

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



## DIPLOMOVÁ PRÁCA

# Izolácia exozómov produkovaných makrofágmi infikovaných *F. tularensis*

Michaela Hudáková

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

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

HRADEC KRÁLOVÉ, 2023/2024

## **Pod'akovanie**

Touto cestou by som sa chcela poďakovať pani doc. PharmDr. Ivone Pávkovej, Ph.D., za jej nekonečnú trpezlivosť, odborné vedenie, čas a pomoc pri zostavovaní tejto diplomovej práce. Rovnako ďakujem pani RNDr. Kláre Konečnej, Ph.D., za tolerantnosť, výpomoc a zaštitenie tejto diplomovej práce. Vďaka patrí aj PharmDr. Jane Klimentovej, Ph.D., za prevedenie separácie peptidov a hmotnostnej analýzy v laboratóriu Katedry molekulárnej patológie a biológie na Vojenskej lekárskej fakulte Univerzity obrany (KMPB VLF UO) a PharmDr. Ondřejovi Holasovi, Ph.D., za stanovenie prítomnosti a polydisperzity vyizolovaných častíc v submikrónovej oblasti na princípe dynamického rozptylu svetla v laboratóriu Katedry farmaceutickej technológie na Farmaceutickej fakulte v Hradci Králové. Zároveň by som sa chcela poďakovať KMPB VLF UO v Hradci Králové za umožnenie realizácie diplomovej práce v jej priestoroch.

Prehlasujem, že toto dielo je mojím pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a iné použité zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a sú v práci riadne citované. Dielo nebolo použité na získanie iného alebo rovnakého titulu.

V Hradci Králové 16. 8. 2024

Michaela Hudáková

# 1. OBSAH

2.	ABSTRAKT.....	6
3.	ABSTRACT.....	8
4.	ÚVOD.....	10
5.	ZADANIE – CIEĽ PRÁCE.....	11
6.	TEORETICKÁ ČASŤ.....	12
6.1	Exozómy.....	12
6.1.1	Charakteristika exozómov.....	12
6.1.2	Význam exozómov z hľadiska infekcie.....	14
6.2	<i>Francisella tularensis</i> .....	15
6.2.1	Charakteristika baktérie <i>Francisella tularensis</i> .....	15
6.2.2	Taxonómia <i>Francisella tularensis</i> .....	17
6.2.3	Ochorenie tularémia.....	19
6.3	Izolácia exozómov.....	22
6.3.1	Metódy izolácie exozómov.....	22
6.3.2	Centrifugačné metódy.....	23
6.3.3	Ostatné izolačné metódy.....	23
7.	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ.....	25
7.1	Zoznam použitého materiálu.....	25
7.1.1	Biologický materiál.....	25
7.1.2	Chemický materiál.....	25
7.1.3	Prístrojové vybavenie.....	27
7.1.4	Laboratórne pomôcky.....	27
7.2	Metódy.....	28
7.2.1	Kultivácia baktérií a príprava bakteriálnej suspenzie.....	28
7.2.2	Izolácia makrofágov.....	28
7.2.3	Diferenciácia makrofágov.....	29
7.2.4	Infekcia makrofágov.....	30

7.2.5	Mikroskopia.....	30
7.2.6	Izolácia exozómov.....	32
7.2.7	Príprava vzorku na hmotnostnú spektrometriu.....	33
7.2.8	Stanovenie bielkoviny vo vzorkách izolovaných exozómov pomocou mikrofluorometra Qubit™ .....	34
7.2.9	Stanovenie bielkoviny vo vzorkách izolovaných exozómov pomocou kyseliny bicinchonínovej modifikované pre malé objemy.....	35
8.	VÝSLEDKY.....	36
8.1	Mikroskopické hodnotenie.....	36
8.1.1	Hodnotenie makrofágov pod svetelným mikroskopom.....	36
8.1.2	Hodnotenie makrofágov pod fluorescenčným mikroskopom.....	38
8.2	Demonštrácia výsledkov a experimentálnych podmienok jednotlivých experimentov.....	45
8.2.1	Vyhodnotenie vzoriek získaných prvou izoláciou exozómov.....	47
8.2.2	Vyhodnotenie vzoriek získaných druhou izoláciou exozómov.....	49
9.	DISKUSIA.....	54
10.	ZÁVER.....	57
11.	POUŽITÉ SKRATKY.....	58
12.	ZOZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKOV, GRAFOV A TABULIEK.....	60
13.	POUŽITÁ LETERATÚRA.....	62

## 2. 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 myší typu BALB/c, virulentným kmeňom baktérie, *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* FSC200 s následnou základnou charakterizáciou a identifikáciou vyzolovaných 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 vyzolovaných 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 vyzolovať a charakterizovať dva myšacie proteíny v kontrolnej vzorke (proteíny vyzolované z neinfikovaných makrofágov) a trinásť myšacích proteínov a dva proteíny pôvodom z *F. tularensis* v infikovanej vzorke (proteíny vyzolované 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*

### 3. ABSTRACT

**Charles University**

**Faculty of Pharmacy in Hradec Králové**

**Department of Biological and Medical Sciences**

**Author:** Michaela Hudáková

**Supervisor:** RNDr. Klára Konečná, Ph.D.

**Consultant:** doc. PharmDr. Ivona Pávková, Ph.D.

**Title of master's thesis:** Isolation of exosomes produced by macrophages infected with *F. tularensis*

**Background:** The main objective of the presented work was to establish and optimize a model for isolating exosomes from infected BALB/c mouse macrophages using the virulent strain of the bacterium *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* FSC200, followed by the basic characterization and identification of the isolated proteins.

**Methods:** The model setup for the exosome isolation method was carried out using light and fluorescence microscopy, during which the experimental conditions were established — a two-hour interval for infection, and cultivation and infection of cells in a serum-free environment. For the actual isolation of exosomes, a method based on differential centrifugation and ultracentrifugation was chosen. Selected analytical methods were used for the basic characterization of the isolated proteins – protein determination using bicinchoninic acid modified for small volumes and analysis by dynamic light scattering. The final identification of these proteins was carried out by performing mass spectrometry.

**Results:** Based on the selected methodological approach, it was possible to isolate and characterize two mouse proteins in the control sample (proteins isolated from uninfected macrophages) and thirteen mouse proteins and two proteins originating from *F. tularensis* in the infected sample (proteins isolated from infected macrophages). Mass spectrometry showed zero or undetectable amount of proteins typical for exosomes (e.g., CD9, CD81, TSG101, Alix).



**Conclusions:** The conditions chosen for the exosome isolation model proved to be inadequate due to the low exosomal yield. A possible cause might be the short time interval selected for macrophage infection, during which not enough exosomes are produced.

**Keywords:** exosomes, macrophages, isolation, *Francisella tularensis*

## 4. ÚVOD

Exozómy sú nanovezikuly s veľkosťou približne od 30 do 150 nm, patriace do skupiny extracelulárnych vezikúl (*extracellular vesicles*, EV), ktoré sa ďalej delia na mikrovezikuly, ektozómy a apoptotické telieska. Ako nositelia bioaktívnych molekúl z materských buniek do buniek hostiteľských sa exozómy podieľajú na medzibunkovej komunikácii, čím môžu takisto regulovať množstvo fyziologických aj patologických procesov. Predovšetkým ich úloha v rôznych imunitných procesoch či priebehu ochorení z nich robí zaujímavých kandidátov pre ich dôkladnejšie preskúmanie, ktoré by mohlo odhaliť ich potenciálne využitie v odbore diagnostiky, terapie či objasnení patogenézy mnohých ochorení.

Predmetom výskumu sú najmä exozómy produkované makrofágmi, ktoré sú zaujímavé z hľadiska ich schopnosti vyvolať alebo potlačiť imunitnú reakciu organizmu v procese infekcie v závislosti na pôvode nákladu, ktorý nesú. Ten môže byť modulovaný v prospech patogénu, ktorý ochorenie spôsobuje tak, aby bola zachovaná jeho virulencia. Preto je vysoko pravdepodobné, že exozómy produkované makrofágmi môžu hrať kľúčovú rolu pri infekcii potenciálne smrteľným ochorením, tularémiou, ktorá je spôsobená vysoko infekčnou gramnegatívnou baktériou, *F. tularensis*. Tento intracelulárny patogén aktívne napadá široké spektrum buniek vrátane makrofágov, pričom s ľahkosťou uniká imunitnému systému hostiteľa. Nutnosť v pochopení základných mechanizmov patogenézy, ktorých znalosť je potrebná pre vývoj nových terapeutických a profylaktických prostriedkov je fakt, že *F. tularensis* je potenciálne zneužitelná ako bioteroristická zbraň. Mnoho súčasných štúdií sa preto venuje izolácii exozómov, avšak aj napriek tomu, že izolačných metód je pomerne veľké množstvo, ani jedna z nich nie je ideálna a neuspokojuje svojimi výsledkami. Ich častým problémom je neschopnosť odlíšiť jednotlivé EV, tým zabezpečiť čistý produkt izolácie, a teda získať dostatočný počet exozómov na vykonanie funkčných štúdií. Práve preto je kladená značná dôležitosť na optimalizáciu ostatných krokov postupu získania exozómov, ktoré by mohli zlepšiť výsledky aj samotnej izolácie.

## 5. ZADANIE – CIEĽ PRÁCE

Hlavným cieľom predkladanej práce bolo nastavenie podmienok pre izoláciu exozómov z infikovaných primárnych makrofágov izolovaných z kostnej drene myší typu BALB/c, virulentným kmeňom baktérie, *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* FSC200. Jednotlivé kroky zahrňovali:

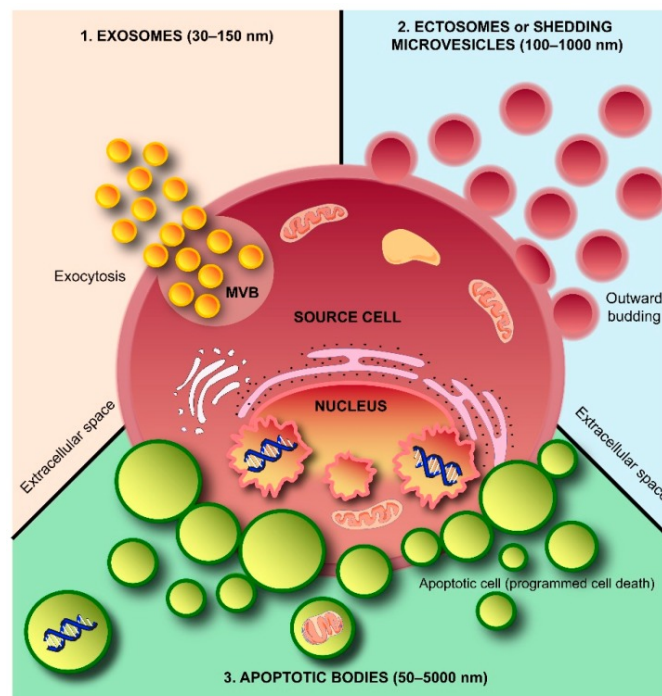
- optimalizáciu modelu infekcie buniek kultivovaných v médiu bez séra
- aplikácia postupu izolácie založeného na použití diferenciálnej centrifugácie a ultracentrifugácie
- vyskúšanie a ohodnotenie zvolených analytických metód využitých pre základnú charakteristiku vyizolovaných proteínov (modifikované stanovenie bielkoviny pomocou kyseliny bicinchonínovej, stanovenie veľkosti častíc pomocou dynamického rozptylu svetla)
- identifikácia proteínov typických pre exozómy vo výsledných vzorkách pomocou hmotnostnej spektrometrie

## 6. TEORETICKÁ ČASŤ

### 6.1 Exozómy

#### 6.1.1 Charakteristika exozómov

Exozómy sú charakterizované ako nanovezikulárne štruktúry o veľkosti 30 - 150 nm, produkované rôznymi typmi buniek. Patria do početnej skupiny EV, ktoré hrajú významnú úlohu v medzibunkovej komunikácii. EV je možné vzhľadom na ich odlišné funkčné a morfológické znaky kategorizovať tromi podskupinami – exozómy; ektozómy a mikrovezikuly; apoptotické telieska (viď. Obr. č. 1). Exozómy slúžia ako nosiči radu bioaktívnych molekúl produkovaných bunkou, z ktorej sú secerované. Plnia komunikačnú funkciu nie len pri fyziologických, ale aj patologických stavoch organizmu (Iraci *et al.* 2016; Rodrigues *et al.* 2018a).

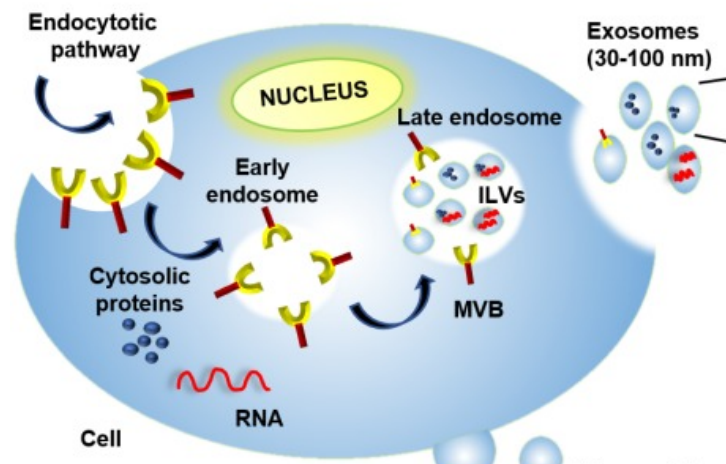


Obrázok č. 1 – Delenie extracelulárnych vezikúl

Legenda: *apoptic cell / bodies* – apoptotické bunky / telieska, *ectosomes* – ektozómy, *exocytosis* – exocytóza, *exosomes* – exozómy, *extracellular space* – extracelulárny priestor, *MBV* – multivezikulárne telieska, *nucleus* – jadro, *outward budding* – vonkajšie pučanie, *source cell* – zdrojová bunka

Zdroj: prevzaté z Kalra H, Drummen GP, Mathivanan S., 2016

Biogenéza exozómov začína tvorbou skorých endozómov vnútorným pučaním plazmatickej membrány bunky. Takto vzniknuté endozómy sú označované ako intraluminárne vezikuly (ILV) a ich opätovnou invagináciou dochádza k vzniku multivezikulárnych teliesok (MBV), čo je iné pomenovanie pre neskorý endozóm (Rodrigues *et al.* 2018a). Ten sa buď po fúzii s lyzozýmami degraduje alebo splýva s plazmatickou membránou, čím dochádza k uvoľneniu ILV, v tomto momente označovaných ako „exozómy“, do extracelulárneho prostredia (viď. Obr. Č 2) (Chaudhari *et al.* 2022). Pri procese biogenézy exozómov spoločne so selekciou exozomálneho nákladu hrá významnú úlohu endozomálny triediaci komplex, ktorý je potrebný pre transport (*endosomal sorting complex required for transport*, ESCRT). ESCRT je komplex skladajúci sa zo štyroch podjednotiek (0 – III), pričom každá z nich zastáva odlišnú funkciu. Vzájomne sa podieľajú na vzniku endozómov (ILV, MBV) a triedení proteínov. Aj napriek existujúcim pochybnostiam o role ESCRT pri uvoľňovaní exozómov, mnohé proteínové zložky zviazané s ESCRT boli nájdené vo vyizolovaných exozómoch (ubikvitonové proteíny, Alix a iné) na podklade čoho je možné usúdiť, že ESCRT pre biogenézu exozómov nejaký význam má. Podľa novších štúdií, exozómy dokážu vznikáť aj iným spôsobom, kde sa na rozdiel od ESCRT podieľajú na procese biogenézy mikrodomény. Sfingomyelinázy, bohato zastúpené v membránových mikrodoménach, dávajú vzniku ceramidom. Tie môžu indukovať a dopomáhať pučaniu endozomálnej membrány, a teda aj vzniku exozómov (Zhang *et al.* 2019). Okrem spomínaných sfingomyelináz sú v mikrodoménach obsiahnuté aj proteíny tetraspaníny, ktoré tiež zastávajú významnú rolu v tvorbe exozómov či ich nákladu.



**Obrázok č. 2 – Proces biogenézy exozómov.**

Legenda: *cytosolic proteins* – cytosolické proteíny, *early endosome* – skorý endozóm, *endocytotic pathway* – endocytárna dráha, *exosomes* – exozómy, *MBV* – multivezikulárne telieska, *nucleus* – jadro, *late endosome* – neskorý endozóm, *RNA* – ribonukleová kyselina

Zdroj: prevzaté z Rodrigues *et al.* 2018 a upravené

Vytvorené exozómy sú nosičmi biomolekúl, najčastejšie proteínov, lipidov a nukleových kyselín (miRNA, mRNA, DNA) alebo bunkových metabolitov chránených fosfolipidovou membránou (Rodrigues *et al.* 2018b). Jej stavba prevažne pozostáva z nenasýtených lipidov, cholesterolu, fosfatidylserínu a sfingolipidov. Exozómy sú vybavené proteínmi nachádzajúcimi sa na povrchu membrány alebo priamo v cytosole sprostredkujúcimi rôzne funkcie. Transport a následne fúziu s cieľovou bunkou umožňujú proteínové zložky ako anexíny, GTPázy, flotilín či proteíny tepelného šoku špecifické pre všetky typy exozómov (Zou *et al.* 2023; Gurung *et al.* 2021). Významnou skupinou proteínov sú tetraspaníny, a to hlavne molekuly s označením klastra (*cluster designation*, CD) ako CD9, CD63 a CD81, ktoré sa podieľajú na tvorbe exozomálneho obsahu. Spolu s integrínmi zabezpečujúcimi adhéziu alebo antigén prezentujúcimi molekulami hlavného histokompatibilného komplexu triedy I a II, spadajú tetraspaníny a ďalšie iné proteíny do skupiny proteínov špecificky tvorených v mieste pôvodu daného exozómu (Mashouri *et al.* 2019). Zaujímavosťou je, že práve tetraspaníny, proteíny situované v exozomálnej membráne, sú pri chorobných procesoch patogénmi zneužívané k ľahšiemu vstupu do bunky (Perez-Hernandez *et al.* 2013). Obsah exozómov pochádzajúci z cytosolu rodičovskej bunky, bunka prispôsobuje na základe vonkajších vplyvov. Jeho zloženie môže poskytovať náhľad na aktuálny stav bunky (Shahi, Kang, Fonseka 2024).

### 6.1.2 Význam exozómov z hľadiska infekcie

Exozómy sa rovnako ako všetky EV podieľajú na zabezpečení správneho chodu mnohých fyziologických pochodov, medzi ktoré sa zaradzuje hlavne oprava tkanív a stimulácia imunity. Pozornosť na seba strhávajú avšak aj z iného dôvodu, a tým je ich význam v procese patologických dejov a ich potencionálne využitie v terapii (Shahi *et al.* 2024). V procese infekcie sú exozómy jedným z cieľových miest pôsobenia patogénov, ktoré modifikujú ich funkciu s cieľom potlačiť imunitnú reakciu hostiteľského organizmu alebo potencovať vlastnú schopnosť infekcie (Rodrigues *et al.* 2018b). Modifikované exozómy hostiteľskej bunky tak vo svojom náklade nesú navyše aj faktory virulencie patogénu, ktorý bunku infikuje (Kwaku *et al.* 2024).

Medzi najviac skúmané sa ukázali exozómy vylučované makrofágmi, vzhľadom na významnú úlohu makrofágov v imunologických procesoch, ako napríklad schopnosť podnecovať prozápalovú odpoveď pri fyziologických procesoch či pomáhať imunitnému systému rozpoznávať infikované bunky (Bhatnagar *et al.* 2007). Tieto exozómy s obsahom prozápalových cytokínov a chemokínov sú vylučované makrofágmi ako reakcia organizmu pri infekcii patogénom a aktivujú rôzne prozápalové signálne kaskády. Zaujímavosťou je, že táto imunitná odpoveď je špecificky podmienená patogénnymi exozómami a nie patogénom ako takým. Vo viacerých prípadoch však bunky v reakcii

s exozómami odvodenými od baktérií, ako napríklad *F. tularensis*, začnú spoločne s prozápalovými faktormi indukovať aj protizápalové, čím dochádza k dvojitej odpovedi bunky na infekciu (viď. Tab. č. 1). Mnohé exozómy odvodené od baktérií dokážu rovnako tmiť prozápalové reakcie organizmu a modulovať aktiváciu buniek imunitného systému znížením tvorby molekúl histokompatibilných komplexov či antigén prezentujúcich molekúl. V prípade potreby dokážu bakteriálne exozómy, tiež cez svoj špecifický obsah, indukovať apoptózu hostiteľskej bunky (Kwaku *et al.* 2024).

**Tabuľka č. 1 – Porovnanie efektorových molekúl vylučovaných bunkami imunitného systému pri infekcii *Francisella tularensis***

Druh baktérie	Prozápalové reakcie		Protizápalové reakcie	
	typ bunky	odpoveď	typ bunky	odpoveď
<i>Francisella tularensis</i>	Myšie makrofágy	zníženie aktivity kaspázy, produkcia TNF $\alpha$ , IL-6, IL-12p70, CXCL1, MCP-1 a IL-1 $\alpha$	Myšie makrofágy	zvýšenie tvorby IL-10, porušenie membrány, zvýšená aktivita kaspázy

Zdroj: prevzaté a upravené z Kwaku *et al.* 2024

## 6.2 *Francisella tularensis*

### 6.2.1 Charakteristika baktérie *Francisella tularensis*

Gramnegatívna baktéria, *Francisella tularensis* (*F. tularensis*), je nepohyblivým, fakultatívne intracelulárnym patogénom. Je vysoko virulentným agensom a priamym pôvodcom tularémie, nebezpečného a potencionálne smrteľného zoonotického ochorenia (Oyston 2008; Maurin 2015).

