) e i campioni 36C e 6C. Le cellule sono state sottoposte a un lavaggio con PBS ghiacciato e successiva centrifugazione a 2000 g per 5 minuti a 4°C con una centrifuga da banco. Eliminato il surnatante, è stato aggiunto il tampone di lisi, con la seguente composizione: 150 mM NaCl, 1% Triton X-100 (p/v), 0,5% (p/v) Na deossicolato, 0,1% (p/v) SDS, 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM PMSF (fenilmetilsulfonil fluoruro, un inibitore delle proteasi). Le cellule nel tampone di lisi sono state poste in agitazione per 30 minuti a 4°C e successivamente centrifugate a 16'000 g per 20 minuti a 4°C. Il surnatante ottenuto costituisce il campione di controllo. Tutti i campioni sono stati immersi in acqua a 100°C per 3 minuti. Sono stati infine caricati nei pozzetti 30 μ L di ciascun campione, addizionati di 5 μ L di blu di bromofenolo, 5 μ L di tampone R, 5 μ L di tampone M e 5 μ L di 10% (p/v) SDS. Nell'ordine sono stati caricati: lo standard proteico Thermo Scientific PageRuler Protein Ladder, il controllo, il campione 36C e il campione 6C.

La corsa elettroforetica è stata effettuata utilizzando una cella per elettroforesi verticale Bio-Rad Mini-PROTEAN Tetra (Figura 5.8). Nello spazio delimitato dai vetrini che contengono il gel è stato versato il tampone Tris-glicina-SDS, mentre nella vaschetta all'esterno dei vetrini il tampone Tris-glicina. Per dare inizio alla corsa elettroforetica è stata applicata una corrente costante di 30 mA nel caso di un unico gel o di 40 mA con due gel in contemporanea.

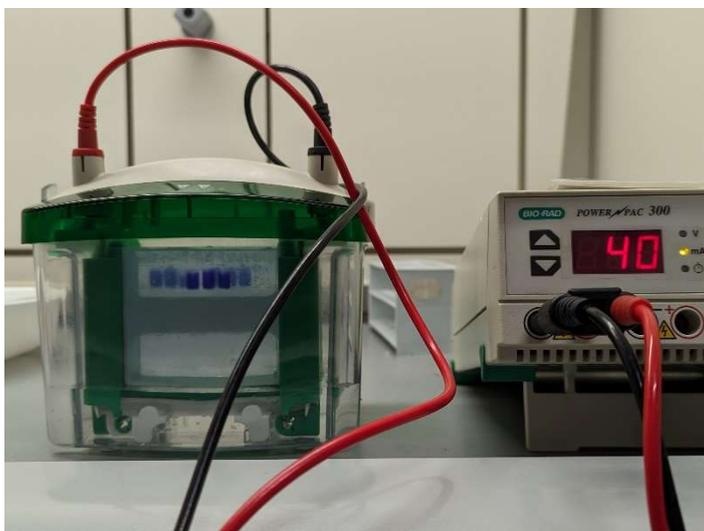


Figura 5.8: cella per elettroforesi verticale Bio-Rad Mini-PROTEAN Tetra.

Terminata la corsa il gel è stato separato dai vetrini ed è stato rimosso lo *stacking gel* utilizzando un bisturi. Il *running gel* è stato posto in 7,5% (v/v) acido acetico in agitazione per 6-7 minuti. Infine, è stato trasferito in una soluzione di blu di Coomassie, dove è stato lasciato *overnight* in agitazione. Il giorno successivo, dopo diversi lavaggi in acqua, è possibile osservare le bande proteiche all'interno del gel.

5. 6. *Western Blot*

Il *Western blot* o immunoblotting è una tecnica che ha lo scopo di identificare le proteine che sono state separate tramite elettroforesi, sfruttando la specificità delle interazioni tra anticorpi e antigeni.

Nel corso di questa prova sono state utilizzate le seguenti soluzioni:

- Tampone di trasferimento: 0,6 g di Tris, 2,88 g di glicina e 40 mL di metanolo in 200 mL totali.
- Soluzione di rosso Ponceau S: 0,2 g di rosso Ponceau S e 5 g di acido acetico in 100 mL.
- Tris-Buffered Saline (TBS): 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) e 150 mM NaCl.
- Tampone di saturazione: 3% (p/v) di BSA in 100 mL di TBS.
- Tampone di incubazione: 0,05% (v/v) di Tween 20 e 0,5% (p/v) di BSA in 35 mL di TBS.
- Tampone di lavaggio: 0,05% (v/v) di Tween 20 in 400 mL di TBS.
- Tampone di sviluppo: Tablet Sigma B-5655 solubilizzata in 10 mL di acqua bidistillata e coperta con carta stagnola perché sensibile alla luce, da preparare poco prima dell'uso.

