

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Autor: Michaela Hudáková

Vedúci diplomovej práce: RNDr. Klára Konečná, Ph.D.

Konzultant: doc. PharmDr. Ivona Pávková, Ph.D.

Názov diplomovej práce: Izolácia exozómov produkovaných makrofágmi infikovaných *F. tularensis*

Cieľ práce: Hlavným cieľom predkladanej práce bolo nastavenie a optimalizácia modelu izolácie exozómov z infikovaných makrofágov izolovaných z myši typu BALB/c, virulentným kmeňom baktérie, *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* FSC200 s následnou základnou charakterizáciou a identifikáciou vyizolovaných proteínov, ktoré sa typicky vyskytujú v štruktúre a obsahu exozómov.

Metódy: Nastavenie modelu pre metódu izolácie exozómov prebehlo za využitia svetelnej a fluorescenčnej mikroskopie, kedy boli stanovené podmienky experimentu – dvojhodinový interval k infekcii, kultivácia a infekcia buniek v prostredí bez obsahu séra. Pre samotnú izoláciu exozómov bol zvolený postup založený na použití diferenciálnej centrifugácie a ultracentrifugácie. K základnej charakteristike vyizolovaných exozomálnych proteínov boli využité zvolené analytické metódy – stanovenie bielkoviny pomocou kyseliny bicinchonínovej modifikované pre malé objemy a analýza pomocou dynamického rozptylu svetla. Výsledná identifikácia týchto proteínov prebehla prevedením hmotnostnej spektrometrie.

Výsledky: Na základe zvoleného metodického postupu bolo možné vyizolovať a charakterizovať dva myšacie proteíny v kontrolnej vzorke (proteíny vyizolované z neinfikovaných makrofágov) a trinásť myšacích proteínov a dva proteíny pôvodom z *F. tularensis* v infikovanej vzorke (proteíny vyizolované z infikovaných makrofágov). Hmotnostná spektrometria preukázala nulové alebo nedetekovateľné množstvo proteínov typických pre exozómy (napr. CD9, CD81, TSG101, Alix).

Záver: Podmienky zvolené pre model izolácie exozómov sa ukázali ako nevyhovujúce z dôvodu nízkeho exozomálneho výťažku. Možnou príčinou je krátky časový interval zvolený k infekcii makrofágov, počas ktorého nedochádza k tvorbe dostatočného množstva exozómov.

Kľúčové slová: exozómy, makrofágy, izolácia, *Francisella tularensis*