Izolovaná bola *F. tularensis* prvýkrát zo sýslôv nakazených morom na začiatku 20. storočia. Sýsle žili v oblasti amerického štátu Kalifornia s názvom Tulare, na základe ktorého dostala prvotné pomenovanie, *Bacterium tularense* (McCoy a Chapin 1912). Až neskôr, v roku 1947, bol jej názov zmenený podľa Dr. Edwarda Francisa, ktorý sa vo významnej miere, ako jeden z prvých, podieľal na jej výskume. Následne sa stala prvým zástupcom dominujúcim v novovzniknutom rode *Francisella* (Oyston 2008).

Z mikrobiologického hľadiska je *F. tularensis* definovaná ako pleomorfný, obligátne aeróbný kokobacil neprodukujúci spóry s veľkosťou 0,1 - 3  $\mu$ m. Vyznačuje sa pomalým nárastom v tekutom

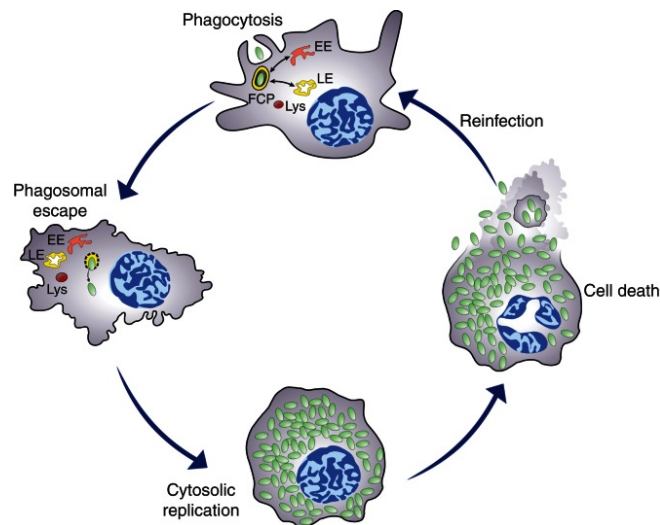
médiu a všeobecnou vysokou náročnosťou na kultiváciu s potrebou obohatenia kultivačného média, napríklad o cysteín. Ako optimálne podmienky pre rast sa ukázali teplota 37 °C a pH 6,9. Po 24 - 48 hodinách možno pozorovať nárast 2 - 4 mm veľkých kolónií. V prípade najinfekčnejších kmeňov je pre prácu s nimi vyžadovaná úroveň bezpečnosti 3 (Oyston 2008; Foley a Nieto 2010; Hayoun *et al.* 2024; Sharma *et al.* 2023)

Už pri dávke desať jednotiek tvoriacich kolónie (*Colony Forming Units*, CFU) má baktéria *F. tularensis* schopnosť vyvolať infekciu (Ellis *et al.* 2002), čo poukazuje na jej vysokú mieru virulencie a ohrozujúci charakter v kontexte verejného zdravia (Hayoun *et al.* 2024). Z tohto dôvodu, ako aj pre iné vlastnosti (ľahká šíriteľnosť aerosólom, schopnosť prenosu infekcie rôznymi cestami), bola *F. tularensis* kategorizovaná Centrom pre kontrolu a prevenciu chorôb Spojených štátov amerických, do skupiny možných bioteroristických agens kategórie A, teda do skupiny s najvyššou prioritou (Maurin 2015; Hayoun *et al.* 2024).

Aj napriek tomu, že doposiaľ nie sú všetky faktory virulencie baktérie *F. tularensis* plne preskúmané, viacero štúdií poukazuje, že jej schopnosť infikovať živé organizmy, sa ukrýva v bunkovej štruktúre, genóme a obranných mechanizmoch, ktoré si počas svojej existencie dokázala vybudovať. Príkladom je kapsula, ktorou poddruhy *tularensis* a *holarctica* disponujú. Špecifické zloženie bakteriálnej lipopolysacharidovej membrány umožňuje baktérii ostať chránenou a nepovšimnutou z hľadiska imunitných procesov oproti iným baktériám (Hood 1977; McLendon *et al.* 2006). *F. tularensis* si vybudovala niekoľko mechanizmov virulencie, ktoré jej dopomáhajú v procese infekcie hostiteľskej bunky (viď. Obr. č. 3). Tento proces začína fagocytózou baktérie, pričom infikované môžu byť bunky rôzneho typu. Často sa jedná o makrofágy alebo iné bunky imunitného systému (neutrofil, dendritické bunky, hepatocyty a iné) (Vozandychova *et al.* 2023). V prípade fagocytózy baktericídny fagocytmi sa *F. tularensis* bráni pred vychytávaním tým, že zníži expresiu ligandov potrebných pri opsonizácii fagocytmi, a tým znižuje pravdepodobnosť jej rozpoznania (Celli a Zahrt 2013). Naopak, je schopná zvyšovať aktivitu deubikvitinačných enzýmov hostiteľa, a tým podporuje degradáciu ubikvitínu, proteínu, ktorý má význam v modifikácii proteínov pre uľahčenie ich lokalizácie a endocytózu (Vozandychova *et al.* 2023). Po fagocytóze ďalej baktéria putuje do fagozómu, ktorý postupne dozrieva a následne fúzuje s lyzozómom, kde dochádza k jej degradácii. Genóm *F. tularensis* obsahuje duplikovanú špecifickú sekvenciu kódujúcich génov s názvom ostrov patogenity, ktorý je kľúčový pre únik baktérie z fagozómu do cytosolu. Tak robí na základe expresie génov kódujúcich produkciu proteínov (IglC, MglA a iné) podieľajúcich sa na procese biogenézy fagozómov, a teda aj na ich dozrievaní. Dozrievanie je podmienkou pre fúziu s lyzozómami hostiteľskej bunky (Bröms *et al.* 2010). Fagozomálny únik je nevyhnutnou fázou procesu infekcie. Baktériu sú tak uvoľnené do cytosolu kde dochádza k proliferácii. Tá postupne vedie k poslednému



kroku infekcie, ktorým je apoptóza bunky a uvoľneniu proliferovaných baktérií do extracelulárneho prostredia (Celli a Zahrt 2013).



**Obrázok č. 3 – Proces infekcie makrofágov baktériou *Francisella tularensis***

Legenda: phagocytosis – fagocytóza, phagosomal escape – fagozomálny únik, cytosolic replication – cytozolitická replikácia, cell death – bunková smrť, reinfection – reinfikácia

Zdroj: prevzaté a upravené z Celli a Zahrt 2013

## 6.2.2 Taxonómia *Francisella tularensis*

*F. tularensis* je radená medzi gramnegatívne baktérie a na základe analýzy 16s ribozomálnych DNA sekvencií spadá do  $\gamma$ -podtriedy proteobaktérií. Taxonomicky sa zaradzuje do čeľade *Francisellaceae* a jediného dominujúceho rodu, rodu *Francisella* (viď. Tab. č. 2) (Forsman *et al.* 1994; McLendon *et al.* 2006). Známe sú všeobecne štyri poddruhy *F. tularensis*, ktoré sa navzájom líšia geografickým výskytom a mierou virulencie – *F. tularensis* subsp. *tularensis* (typ A), *F. tularensis* subsp. *holarctica* (typ B), *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* a *F. tularensis* subsp. *novicida*.

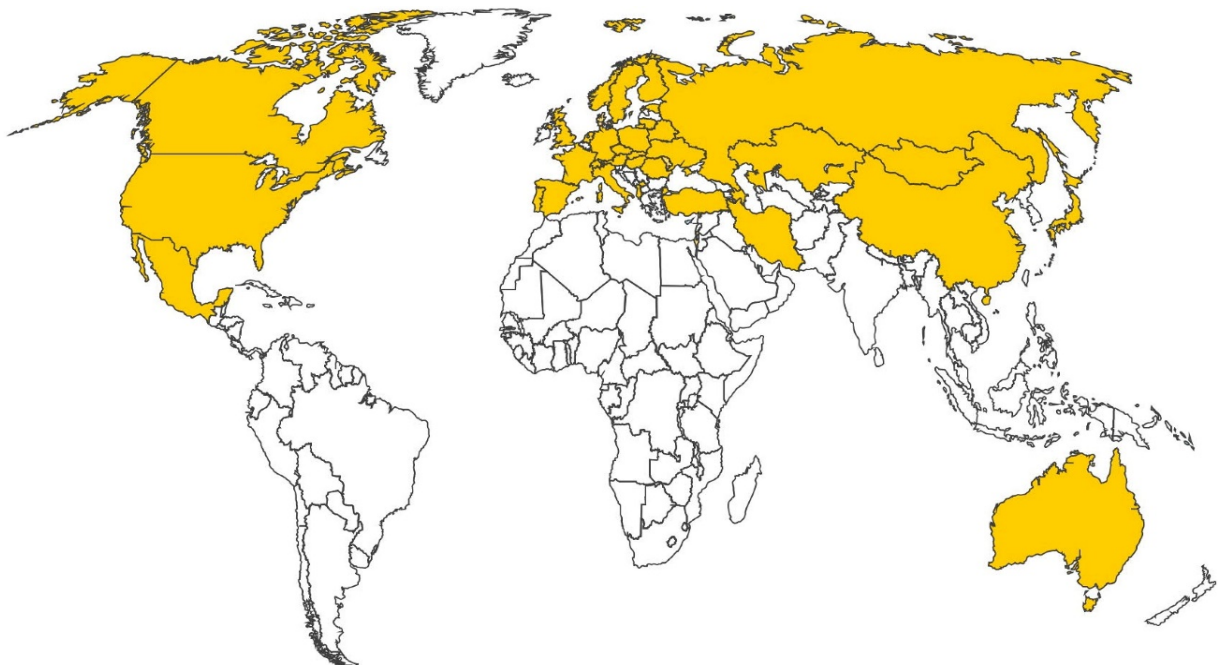
Najväčšiemu záujmu v oblasti výskumu sú vystavené biovary *F. tularensis* subsp. *tularensis* a *F. tularensis* subsp. *holarctica*, disponujúce schopnosťou tvoriť puzdrá. Tento fakt prispieva k ich vysokej patogenite, virulencii a robí z nich klinicky významné poddruhy, ktoré ako jediné spôsobujú ochorenie u ľudí (McLendon *et al.* 2006). Oba biovary boli bližšie kategorizované za využitia pulznej gélovej elektroforézy na ďalšie podtypy (typ A – I, II; typ B – I, II, *Japonica*), pričom bola na rozdiel od typu B, preukázaná pri type A súvislosť medzi genotypom a virulenciou. Novšie štúdie ďalej konkretizovali, že práve podtyp A.I sa ukazuje ako najvirulentnejší, čo podčiarkuje aj fakt, že až 35 % prípadov nákazy končí úmrtím (Maurin 2015; Larson *et al.* 2020). Ich výskyt je lokalizovaný vo väčšej miere na severnej hemisfére poglobule, avšak nedávne štúdie vykazujú dôkazy, ktoré identifikujú nové

prípady výskytu tularémie v krajinách južnej pologule ako Austrália či Turecko. *F. tularensis* subsp. *tularensis* je patogénom najviac pôsobiacim na území Severnej Ameriky a *F. tularensis* subsp. *holarctica* zas vyskytujúcim sa najmä na severnej pologuli, preferovane v Európe (vid'. Obr. č. 4) (Appelt *et al.* 2020; Kutlu *et al.* 2021; Foley a Nieto 2010)

Tabuľka č. 2 – Druhy rodu *Francisella* a ich charakterizácia

Druh	Poddruh	Podtyp	Virulencia	Distribúcia
<i>F. tularensis</i>	<i>tularensis</i>	A.I	Veľmi vysoká	Severná Amerika
	<i>tularensis</i>	A.II	Stredná (Menej virulentná pre ľudí ako izoláty typu B)	Severná Amerika
	<i>holarctica</i>	B	Vysoká	Na celej severnej (južnej) pologuli
	<i>mediasiatica</i>	–	Vysoká	Stredná Ázia
	<i>novicida</i>	–	Nízka (jedinci s potlačenou imunitou)	Široký

Zdroj: prevzaté a upravené z Johansson *et al.* 2015



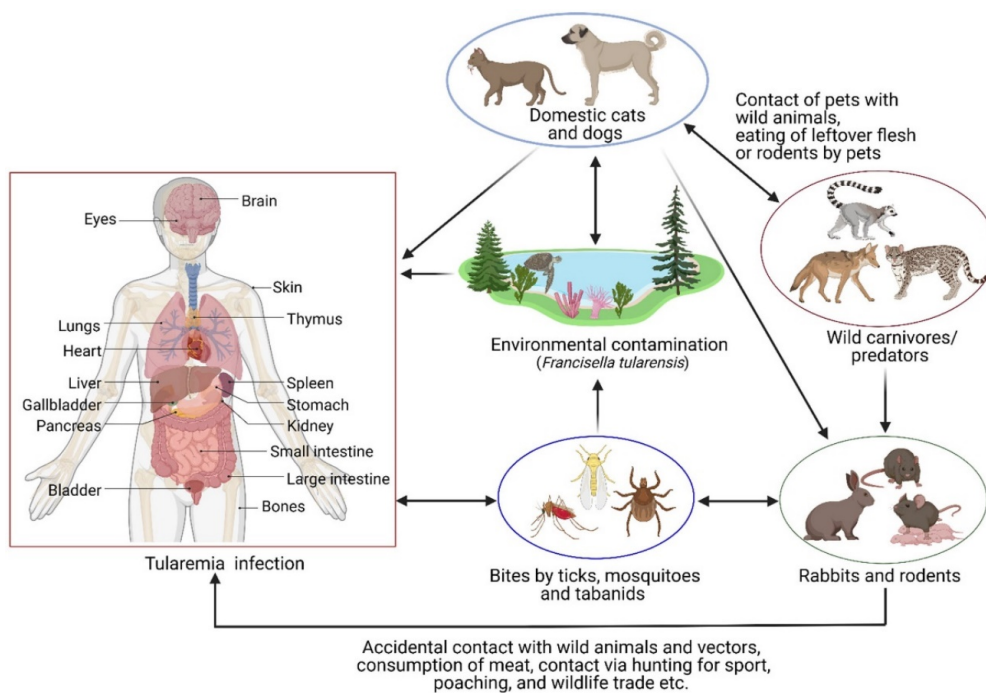
Obrázok č. 4 – Rozšírenie tularémie vo svete

Zdroj: prevzaté z Sharma *et al.* 2023

### 6.2.3 Ochorenie tularémia

„Kráľičia horúčka“, „zajačia horúčka“ alebo „Oharova choroba“ sú rozdielne pomenovania pre jedno a to isté ochorenie, ktoré dnes poznáme pod súhrnným názvom tularémia. Jedná sa o multisystémovú vysoko infekčnú zoonózu spôsobenú baktériou *F. tularensis* (Foley a Nieto 2010).

Zradná nebezpečnosť tohto ochorenia sa skrýva v jeho ľahkej šíriteľnosti a spôsobe prenosu na hostiteľa. Najčastejšie tak býva cez vdychovaný vzduch, požitím infikovanej vody alebo potravy či priamym kontaktom patogénu s hostiteľom. K prenosu môže dôjsť aj prostredníctvom uhryznutia nakazeným vektorom. Bolo rozpoznávaných viac ako 300 rôznych druhov živočíchov, ktoré podliehajú infekcii, a tým pádom vystupujú ako potencionálni prenášači tohto ochorenia, pričom nebol zaznamenaný žiaden prípad prenosu tejto choroby medzi ľuďmi navzájom. Jedná sa najmä o malé článkonožce, napríklad kliešte, komáre či muchy, ktoré môžu priamo infikovať človeka alebo tak robia cez druhotného prenášača akým sú zväčša malé cicavce. Práve kvôli mnohým prípadom nákazy, ktoré boli v minulosti zaznamenané u malých hlodavcov ako sú králiky, zajace či sysle, dostala tularémia svoje historické pomenovanie. Dlho sa verilo, že tieto zvieratá sú hlavným rezervoárom a prenášačom tularémie. Dnes sa vie, že tento fakt nie je pravdou, na základe hlásených prípadov nákazy domácimi miláčikmi, najviac mačka a pes, kedy došlo k prenosu infekcie na majiteľa (viď. Obr. č. 5) Aj napriek tomu ostávajú najviac ohrozenou skupinou poľnohospodári, lesníci, veterinári. (Snowden a Simonsen 2024; Oyston 2008; Johansson *et al.* 2015).



Obrázok č. 5 – Schéma prenosu tularémie

Vysvetlivky: K prenosu tularémie môže dôjsť rôznymi, častokrát od seba závislými cestami – uhryznutie človeka nakazeným hmyzom, požitie kontaminovanej vody a potravy, vdychnutím, náhodný kontakt s nakazenými zvieratami (malé hlodavce, divoké mäsožravce, domáci miláčikovia)

Zdroj: prevzaté a upravené z Sharma *et al.* 2023

Typ ochorenia, klinický obraz, ale aj citlivosť na antibiotickú liečbu sa líši v závislosti na bakteriálnom kmeni, ktorý ochorenie spôsobí. V prípade nákazy najviac virulentnými kmeňmi (*F. tularensis* biovar *tularensis* typ A.I) dochádza k nástupu ochorenia už do piatich dní od stretu s patogénom. Zároveň môže byť ochorenie sprevádzané závažnými komplikáciami, v dôsledku ktorých až tretina nedostatočne liečených nakazených končí úmrtím (Oyston 2008).

Medzi základné klinické symptómy tularémie sa radia príznaky podobné chrípke, ako napríklad zimnica, vysoká horúčka (38 - 40°C), bolesť hlavy, myalgia a malátnosť. Ostatné prejavy sú špecificky viazané s konkrétnym typom choroby, ktorých vývin je podmienený cestou infekcie (viď. Obr. č. 6). Všeobecne je známych šesť foriem tularémie – ulceroglandulárna, glandulárna, okoglandulárna, pľúcna, orofaryngeálna a gastrointestinálna a tyfoidná.

Prenos kožou vedie k ulceroglandulárnemu typu, ktorý je spomedzi všetkých najbežnejší (80 % prípadov). Typickým rysom tejto formy je vred tvoriaci sa v mieste infekcie, ktorý je prvotne ohraničený s exudátom a neskôr časom sčernie. Ďalším charakteristickým rysom je zápal tkaniva lokalizovaný v blízkosti miesta vredu a bolestivý opuch lymfatických uzlín spravidla v axilárnej oblasti odprevádzaný hnisavým výtokom. V najhorších prípadoch dochádza u pacientov nakazených týmto typom tularémie k septikémii, pneumónii alebo smrti. Ak nedochádza k tvorbe vredu, nazýva sa táto forma ako glandulárna. Po infekcii hostiteľa prostredníctvom očí môže dôjsť k vývoju takzvanej okuglandulárnej formy vyznačujúcej sa jednostrannou konjunktivitídou a vredom spojivky. Pľúcny alebo aj inak pneumónny typ tularémie sa vyskytuje za predpokladu, že k nákaze došlo po inhalácii patogénu. Charakteristickou črtou sú ťažké respiračné problémy – suchý dráždivý a bolestivý kašeľ – pričom ochorenie môže progredovať do lobárnej pneumónie, krvavému pleurálnemu výpotku a až v 40 % prípadov končí úmrtím. Po perorálnom podaní sa môže vyvinúť orofaryngeálna a gastrointestinálna forma. U pacientov sa nachádza lymfodenopatia v oblasti zažívacieho traktu a faryngu, čo vedie k bolesti, hnačke, zvracaniu alebo pri komplikáciách aj ku krvácaniu v mezenterickej oblasti čoho následkom je v 60 % smrť. U tyfoidnej tularémie nebola presne identifikovaná cesta prenosu, avšak domnieva sa, že vzniká progredáciou iných typov ochorenia. Typickým pre ňu je absencia lézií a neurologické príznaky (Foley a Nieto 2010; Snowden a Simonsen 2024; Sharma *et al.* 2023).



prvotný svetlý vred s exudátom v mieste infekcie patogénom

Zdroje: (Anon. [b.r.])



druhový čierny vred v mieste infekcie patogénom

Zdroje: (Frischknecht *et al.* 2019)



lymfadenopatia v oblasti krku

Zdroje: (Ulu-Kilic a Doganay 2014)



hnisavá konjunktívída pri okuloglandulárnej forme

Zdroje: (Thompson *et al.* 2001)

### Obrázok č. 6 – Symptómy tularémie

Diagnostika tularémie u ľudí je v mnohých prípadoch kvôli málo špecifickým symptómom pomerne náročná. Existuje však niekoľko metód, ktoré k správnej diagnostike dopomáhajú. Jedným z nich je vyhodnotenie na základe hodnoty protilátok v odobratom vzorku. Tým môže byť najčastejšie sekrét z vredov alebo aj krv, sérum, moč, aspirát a iné. Odber sa vykonáva pred zahájením antibiotickej liečby. Druhým a hlavným spôsobom je diagnostika postavená na kultivácii mikroorganizmu. K detekcii *F. tularensis* v klinických vzorkách sa využívajú aj metódy sérologickej

diagnostiky (napr. ELISA, imunoblot), molekulárnej diagnostiky (napr. špecifické PCR testy) a mikrobiologickej diagnostiky (napr. sekvenovanie genómu, MALDI–TOF spektrometria) (Sharma *et al.* 2023).