La prima fase consiste nel trasferimento delle proteine dal gel dell'elettroforesi ad una membrana di nitrocellulosa e ciò è stato fatto seguendo il protocollo del *semi-dry immunoblotting*, utilizzando la cella di trasferimento *Bio-Rad Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell*. Il gel, la membrana di nitrocellulosa e i filtri sono stati posti ad equilibrare nel tampone di trasferimento per 30 minuti. Essi sono stati poi collocati sulla piastra della cella nel seguente ordine: un filtro, la membrana di nitrocellulosa, il gel e il secondo filtro; eliminando eventuali bolle d'aria facendo rotolare con una leggera pressione una provetta di vetro. Per far avvenire il trasferimento, lo strumento è stato impostato a 15 V e 250 mA per 1 ora e 30 minuti.

La membrana di nitrocellulosa è stata immersa per 10 minuti nella soluzione di Rosso Ponceau S, per poter identificare le bande proteiche ed evidenziare con una matita le estremità delle corse elettroforetiche. Sono stati eseguiti 3 lavaggi con TBS fino alla scomparsa delle bande, dopo i quali la membrana è stata trattata con il tampone di saturazione e lasciata in agitazione per 1 ora, allo scopo di saturare i siti di legame aspecifici. Sono stati effettuati ulteriori 3 lavaggi con TBS ed è stata posta in incubazione con l'anticorpo primario, diluito nel tampone di incubazione, per tutta la notte. Questa analisi è stata ripetuta utilizzando 4 diversi anticorpi policlonali di coniglio ottenuti commercialmente:

- Agrisera AS07 260 H⁺-ATPasi, diluizione 1:2000.
- Agrisera AS07 213 V-ATPasi, diluizione 1:1000.
- Agrisera AS08 327 Sec21p, diluizione 1:1000.
- Agrisera AS12 2365 CNX1/2, diluizione 1:2000.

Terminata l'incubazione, la membrana è stata lavata 4 volte con un volume totale di circa 200 mL di tampone di lavaggio per un tempo totale di 20 minuti. Successivamente è stata posta in incubazione con l'anticorpo secondario per 1 ora e 30 minuti. È stato utilizzato l'anticorpo *anti-rabbit* Sigma-Aldrich A3687 ottenuto da capra, coniugato alla fosfatasi alcalina, con diluizione 1:5000 nel tampone di incubazione. Terminata anche la seconda incubazione, la membrana è stata lavata 3 volte con un volume totale di 150 mL di tampone di lavaggio e per 2 volte con un volume totale di 100 mL di TBS per un tempo totale di 30 minuti. A questo punto, la membrana è stata immersa nel tampone di sviluppo, preparato sul momento. La reazione è stata bloccata con acqua distillata nel momento in cui la colorazione delle bande ha raggiunto l'intensità desiderata.

5. 7. Analisi statistica

I dati riguardanti le dimensioni e la morfologia delle vescicole sono stati espressi come $\text{media} \pm \text{deviazione standard}$. La presenza di differenze statisticamente significative è stata determinata tramite *t* test di Student.

6. Risultati e discussione

6.1. Morfologia delle vescicole

6.1.1. Osservazione al TEM e analisi con *software ImageJ*

L'osservazione al TEM delle frazioni 36C e 6C ha permesso di ottenere diverse fotografie delle vescicole contenute in questi campioni (Figura 6.1). Nelle sigle di entrambi i campioni il numero indica la durata della centrifugazione e la lettera C la *cultivar Castillo*. La successiva analisi con il *software ImageJ* ha consentito la misurazione delle aree di queste EVs, assieme al perimetro e ad altri parametri morfometrici, quali *Circularity*, *Aspect Ratio*, *Roundness* e *Solidity*.

L'area media delle vescicole del campione 36C è risultata essere 12'602 nm², mentre per il campione 6C è stata 12'362 nm². Quindi, le dimensioni delle vescicole nei due campioni sono molto simili e non si evidenzia una differenza statisticamente significativa (Tabella 6.1).

In Figura 6.2 sono riportate le distribuzioni delle aree delle vescicole nei due diversi campioni. Come si può osservare, nonostante non ci sia una differenza significativa nelle aree medie calcolate, le distribuzioni non sono completamente sovrapponibili. In particolare, nel campione 6C è presente un maggior numero di vescicole con area compresa tra i 5000 nm² e i 20'000 nm² rispetto al campione 36C. Viceversa, vescicole con area minore di 5000 nm² e maggiore di 20'000 nm² sono presenti in quantità più elevata nel campione 36C.

Anche per gli altri parametri misurati con il *software ImageJ* (i.e., perimetro, *Circularity*, *Aspect Ratio*, *Roundness* e *Solidity*) non emergono differenze statisticamente significative (Tabella 6.1).