Stratégia terapie tularémie je postavená na profylaxii vo forme lekárskeho odporúčania, ohľadom dodržiavania ochranných opatrení voči hlavným prenášačom a antibiotickej liečbe. V medikamentóznej liečbe dominujú zástupcovia skupiny aminoglikozidov (streptomycín, gentamicín), tetracyklínov (doxycyklín) a fluorochinolónov (ciprofloxacín, levofloxacín, moxifloxacín). Aj napriek neustále prebiehajúcim výskumom, doposiaľ nebola uvedená a povolená žiadna vakcína proti tularémii, ktorá by mohla pôsobiť ako u ľudí tak i u zvierat (Maurin *et al.* 2023; Sharma *et al.* 2023).

## **6.3 Izolácia exozómov**

### **6.3.1 Metódy izolácie exozómov**

Potenciálna hodnota exozómov v oblasti diagnostiky a terapie chorôb podnietila záujem výskumníkov o vývoj metód k ich izolácii. Aj napriek tomu v dnešnej dobe existuje pomerne malé množstvo využiteľných postupov, na základe ktorých by bolo možné efektívne (rýchlo a jednoducho), špecificky (odlíšenie od iných EV) a bez strát (vyšší výťažok) vyizolovať a následne identifikovať nanovezikuly akými sú žiadané exozómy (Rodrigues *et al.* 2018b). Metódy izolácie exozómov používané v súčasnosti fungujú na princípe, ktorý využíva fyzikálne–chemické vlastnosti exozómov, ako je ich veľkosť, tvar, hustota, a prítomnosť membránových proteínov. Aj napriek snahe o extrakciu čistých exozómov, aktuálna technika nedokáže rozlíšiť jemné odchýlky vo vlastnostiach iných EV, a preto sa mnohokrát vyskytujú v izoláte spolu s exozómami (Zhang *et al.* 2020).

Existuje niekoľko základných postupov izolácie, pričom každý z nich je využívaný v závislosti na požiadavky na výsledný izolát. Medzi najčastejšie využívané patria ultracentrifugačné metódy (diferenciálna ultracentrifugácia a ultracentrifugácia s gradientom hustoty), ultrafiltrácia, veľkostne vylučovacia chromatografia, imunoafinitné zachytenie, zrážanie polymérov a iné (vid'. Tab. č. 3) (Liu *et al.* 2022).

### **6.3.2 Centrifugačné metódy**

Existuje niekoľko centrifugačných metód. Metódou voľby pre izoláciu exozómov vzhľadom na ich veľkosť je ultracentrifugácia (UC). Princíp UC spočíva vo využití veľkosti a hustoty izolovaných

častíc, čo z nej robí výhodnú metódu v prípade izolácie vzoriek s veľkostne definovanými časticami o rozdielnom sedimentačnom koeficiente. Pred UC je v mnohých prípadoch uskutočnená diferenciálna centrifugácia, kedy dochádza k peletovaniu bunkového odpadu, mŕtvych buniek a väčších EV, pri nižších rýchlostiach. Následne sa pri UC pri vysokých rýchlostiach peletujú spomínané exozómy a EV im podobné. Čistota a výťažok získaného izolátu je možné regulovať optimalizáciou podmienok a parametrov UC (typ rotora, odstredivá sila, čas). Jej výhoda v schopnosti izolovať exozómy bez potreby ich predošlého označenia, sa stretáva s nevýhodami, ako vysoká nákladovosť, časová náročnosť, poškodenie štruktúry exozómov alebo ich agregácia (Zhang *et al.* 2020). Práve kvôli nožnej agregácii proteínov v priebehu izolácie je potreba extrahované „exozómy“ podrobiť dodatočnej purifikácii. Deštrukcia integrity exozómov zapríčinená odstredivou silou, zas vedie k mylným výsledkom pri charakterizácii a identifikácii vyizolovaných exozómov (Liu *et al.* 2022). Izolácia exozómov je často doplnená UC v hustotnom gradiente. Princíp danej metódy je založený na rozdieloch v hustote izolovaných častíc a média, do ktorého sú umiestnené. To tvorí inertná látka s hustotným gradientom (napr. sacharóza). Pôsobením odstredivej sily sa rôzne častice sústreďujú v rozdielnych polohách média. Výhodou tejto metódy je, že nedochádza k deformáciám častíc a poskytuje čistejšie vzorky v porovnaní s klasickou UC (Liu *et al.* 2022).

### 6.3.3 Ostatné izolačné metódy

Okrem centrifugačných metód sa k izolácii frekventovanej používajú aj iné metódy. Príkladom je ultrafiltrácia (technika izolácie exozómov založená na filtrácii vzorky exozómov cez membránový filter, ktorý má definovanú veľkosť pórov o niečo väčšiu ako je veľkosť samotných exozómov) (0,8 a 0,45  $\mu\text{m}$ ). Tým dochádza k zachytávaniu častíc väčších ako sú požadované exozómy a výsledkom je filtrát s obsahom exozómov. Aj napriek nízkej nákladovosti má táto metóda mnoho nevýhod (malá čistota, nízky výťažok, potreba dodatočných úprav) (Sidhom *et al.* 2020). Ďalšou metódou pasívnej izolácie exozómov je veľkostne vylučovacia chromatografia, pri ktorej dochádza k separácii častíc v mobilnej fáze (biologická tekutina) prechodom cez stacionárnu fázu (porézny gélový polymér). V procese izolácie dochádza k zachytávaniu častíc v póroch polyméru, pričom väčšie častice sa tak eluujú ako prvé (menej sa zachytávajú) a žiadané exozómy ako posledné. Metóda poskytuje čisté izoláty bez poškodenia štruktúry exozómov. Nevýhodou je nízka výťažnosť a nedostatočná citlivosť metódy (Liu *et al.* 2022). Efektívna, rýchla a hromadne využiteľná je metóda zrážania proteínov. Sústreďením exozómov do vodného roztoku polyetylénglykolu dochádza k ich zhlukovaniu do agregátov, ktoré sú ľahko vyizolovateľné nízkorýchlostnou centrifugáciou. Možnou prekážkou v jej využití by mohla byť nízka čistota výslednej vzorky (Sidhom *et al.* 2020). Poslednou spomenutou je

metóda imunoafinitného zachytávania. Prítomnosť špecifických molekúl na exozomálnej membráne umožňuje ich izoláciu na princípe väzby antigén–protilátka. Vysoká cena tejto metódy ju umožňuje vykonávať na objemovo malých vzorkách (Sidhom *et al.* 2020; Liu *et al.* 2022).

**Tabuľka č. 3 – Porovnanie vybraných metód izolácie exozómov**

Metóda	Princíp	Výhoda	Nevýhoda	Čistota	čas	Objem vzorky
<b>Diferenciálna ultracentrifugácia</b>	Rôzne častice majú rôzne sedimentačné koeficienty	<ul style="list-style-type: none"> <li>Vhodné pre veľkoobjemové vzorky</li> <li>Nízke náklady</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Zložitá výbava</li> <li>Náročné na prácu</li> <li>Potenciálne zničenie exozómov</li> </ul>	Nízka	≈4 hod	Veľký
<b>Ultracentrifugácia s hustotným gradientom</b>	Rôzne častice sa koncentrujú v špecifickej polohe v gradientovom médiu	<ul style="list-style-type: none"> <li>Vyššia čistota v porovnaní s DUC</li> <li>Samostatná exozomálna subpopulácia</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Zdlhávavá metóda</li> <li>Obmedzená kapacita spracovania</li> </ul>	Vysoká	10 - 18 hod	Stredný
<b>Ultrafiltrácia</b>	Použité membrány so špecifikovaným priemerom pórov alebo s limitom molekulovej hmotnosti ( <i>Molecular Weight Cut-Off</i> , MWCO)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Nízke náklady</li> <li>Časovo efektívna</li> <li>Jednoduché</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Hrozba roztrhnutia exozómu</li> </ul>	Stredná	≈2 - 4 hod	Stredný
<b>Veľkostne vylučovacia chromatografia</b>	Oddeľuje exozómy na základe hydrodynamických polomerov	<ul style="list-style-type: none"> <li>Zachováva integritu exozómov a prirodzenú biologickú aktivitu</li> <li>bez potreby predbežného spracovania</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Potenciálna kontaminácia</li> <li>Vysoké náklady na vybavenie</li> </ul>	Vysoká	15 min	Malý
<b>Imunoafinitné zachytenie</b>	Založené na špecifickom rozpoznávaní a väzbe antigén-protilátka	<ul style="list-style-type: none"> <li>Vysoká špecifickosť</li> <li>Jednoduché</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>poškodenie integrity exozómu</li> <li>Nákladné</li> <li>Nešpecifická väzba</li> </ul>	Vysoká	2 - 6 hod	Malý
<b>Zrážanie polymérov</b>	Polymér môže adherovať a precipitovať exozómy	<ul style="list-style-type: none"> <li>Vhodné pre všetky typy vzoriek</li> <li>Jednoduché a rýchle</li> <li>Žiadna deformácia exozómov</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ďalšie kroky pre vyššiu čistotu</li> </ul>	Stredná	0,5 - 12 hod	Malý

Zdroje: prevzaté a upravené z Liu *et al.* 2022



## 7. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

### 7.1 Zoznam použitého materiálu

#### 7.1.1 Biologický materiál

*Francisella tularensis* subsp. *holarctica* FSC200 – klinický izolát z kolekcie kmeňa (*Francisella Strain Collection*,FSC) (Swedish Defense Research Agency , Švédsko)

*Francisella tularensis* subsp. *holarctica* FSC200 pTP388Hyg::mCherry – klinický izolát FSC2000 geneticky modifikovaný k exprimovaniu fluorescenčného proteínu mCherry (KMPB VLF UO, Česko)

*Francisella tularensis* FSC200 pTP551Hyg::eGFP – klinický izolát FSC2000 geneticky modifikovaný k exprimovaniu fluorescenčného proteínu eGFP (KMPB VLF UO, Česko)

laboratórne myši typu BALB/c, MHC Haplotyp H2d (Velaz s.r.o., Česko)

#### 7.1.2 Chemický materiál

##### 7.1.2.1 Chemikálie

BBL™ Hemoglobin	(Becton Dickinson, New Jersey)
BBL™ isoVitalex Enrichment	(Becton Dickinson, New Jersey)
Bovine Serum Albumin (BSA)	(Sigma-Aldrich, Massachusetts)
DAPI, 4',6 – Diamidino-2phenylindole dihydrochloride	(Invitrogen™, Massachusetts)
Difco™ GC Medium Base	(Becton Dickinson, New Jersey)
Deoxycholát sodný	(Sigma-Aldrich, Massachusetts)
Dithiothreitol (DTT)	(Sigma-Aldrich, Massachusetts)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	(Sigma-Aldrich, Massachusetts)
Ethylacetát	(Sigma-Aldrich, Massachusetts)
Fetal Bovine Serum, Heat inactivated (FBS)	(Sigma-Aldrich, Massachusetts)
16 % Formaldehyde Solution (W/v), Metanol-free (PFA)	(ThermoScientific, Massachusetts)
Hygromycin B (50 mg/ml)	(Invitrogen™, Massachusetts)
Jodoacetamid (IAA)	(Invitrogen™, Massachusetts)
Hydrogenuhličitan amónny (NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> )	(Sigma-Aldrich, Massachusetts)

Penicillin-Streptomycin	(Sigma-Aldrich, Massachusetts)
Phalloidin, Fluorescein isothiocyanate labeled (Phalloidin-FITC)	(Sigma-Aldrich, Massachusetts)
Phalloidin, tetramethylrhodamine B isothiocyanate (Phalloidin-TRITC)	(Sigma-Aldrich, Massachusetts)
ProLong™ Diamond Antifade Mountant	(Invitrogen™, Massachusetts)
StableCell™ DMEM – high glucose	(Sigma-Aldrich, Massachusetts)
Triton™ X-100	(Sigma-Aldrich, Massachusetts)
Trypánová modř	(Lachema s.r.o, Česko)
Trypsin	(Promega, Wisconsin)

### **7.1.2.2 Média a kultivačné pôdy**

#### **BMM (Bone Marrow–deprived Macrophages) médium**

##### Zloženie:

- StableCell™ DMEM – high glucose (200 ml )
- 10 % FTSI (50 ml)
- 10 % médium z bunkovej myšacej línie L929 (50 ml)

##### Príprava:

BMM médium bolo pripravené zmiešaním, jednotlivých roztokov, ktorými je tvorené.

#### **McLeodova kultivačná pôda**

##### Zloženie:

- roztok I. : GC Medium Base (72 g) deionizovaná voda (1 l)
- roztok II. : hemoglobín (20 g) deionizovaná voda (1 l)

##### Príprava:

Roztok I a roztok II bol pripravený zmiešaním jednotlivých zložiek daných roztokov. Roztoky boli autoklávované po dobu 20 minút pri teplote 121°C a následne spojené. Po ochladení na teplotu 50 °C bolo pridaných 20 ml IsoVitallexu. Za tepla bola prichystaná pôda naliata na platne a po stuhnutí pri izbovej teplote (room temperature, RT) uchovávaná v chladničke.

### 7.1.2.3 Kity

Qubit Protein Assay Kit	(Invitrogen™, Massachusetts)
Micro BCA kit	(Pierce, Massachusetts)

### 7.1.3 Prístrojové vybavenie

BOX BIO.EUROFLOW EF/S4	(Class II Cabinet, Florida)
------------------------	-----------------------------

#### Centrifugačné zariadenia

- centrifúgy

MiniSpinplus	(Eppendorf, Nemecko)
--------------	----------------------

Centrifuge 5804 R	(Eppendorf, Nemecko)
-------------------	----------------------

- Ultracentrifúgy

Optima™ L-90K Ultracentrifuge	(Beckman Coulter, Kalifornia)
-------------------------------	-------------------------------

Optima™ MAX Ultracentrifuge	(Beckman Coulter, Kalifornia)
-----------------------------	-------------------------------

Concentrator plus	(Eppendorf, Nemecko)
-------------------	----------------------

Inkubátor CO <sub>2</sub> CB 160	(Binder, Nemecko)
----------------------------------	-------------------

LUNA™ fl Dual Fluorescence Cell Counter	(Logos, Južná Kórea)
---	----------------------

Nano-Photometer	(Implen, Mníchov)
-----------------	-------------------

#### Mikroskopy

- Svetelné mikroskopy

Nikon Eclipse TS2	(Nikon, Japonsko)
-------------------	-------------------

- Fluorescenčné mikroskopy

Nikon Eclipse Ti Epi	(Nikon, Japonsko)
----------------------	-------------------

Thermomixer comfort	(Eppendorf, Nemecko)
---------------------	----------------------

Vortex	(Fisherbrand, Massachusetts)
--------	------------------------------

Zetasizer Nano ZS	(Malvern Panalytical, Spojené kráľovstvo)
-------------------	---

### 7.1.4 Laboratórne pomôcky

Empore™ C18-SD	(Supelco, Pennsylvania)
----------------	-------------------------

#### Kultivačné misky

Petriho misky o rôznych priemeroch (9 cm; 15 cm)

#### Mikrotitračné platničky

Rôzne druhy automatických pipiet a špičiek

Skúmavky o rôznych veľkostiach	(Eppendorf; Falcon)
--------------------------------	---------------------

Sterilné jednorázové pomôcky (kultivačný plast, hokejky, bakteriologická kľučka atd.)

## 7.2 Metódy

### 7.2.1 Kultivácia baktérií a príprava bakteriálnej suspenzie

Zmrazené zásobné roztoky kmeňov baktérie *F. tularensis* boli vysiate tri dni pred plánovaným prevedením pokusu na štyri McLeodove platne. Použité boli kmene baktérie *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* FSC200 (FSC200); *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* FSC200 (pTP388Hyg::mCherry) (FSC200/mCherry); *Francisella tularensis* FSC200 (pTP551Hyg::eGFP) (FSC200/eGFP). Platne sa nechali inkubovať 24 hodín pri teplote 37°C. Deň pred experimentom sa baktériami narastenými na týchto „zásobných“ platniach masívne preočkovali dve McLeodove platne a ponechali k inkubácii po dobu 24 hodín pri teplote 37°C. Narastené baktérie boli použité na prípravu bakteriálnych suspenzií.

Baktérie zozbierané bakteriologickou kľučkou, približne z polovice plochy jednej McLeodovej platne, boli rozotrené po bočnej strane steny skúmavky, doplnené o 2,5 ml fosfátového pufru (Phosphate Buffered Saline, PBS) a dôkladne vortexované do vzniku homogénnej suspenzie. Daná suspenzia bola meraná oproti blanku, ktorý tvoril čistý PBS a dopĺňaná o PBS do dosiahnutia výslednej hodnoty O.D. 1,0. Takto pripravená suspenzia obsahuje v 1 ml približne  $4 \times 10^9$  baktérií. Pre kontrolu bol vždy uskutočnený výsev vzorky tejto suspenzie v objeme 50  $\mu$ l a v riedení  $10^{-7}$  na dve McLeodove platne. Po niekoľkých dňoch kultivácie pri teplote 37°C sa odpočítal počet kolónií a vypočítal skutočný počet baktérií v pripravenej suspenzii. Zo suspenzie bol odobratý 1 ml vzorky do novej skúmavky a centrifugovaný po dobu 7 minút, pri otáčkach 3600 x g. Vzniknutý supernatant bol odpipetovaný a peleta prisadnutých baktérií resuspendovaná v 1 ml DMEM média s obsahom séra (10 % FTSI) alebo bez séra.

### 7.2.2 Izolácia makrofágov

Izolácia makrofágov bola realizovaná z kostnej drene myši typu BALB/c, extrahovanej z kostí zadných končatín. Jednotlivé zadné končatiny boli umiestnené po dobu troch minút do 70% roztoku etanolu, kde boli vydezinfikované a následne premiestnené do DMEM média. Tento proces bol opakovaný dva razy. Pomocou netkanej textílie alebo obrúsku boli šetrne zbavené prebytočného svalového tkaniva a opláchnuté DMEM médium. Prostredníctvom chirurgických nožničiek bola v kĺbovom spoji oddelená stehenná kosť od holennej a to tak, aby nedošlo k porušeniu celistvosti kosti. Následne im bola z oboch strán odňatá epifyzálna časť kosti, čím došlo k otvoreniu dutiny kostnej

drene. Injekčnou striekačkou s ihlou o veľkosti 25 G a pripraveným DMEM médiom boli nastrihnuté kosti z obidvoch strán prepláchnuté, a takýmto spôsobom zbavené kostnej drene. Na prepláchnutie bolo použité médium o minimálnom objeme 2 ml, ktoré sa následne zachytávalo spoločne s vyzolovanou kostnou dreňou do 50 ml skúmavky. Získaná vzorka bola ponechaná minútu v pokoji, aby mohlo dôjsť k usadeniu väčších častí. Supernatant bol pomocou Pasteurovej pipety prenesený do novej 50 ml skúmavky, centrifugovaný po dobu siedmich minút pri 300 x g a pri izbovej teplote. Centrifugáciou vzniknutý supernatant bol odstránený a sediment resuspendovaný v BMM médiu. Takto bola získaná suspenzia buniek kostnej drene s obsahom žiadaných kmeňových pluripotentných buniek esenciálnych pre kultiváciu makrofágov.

### 7.2.3 Diferenciácia makrofágov

Pre stanovenie množstva vyzolovaných buniek bol uskutočnený prepočet na základe mikroskopického pozorovania za použitia Bürkerovej komôrky. Prepočet bol zároveň overený na prístroji LUNA™– fl Dual Fluorescence Cell Counter. Na podklade týchto metód bolo možné určiť kvantum buniek na jeden mililiter média a overiť, či je počet extrahovaných buniek pre vykonanie experimentu dostačujúci (približné množstvo makrofágov, ktoré je možné vyzolovať z jedného kusu myši je minimálne  $1.5 \times 10^7$  buniek).

Pripravená bunková suspenzia bola nasadená na bakteriálne Petriho misky o priemere 90 cm, a to v množstve  $5 - 6 \times 10^6$  buniek na misku. Každá z misiek bola doplnená do 15 ml BMM média obohateného 50 U/ml roztokom penicilínu a 50  $\mu$ l/ml roztokom streptomycínu. Bunky boli kultivované po dobu troch dní pri teplote 37°C a 5 % CO<sub>2</sub>. Na tretí deň došlo k výmene média odobratím prvotne použitého BMM média s obsahom antibiotík a resuspendovaním buniek v novom BMM médiu bez prítomnosti antibiotík o objeme 15 ml. Po uplynutí siedmich dní došlo k diferenciácii vyzolovaných pluripotentných kmeňových buniek z myšacej kostnej drene na požadované makrofágy. Po vydiferencovaní buniek boli zozbierané a to prvotným odpipetovaním média a pridaním do každej Petriho misky približne 5 ml ľadového PBS. Vzorka sa takto nechala 5 - 10 minút odpočívať v chladničke. Následne bolo dno Petriho misky opakovaným pipetovaním šetrne oplachované zmieneným PBS, a tým prisadnuté makrofágy jemne "odrhnuté" teda zozbierané. Získané suspenzie makrofágov boli zozbierané zo všetkých misiek a sústredené do centrifugálnej skúmavky, centrifugované po dobu 15 minút pri 400 x g, resuspendované v 5 ml DMEM média a neskôr doplnené o ďalších 10 ml DMEM média. Počet makrofágov v 1 ml média bol opätovne určený prepočtom skrze Bürkerovú komôrku. Množstvo makrofágov potrebných pre daný experiment bol premiestnený do vhodnej kultivačnej nádoby (24-jamkový panel, Petriho misky) a ponechaný

k adhézii po dobu približne 16 hodín, pri teplote 37°C a v prostredí 5 % CO<sub>2</sub>. Podľa potreby boli bunky ponechané v médiu DMEM so sérom (10 % FTSI) alebo bez séra.

## **7.2.4 Infekcia makrofágov**

K adherovaným makrofágov, bola po kompletnom odsatí DMEM média pridaná bakteriálna suspenzia pripravená v DMEM médiu so sérom alebo bez séra, v takom množstve aby bola zachovaná multiplicita infekcie (MOI) 100. tj. 100 baktérií na jednu bunku. Takto infikované bunky sa nechali inkubovať 2 hodiny, pri teplote 37°C, v prostredí 5 % CO<sub>2</sub>. Infekcia makrofágov bola uskutočnená pred mikroskopickým pozorovaním a izoláciou exozómov.

## **7.2.5 Mikroskopia**

### **7.2.5.1 Pozorovanie makrofágov pod svetelným mikroskopom**

Vyizolované a vydiferencované makrofágy boli nasadené do 24-jamkovej doštičky v počte 5x10<sup>5</sup> buniek na jamku. V niektorých jamkách boli makrofágy v médiu DMEM s 10 % FTSI, v iných v médiu bez séra. Nasledujúci deň boli adherované makrofágy infikované, pridaním bakteriálnej suspenzie *F. tularensis* (MOI 100) a vo vybraných intervaloch (1 hod, 4 hod, 6 hod a 24 hod) bola prevedená vizuálna kontrola stavu buniek pod svetelným mikroskopom, Nikon Eclipse TS2 (objektív 10x), vybaveným kamerou DFK 33UX174 33U Series. Pozoroval sa rozdiel vo vzhľade a adhézii buniek v závislosti od prítomnosti séra v kultivačnom médiu. Z daného pozorovania boli v spomínaných časových intervaloch vyhotovené snímky.

### **7.2.5.2 Pozorovanie makrofágov pod fluorescenčným mikroskopom**

Suspenzia makrofágov bola nasadená na krycie sklá v počte 5x10<sup>5</sup> na jamku do dvoch multijamkových doštičiek. Táto bunková suspenzia bola vyhotovená v dvoch prevedeniach, jedna s obsahom séra v médiu a druhá bez séra. Nasledujúci deň, po prisadnutí makrofágov, bola pridaná bakteriálna suspenzia, v množstve dostatočnom na zachovanie MOI 100. Na prípravu bakteriálnych suspenzií boli použité tri druhy bakteriálnych kmeňov – FSC200, FSC200/mCherry a FSC200/eGFP. Každá z daných bakteriálnych suspenzií bola pripravená v médiu so sérom a v médiu bez séra. Infekcia sa uskutočnila spôsobom, ktorý umožnil vzniku troch základných typov vzoriek, každý v duplikáte. V prvom type boli bunky v médiu so sérom infikované bakteriálnou suspenziou v médiu so sérom [+/+], zatiaľ čo v druhom type boli bunky v médiu bez séra infikované bakteriálnou suspenziou v médiu so sérom [-/+]. V treťom type boli bunky v médiu bez séra infikované

bakteriálnou suspenziou v médiu bez séra [-/-] (viď. Obr. č 7). Prvá multijamková doštička vzoriek bola vystavená infekcii jednu hodinu. Druhá multijamková platnička bola ponechaná infekcii dve hodiny.

	1	2	3	4	5	6
KONTROLA	++	++	-+	-+	--	--
FSC200	++	++	-+	-+	--	--
FSC200/ mCherry	++	++	-+	-+	--	--
FSC200/ eGFP	++	++	-+	-+	--	--

**Obrázok č. 7 – Schéma infekcie makrofágov v médiu so sérom a bez séra baktériou *Francisella tularensis* v médiu so sérom a bez séra v 24-jamkovej platničke**

Vysvetlivky: Prítomnosť séra v bunenej suspenzii je vyjadrená znakom + alebo – (čiernej farby). Prítomnosť séra v bakteriálnej suspenzii je vyjadrená znakom + alebo – (červenej farby).

Po uplynutí oboch intervalov sa vzorky v oboch sadách zafixovali. Médium zo vzoriek bolo odpipetované a bunky v jamkách boli následne jedenkrát prepláchnuté PBS. Bunky boli zafixované pridaním 200  $\mu$ l 4 % roztoku formaldehydu na dobu 20 až 30 minút, RT. Následne boli bunky trikrát premyté sterilným PBS a do ďalšieho spracovania uskladnené v chladničke pri teplote 4°C.

U zafixovaných buniek boli fluorescenčne zviditeľnené vybrané štruktúry – cytoskelet a bunkové jadrá. Na zviditeľnenie cytoskeletu bol použitý faloidín, ktorý sa špecificky viaže na polymerizovaný aktín. Zvolený bol faloidín konjugovaný s fluorochrómom fluoresceín izotiokynátom (Phalloidin–FITC) alebo tetrametylrhodamínom B izotiokynátom (Phalloidin–TRITC). K zafarbeniu jadier bol použitý 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), fluorescenčné farbivo viažuce sa na adenín–tymínové bohaté oblasti DNA. Pred farbením boli bunčné membrány makrofágov permeabilizované 0,1 % roztokom Triton™ X-100 v PBS (15 minút, RT). Následne boli trikrát premyté PBS a ponechané v 1 % roztoku BSA v PBS po dobu 10 minút, RT. Čerstvo pripravené a pred svetlom chránené roztoky farbív, Phalloidin–FITC a Phalloidin–TRITC o koncentrácii 0,5  $\mu$ l g/ml v PBS boli pridané ku vzorkám na

dobu 20 minút, RT. Prebytočné farbivá boli zo vzoriek odstránené niekoľkonásobným premytím PBS. Následne boli jadrá odfarbené 330 nM DAPI v PBS po dobu 10 minút, RT. Vzorky boli dôkladne päťkrát premyté v PBS a jedenkrát deionizovanou vodou. Posledným krokom bolo montovanie krycích skiel v kvapke montovacieho média ProLong™ Diamond Antifade Mountant (Invitrogen) na podložné sklo. Takto upravené vzorky sa nechali v tme zaschnúť na 24 hodín pri RT a uskladnili sa do doby pozorovania pri teplote 4°C.

Zafarbené vzorky boli podrobené mikroskopickému hodnoteniu pod invertným fluorescenčným mikroskopom za použitia filter blokov (DAPI: 375 - 460 nm, FITC: 480 - 535 nm, TRITC: 540 - 605 nm, filter pre mCherry: 603 - 678 nm) a objektívom 60x. Z pozorovania boli vyhotovené obrázky v intervale 1 hodina a 2 hodiny. Na vzorke 200 makrofágov bola hodnotená miera infikovateľnosti v závislosti na prítomnosť séra. Sledovala sa kvantita infikovaných a neinfikovaných buniek.

### 7.2.6 Izolácia exozómov

Izolácia exozómov bola vykonaná z média bez séra odobratého z makrofágov infikovaných *F. tularensis* po dobu 2 hodín a z neinfikovaných makrofágov (kontrola). Makrofágy boli 16 hodín pred experimentom nasadené na 3 Petriho misky s priemerom 15 cm (pre jednu skupinu v množstve približne  $2,5 \times 10^7$  buniek / miska). K izolácii exozómov bolo celkovo použité médium z cca.  $7,5 \times 10^7$  buniek. Adherované bunky boli infikované bakteriálnou suspenziou *F. tularensis* v 10 ml DMEM bez séra na miskú s MOI 100. V kontrolných, neinfikovaných bunkách bolo médium nahradené čerstvým DMEM bez séra. Po dvoch hodinách sa médium opatrne prenieslo do sterilných centrifugačných skúmaviek a počas celého spracovania bolo uchovávané v ľade.

Izolácia exozómov bola zabezpečená metódou diferenciálnej centrifugácie, ukončená ultracentrifugáciou. Odobrané médium sa podrobilo centrifugácii pri 200 x g, po dobu 5 minút, pri teplote 4 °C za použitia výkyvného motora. Supernatant bol opatrne, bez narušenia vzniknutej pelety prenesený do nových skúmaviek a scentrifugovaný pri 5000 x g, po dobu 10 minút, pri teplote 4°C za použitia pevného uhlového rotoru. Vzniknutý supernatant bol odobratý, prenesený do nových skúmaviek a opätovne scentrifugovaný pri 10 000 x g, po dobu 30 minút, pri teplote 4°C za použitia pevného rotoru.

Pre odstránenie zvyšných baktérií a teda zaistenie sterility sa získané vzorky sfiltrovali cez injekčný filter s polyesterovou membránou s veľkosťou pórov 0,22  $\mu\text{m}$ . Pre kontrolu sterility vzorku bol uskutočnený výsev 5  $\mu\text{l}$  filtrátu na platňu s McLeodovou pôdou a inkubovaním po dobu siedmich



dní v inkubátore pri teplote 37°C. Po uplynutí inkubačnej doby nebol zaznamenaný nárast kolónií, čím bol skúšaný filter preukázaný ako dostatočne sterilný.

Filtrát bol prenesený do ultracentrifugačných skúmaviek s objemom 8 ml a nechal sa centrifugovať pri 100 000 x g (pevný uhlový rotor Ti70.1), po dobu 70 minút, pri teplote 4°C. Po centrifugácii bol supernatant odobraný a peleta resuspendovaná v 500 µl PBS. Vzniknutá suspenzia sa doplnila 3 ml PBS a opätovne podrobila centrifugácii pri 100 000 x g, po dobu 70 minút, pri teplote 4°C. V poslednom kroku bol opätovne odobraný supernatant a peleta resuspendovaná v objeme 100 µl PBS. Takto pripravenú vzorku možno uskladniť na niekoľko dní pri teplote 4 °C alebo uchovať pri teplote -20°C do doby výsledného hodnotenia, ktoré bolo v tomto prípade vykonávané metódou hmotnostnej spektrometrie (Mass spectrometry, MS).

### **7.2.7 Príprava vzorku na hmotnostnú spektrometriu**

Do 2 ml skúmavky bolo odobratých 45 µl vzorky a 10 % roztok deoxycholátu sodného (DOCHNa) o rovnakom objeme. Po dôkladnom zvortexovaní sa vzorka ponechala inkubovať 20 minút, pri teplote 90°C. Následne bolo po ochladení pridaných 45 µl čerstvo pripraveného 200 mM roztoku ditiotreitolu a vzorka sa ponechala k redukcii 60 minút pri teplote 37°C. Po inkubácii sa ku vzorke pridalo 45 µl 400 mM roztoku jodoacetamidu, ktorý pôsobí ako alkylačné činidlo. Vzorka sa nechala inkubovať v temne po dobu 30 minút pri izbovej teplote. Prebytočné množstvo jodoacetamidu bolo zredukované pridaním 45 µl 200 mM ditiotreitolu a inkubáciou po dobu 15 minút pri izbovej teplote. Pridaním 796,5 µl 50mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> klesla koncentrácia DOCHNa vo vzorke na požadovaných 0,5 %. V ďalšom kroku bolo pridaných 0,5 µg trypsínu, čím došlo k štiepeniu proteínov na peptidy a následne bola prevedená kontrola pH. V prípade, že sa pH vzorky nepohybovalo v okolí ôsmich, bolo pridané malé množstvo 50 mM hydrogén uhličitanu amónneho, a takto pripravená vzorka sa nechala inkubovať cez noc pri teplote 37°C.

Na ďalší deň bol po ukončení inkubácie zo vzorky odstránený DOCHNa extrakciou etylacetátom. Ten bol pridaný ku vzorke v množstve 400 µl a tvoril hornú organickú fázu vzorky. Vzorka bola okyslená na hodnotu pH okolo 2 pomocou 9 µl trifloroctovej kyseliny (TFA), (výsledná koncentrácia TFA sa nachádza v okolí 1 %). Upravená vzorka bola 1 minútu prudko vortexovaná a následne 5 minút centrifugovaná pri 11300 x g. Horná organická fáza bola zväčša celá opatrne odpipetovaná do novej skúmavky. U zvyšku vzorky sa vykonala kontrola pH. V prípade, že pH vzorky nedosahovalo hodnotu dva, bolo pridané malé množstvo TFA, pričom zvyšok postupu prebiehal rovnako. Ku vzorke sa opätovne pridalo 200 µl etylacetátu, ktorý bol zároveň priamo odobratý do

novej skúmavky. Tento krok sa vykonal v troch opakovaníach. Pri poslednom opakovaní bolo odobraté čo najväčšie možné množstvo etylacetátu a zvyšok, ktorý sa pipetou odobrať nepodarilo, bol odparený umiestnením vzorky na dobu 15 minút do vakuového koncentrátora SpeedVac.

Posledným krokom úpravy vzoriek bolo ich odsolenie na kolóne EMPORE C18-SD. Kolóny sa pred nanosením vzorky prepláchli 300  $\mu$ l 100 % acetonitrilom (ACN) 300  $\mu$ l roztoku 60 % ACN a 0,1 % TFA, čím došlo k zvlhčeniu reverznej stacionárnej fázy. Ďalším preplachom 0,1 % roztokom TFA o objeme 300  $\mu$ l bola prevedená ekvilibrácia stacionárnej fázy. Do kolón sa naniesli obe skúšané vzorky, ktoré sa pod vákuom nechali prekvapkať do predpripravených skúmaviek. Týmto krokom dochádzalo k naviazaniu peptidov na stacionárnu fázu, zatiaľ, čo sú nečistoty odplavované mobilnou fázou von. Následne sa daný proces zopakoval. Kolóna sa premyla pridaním 300  $\mu$ l 0,1% roztoku TFA, ktorá bola priamo odoberaná do nových skúmaviek a následne odparená. V poslednom kroku sa vykonala eluácia peptidov, a to pridaním 300  $\mu$ l roztoku 60 % ACN a 0,1 % TFA. Eluáty boli zbierané do nových skúmaviek, odparené dosucha a zmrazené pri teplote  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , pokiaľ neboli podrobené MS analýze. Separácia peptidov a ich následná hmotnostná analýza bola prevedená na prístrojoch Ultimate 3000 RSLCnano system a Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific) v laboratóriu hmotnostnej spektrometrie KMPB VLF UO, PharmDr. Janou Klimentovou, Ph.D.

### **7.2.8 Stanovenie bielkoviny vo vzorkách izolovaných exozómov pomocou mikrofluorometra Qubit™**

Koncentrácia bielkoviny vo vzorkách bola fluorometricky stanovená pomocou komerčne dodávaného kitu Qubit™ Protein Assay Kit (Invitrogen™). Meraná bola intenzita signálu vydávaného komplexom bielkovina – fluorescenčné farbivo, ktorý priamo úmerne vzrastá s množstvom bielkoviny vo vzorke.

Postup bol prevedený podľa návodu dodaného výrobcom. Stanoveniu predchádzala príprava pracovného roztoku Qubit Protein Reagent, čím sa nariadil roztok fluorescenčného farbiva. Tento roztok bol následne pridaný o objeme 190  $\mu$ l k 10  $\mu$ l predpripraveným roztokom štandardov alebo vzoriek za účelom vyhotovenia kalibračnej krivky. Po krátkom zvortexovaní boli vyhotovené roztoky inkubované po dobu 15 minút, RT. Meranie a vyhodnotenie bolo uskutočnené pomocou mikrofluorometra Qubit™.

## 7.2.9 Stanovenie bielkoviny vo vzorkách izolovaných exozómov pomocou kyseliny bicinchonínovej modifikované pre malé objemy

Pre kvantifikáciu bielkoviny vo vzorkách bol použitý komerčný kit MicroBCA™ Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). Postup stanovenia bielkoviny pomocou kyseliny bicinchonínovej (Bicinchoninic Acid Assay, BCA) bol upravený tak, aby umožňoval stanovenie proteínu v malých objemoch (niekoľko  $\mu\text{l}$ ).

V prvom kroku došlo k príprave vzoriek, a to nariedením (10x) skúšanej vzorky, tak aby sa po nariedení predpokladaná koncentrácia, nachádzala v rozhraní stanovenej kalibrácie. Následne bola nariedením štandardu (bovinný sérový albumín, BSA) pripravená kalibračná rada v koncentračnom rozmedzí 0 - 500  $\text{ng}/\mu\text{l}$  (viď. Tab. č. 4). K riedeniu sa v oboch prípadoch využila destilovaná voda. Zmiešaním čiastkových pracovných činidiel (working reagent, WR) v stanovenom pomere (50 (WR–A) : 48(WR–B) : 2(WR–C)) bol získaný výsledný WR. V ďalšom kroku bola v 0,2 ml mikroskúmavkách (Eppendorf) pripravená reakčná zmes, pridaním 5  $\mu\text{l}$  WR ku 5  $\mu\text{l}$  nariedené vzorky alebo štandardu, všetko v duplikáte.

Pripravené zmesi boli vortexované, na krátku dobu scentrifugované a ponechané k inkubácii po dobu 60 min pri 60°C. Po inkubácii bola každá vzorka meraná dvakrát v cele LabelGuard na prístroji Nano-Photometer pri vlnovej dĺžke 562 nm a optickej dĺžke 1 mm. Pri každom meraní sa cela pred aj po meraní opláchla vodou, otrela bezchlporou papierovou vreckovkou a jamka, do ktorej sa cela ukladala, ofúkla stáčaným vzduchom. Ako blank bola použitá destilovaná voda.

Tabuľka č. 4 – Kalibračná rada

	BSA štandard	voda	koncentrácia
	1 mg/ml [ $\mu\text{l}$ ]	[ $\mu\text{l}$ ]	[ng/ $\mu\text{l}$ ]
<b>1</b>	0	400	0
<b>2</b>	1	399	2,5
<b>3</b>	2	398	5
<b>4</b>	4	396	10
<b>5</b>	8	392	20
<b>6</b>	12	388	30
<b>7</b>	16	384	40
<b>8</b>	20	380	50
<b>9</b>	28	372	70

## 8. VÝSLEDKY

### 8.1 Mikroskopické hodnotenie

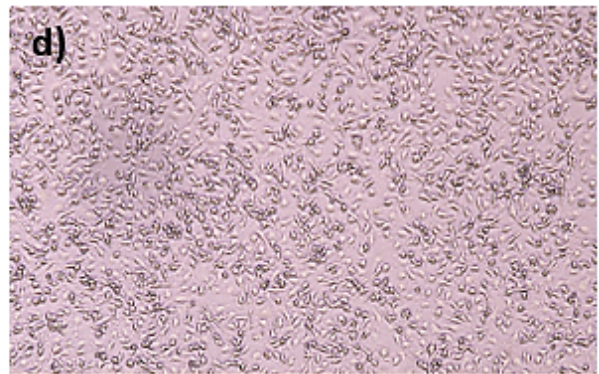
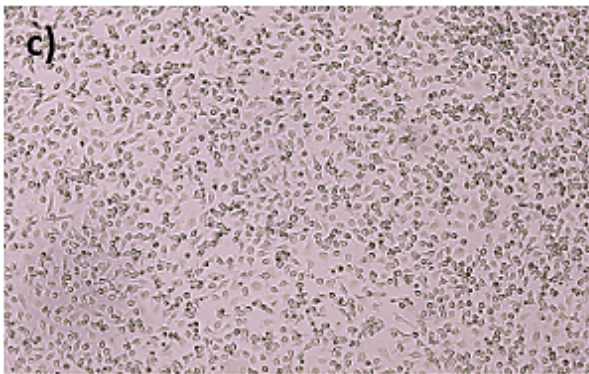
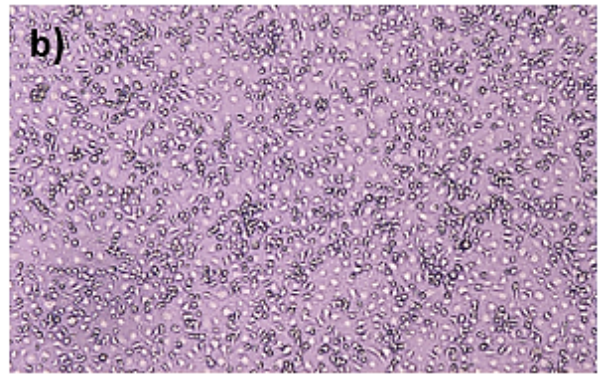
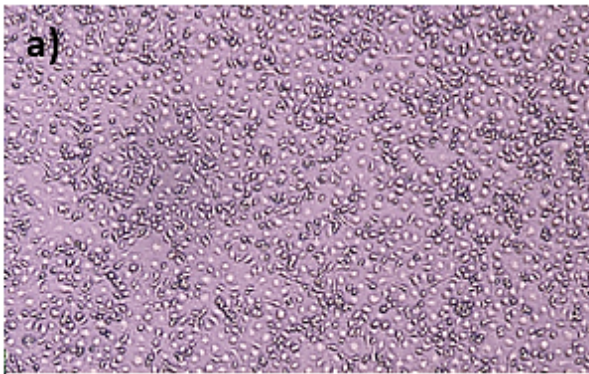
Účelom mikroskopickej analýzy je snaha o nastavenie vhodných kultivačných a infekčných podmienok pre izoláciu exozómov produkovaných makrofágmi ovplyvnenými intracelulárnou baktériou *F. tularensis*. Pri výbere optimálnych podmienok bola predmetom skúšok infikovateľnosť makrofágov v médiu bez prítomnosti séra. Účelom bolo zabrániť kontaminovaniu vzoriek a skresleniu výsledkov analýzy, ktoré by mohlo nastať po pridaní séra do vzoriek vzhľadom na to, že samotné sérum disponuje prítomnosťou exozómov. Z tohto dôvodu bol vykonaný najskôr predpokús vo forme mikroskopického pozorovania infikovaných makrofágov pod svetelným mikroskopom. Sledovaný bol stav a vzhľad buniek kultivovaných a infikovaných v médiu bez prítomnosti séra, ktoré sa porovnávali s bunkami v médiu so sérom (10 % FTSI). Cieľom pozorovania bolo zistiť, či nedošlo k narušeniu adhézie buniek alebo výraznej vzhľadovej odlišnosti. Nasledovali ďalšie fluorescenčne mikroskopické analýzy, v rámci ktorých bol sledovaný rozdiel v infikovateľnosti buniek v závislosti na prítomnosť, resp. neprítomnosť séra v kultivačnom médiu.