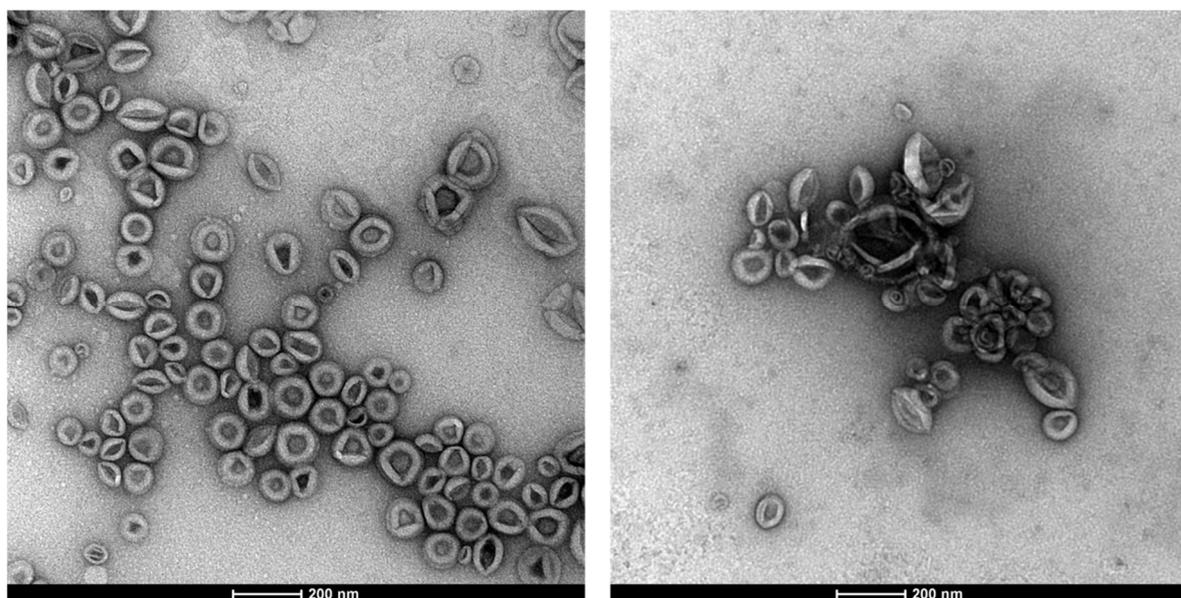


Figura 6.1: Immagini di vescicole acquisite al TEM riguardanti i campioni 36C (a sinistra) e 6C (a destra).

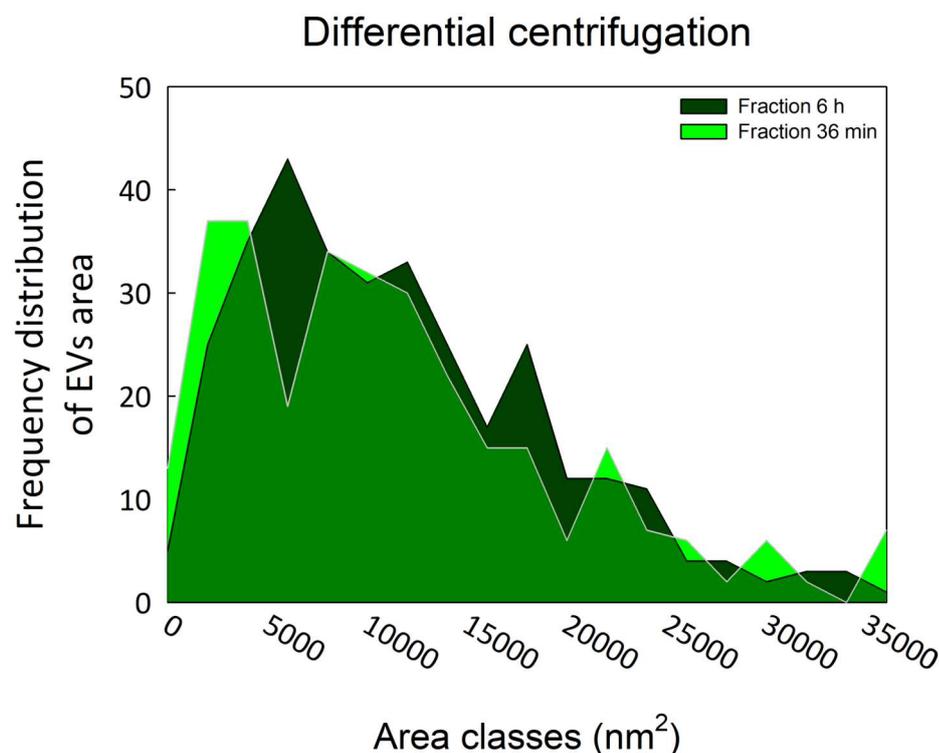


Figura 6.2: Grafico che rappresenta la distribuzione delle frequenze delle aree delle EVs nelle frazioni 36C (in verde chiaro) e 6C (in verde scuro), misurate con software ImageJ sulle foto ottenute al TEM.

Tabella 6.1: Media e deviazione standard di area e parametri morfometrici dei due campioni di EVs misurati con software ImageJ.

Campioni	Area \pm SD (nm ²)	Perimetro \pm SD (nm)	Circularity \pm SD	Aspect Ratio \pm SD	Roundness \pm SD	Solidity \pm SD (nm ²)
36C	12'602 \pm 7494	460,13 \pm 151,26	0,70 \pm 0,12	1,22 \pm 0,21	0,84 \pm 0,12	0,95 \pm 0,02
6C	12'362 \pm 8685	455,22 \pm 165,11	0,67 \pm 0,12	1,14 \pm 0,12	0,88 \pm 0,08	0,95 \pm 0,02

6. 1. 2. Confronto misurazioni al TEM e al DLS

Nella Tabella 6.2 è possibile confrontare il diametro delle vescicole ricavato dalle misurazioni effettuate sulle fotografie del TEM con il diametro idrodinamico misurato al DLS.