#### 8.1.1 Hodnotenie makrofágov pod svetelným mikroskopom

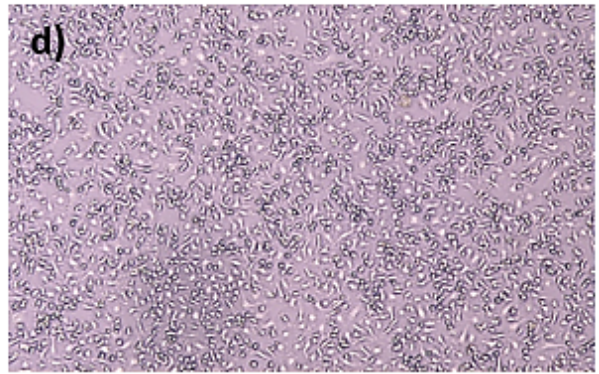
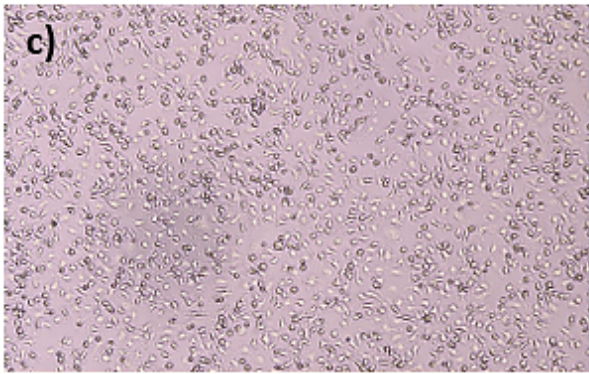
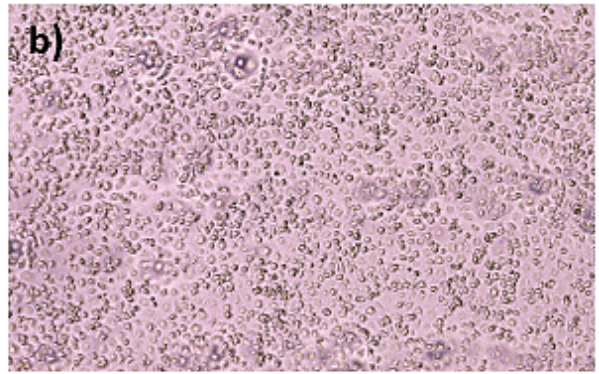
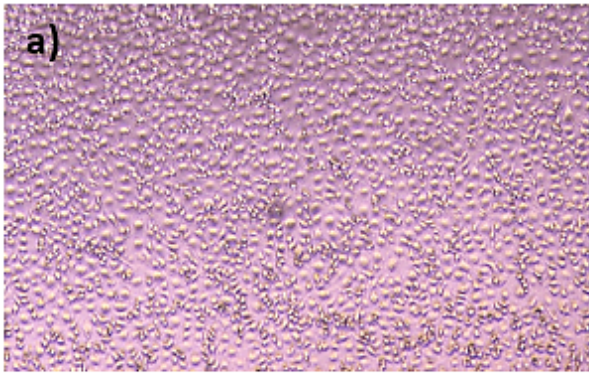
Pri mikroskopii pod svetelným mikroskopom boli hodnotené infikované a neinfikované makrofágy v troch rôznych časových intervaloch po infekcii – 1, 4 a 6 hodín. K infekcii bol navyše použitý 24 – hodinový časový interval, avšak ten analyzovaný nebol, a to z dôvodu výrazného poškodenia buniek. Pozorovali sa štyri typy suspenzií makrofágov – neinfikované makrofágy v médiu bez séra; infikované makrofágy v médiu bez séra; neinfikované makrofágy v médiu so sérom; infikované makrofágy v médiu so sérom. Sledovaný a porovnávaný bol mikroskopický vzhľad makrofágov pri jednotlivých modifikáciách a ich dostatočné prisadnutie na dno jamiek (vid'. Obr. č. 8). Predmetom záujmu bolo rovnako určiť nakoľko je potrebná prítomnosť séra v médiu a jeho vplyv na stav makrofágov. Pozorovanie prebiehalo v intervaloch 1, 4 a 6 hodín pod objektívom 10x.

Pri pozorovaní pod svetelným mikroskopom bola preukázaná schopnosť makrofágov adherovať sa na dno jamiek, a to aj za predpokladu, že médium neobsahovalo sérum. Z tohto dôvodu bolo možné konštatovať, že prítomnosť séra v médiu makrofágov nie je pre ich existenciu v týchto časových intervaloch priamo nevyhnutná. Ďalej bolo možné vyhodnotiť, že vzhľad pozorovaných makrofágov nevykazoval v neprítomnosti séra alebo v priebehu času výrazné zmeny.

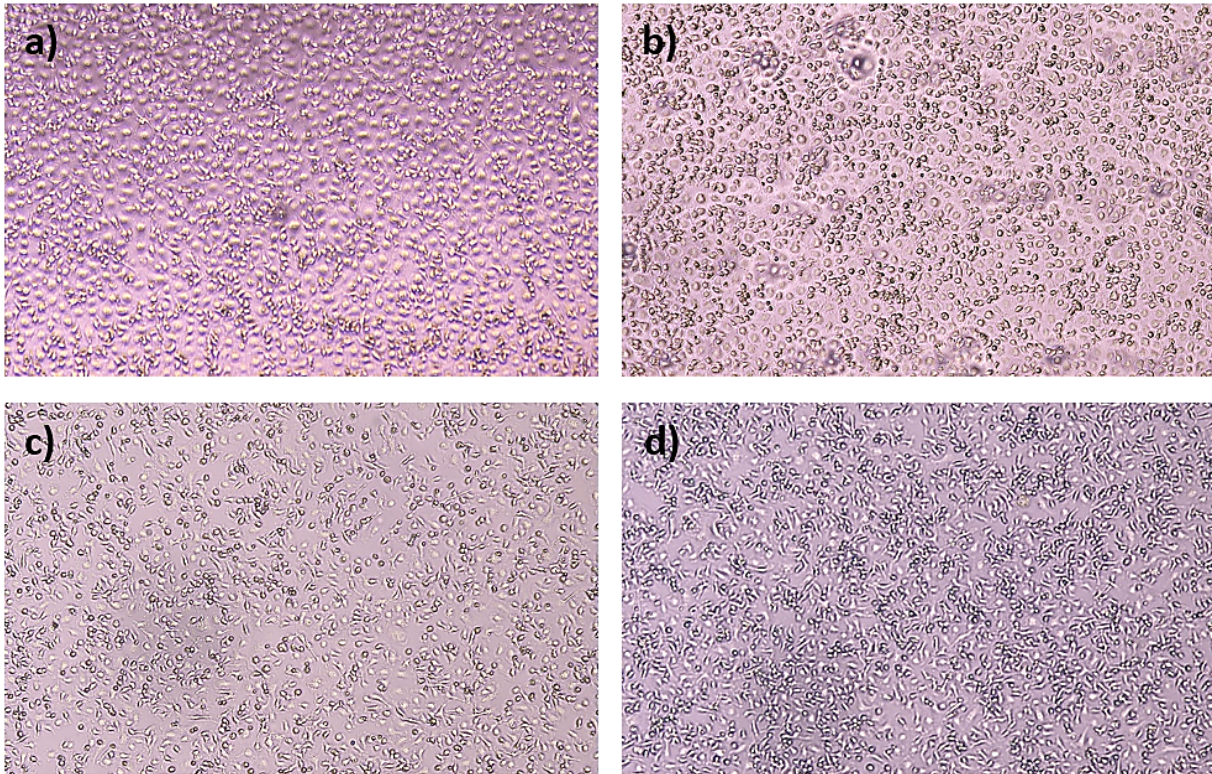
**A)**



**B)**



c)



**Obrázok č. 8 – Porovnanie makrofágov pod svetelným mikroskopom za stanovených podmienok pri intervale 1 hodina, 4 hodiny a 6 hodín po infekcii**

Vysvetlivky: A) – 1 hodina, B) – 4 hodiny, C) – 6 hodín a) – neinfikované makrofágy v médiu bez séra, b) – infikované makrofágy v médiu bez séra, c) – neinfikované makrofágy v médiu so sérom, d) – infikované makrofágy v médiu so sérom

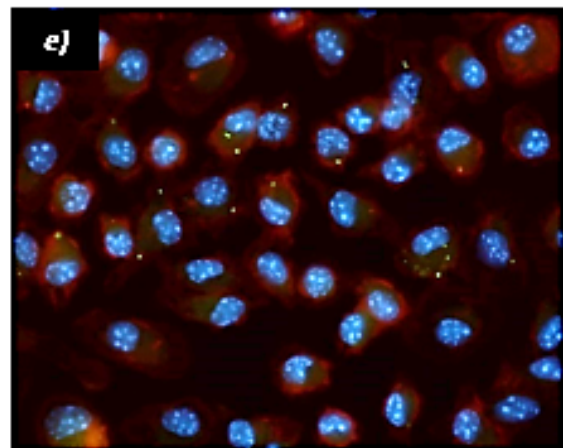
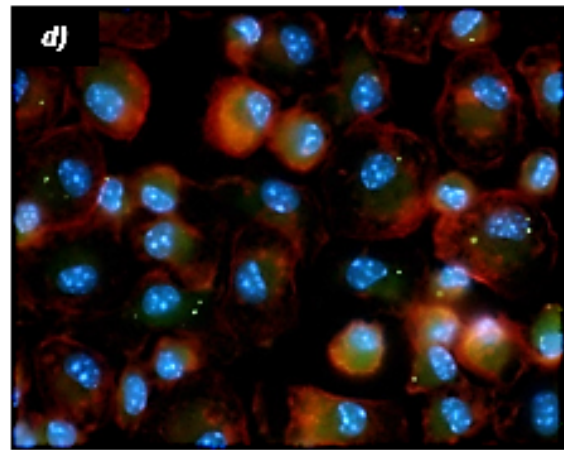
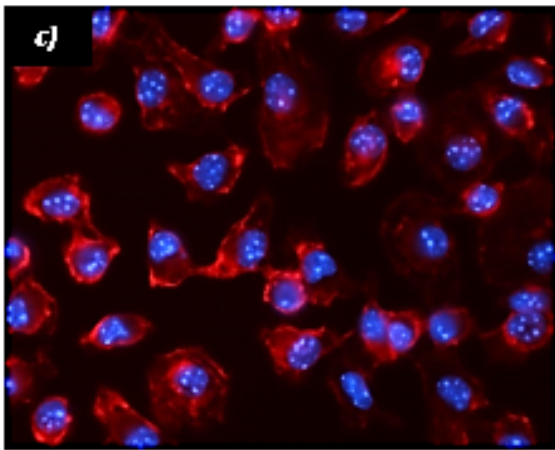
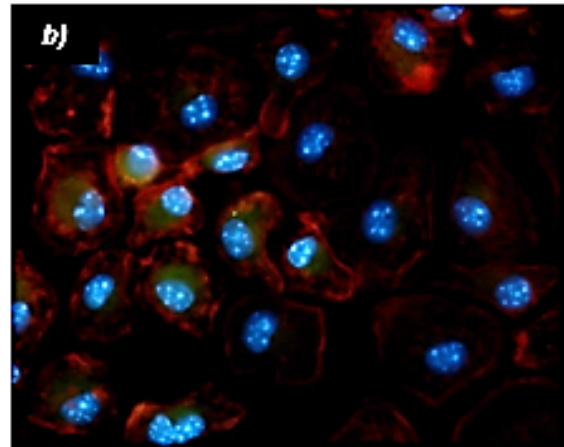
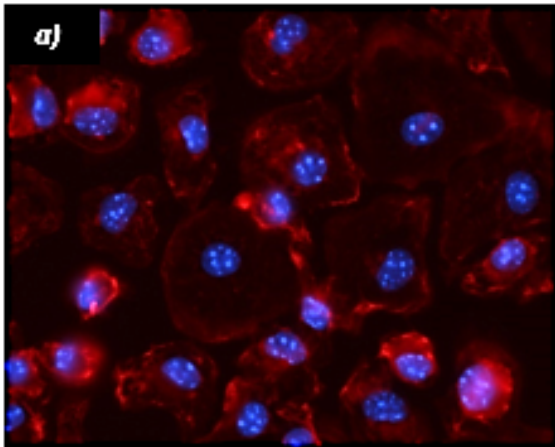
### **8.1.2 Hodnotenie makrofágov pod fluorescenčným mikroskopom**

Hodnotenie bolo uskutočnené pozorovaním a priamym porovnávaním makrofágov pri stanovených podmienkach za využitia fluorescenčnej mikroskopie a následným percentuálnym zhodnotením. Pozorované boli tri typy vzoriek – makrofágy v médiu bez séra infikované baktériami v médiu bez séra, makrofágy v médiu bez séra infikované baktériami v médiu so sérom, makrofágy v médiu so sérom infikované baktériami v médiu so sérom – spoločne s kontrolnými vzorkami – neinfikované makrofágy v médiu bez séra, neinfikované makrofágy v médiu so sérom. Sledovala sa miera potreby prítomnosti séra a jeho vplyv na stav a infikovateľnosť buniek. Kvôli potenciálnej prítomnosti opsonizačných látok v sére sa taktiež pozoroval jeho možný vplyv, v prípade bakteriálnej suspenzie s jeho obsahom alebo bez neho, na mieru pohltienia baktérií bunkami.

Vyhodnocovanie bolo uskutočnené v dvoch opakovaniach, pričom u všetkých vzoriek bolo analyzovaných minimálne 200 buniek. U každej bunky bolo hodnotené či je infikovaná, tj. či sú

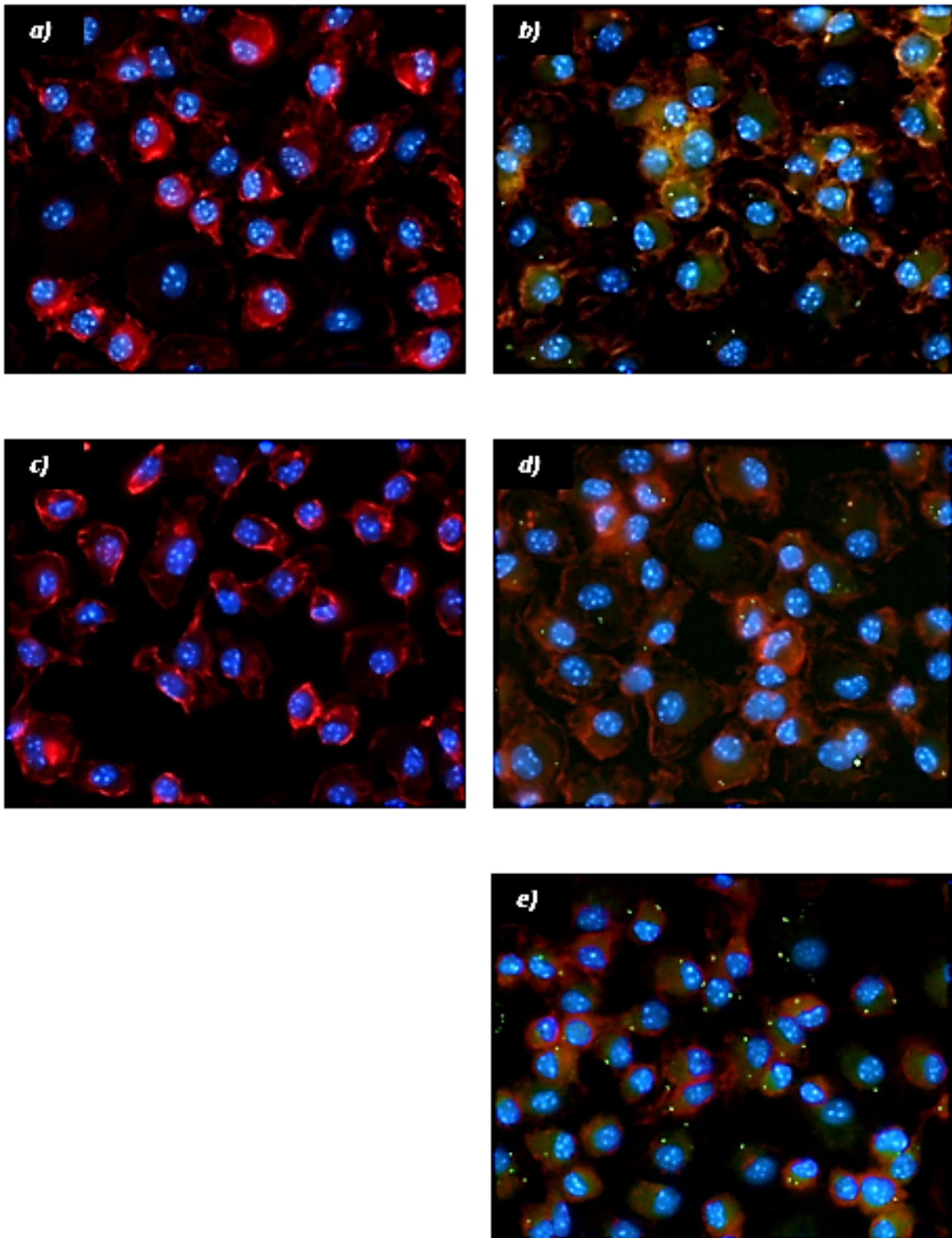
prítomné baktérie ako aj počet baktérií v bunke. Bunky boli infikované baktériami produkujúcimi zelene žiariaci proteín GFP alebo červene žiariaci mCherry. Intenzita proteínov mCherry však bola veľmi nízka, kvôli čomu boli pre hodnotenie vybrané bunky infikované *F. tularensis* produkujúcou GFP. Cytoskelet týchto buniek bol potom vizualizovaný fluorescenčným farbivom Phalloidin-TRITC (červeno žiariaci) a bunkové jadrá DAPI (modro žiariace), pričom pozorovanie prebiehalo pod objektívom 60x (vid'. Obr. č. 9).

A)





B)



Obrázok č. 9 – Porovnanie makrofágov pod fluorescenčným mikroskopom za stanovených podmienok pri intervale 1 hodina a 2 hodiny po infekcii

*Vysvetlivky: A) – 1 hodina, B) – 2 hodiny; a) – neinfikované makrofágy v médiu bez séra, b) – makrofágy v médiu bez séra infikované baktériami v médiu bez séra, c) – neinfikované makrofágy v médiu so sérom, d) – makrofágy v médiu bez séra infikované baktériami v médiu so sérom, e) – makrofágy v médiu so sérom infikované baktériami v médiu so sérom*

*Poznámka: červená farba – aktínový skelet, modrá farba – jadro, zelená farba – baktérie*

Pri pozorovaní pod fluorescenčným mikroskopom bolo možné sledovať najvyššiu infikovateľnosť buniek vo vzorkách so sérom (bunky aj baktérie). Mierne nižší počet infikovaných buniek rovnako ako počet fagocytovaných baktérií (väčšinou 1 baktéria / bunka) bolo možné pozorovať u vzoriek, ktoré sérum obsahovali len v jednom z médií alebo sérum neobsahovali vôbec (vid'. Tab. č. 5 - 7). Pri porovnávaní oboch časových intervalov sa preukázala značne rastúca infikovateľnosť makrofágov so vzrastajúcim časovým intervalom (vid'. Graf. č. 1, Tab. č. 8). Evidentný vplyv na infikovateľnosť malo pridanie séra už do bakteriálnej suspenzie, kedy bolo možné zaznamenať nárast počtu infikovaných buniek.

Aj napriek vysokej miere infikovateľnosti vo vzorkách so sérom sa ukázalo, že vzorka bez obsahu séra (v bakteriálnom a bunkovom médiu) vykazuje pri použití dvojhodinového časového intervalu k infekcii dostatočujúcu infikovateľnosť makrofágov. Z tohto dôvodu bola pre experiment zvolená práve táto modifikácia.