Una prima considerazione può essere fatta sui diametri derivanti dal TEM, ossia questi valori sono molto simili tra loro e rientrano nei range per poter classificare queste EVs come esosomi. Inoltre, i risultati ottenuti sono comparabili alle dimensioni di molti altri esosomi di origine vegetale. Ad esempio, Lee *et al.* (2020) e Y. Liu *et al.* (2020), sono stati in grado di isolare esosomi rispettivamente da *Dendropanax morbifera*, con dimensioni tra i 30 nm e i 200 nm, e da *Arabidopsis thaliana*, con diametri compresi tra i 60 nm e i 200 nm. Dimensioni simili sono state riscontrate anche per vescicole estratte dalla bevanda del caffè, in particolare comprese tra i 40 nm e i 100 nm (Kantarcioglu *et al.*, 2023).

Pur avendo le stesse dimensioni, le vescicole sono state isolate in tempi di centrifugazione diversi e sono state quindi raccolte nelle due distinte frazioni 36C e 6C. Un'ipotesi che potrebbe spiegare questo fenomeno riguarda possibili variazioni nella composizione delle vescicole, che si rifletterebbero sulla loro densità e quindi sul tempo di sedimentazione durante la centrifugazione differenziale. Infatti, alcuni studi hanno dimostrato che EVs che presentano diversi marcatori proteici sono caratterizzate da una diversa densità. Un esempio è dato dalle EVs isolate da *Arabidopsis thaliana*: le vescicole che contengono il marcatore PEN1 hanno una densità compresa tra 1,029 e 1,056 g/mL; mentre in quelle che presentano il marcatore TET8 si osserva una densità tra 1,12 e 1,19 g/mL (Rutter & Innes, 2017; He *et al.*, 2021).

Come si può notare, i diametri misurati al DLS risultano essere maggiori di quelli ricavati dalle immagini del TEM, per entrambi i campioni. Ciò è dovuto al fatto che il diametro idrodinamico misurato al DLS comprende anche lo strato di idratazione che circonda gli esosomi, quindi la misura rilevata è sovrastimata rispetto alle dimensioni reali. Un'altra possibile causa di sovrastima potrebbe essere la presenza di aggregati. In particolare, il DLS determina le dimensioni dell'aggregato intero, invece, tramite l'analisi delle immagini del TEM è possibile misurare singolarmente le vescicole anche all'interno di aggregati.

Inoltre, nelle misurazioni al DLS il diametro idrodinamico delle vescicole del campione 6C risulta essere maggiore di quello delle vescicole del campione 36C. Una possibile spiegazione è attribuibile alla diversa composizione superficiale delle vescicole che può influenzare le dimensioni dello strato di idratazione. Infatti, come dimostrato nello studio di Varga *et al.* (2020), diverse tipologie di vescicole, in base alla loro composizione superficiale, possono presentare strati di idratazione di dimensioni variabili, che si riflettono in un differente grado di sovrastima del diametro misurato al DLS.

Infine, il DLS è stato utilizzato anche per la misurazione del potenziale ζ degli esosomi. In particolare, per il campione 36C è stato ottenuto un valore medio di 0,001, mentre per il campione 6C di 0,079 (Tabella 6.2). Si tratta di potenziali prossimi allo 0, che indicano l'assenza di cariche superficiali. Questa potrebbe essere una delle cause della formazione di aggregati nei campioni di vescicole.

Tabella 6.2: media e deviazione standard del diametro ricavato dai dati di ImageJ, del diametro idrodinamico misurato al DLS e del potenziale ζ delle due frazioni di EVs.

Campioni	Diametro \pm SD (nm) TEM	Diametro \pm SD (nm) DLS	Potenziale $\zeta \pm$ SD
36C	120,90 \pm 37,84	281,04 \pm 130,79	0,001 \pm 0,233
6C	117,81 \pm 43,22	390,25 \pm 141,34	0,079 \pm 0,135

6. 2. Quantificazione delle proteine

I dati ottenuti dal saggio di Bradford sono stati utilizzati per calcolare la quantità media di proteina contenuta negli esosomi rapportata al volume del filtrato di partenza (Figura 6.3). Come si può notare, sembrerebbe esserci una maggiore quantità di proteina nella frazione 6C rispetto alla 36C. Questi dati suggerirebbero, almeno in parte, una diversa composizione delle EVs e in particolare un maggior contenuto proteico delle vescicole contenute nella frazione 6C. Tuttavia, soprattutto in questo campione si osserva una variabilità dei dati. Ciò potrebbe essere attribuibile alla presenza di aggregati, che renderebbero meno omogenea la sospensione delle vescicole nei campioni e di conseguenza meno costante la concentrazione delle proteine nelle misurazioni durante il saggio di Bradford. Un'altra possibile spiegazione potrebbe essere la variabilità della quantità di EVs prodotte dalle cellule nelle diverse repliche biologiche, probabilmente a causa della diversa età delle colture al momento dell'isolamento, che si rifletterebbe in una diversa concentrazione proteica nei campioni finali.