**Tabuľka č. 5 – Zastúpenie infikovaných makrofágov v médiu bez séra infikovaných baktériami v médiu bez séra (- / -)**

[- / -]	Počet baktérií v 1 bunke	Priemerný počet infikovaných buniek		Priemerný počet infikovaných buniek v %	
		1h	2h	1h	2h
	1	46	60	66 %	46 %
2	14	34	20 %	26 %	
3	6,5	19	9 %	15 %	
4	3	10	4 %	8 %	
5	0,5	5	1 %	4 %	
6	0	2,5	0 %	2 %	
7	0	0	0 %	0 %	
8	0	0	0 %	0 %	

**Tabuľka č. 6 – Zastúpenie infikovaných makrofágov v médiu bez séra infikovaných baktériami v médiu so sérom (- / +)**

[- / +]	počet baktérií v 1 bunke	Priemerný počet infikovaných buniek		Priemerný počet infikovaných buniek v %	
		1h	2h	1h	2h
	1	56,5	48	61 %	33 %
2	25	35,5	27 %	24 %	
3	8,5	33	9 %	22 %	
4	1,5	15	2 %	10 %	
5	1,5	8	2 %	5 %	
6	0,5	4,5	1 %	3 %	
7	0	2	0 %	1 %	
8	0	1,5	0 %	1 %	

**Tabuľka č. 7 – Zastúpenie infikovaných makrofágov v médiu so sérom infikovaných baktériami v médiu so sérom (+ / +)**

[+ / +]	počet baktérií v 1 bunke	Priemerný počet infikovaných buniek		Priemerný počet infikovaných buniek v %	
		1h	2h	1h	2h
	1	63,5	63	64 %	40 %
2	22	45,5	22 %	29 %	
3	6,5	25	6 %	16 %	
4	5,5	12,5	5 %	8 %	
5	1,5	4,5	1 %	3 %	
6	0,5	5,5	1 %	3 %	
7	0	1,5	0 %	1 %	
8	0	0	0 %	0 %	

**Tabuľka č. 8 – Porovnanie množstva infikovaných a neinfikovaných makrofágov vzhľadom na prítomnosť séra a časového intervalu**

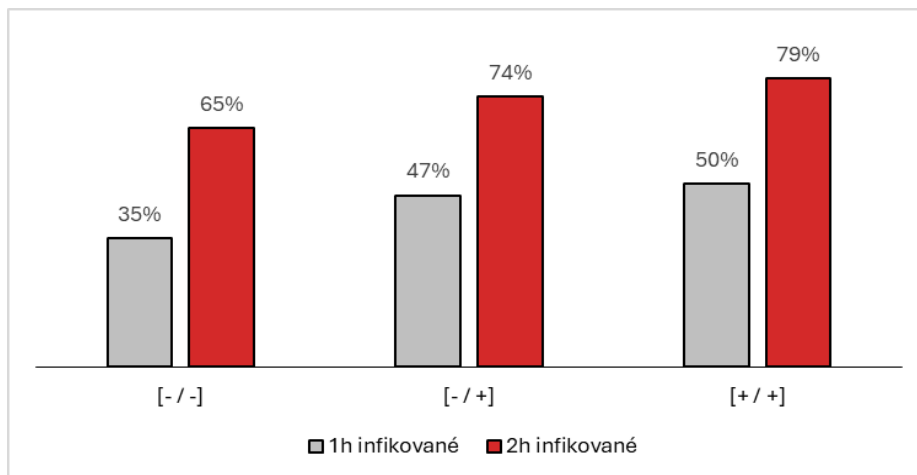
[- / -]	1h		2h	
	infikované	neinfikované	infikované	neinfikované
	Ø POČET	70	130	130
Ø %	35 %	65%	65 %	35 %

[- / +]	1h		2h	
	infikované	neinfikované	infikované	neinfikované
	Ø POČET	94	106	148
Ø %	47 %	53 %	74 %	26 %

[+ / +]	1h		2h	
	infikované	neinfikované	infikované	neinfikované
	Ø POČET	100	100	158
Ø %	50 %	50%	79 %	21 %

Poznámka: žltá farba (- / -) – makrofágy v médiu bez séra infikované baktériami v médiu bez séra, modrá farba (- / +) – makrofágy v médiu bez séra infikované baktériami v médiu so sérom, zelená farba (+ / +) – makrofágy v médiu so sérom infikované baktériami v médiu so sérom

**Graf č. 1 – Graf závislosti prítomnosti séra a času na infikovateľnosť makrofágov**



Vysvetlivky: [- / -] – makrofágy v médiu bez séra infikované baktériami v médiu bez séra, [- / +] – makrofágy v médiu bez séra infikované baktériami v médiu so sérom, [+ / +] – makrofágy v médiu so sérom infikované baktériami v médiu so sérom

Poznámka: Hodnotenie sa vzťahovalo na 200 makrofágov čo predstavovalo v danom prípade 100 %.

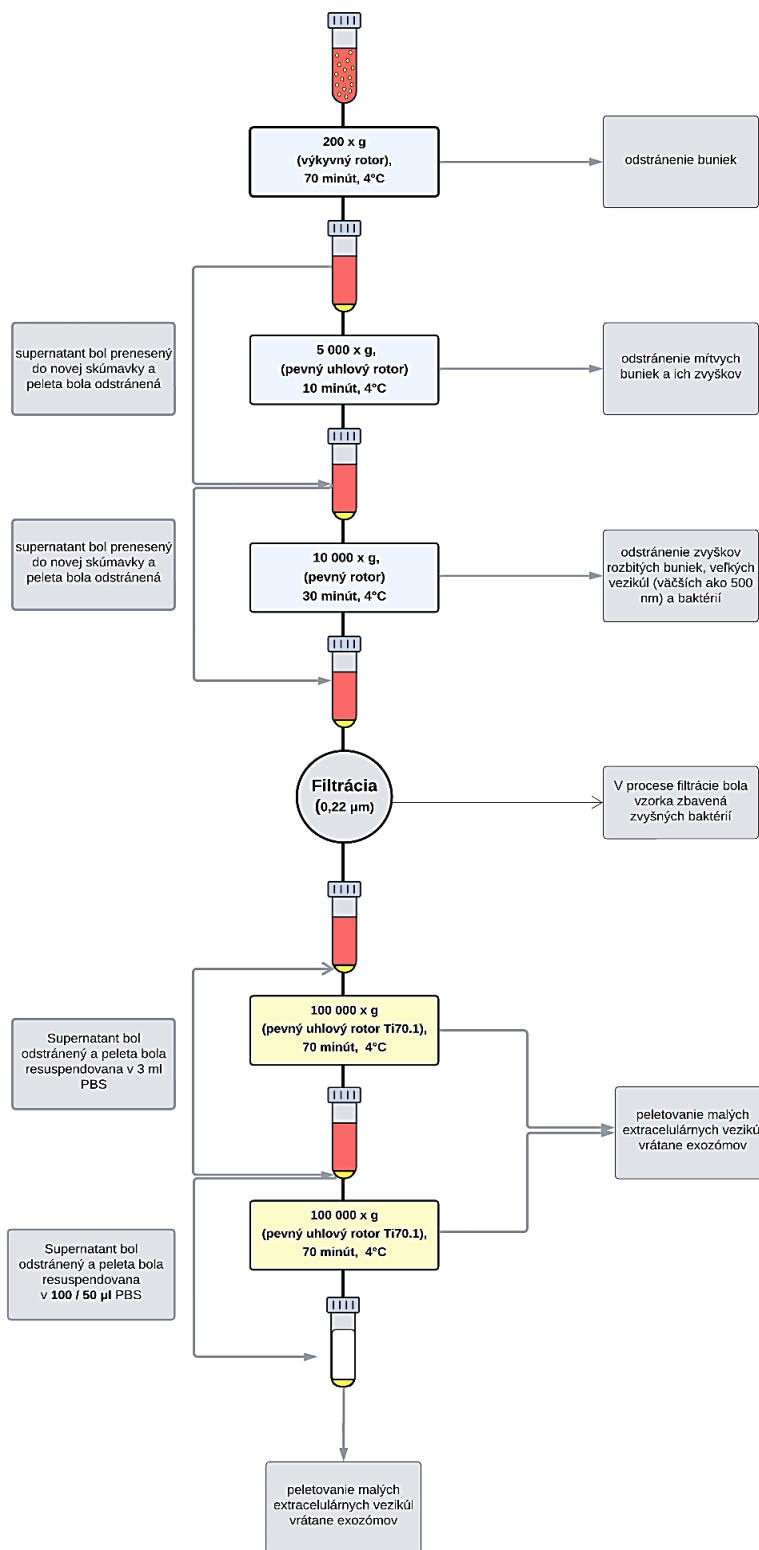
## 8.2 Demonštrácia výsledkov a experimentálnych podmienok jednotlivých experimentov

Experiment izolácie exozómov bol vyhotovený v dvoch opakovaniach (viď. Tab. č. 9). V pokuse boli aplikované experimentálne podmienky vybrané na základe výsledkov mikroskopického pozorovania. Pre experiment boli použité makrofágy vyizolované a vydiferencované z kostnej drene myší typu BALB/c v množstve dva kusy pre prvý a tri kusy pre druhý pokus. Z vyizolovaných makrofágov bola následne pripravená bunková suspenzia v DMEM médiu bez séra, ktorá bola nasadená na Petriho misky v počte štyri misky (2x infekcia, 2x kontrola) pre prvý experiment a v počte šesť misiek (3x infekcia, 3x kontrola) pre druhý experiment. Ponechaná bola 16 hodín k adhézii pri teplote 37 °C a v prostredí 5 % CO<sub>2</sub>. V deň experimentu bola z čerstvo narastených baktérií *F. tularensis* FSC 200 pripravená suspenzia v médiu bez séra o O.D. 1,0. K adherovaným makrofágom bola pridaná bakteriálna suspenzia o MOI 100 a ponechaná 2 hodiny pri teplote 37 °C, v prostredí 5 % CO<sub>2</sub> k infekcii. Následne bol odobraný supernatant, z ktorého sa vykonala izolácia exozómov, pre ktorú bola v oboch prípadoch použitá diferenciálna centrifugácia a ultracentrifugácia (viď. Obr. č. 10).

Tabuľka č. 9 – Porovnanie experimentálnych podmienok

	1. experiment	2. experiment
Počet použitých myší BALB/c	2	3
Počet vyizolovaných buniek / ml média	5,8 x 10 <sup>6</sup> bb/ml (v 40 ml média)	4 x 10 <sup>6</sup> bb/ml (v 40 ml média)
Počet makrofágov k infekci / Petriho miska	5 x 10 <sup>7</sup> bb/miska (v 20 ml média)	2,5 x 10 <sup>7</sup> bb/miska (v 20 ml média)
Počet misiek k nasadeniu makrofágov	4 (2x k infekcii; 2x kontrola)	6 (3x k infekcii; 3x kontrola)
Sérum v médiu makrofágov	nepřítomné	nepřítomné
Sérum v bakteriálnom médiu	nepřítomné	nepřítomné
Interval použitý pre infekciu	2 hodiny	2 hodiny
Objem výslednej vzorky exozómov	100 µl (PBS)	50 µl (PBS)

## Diferenciálna centrifugácia



Obrázok č. 10 – Schéma izolácie exozómov

Zdroj: vyrobené na základe Wang *et al.* 2021; Choy *et al.* 2021

## **8.2.1 Vyhodnotenie vzoriek získaných prvou izoláciou exozómov**

### **8.2.1.1 Stanovenie bielkoviny pomocou mikrofluorometra Qubit™**

Izolát získaný prvou izoláciou exozómov bol podrobený analýze k stanoveniu bielkoviny pomocou mikrofluorometra, za využitia komerčne dodávaného kitu, Qubit™ Protein Assay Kit. Tento pokus bol hodnotený ako neúspešný, pretože koncentrácia stanovovanej bielkoviny bola pod limitom detekcie.

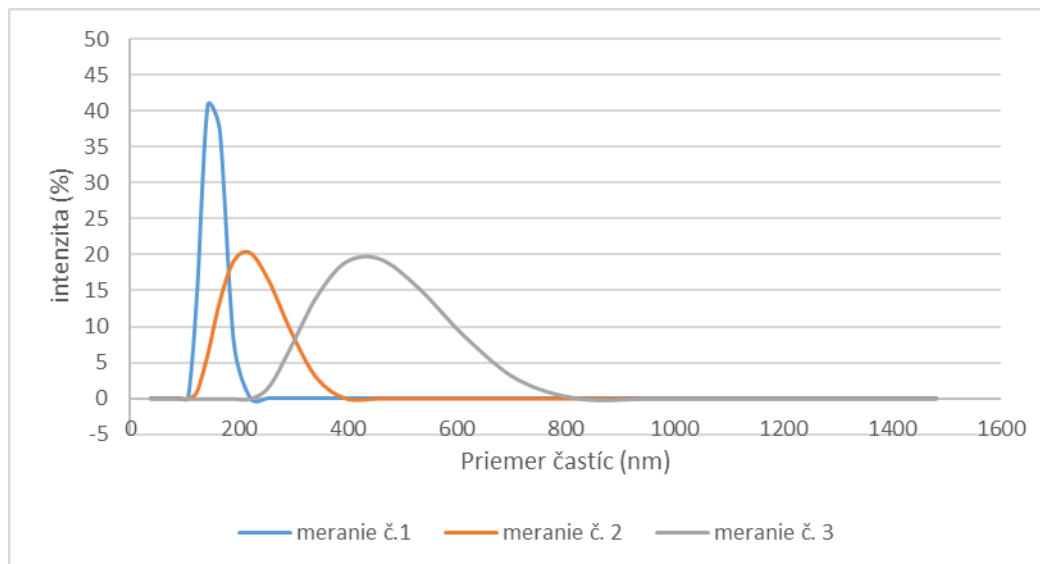
### **8.2.1.2 Stanovenie veľkosti častíc pomocou dynamického rozptylu svetla**

Získané vzorky boli následne podrobené analýzám pre stanovenie prítomnosti a polydisperzity vyizolovaných častíc v submikrónovej oblasti. Prebiehalo to na princípe dynamického rozptylu svetla (Dynamic Light Scattering, DLS), pomocou prístroja Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical, Malvern, UK). Analýza bola vykonaná na Katedre farmaceutickej technológie na Farmaceutickej fakulte v Hradci Králové, PharmDr. Ondřejem Holasem, Ph.D. Kontrolná a infikovaná vzorka získaná z prvého experimentu o objeme 50  $\mu$ l vzorku bola nariadená deionizovanou vodou do 1 ml a opakovane meraná metódou DLS za účelom stanovenia veľkosti častí spoločne s polydisperzitou vzoriek. Kontrolná vzorka bola meraná trikrát a infikovaná vzorka šesťkrát (vid'. Graf č. 2). Získané dáta z DLS vykazovali prítomnosť častíc, veľkosťou v rozmedzí 100 - 150 nm, ktorá by teoreticky odpovedala veľkosti exozómov. Opakované meranie však preukázalo tvorbu časticových agregátov. Predpokladaným dôvodom agregácie bolo nariadenie vzoriek vodou. Riešením by mohla byť zámerna vody za PBS.

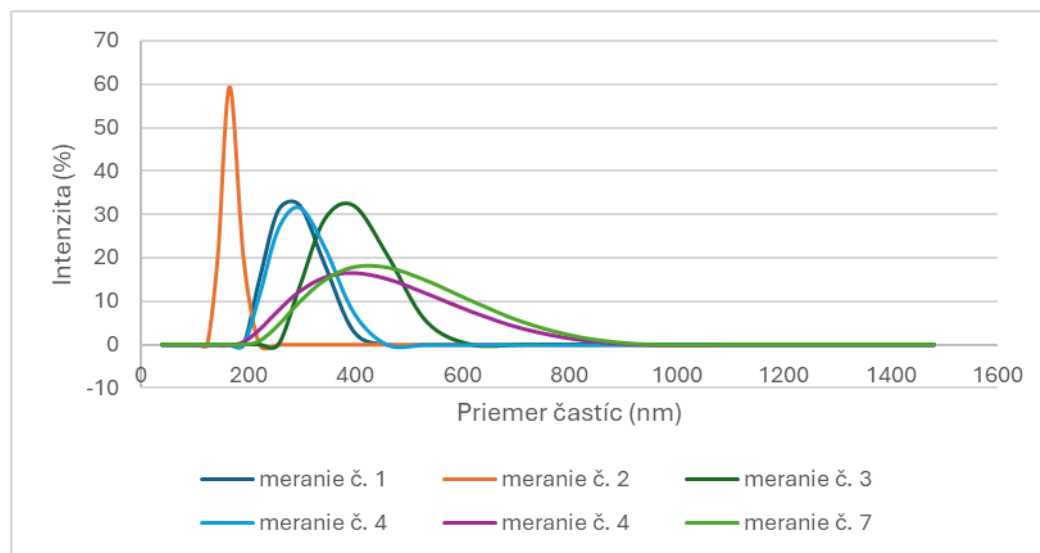
Aj napriek tomu, že výsledky vykazovali prítomnosť častíc, jednalo sa evidentne len o veľmi malé množstvo, pretože sa nepodarilo stanoviť koncentráciu proteínov vo vzorku. Preto bol prevedený druhý experiment, v ktorom bol počet myši využitých k izolácii makrofágov navýšený na tri kusy a výsledná vzorka bola resuspendovaná v polovičnom množstve pufru (50  $\mu$ l).

**Graf č. 2 – Grafy stanovenia veľkosti častíc pomocou dynamického rozptylu svetla**

**A)**



**B)**



Vysvetlivky: A) – kontrolná vzorka, B) – infikovaná vzorka

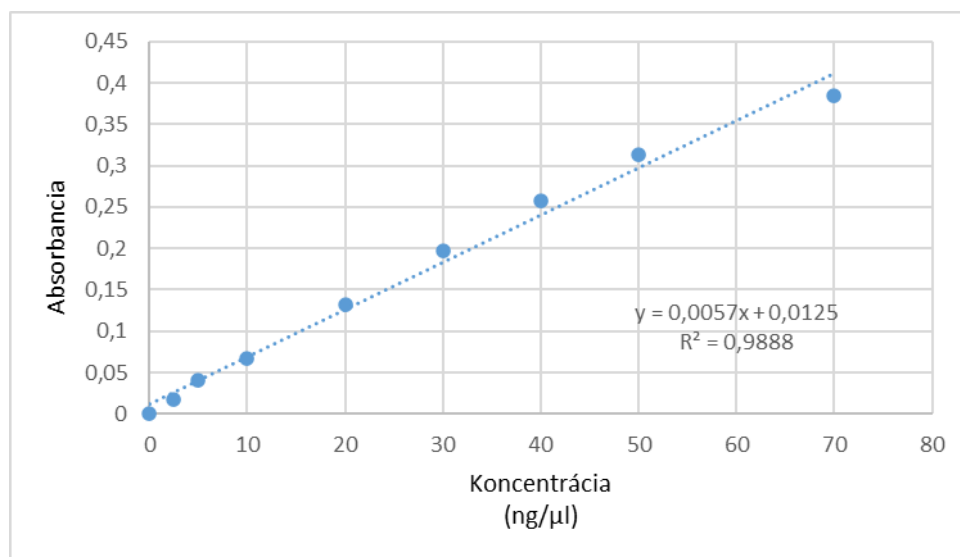


## 8.2.2 Vyhodnotenie vzoriek získaných druhou izoláciou exozómov

### 8.2.2.1 Stanovenie bielkoviny pomocou kyseliny bicinchonínovej modifikované pre malé objemy

Koncentrácia bielkovín vo vzorkách vyizolovaných v druhom experimente bola stanovená pomocou kitu microBCA. Postup metódy BCA bol poopravený na stanovenie koncentrácie bielkoviny v malých objemoch použitím protokolu štandardne zavedeným na pracovisku KMPB VLF UO. Po zmeraní absorpcie roztokov štandardov boli získané hodnoty použité k tvorbe kalibračnej krivky. (viď. Graf. č. 3). Z rovnice lineárnej regresie získanej v programe Excel bola dosadením priemerných hodnôt nameranej absorpcie skúšaných vzoriek (infikovaných, kontrolných) vypočítaná ich koncentrácia (viď. Tab. č. 10).

Graf č. 3 – Graf kalibračnej krivky získanej z priemerných hodnôt roztokov štandardov



Tabuľka č. 10 – Tabuľka výsledných hodnôt koncentrácie a absorpcie vzoriek

	<b>A</b>	<b>c[ng<sup>μl</sup>]</b>
<b>Kontrola</b>	0,758	130,702
<b>Infekcia</b>	0,838	144,737

Na základe získaných výsledkov je možné hodnotiť, že sa podarilo stanoviť koncentráciu bielkovín vo vzorke. Vzorky získané izoláciou z infikovaných makrofágov vykazujú vyššiu koncentráciu proteínov v porovnaní s kontrolnými vzorkami, ktoré infikované neboli.