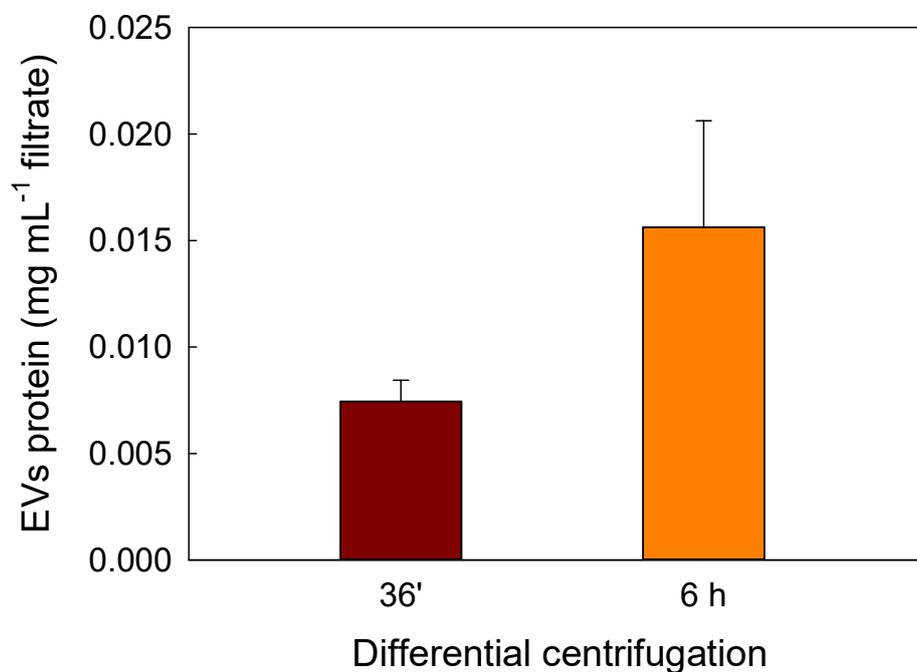


Figura 6.3: Rappresentazione della quantità media di proteina nelle due frazioni rapportata al volume di filtrato di partenza.

6. 3. *Western blot*

I gel derivanti dalla corsa elettroforetica SDS-PAGE sono stati sottoposti ad analisi immunologica tramite tecnica *Western blot* allo scopo di individuare alcuni marcatori proteici di membrane cellulari e organelli. L'analisi è stata ripetuta 4 volte utilizzando i seguenti anticorpi policlonali:

- Agrisera AS07 260, che riconosce la proteina H⁺-ATPasi, presente a livello della membrana plasmatica;
- Agrisera AS07 213, in grado di riconoscere la V-ATPasi, un H⁺-ATPasi contenuta nel tonoplasto, la membrana del vacuolo;
- Agrisera AS08 327, diretto contro la proteina Sec21p, marcatore proteico del Golgi;
- Agrisera AS12 2365, anticorpo anti-CNX 1/2, proteina integrale della membrana del reticolo endoplasmatico.

Come si può osservare nella Figura 6.4, nelle reazioni ottenute utilizzando l'anticorpo anti-H⁺-ATPasi e l'anticorpo anti-CNX 1/2 sono state ottenute delle bande ben visibili in entrambe le frazioni. Viceversa, negli immunoblotting realizzati utilizzando gli anticorpi anti-V-ATPasi e anti-Sec21p non erano visibili bande colorate nei campioni.

Dai risultati ottenuti sembrerebbe che le membrane di queste EVs derivino principalmente dalla membrana plasmatica e dal reticolo endoplasmatico. Queste strutture cellulari potrebbero essere coinvolte nelle vie di biosintesi degli esosomi contenuti in questi campioni.

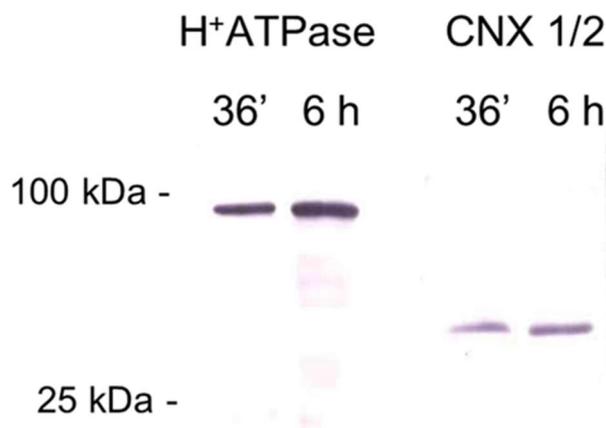


Figura 6.4: *Western blot* dei campioni 36C e 6C realizzati con anticorpo anti-H⁺-ATPasi (a sinistra) e con anticorpo anti-CNX 1/2 (a destra).

7. Conclusioni

Le colture cellulari di caffè si sono rivelate essere un sistema adeguato per ottenere vescicole extracellulari. Infatti, le cellule in sospensione rilasciano spontaneamente le EVs nel mezzo di coltura, rendendo possibile il loro isolamento tramite centrifugazione differenziale. Sono state ottenute due frazioni di vescicole: 36C e 6C, rispettivamente in seguito ad una prima centrifugazione di 36 minuti e dopo un'ulteriore centrifugazione di 6 ore ad un'intensità maggiore.

Le analisi sulle immagini ricavate al TEM hanno permesso di accertare che il diametro delle EVs ottenute è compreso tra i 30 e i 200 nm, misure che corrispondono a quelle di molti altri esosomi di origine vegetale riportate in letteratura. Le dimensioni simili delle EVs contenute nelle due frazioni potrebbero essere dovute alla diversa composizione, che potrebbe determinare la minore densità di alcune vescicole, le quali sedimenterebbero solamente in seguito ad una centrifugazione più lunga e intensa.

I dati ottenuti dal saggio di Bradford indicano una maggiore quantità di proteine nel campione 6C rispetto al 36C, il che suggerirebbe una diversa composizione delle vescicole.

L'immunoblotting ha evidenziato la presenza di marcatori del plasmalemma e del reticolo endoplasmatico. Quindi, è probabile che questi esosomi derivino dalla gemmazione della membrana plasmatica e in parte dal reticolo endoplasmatico. Inoltre, vista l'assenza di componenti vacuolari e del Golgi, sembrerebbe che la loro origine sia attribuibile ad un meccanismo spontaneo e che non sia dovuta a sfaldamento o morte cellulare. Tuttavia, questo meccanismo rimane ancora poco conosciuto e va studiato e approfondito.

A questo scopo, e per una più completa caratterizzazione delle EVs di colture cellulari di caffè, sono necessari ulteriori studi, come ad esempio, le analisi di proteomica, ma anche la definizione della composizione dei lipidi di membrana, del contenuto di metaboliti secondari e di acidi nucleici.

Maggiori conoscenze sulla composizione delle EVs di colture cellulari di caffè potranno essere molto utili per approfondire quali applicazioni potranno avere queste vescicole in futuro. Come ipotizzato per altri esosomi di origine vegetale, anche quelli di caffè potrebbero trovare impieghi in molti ambiti diversi: dalla protezione delle colture dai patogeni, alla realizzazione di formulazioni nutraceutiche. Potrebbero essere utilizzati nella loro forma nativa, sfruttando i composti bioattivi che contengono naturalmente, ma anche come strumenti di drug delivery, per il trasporto di farmaci ad uno specifico sito o tessuto bersaglio.

Tuttavia, per poter raggiungere un reale impiego su larga scala sono necessarie ulteriori attività di ricerca, in particolare per stabilire i migliori protocolli e condizioni di crescita delle cellule che assicurino una maggiore produzione di esosomi. Per quanto riguarda il loro utilizzo nel trattamento di patologie umane, dovranno essere definite le strategie più efficaci per il caricamento dei farmaci al loro interno o sulla loro superficie. Infine, dovrà essere valutata l'effettiva sicurezza ed efficacia su larga scala attraverso trials clinici, stabilendo anche quale sia la migliore via di assunzione e la loro biodistribuzione.

8. Bibliografia

- Ambrosone, A., Barbulova, A., Cappetta, E., Cillo, F., De Palma, M., Ruocco, M., & Pocsfalvi, G. (2023). Plant Extracellular Vesicles: Current Landscape and Future Directions. In *Plants* (Vol. 12, Issue 24). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/plants12244141>
- Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential - What they are and what they are not? In *Journal of Controlled Release* (Vol. 235, pp. 337–351). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>
- Bosch, S., De Beaurepaire, L., Allard, M., Mosser, M., Heichette, C., Chrétien, D. *et al.* (2016). Trehalose prevents aggregation of exosomes and cryodamage. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep36162>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Chitwood, D. H., Kumar, R., Ranjan, A., Pelletier, J. M., Townsley, B. T., Ichihashi, Y. *et al.* (2015). Light-induced indeterminacy alters shade-avoiding tomato leaf morphology. *Plant Physiology*, 169(3), 2030–2047. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01229>
- de Melo Pereira, G. V., de Carvalho Neto, D. P., Magalhães Júnior, A. I., do Prado, F. G., Pagnoncelli, M. G. B., Karp, S. G., & Soccol, C. R. (2020). Chemical composition and health properties of coffee and coffee by-products. In *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 91, pp. 65–96). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2019.10.002>
- De Palma, M., Ambrosone, A., Leone, A., Del Gaudio, P., Ruocco, M., Turiák, L. *et al.* (2020). Plant roots release small extracellular vesicles with antifungal activity. *Plants*, 9(12), 1–14. <https://doi.org/10.3390/plants9121777>
- Dyball, L. E., & Smales, C. M. (2022). Exosomes: Biogenesis, targeting, characterization and their potential as “Plug & Play” vaccine platforms. In *Biotechnology Journal* (Vol. 17, Issue 11). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/biot.202100646>
- Eibl, R., Meier, P., Stutz, I., Schildberger, D., Hühn, T., & Eibl, D. (2018). Plant cell culture technology in the cosmetics and food industries: current state and future trends. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 102, Issue 20, pp. 8661–8675). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9279-8>
- Fehér, A. (2019). Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: What these terms mean in the era of molecular plant biology? In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00536>
- Guzzo, L. S., Castor, M. G. M. E., Perez, A. D. C., Duarte, I. D. G., & Romero, T. R. L. (2016). Natural Diterpenes from Coffee, Cafestol, and Kahweol Induce Peripheral