### 8.2.2.2 Prevedenie hmotnostnej spektrometrie

Proteíny obsiahnuté vo vzorkách pripravených v rámci druhej izolácie exozómov boli identifikované pomocou LC–MS/MS analýzy. Vzorky boli merané dva razy, pričom sa podľa zadaných kritérií podarilo identifikovať v kontrolnej vzorke dva proteíny, v infikovanej vzorke trinásť myšacích a dva bakteriálne proteíny (viď. Tab. č. 11 a 12). Vyizolované proteíny boli bližšie charakterizované s použitím internetových databáz: UniProt (<https://www.uniprot.org/>), Reactome Pathway Database (<https://reactome.org/>), ExoCarta (<http://exocarta.org/index.html>) a National Library of Medicine (NLH) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Databáza ExoCarta je súborom dát všetkých doposiaľ vyizolovaných exozómov. Základné informácie ako pôvod, funkcia a iné vlastnosti boli získané z databáz Reactome Pathway Database, UniProt a rôznych literárnych zdrojov.

Tabuľka č. 11 – Zoznam identifikovaných proteínov hmotnostnou spektrometriou – kontrolná vzorka

Pôvod proteínov	Identifikačné číslo	Názov génu	Názov proteínu	Funkcia (Uniprot, Reactome, NIH)	ExoCarta
myš ( <i>Mus musculus</i> )	Q61781	Krt14	<i>Keratin, type I cytoskeletal 14</i>	tvorba cytoskeletu epitelových buniek	Áno
	Q922U2	Krt5	<i>Keratin, type II cytoskeletal 5</i>	tvorba intermediárnych keratínových filamentov; udržanie správnej funkcie kožnej bariéry	Áno

Tabuľka č. 12 – Zoznam identifikovaných proteínov hmotnostnou spektrometriou – infikovaná vzorka

Pôvod proteínov	Identifikačné číslo	Názov génu	Názov proteínu	Funkcia (Uniprot, Reactome, NIH)	ExoCarta	Zdroje
Myš ( <i>Mus musculus</i> )	P50446	Krt6a	<i>Keratin, type II cytoskeletal 6A</i>	hojenie rán; antimikrobiálna humorálna imunitná odpoveď proti gram pozitívnym baktériám	Áno	Reactome, Uniprot, NIH
	Q9QWL7	Krt17	<i>Keratin, type I cytoskeletal 17</i>	tvorba a udržanie tvaru kožných priveskov; hojenie rán	Áno	Reactome, Uniprot, NIH
	Q9Z2K1	Krt16	<i>Keratin, type I cytoskeletal 16</i>	regulátor imunitnej odpovede v prípade porušenia kožnej bariéry	Áno	Reactome, Uniprot, NIH
	Q922U2	Krt5	<i>Keratin, type II cytoskeletal 5</i>	tvorba intermediálnych keratínových filamentov; udržanie správnej funkcie kožnej bariéry	Áno	Reactome, Uniprot, NIH
	Q6IFX2	Krt42	<i>Keratin, type I cytoskeletal 42</i>	Funkcia neznáma	Nie	Reactome, Uniprot, NIH
	P28798	Grn	<i>Progranulin</i>	rastový faktor zapojený do zápalu, hojenia rán, proliferácie buniek	Nie*	Jian <i>et al.</i> 2013
	Q9WUU7	Ctsz	<i>Cathepsin Z</i>	produkcia peptidov potencujúcich kinín; komunikácia a degradácia intracelulárnych infekčných agensov	Nie*	GAO <i>et al.</i> 2018
	O09159	Man2b1	<i>Lysosomal alpha-mannosidase</i>	metabolizmus oligosacharidov	Nie*	Lin <i>et al.</i> 2022
	E9Q557	Dsp	<i>Desmoplakin</i>	organizácia cytoskeletu v mieste spojov; udržiavanie elektrickej a mechanickej konektivity medzi srdcovými bunkami	Nie*	Stahley a Kowalczyk 2015
	P60710	Actb	<i>Actin, cytoplasmic 1</i>	základný stavebný kameň aktínových filamentov; motilita a kontrakcia buniek; intracelulárny transport; regulácia génovej transkripcie	Áno	Reactome, Uniprot, Stradal a Schelhaas 2018
	P29391	Ftl1	<i>Ferritin light chain 1</i>	skladovanie a dodávanie netoxickej formy železa do hostiteľských buniek, regulácia imunologických dejov	Áno	Zarjou <i>et al.</i> 2019
	AOA0N4SVF0	Tmsb10	<i>Thymosin, beta 10</i>	inhibícia polymerizácie aktínových monomérov; regulácia motility, diferenciácie a proliferácie buniek	Nie	Reactome, Zhang <i>et al.</i> 2017
	Q02257	Jup	<i>Junction plakoglobin</i>	základná súčasť adhézných spojov; udržiavanie bunkovej štruktúry v interakcii s cytoskeletálnymi proteínmi	Áno	Reactome, Uniprot
<i>F. tularensis</i>	AFT93032	–	<i>OmpA family protein</i>	bunkové delenie, udržiavanie tvaru a štruktúrálnej integrity buniek, virulencia	–	Robertson <i>et al.</i> 2014
	AFT92965	–	<i>Hypothetical protein FTS_1201</i>	funkcia neznáma	–	–

Vysvetlivky: ÁNO – v databáze ExoCarta je evidovaná štúdia, v rámci ktorej bol proteín nájdený v exozómoch druhu *Mus musculus*, NIE – v databáze ExoCarta nie je evidovaná štúdia, ktorá by proteín identifikovala v exozómoch druhu *Mus musculus*; \* proteín bol identifikovaný v exozómoch *Homo sapiens*

Pri porovnávaní zastúpenia proteínov v infikovanej a kontrolnej vzorke bolo možné pozorovať značný rozdiel. Aj napriek tomu, že obe vzorky obsahovali proteíny skupiny keratínov, ktoré vo väčšine prípadov plnia prevažne stavebnú funkciu bunky, len v infikovanej vzorke vystupovali takí zástupcovia tejto proteínovej rodiny, ktorí sa podieľajú aj na imunitných procesoch organizmu. Príkladom môže byť myšací proteín Keratín, type II cytoskeletal 6A a jeho schopnosť modulovať imunitný systém v boji proti grampozitívnym baktériám. Až na Keratín, type I cytoskeletal 42, ktorého funkcia zatiaľ nebola objasnená, boli všetky nájdené proteíny tejto skupiny uvedené v databáze Exocarta.

Rada izolovaných proteínov druhovo pochádzajúcich z *Mus musculus* bola nájdená aj v exozómoch pochádzajúcich z človeka. Jedným z nich je aj progranulín, proteín často diskutovaný v kontexte neurodegeneratívnych chorôb človeka, ktorý sa podieľa na imunoregulačných procesoch v prípade zápalových reakcií v organizme. Nové poznatky ukazujú, že exprimovaný je aj v procese infekcie, kedy dopomáha hostiteľskému organizmu eliminovať patogén (Jian *et al.* 2013). Schopnosť modulovať imunitný systém v boji proti infekcii majú aj ďalšie dva proteíny, katepsín Z a alfa-manozidáza (GAO *et al.* 2018; Lin *et al.* 2022). Posledným z radu myšacích proteínov vyskytujúcich sa aj u človeka je desmoplankín patriaci do skupiny desmozómov. Jedná sa o proteín, ktorý tvorí silné intracelulárne aj extracelulárne spoje medzi bunkami prispievajúc tak k zaisteniu integrity tkaniva, a tým chráni bunky pred vstupom patogénu (Stahley a Kowalczyk 2015).

Známky prítomnosti vykazuje aj myšací exozomálny proteín, feritín s ľahkým reťazcom 1, doposiaľ vnímaný ako zásobovateľ hostiteľských buniek železom. Ferritin sa podieľa aj na kontrole procesov spojených so zápalom, a tým hrá významnú úlohu v regulácii imunity (Zarjou *et al.* 2019). Aktín, ktorý sa takisto vyskytuje v infikovanej vzorke, zabezpečuje pohybovú funkciu bunky, vrátane tvorby fagozómu či EV, a preto je potencionálnym cieľom patogénov (Stradal a Schelhaas 2018).

Okrem myšacích proteínov však bola v infikovaných vzorkách potvrdená aj prítomnosť dvoch bakteriálnych proteínov, a to OmpA family proteín a hypothetical proteín FTS\_1201. Význam lipoproteínu OmpA family spočíva v jeho podiele na virulencii *F. tularensis*. Počas infekcie je baktériou exprimovaný, čím dokáže narušiť schopnosť imunity hostiteľských buniek (zväčša myšacích makrofágov). Potrebný je aj pre intracelulárny rast a integritu baktérie, čím opäť prispieva k jej virulencii (Robertson *et al.* 2014).

Na základe charakterizácie vyizolovaných exozomálnych proteínov bolo možné konštatovať, že sa prevažne jednalo o proteíny s imunomodulačnými vlastnosťami, ktoré boli produkované makrofágmi v reakcii na infekciu *F. tularensis*. V analýze sa podarilo odhaliť dva proteíny baktérie *F. tularensis*, teda nositeľov virulencie v hostiteľských bunkách.

## 9. DISKUSIA

Exozómy nesú značný význam pre vedeckú, ale aj klinickú sféru, keďže sa ukázalo, že môžu byť kľúčové pri objasnení patogenézy mnohých ochorení, pre diagnostiku chorôb ako biomarkery a pre terapiu v úlohe prírodných nanonosičov terapeutík (Liu *et al.* 2022; Zou *et al.* 2023). Ich stále nedostatočne prebádaný potenciál podnietil výskum k vývoju efektívneho izolačného postupu, ktorý by dokázal zabezpečiť dostatočné množstvo exozómov. Aj napriek vysokej snahe, neexistuje izolačná metóda, ktorá by bola plne optimálna a prinášala uspokojivé výsledky. Príčinou toho môže byť nestabilita biologických vzoriek či podobné vlastnosti exozómov s ostatnými EV, ktoré zabraňujú ich špecifickej izolácii. Kvôli tomuto faktoru je vysoko náročné a aktuálne takmer nemožné získať dokonale čistý výťažok s obsahom bohatým len na exozómy. Preto sa už dopredu predvída, a pri analýze zohľadňuje, prítomnosť aj iných EV, ako sú napríklad mikrovezikuly, apoptotické telieska a iné. Množstvo neštandardizovaných postupov izolácie môže viesť chaos do problematiky vývoja vhodnej izolačnej metódy exozómov, ich charakterizácie a funkčných analýz pripravených vzoriek. Exozómy pripravené rôznymi postupmi môžu disponovať odlišnými vlastnosťami, čo spôsobuje priveľkú diverzitu a nejednotnosť výstupných údajov, čím sa sťažuje ich analýza (Liu *et al.* 2022). Optimalizácia a následná štandardizácia postupu izolácie exozómov musí predchádzať každej štúdii zameranej na analýzu exozómov.

Hlavnou náplňou tejto práce je preto popis, skúšanie a porovnanie nastavených experimentálnych podmienok izolácie exozómov z myšacích makrofágov infikovaných baktériou *F. tularensis* a následná charakteristika vyzolovaných proteínov. Prvým krokom k nastaveniu podmienok izolácie bola optimalizácia postupu infekcie kultivovaných buniek *in vitro*. Kultivácia buniek v médiu obohatenom o sérum je bežnou praxou, avšak nemusí byť striktnou nutnosťou. Sérum disponuje komplexným zložením, ktoré na jednej strane dopomáha dodaním živín bunke k rastu a životaschopnosti, no na strane druhej, kvôli obsahu rôznych EV vrátane exozómov, môže kontaminovať výslednú vzorku, a tak viesť k nesprávnym výsledkom. Prípadným riešením by teda mohlo byť použitie séra ochudobneného o exozómy. Výroba takýchto sér je ale zdĺhavá, finančne náročná a nedokáže zaručiť úplnú elimináciu exozómov, čo by mohlo opätovne viesť ku kontaminácii vzorky. K využitiu tohto typu séra sa uchýľuje až v prípade, ak by bola prítomnosť séra pre prežitie buniek totálne nevyhnutná. Ďalším možným riešením je použitie bezsérového média, čo však nemusí byť vhodné pre všetky typy buniek. Pri kultivácii v médiu bez séra môže dôjsť k „hladovaniu“ buniek a aj apoptóze na základe vylučovania apoptotických teliesok. Vtedy je možné čas infekcie, a teda produkcie exozómov, skrátiť na dobu, počas ktorej exozómy nezačnú prejavovať známky cytotoxicity.

Existuje obava, že použitie dlhšieho časového obdobia by mohlo spôsobiť zníženie čistoty vzorku práve vyplavovaním spomínaných bunkových častíc kultivovanými bunkami (Aliakbari *et al.* 2024; Théry *et al.* 2006; Shelke *et al.* 2014).

To, či v tomto prípade použité kostne – dreňové myšacie makrofágy dokážu prežiť v podmienkach bez séra, ako tieto podmienky budú vplývať na ich základné vlastnosti (tvar, adherencia k podkladu a iné) a či sa neovplyvní infikovateľnosť buniek *F. tularensis* bolo overené prvotnými pokusmi. Ukázalo sa, že tieto bunky vykazujú schopnosť prežitia v médiu bez séra, a to aj počas dlhšieho časového obdobia (24 hodín) bez výrazných zmien ich základných vlastností. Infikovateľnosť buniek v médiu bez séra bola síce v porovnaní s bunkami v médiu so sérom znížená, avšak nie natoľko, aby to zabránilo jeho ďalšiemu použitiu. Vzhľadom na tieto zistenia bolo možné hodnotiť, že bunky použité k izolácii exozómov môžu byť ponechané v médiu bez prítomnosti séra. Výber časového intervalu vychádzal z poznatkov dvoch štúdií zaoberajúcich sa izoláciou exozómov. Zatiaľ čo v prvej boli exozómy izolované po dvoch hodinách od infekcie makrofágov THP-1 baktériou *Salmonella enterica* sérovar *Typhimurium* (Hui *et al.* 2018) v druhej štúdií, kde boli infikované opäť makrofágy THP-1, ale baktériou *F. tularensis* bol získaný exozomálny výťažok už pri použití časového intervalu jedna hodina (Vozandychova *et al.* 2023). Na základe dát vyplývajúcich z týchto štúdií a preukázaného dostatočného množstva infikovaných buniek (65%) bol pre prvý pokus izolácie zvolený dvojhodinový interval.

Pre izoláciu exozómov z infikovaných aj neinfikovaných buniek sa použil jeden zo základných a najviac využívaných postupov, pričom bol prevzatý a poupravený zo spomínaných štúdií. Tento postup je založený na metóde diferenciálnej centrifugácie a ultracentrifugácie, ktorá je vnímaná ako zlatý štandard medzi všetkými izolačnými metódami (Zhang *et al.* 2020). Na základe miery potreby čistoty vzorky, môže byť získaná frakcia dodatočne purifikovaná centrifugáciou v hustotnom gradiente, ktorá zbavuje vzorku interferujúcich nečistôt (napr. proteínové agregáty). Do prvotného kola izolačných pokusov tento krok zavedený nebol, no bude aplikovaný v tých nasledujúcich. Pri hodnotení izolátov z prvého experimentu pomocou DLS analýzy bola preukázaná prítomnosť častíc, veľkosťou podobných exozómom, avšak ich množstvo bolo primálne na to, aby bolo možné určiť ich koncentráciu.

Tieto výsledky viedli pri druhom postupe izolácie k navýšeniu počtu buniek a resuspendovaniu výsledných vzoriek v polovičnom množstve pufru, za účelom zvýšenia výslednej koncentrácie. Koncentrácia proteínov vo vzorke bola síce tentokrát zameraná, no kontrolná analýza pomocou kvapalinovej chromatografie, vždy predchádzajúca MS meraniu, odhalila, že skutočné

množstvo proteínov vo vzorke bolo oveľa nižšie (výsledok nie je v tejto práci uvedený). Predpokladaným dôvodom vzniku tejto nepresnosti mohlo byť, že sa hodnota koncentrácie bielkoviny pohybovala na hrane detekčného limitu alebo interferencia niektorej zo zložiek obsahu vzorky.

Predpoklad, že počet proteínov bude nízky, nakoniec potvrdila aj MS analýza. V kontrolnej vzorke boli identifikované len dva, pôvodom myšacie, proteíny a v infikovanej vzorke trinásť proteínov – jedenásť myšacích a dva bakteriálne. Sedem z týchto myšacích proteínov bolo už v súvislosti s exozómami základe databázy ExoCarta niekedy nájdených. MS analýzou, ale neboli odhalené žiadne proteíny typické pre exozómy (napr.. CD9, CD81, TSG101, Alix) (da Costa *et al.* 2021). Je teda neznáme, či bolo množstvo exozomálnych proteínov vo vzorke príliš nízke, a preto ich MS analýza nedokázala odhaliť alebo sa tam nenachádzali vôbec.

Charakteristika preukázala, že väčšina vyizolovaných proteínov pôvodom z myši vykazuje imunomodulačné vlastnosti. Ako bolo spomenuté, podarilo sa nám identifikovať aj dva bakteriálne proteíny pochádzajúce z *F. tularensis*. Zatiaľ čo u prvého z nich, ktorý pochádza z rodiny OmpA, už bol niekedy popísaný možný virulentný charakter (Robertson *et al.* 2014), funkcia druhého lipoproteínu nebola objasnená. Niektoré zo štúdií, ale popisujú jeho imunoreaktívne účinky (Chu *et al.* 2014). Prítomnosť týchto bakteriálnych proteínov v exozómoch izolovaných z buniek infikovaných *Salmonella Typhimurium* tiež odhalila Hui *et al.* 2018

Po vyhodnotení výsledkov sa ukázalo, že pri použití dvojhodinového intervalu nebol dosiahnutý žiaden exozomálny výťažok alebo bol príízky, a preto je potrebné tento model ďalej optimalizovať. Možným riešením by mohlo byť predĺženie času infekcie, počas ktorého by tak dochádzalo k tvorbe exozómov po dlhší čas, čo by viedlo aj k finálnemu zvýšeniu množstva exozómov v izolovanej vzorke. Tu je ale nutná bilancia medzi časom, počas ktorého by sa bunkami produkovali ešte exozómy a časom, pri ktorom by už bunky začali prejavovať známky cytotoxicity a apoptózy či už v dôsledku infekcie alebo absencie séra. Zároveň navrhujeme nahradiť použité analytické metódy k základnej charakteristike exozómov za vhodnejšie. Metóda DLS použitá k stanoveniu veľkosti častíc v našej vzorke sa prejavila ako nevhodná pre svoju nízku špecifickosť a neschopnosť analýzy objemovo malých vzoriek. Výhodnejšou by mohla byť analýza trajektórie nanočastíc (nanoparticle tracking analysis, NTA), na základe ktorej je možné určiť koncentráciu aj veľkosť skúmaných častíc, a to len zo vzorky v radoch mikrolitrov. Do budúca odporúčame takisto pred samotnou izoláciou overiť prítomnosť proteínov typických pre exozómy imunodetekciou pomocou Western blot analýzy, poprípade priamo potvrdiť prítomnosť exozómov vo vzorkách elektrónovou mikroskopiou.



## 10. ZÁVER

Táto práca popisuje kompletný proces izolácie exozómov, v ktorom bol zavedený model kultivácie a infekcie primárnych myších makrofágov v podmienkach bez séra, pri použití postupu založenom na diferenciálnej centrifugácii a ultracentrifugácii. Analýza vzorkov pomocou DLS a koncentrácia bielkovín, však naznačovala len sporadickú prítomnosť bielkovinného materiálu, čo vo výsledku potvrdila i MS analýza, pomocou ktorej sa podarilo identifikovať len veľmi malý počet proteínov. Na základe tejto analýzy sa podarilo vyizolovať dokopy štrnásť myšacích proteínov a dva bakteriálne proteíny z *F. tularensis*, avšak odhalený nebol žiaden proteín typický pre exozómy. Po vyhodnotení dosiahnutých výsledkov je možné konštatovať, že podmienky zvolené pre model izolácie exozómov neboli plne vhodné. Príčinou by mohla byť zvolená doba infekcie, počas ktorej hypoteticky nemuselo dôjsť k dostatočnej produkcii exozómov, a to aj napriek navýšeniu počtu buniek pri opakovanom prevedení metódy.

Za predpokladu, že sa tento model izolácie a charakterizácie exozómov podarí vhodne optimalizovať, a tak získať dostatočné množstvo exozómov, je možné očakávať jeho zavedenie ako štandardného postupu využiteľného v rámci funkčných štúdií pre výskum potenciálneho významu exozómov v patogenéze tularémie. V závere je nutné podotknúť, že sa v tomto prípade jednalo o prvotné štúdie zaoberajúce sa optimalizáciou metód izolácie exozómov, ktoré aj naďalej pokračujú, a ktorých doterajšie výsledky budú prezentované tento rok formou posteru na každoročnej konferencii ASEV a CzeSEV vo Viedni.