- Antinoception by Adrenergic System Interaction. *Planta Medica*, 82(1–2), 106–112. <https://doi.org/10.1055/S-0035-1558084>
- Häkkinen, S. T., Legay, S., Rischer, H., Renaut, J., & Guerriero, G. (2024). Editorial: Plant cell factories: current and future uses of plant cell cultures. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 15). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1439261>
- He, B., Cai, Q., Qiao, L., Huang, C. Y., Wang, S., Miao, W. *et al.* (2021). RNA-binding proteins contribute to small RNA loading in plant extracellular vesicles. *Nature Plants*, 7(3), 342–352. <https://doi.org/10.1038/s41477-021-00863-8>
- Jalota, K., Sharma, V., Agarwal, C., & Jindal, S. (2024). Eco-friendly approaches to phytochemical production: elicitation and beyond. In *Natural Products and Bioprospecting* (Vol. 14, Issue 1). Springer. <https://doi.org/10.1007/s13659-023-00419-7>
- Kantarcıoğlu, M., Yıldırım, G., Oktar, P. A., Yanbakan, S., Özer, Z. B., Sarıca, D. Y. *et al.* (2023). Coffee-Derived Exosome-Like Nanoparticles: Are They the Secret Heroes? *Turkish Journal of Gastroenterology*, 34(2), 161–169. <https://doi.org/10.5152/TJG.2022.21895>
- Lee, R., Ko, H. J., Kim, K., Sohn, Y., Min, S. Y., Kim, J. A. *et al.* (2020). Anti-melanogenic effects of extracellular vesicles derived from plant leaves and stems in mouse melanoma cells and human healthy skin. *Journal of Extracellular Vesicles*, 9(1). <https://doi.org/10.1080/20013078.2019.1703480>
- Lian, M. Q., Chng, W. H., Liang, J., Yeo, H. Q., Lee, C. K., Belaid, M. *et al.* (2022). Plant-derived extracellular vesicles: Recent advancements and current challenges on their use for biomedical applications. In *Journal of Extracellular Vesicles* (Vol. 11, Issue 12). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/jev2.12283>
- Liu, F., Wang, X., Wu, G., Chen, L., Hu, P., Ren, H., & Hu, H. (2015). Coffee consumption decreases risks for hepatic Fibrosis and Cirrhosis: A Meta-Analysis. *PLoS ONE*, 10(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142457>
- Liu, Y., Wu, S., Koo, Y., Yang, A., Dai, Y., Khant, H. *et al.* (2020). Characterization of and isolation methods for plant leaf nanovesicles and small extracellular vesicles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 29. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2020.102271>
- Mathieu, M., Martin-Jaular, L., Lavieau, G., & Théry, C. (2019). Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. In *Nature Cell Biology* (Vol. 21, Issue 1, pp. 9–17). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0250-9>
- Mu, N., Li, J., Zeng, L., You, J., Li, R., Qin, A. *et al.* (2023). Plant-Derived Exosome-Like Nanovesicles: Current Progress and Prospects. *International Journal of Nanomedicine*, 18, 4987–5009. <https://doi.org/10.2147/IJN.S420748>
- Munyendo, L. M., Njoroge, D. M., Owaga, E. E., & Mugendi, B. (2021). Coffee phytochemicals and post-harvest handling—A complex and delicate balance. In *Journal*

of Food Composition and Analysis (Vol. 102). Academic Press Inc.
<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.103995>

- Ou, X., Wang, H., Tie, H., Liao, J., Luo, Y., Huang, W. *et al.* (2023). Novel plant-derived exosome-like nanovesicles from *Catharanthus roseus*: preparation, characterization, and immunostimulatory effect via TNF- α /NF- κ B/PU.1 axis. *Journal of Nanobiotechnology*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12951-023-01919-x>
- Panfoli, I., & Bruschi, M. (2020). The good and bad sides of exosomes: pre-metastatic niche formation, cancer biomarker and therapy carriers. In *Journal of Cancer Metastasis and Treatment* (Vol. 6). OAE Publishing Inc. <https://doi.org/10.20517/2394-4722.2020.50>
- Parra-Aguilar, T. J., Sarmiento-López, L. G., Santana, O., Olivares, J. E., Pascual-Morales, E., Jiménez-Jiménez, S. *et al.* (2023). TETRASPANIN 8-1 from *Phaseolus vulgaris* plays a key role during mutualistic interactions. *Frontiers in Plant Science*, 14. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2023.1152493/FULL>
- Pasternak, T. P., & Steinmacher, D. (2024). Plant Growth Regulation in Cell and Tissue Culture In Vitro. In *Plants* (Vol. 13, Issue 2). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/plants13020327>
- Prashant, S. P., & Bhawana, M. (2024). An update on biotechnological intervention mediated by plant tissue culture to boost secondary metabolite production in medicinal and aromatic plants. In *Physiologia Plantarum* (Vol. 176, Issue 4). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/ppl.14400>
- Raimondo, S., Naselli, F., Fontana, S., Monteleone, F., Lo Dico, A., Saieva, L. *et al.* (2015). Citrus limon-derived nanovesicles inhibit cancer cell proliferation and suppress CML xenograft growth by inducing TRAIL-mediated cell death. *Oncotarget*, 6(23). www.impactjournals.com/oncotarget/
- Ren, Y., Wang, C., Xu, J., & Wang, S. (2019). Cafestol and Kahweol: A Review on Their Bioactivities and Pharmacological Properties. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(17). <https://doi.org/10.3390/IJMS20174238>
- Rutter, B. D., & Innes, R. W. (2017). Extracellular vesicles isolated from the leaf apoplast carry stress-response proteins. *Plant Physiology*, 173(1), 728–741. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01253>
- Şahin, F., Koçak, P., Güneş, M. Y., Özkan, İ., Yıldırım, E., & Kala, E. Y. (2019). In Vitro Wound Healing Activity of Wheat-Derived Nanovesicles. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 188(2), 381–394. <https://doi.org/10.1007/s12010-018-2913-1>
- Salauddin, Md. (2022). Chapter 1 - A Brief Concept of Cell Culture: Challenges, Prospects and Applications. In X. Zhan (Ed.), *Cell Culture - Advanced Technology and Applications in Medical and Life Sciences* (Vol. 30, pp. 1–24). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.94823>
- Schillberg, S., Raven, N., Fischer, R., Twyman, R. M., & Schiermeyer, A. (2013). Molecular Farming of Pharmaceutical Proteins Using Plant Suspension Cell and Tissue Cultures. *Current Pharmaceutical Design*, 19, 5531–5542.

- Shaaltiel, Y., Bartfeld, D., Hashmueli, S., Baum, G., Brill-Almon, E., Galili, G. *et al.* (2007). Production of glucocerebrosidase with terminal mannose glycans for enzyme replacement therapy of Gaucher's disease using a plant cell system. *Plant Biotechnology Journal*, 5(5), 579–590. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2007.00263.x>
- Skoog, F., & Miller, C. O. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured in vitro. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 11, 118–131.
- Subha, D., Harshnii, K., Madhikiruba, K. G., Nandhini, M., & Tamilselvi, K. S. (2023). Plant derived exosome- like Nanovesicles: an updated overview. In *Plant Nano Biology* (Vol. 3). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.plana.2022.100022>
- Teng, Y., Ren, Y., Sayed, M., Hu, X., Lei, C., Kumar, A. *et al.* (2018). Plant-Derived Exosomal MicroRNAs Shape the Gut Microbiota. *Cell Host and Microbe*, 24(5), 637-652.e8. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.10.001>
- Van Dijk, A. E., Olthof, M. R., Meeuse, J. C., Seebus, E., Heine, R. J., & Van Dam, R. M. (2009). *Acute Effects of Decaffeinated Coffee and the Major Coffee Components Chlorogenic Acid and Trigonelline on Glucose Tolerance*. <https://doi.org/10.2337/dc09-0207>
- Varga, Z., Fehér, B., Kitka, D., Wacha, A., Bóta, A., Berényi, S. *et al.* (2020). Size Measurement of Extracellular Vesicles and Synthetic Liposomes: The Impact of the Hydration Shell and the Protein Corona. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 192. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111053>
- Wierzejska, R. (2017). Can coffee consumption lower the risk of Alzheimer's disease and Parkinson's disease? A literature review. In *Archives of Medical Science* (Vol. 13, Issue 3, pp. 507–514). Termedia Publishing House Ltd. <https://doi.org/10.5114/aoms.2016.63599>
- Wilson, S. A., & Roberts, S. C. (2012). Recent advances towards development and commercialization of plant cell culture processes for the synthesis of biomolecules. In *Plant Biotechnology Journal* (Vol. 10, Issue 3, pp. 249–268). <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2011.00664.x>
- Yang, C., Zhang, W., Bai, M., Luo, Q., Zheng, Q., Xu, Y. *et al.* (2023). Edible plant-derived extracellular vesicles serve as promising therapeutic systems. *Nano TransMed*, 2(2–3), 100004. <https://doi.org/10.1016/j.ntm.2023.100004>
- Zhang, Y., Liu, Y., Liu, H., & Tang, W. H. (2019). Exosomes: Biogenesis, biologic function and clinical potential. In *Cell and Bioscience* (Vol. 9, Issue 1). BioMed Central. <https://doi.org/10.1186/s13578-019-0282-2>
- Zhao, W. jun, Bian, Y. ping, Wang, Q. hui, Yin, F., Yin, L., Zhang, Y. lan, & Liu, J. hui. (2022). Blueberry-derived exosomes-like nanoparticles ameliorate nonalcoholic fatty liver disease by attenuating mitochondrial oxidative stress. *Acta Pharmacologica Sinica*, 43(3), 645–658. <https://doi.org/10.1038/s41401-021-00681-w>