## 11. POUŽITÉ SKRATKY

Skratka	Význam skratky	Slovenský význam
ACN	<i>Acetonitrilum</i>	acetonitril
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>	hovädzí sérový albumín
CFU	<i>Colony Forming Units</i>	jednotky tvoriace kolónie
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>	4', 6-diamidino-2-fenylindol
DLS	<i>Dynamic light scattering</i>	dynamický rozptyl svetla
DMEM	<i>Dulbecco 's Modified Eagle's Medium</i>	Dulbekovo modifikované Eaglovo médium
DOCNHNa	<i>Sodium deoxycholate</i>	deoxycholát sodný
DTT	<i>Dithiothreitol</i>	ditiotreitól
EV	<i>Extracellular vesicles</i>	extracelulárne vezikuly
ESCRT	<i>Endosomal sorting complex required for transport</i>	endozomálny triediaci komplex potrebný pre transport
<i>F. tularensis</i>	<i>Francisella tularensis</i>	
FCS	<i>Francisella Strain Collection</i>	zber kmeňov <i>Francisella</i>
FSC200	<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i>	
FSC200/eGFP	<i>Francisella tularensis</i> FSC200 (pTP551Hyg::eGFP)	
FSC200/mCherry	<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> FSC200 (pTP388Hyg::mCherry)	
FTS	<i>Fetal bovine serum</i>	fetálne hovädzie sérum
IAA	<i>Iodoacetamide</i>	jodoacetamid
ILV	<i>Intravesicular bodies</i>	intravezikulárne telieska
KMPB VLF UO		Katedra molekulárnej patológie a biológie Vojenskej lekárskej fakulty Univerzity obrany
MVB	<i>Multivesicular bodies</i>	multivezikulárne telieska
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>	multiplicita infekcie
MS	<i>Mass spectrometry</i>	hmotnostná spektrometria

<b>MWCO</b>	<i>Molecular Weight Cut-Off</i>	limit molekulárnej hmotnosti
<b>NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub></b>	<i>Ammonii hydrogenocarbonas</i>	hydrogenuhličitan amónny
<b>NLH</b>	<i>National Library of Medicine</i>	
<b>NTA</b>	<i>Nanoparticle tracking analysis</i>	analýza trajektórie nanočastíc
<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffered saline</i>	fyziológický roztok tmený fosfátom
<b>PFA</b>	<i>Formaldehyde Solution</i>	formaldehyd
<b>Phalloidin-FITC</b>	<i>Phalloidin, Fluorescein isothiocyanate labeled</i>	faloidín, fluorescein isothiokyanát
<b>Phalloidin-TRITC</b>	<i>Phalloidin, tetramethylrhodamine B isothiocyanate</i>	faloidín, tetrametylrodamin B isothiokyanát
<b>RT</b>	<i>Room temperature</i>	izbová teplota
<b>TFA</b>	<i>Trifluoroacetic acid</i>	trifloroctovej kyseliny
<b>UC</b>	<i>Ultracentrifugation</i>	ultracentrifugácia
<b>WR</b>	<i>Working reagent</i>	pracovné činidlo

## 12. ZOZNAM POUŽITÝCH GRAFOV, OBRÁZKOV A TABULIEK

### ZOZNAM GRAFOV

Graf č. 1 – Graf závislosti prítomnosti séra a času na infikovateľnosť makrofágov.....	44
Graf č. 2 – Grafy stanovenia veľkosti častíc pomocou dynamického rozptylu svetla.....	48
Graf č. 3 – Graf kalibračnej krivky získanej z priemerných hodnôt roztokov štandardov.....	49

### ZOZNAM OBRÁZKOV

Obrázok č. 1 – Delenie extracelulárnych vezikul.....	12
Obrázok č. 2 – Proces biogenézy exozómov.....	13
Obrázok č. 3 – Proces infekcie makrofágov baktériou <i>Francisella tularensis</i> .....	17
Obrázok č. 4 – Rozšírenie tularémie vo svete.....	18
Obrázok č. 5 – Schéma prenosu tularémie.....	19
Obrázok č. 6 – Symptómy tularémie.....	21
Obrázok č. 7 – Schéma infekcie makrofágov v médiu so sérom a bez séra baktériou <i>Francisella tularensis</i> v médiu so sérom a bez séra v 24–jamkovej platničke.....	31
Obrázok č. 8 – Porovnanie makrofágov pod svetelným mikroskopom za stanovených podmienok pri intervale 1 hodina, 4 hodiny a 6 hodín po infekcii.....	38
Obrázok č. 9 – Porovnanie makrofágov pod fluorescenčným mikroskopom za stanovených podmienok pri intervale 1 hodina a 2 hodiny po infekcii.....	41
Obrázok č. 10 – Schéma izolácie exozómov.....	46

### ZOZNAM TABULIEK

Tabuľka č. 1 – Porovnanie efektorových molekúl vylučovaných bunkami imunitného systému pri infekcii <i>Francisella tularensis</i> .....	15
Tabuľka č. 2 – Druhy rodu <i>Francisella</i> a ich charakterizácia.....	18
Tabuľka č. 3 – Porovnanie vybraných metód izolácie exozómov.....	24
Tabuľka č. 4 – Kalibračná rada.....	35
Tabuľka č. 5 – Zastúpenie infikovaných makrofágov v médiu bez séra infikovaných baktériami v médiu bez séra (- / -).....	43
Tabuľka č. 6 – Zastúpenie infikovaných makrofágov v médiu bez séra infikovaných baktériami v médiu so sérom (- / +).....	43
Tabuľka č. 7 – Zastúpenie infikovaných makrofágov v médiu so sérom infikovaných baktériami v médiu so sérom (+ / +).....	43
Tabuľka č. 8 – Porovnanie množstva infikovaných a neinfikovaných makrofágov vzhľadom na prítomnosť séra a časového intervalu.....	44
Tabuľka č. 9 – Porovnanie experimentálnych podmienok.....	45
Tabuľka č. 10 – Tabuľka výsledných hodnôt koncentrácie a absorbcie vzoriek.....	49

Tabuľka č. 11 – Zoznam identifikovaných proteínov hmotnostnou spektrometriou – kontrolná vzorka .....	50
Tabuľka č. 12 – Zoznam identifikovaných proteínov hmotnostnou spektrometriou – infikovaná vzorka .....	51

## 13. POUŽITÁ LITERATÚRA

ALIAKBARI, Farhang, Noah B STOCEK, Maximuss COLE-ANDRÉ, Janice GOMES, Giovanni FANCHINI, Stephen H PASTERNAK, Gunna CHRISTIANSEN, Dina MORSHEDI, Kathryn VOLKENING a Michael J STRONG, 2024. A methodological primer of extracellular vesicles isolation and characterization via different techniques. *Biology Methods and Protocols* [online]. **9**(1), bpae009 [vid. 2024-08-15]. ISSN 2396-8923. Dostupné z: doi:10.1093/biomethods/bpae009

Anon., [b.r.]. *Details - Public Health Image Library(PHIL)* [online] [vid. 2024-08-14]. Dostupné z: <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=2032>

APPELT, Sandra, Mirko FABER, Kristin KÖPPEN, Daniela JACOB, Roland GRUNOW a Klaus HEUNER, 2020. *Francisella tularensis* Subspecies holarctica and Tularemia in Germany. *Microorganisms* [online]. **8**(9), 1448 [vid. 2024-08-12]. ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms8091448

BHATNAGAR, Sanchita, Kazuhiko SHINAGAWA, Francis J. CASTELLINO a Jeffrey S. SCHOREY, 2007. Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response in vitro and in vivo. *Blood* [online]. **110**(9), 3234–3244 [vid. 2024-08-07]. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2007-03-079152

BRÖMS, Jeanette E., Anders SJÖSTEDT a Moa LAVANDER, 2010. The Role of the *Francisella Tularensis* Pathogenicity Island in Type VI Secretion, Intracellular Survival, and Modulation of Host Cell Signaling. *Frontiers in Microbiology* [online]. **1**, 136 [vid. 2024-08-13]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2010.00136

CELLI, Jean a Thomas C. ZAHRT, 2013. Mechanisms of *Francisella tularensis* Intracellular Pathogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* [online]. **3**(4), a010314 [vid. 2024-08-12]. ISSN 2157-1422. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a010314

DA COSTA, Vitor Rodrigues, Rodrigo Pinheiro ARAUDI, Hugo VIGERELLI, Fernanda D'ÁMELIO, Thais Biude MENDES, Vivian GONZAGA, Bruna POLICÍQUIO, Gabriel Avelar COLOZZA-GAMA, Cristiane Wenceslau VALVERDE a Irina KERKIS, 2021. *Cells* [online]. **10**(10), 2617 [vid. 2024-08-16]. ISSN 2073-4409. Dostupné z: doi:10.3390/cells10102617

ELLIS, Jill, Petra C. F. OYSTON, Michael GREEN a Richard W. TITBALL, 2002. Tularemia. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. **15**(4), 631–646 [vid. 2024-08-09]. ISSN 0893-8512, 1098-6618. Dostupné z: doi:10.1128/CMR.15.4.631-646.2002

FOLEY, Janet E. a Nathan C. NIETO, 2010. Tularemia. *Veterinary Microbiology* [online]. **140**(3–4), 332–338 [vid. 2024-08-08]. ISSN 03781135. Dostupné z: doi:10.1016/j.vetmic.2009.07.017

FORSMAN, M., G. SANDSTRÖM a A. SJÖSTEDT, 1994. Analysis of 16S ribosomal DNA sequences of *Francisella* strains and utilization for determination of the phylogeny of the genus and for identification of strains by PCR. *International Journal of Systematic Bacteriology* [online]. **44**(1), 38–46. ISSN 0020-7713. Dostupné z: doi:10.1099/00207713-44-1-38

FRISCHKNECHT, Manuel, Angelina MEIER, Bernhard MANI, Lucas JOERG, Olaf Chan-Hi KIM, Katia BOGGIAN a Carol STRAHM, 2019. Tularemia: an experience of 13 cases including a rare myocarditis in a referral center in Eastern Switzerland (Central Europe) and a review of the literature. *Infection* [online]. **47**(5), 683–695 [vid. 2024-08-13]. ISSN 1439-0973. Dostupné z: doi:10.1007/s15010-019-01269-7

GAO, Siming, Honglin ZHU, Xiaoxia ZUO a Hui LUO, 2018. Cathepsin G and Its Role in Inflammation and Autoimmune Diseases. *Archives of Rheumatology* [online]. **33**(4), 498–504 [vid. 2024-08-14]. ISSN 2148-5046. Dostupné z: doi:10.5606/ArchRheumatol.2018.6595

GURUNG, Sonam, Dany PEROCHEAU, Loukia TOURAMANIDOU a Julien BARUTEAU, 2021. The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling. *Cell Communication and Signaling : CCS* [online]. **19**, 47 [vid. 2024-08-06]. ISSN 1478-811X. Dostupné z: doi:10.1186/s12964-021-00730-1

HAYOUN, Michael A., Richard J. CHEN, Helena M. SWINKELS a Kevin C. KING, 2024. Biological Weapon Toxicity. In: *StatPearls* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing [vid. 2024-08-09]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441942/>

HOOD, A. M., 1977. Virulence factors of *Francisella tularensis*. *Journal of Hygiene* [online]. **79**(1), 47–60 [vid. 2024-08-12]. ISSN 0022-1724. Dostupné z: doi:10.1017/S0022172400052840

HUI, Winnie W., Kamil HERCIK, Sayali BELSARE, Navatha ALUGUBELLY, Beata CLAPP, Carlos RINALDI a Mariola J. EDELMANN, 2018. *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium* Alters the Extracellular Proteome of Macrophages and Leads to the Production of Proinflammatory Exosomes. *Infection and Immunity* [online]. **86**(2), e00386-17. ISSN 1098-5522. Dostupné z: doi:10.1128/IAI.00386-17

CHAUDHARI, Pinal, Vivek GHATE, Madhavan NAMPOOTHIRI a Shaila LEWIS, 2022. Multifunctional role of exosomes in viral diseases: From transmission to diagnosis and therapy. *Cellular Signalling* [online]. **94**, 110325 [vid. 2024-08-06]. ISSN 0898-6568. Dostupné z: doi:10.1016/j.cellsig.2022.110325

CHHOY, Peter, Caitlin W. BROWN, John J. AMANTE a Arthur M. MERCURIO, 2021. Protocol for the separation of extracellular vesicles by ultracentrifugation from in vitro cell culture models. *STAR Protocols* [online]. **2**(1), 100303 [vid. 2024-08-13]. ISSN 26661667. Dostupné z: doi:10.1016/j.xpro.2021.100303

CHU, Ping, Aimee L. CUNNINGHAM, Jieh-Juen YU, Jesse Q. NGUYEN, Jeffrey R. BARKER, C. Rick LYONS, Julie WILDER, Michelle VALDERAS, Robert L. SHERWOOD, Bernard P. ARULANANDAM a Karl E. KLOSE,

2014. Live Attenuated *Francisella novicida* Vaccine Protects against *Francisella tularensis* Pulmonary Challenge in Rats and Non-human Primates. *PLoS Pathogens* [online]. **10**(10), e1004439 [vid. 2024-08-16]. ISSN 1553-7374. Dostupné z: doi:10.1371/journal.ppat.1004439

IRACI, Nunzio, Tommaso LEONARDI, Florian GESSLER, Beatriz VEGA a Stefano PLUCHINO, 2016. Focus on Extracellular Vesicles: Physiological Role and Signalling Properties of Extracellular Membrane Vesicles. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **17**(2), 171 [vid. 2024-07-29]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms17020171

JIAN, Jinlong, Jessica KONOPKA a Chuanju LIU, 2013. Insights into the role of progranulin in immunity, infection, and inflammation. *Journal of Leukocyte Biology* [online]. **93**(2), 199–208 [vid. 2024-08-14]. ISSN 0741-5400. Dostupné z: doi:10.1189/jlb.0812429

JOHANSSON, Anna-Lena, Laila NOPPA, Emelie Näslund SALOMONSSON a Åke FORSBERG, 2015. Chapter 108 - Francisella. In: Yi-Wei TANG, Max SUSSMAN, Dongyou LIU, Ian POXTON a Joseph SCHWARTZMAN, ed. *Molecular Medical Microbiology (Second Edition)* [online]. Boston: Academic Press, s. 1991–2009 [vid. 2024-08-12]. ISBN 978-0-12-397169-2. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-397169-2.00108-6

KUTLU, Murat, Çağrı ERGIN, Aynur KARADENIZLI a Selda SAYIN KUTLU, 2021. An outbreak of tularemia in southwestern Turkey. *Journal of Infection in Developing Countries* [online]. **15**(6), 812–817. ISSN 1972-2680. Dostupné z: doi:10.3855/jidc.12312

KWAKU, Geneva N., Rebecca A. WARD, Jatin M. VYAS a Hannah BROWN HARDING, 2024. Host innate immune systems gather intel on invading microbes via pathogen-derived extracellular vesicles. *Extracellular Vesicle* [online]. **3**, 100043 [vid. 2024-08-12]. ISSN 2773-0417. Dostupné z: doi:10.1016/j.vesic.2024.100043

LARSON, Marilyn A., Khalid SAYOOD, Amanda M. BARTLING, Jennifer R. MEYER, Clarise STARR, James BALDWIN a Michael P. DEMPSEY, 2020. Differentiation of *Francisella tularensis* Subspecies and Subtypes. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. **58**(4), e01495-19 [vid. 2024-08-12]. ISSN 0095-1137. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.01495-19

LIN, Xuelei, Hongwei LIU, Hongyu ZHAO, Shunjin XIA, Yueshuo LI, Chaoqian WANG, Qi HUANG, Siyi WANGGOU a Xuejun LI, 2022. Immune Infiltration Associated MAN2B1 Is a Novel Prognostic Biomarker for Glioma. *Frontiers in Oncology* [online]. **12**, 842973 [vid. 2024-08-14]. ISSN 2234-943X. Dostupné z: doi:10.3389/fonc.2022.842973

LIU, Wen-zhao, Zhan-jun MA a Xue-wen KANG, 2022. Current status and outlook of advances in exosome isolation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. **414**(24), 7123–7141 [vid. 2024-08-13]. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-022-04253-7



MASHOURI, Ladan, Hassan YOUSEFI, Amir Reza AREF, Ali mohammad AHADI, Fatemeh MOLAEI a Suresh K. ALAHARI, 2019. Exosomes: composition, biogenesis, and mechanisms in cancer metastasis and drug resistance. *Molecular Cancer* [online]. **18**, 75 [vid. 2024-08-06]. ISSN 1476-4598. Dostupné z: doi:10.1186/s12943-019-0991-5

MAURIN, Max, 2015. *Francisella tularensis* as a potential agent of bioterrorism? *Expert Review of Anti-infective Therapy* [online]. **13**(2), 141–144 [vid. 2024-08-08]. ISSN 1478-7210, 1744-8336. Dostupné z: doi:10.1586/14787210.2015.986463

MAURIN, Max, Léa PONDÉRAND, Aurélie HENNEBIQUE, Isabelle PELLOUX, Sandrine BOISSET a Yvan CASPAR, 2023. Tularemia treatment: experimental and clinical data. *Frontiers in Microbiology* [online]. **14** [vid. 2024-08-13]. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2023.1348323

MCCOY, George W. a Charles W. CHAPIN, 1912. Further Observations on a Plague-Like Disease of Rodents with a Preliminary Note on the Causative Agent, Bacterium tularensis. *The Journal of Infectious Diseases* [online]. **10**(1), 61–72 [vid. 2024-08-09]. ISSN 0022-1899. Dostupné z: <https://www.jstor.org/stable/30071893>

MCLENDON, Molly K., Michael A. APICELLA a Lee-Ann H. ALLEN, 2006. *Francisella tularensis*: taxonomy, genetics, and Immunopathogenesis of a potential agent of biowarfare. *Annual Review of Microbiology* [online]. **60**, 167–185. ISSN 0066-4227. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.micro.60.080805.142126

OYSTON, Petra C. F., 2008. *Francisella tularensis*: unravelling the secrets of an intracellular pathogen. *Journal of Medical Microbiology* [online]. **57**(8), 921–930 [vid. 2024-08-08]. ISSN 0022-2615, 1473-5644. Dostupné z: doi:10.1099/jmm.0.2008/000653-0

PEREZ-HERNANDEZ, Daniel, Cristina GUTIÉRREZ-VÁZQUEZ, Inmaculada JORGE, Soraya LÓPEZ-MARTÍN, Angeles URSA, Francisco SÁNCHEZ-MADRID, Jesús VÁZQUEZ a María YÁÑEZ-MÓ, 2013. The Intracellular Interactome of Tetraspanin-enriched Microdomains Reveals Their Function as Sorting Machineries toward Exosomes. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. **288**(17), 11649–11661 [vid. 2024-08-06]. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M112.445304

ROBERTSON, Gregory T., Elizabeth Di Russo CASE, Nicole DOBBS, Christine INGLE, Murat BALABAN, Jean CELLI a Michael V. NORSGARD, 2014. FTT0831c/FTL\_0325 Contributes to *Francisella tularensis* Cell Division, Maintenance of Cell Shape, and Structural Integrity. *Infection and Immunity* [online]. **82**(7), 2935–2948 [vid. 2024-08-14]. Dostupné z: doi:10.1128/iai.00102-14

RODRIGUES, Meryl, Jia FAN, Christopher LYON, Meihua WAN a Ye HU, 2018a. Role of Extracellular Vesicles in Viral and Bacterial Infections: Pathogenesis, Diagnostics, and Therapeutics. *Theranostics* [online]. **8**(10), 2709–2721 [vid. 2024-07-30]. ISSN 1838-7640. Dostupné z: doi:10.7150/thno.20576

RODRIGUES, Meryl, Jia FAN, Christopher LYON, Meihua WAN a Ye HU, 2018b. Role of Extracellular Vesicles in Viral and Bacterial Infections: Pathogenesis, Diagnostics, and Therapeutics. *Theranostics* [online]. **8**(10), 2709–2721. ISSN 1838-7640. Dostupné z: doi:10.7150/thno.20576

SHAHI, Sanjay, Taeyoung KANG a Pamali FONSEKA, 2024. Extracellular Vesicles in Pathophysiology: A Prudent Target That Requires Careful Consideration. *Cells* [online]. **13**(9), 754 [vid. 2024-07-30]. ISSN 2073-4409. Dostupné z: doi:10.3390/cells13090754

SHARMA, Rinku, Rajendra Damu PATIL, Birbal SINGH, Sandip CHAKRABORTY, Deepak CHANDRAN, Kuldeep DHAMA, Devi GOPINATH, Gauri JAIRATH, Ajayta RIALCH, Gorakh MAL, Putan SINGH, Wanpen CHAICUMPA a G. SAIKUMAR, 2023. Tularemia – a re-emerging disease with growing concern. *Veterinary Quarterly* [online]. **43**(1), 1–16 [vid. 2024-08-13]. ISSN 0165-2176. Dostupné z: doi:10.1080/01652176.2023.2277753

SHELKE, Ganesh Vilas, Cecilia LÄSSER, Yong Song GHO a Jan LÖTVALL, 2014. Importance of exosome depletion protocols to eliminate functional and RNA-containing extracellular vesicles from fetal bovine serum. *Journal of Extracellular Vesicles* [online]. **3**(1), 24783 [vid. 2024-08-16]. ISSN 2001-3078. Dostupné z: doi:10.3402/jev.v3.24783

SIDHOM, Karim, Patience O. OBI a Ayesha SALEEM, 2020. A Review of Exosomal Isolation Methods: Is Size Exclusion Chromatography the Best Option? *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **21**(18), 6466 [vid. 2024-08-17]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms21186466

SNOWDEN, Jessica a Kari A. SIMONSEN, 2024. Tularemia. In: *StatPearls* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing [vid. 2024-08-13]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430905/>

STAHLEY, Sara N. a Andrew P. KOWALCZYK, 2015. Desmosomes in acquired disease. *Cell and tissue research* [online]. **360**(3), 439–456 [vid. 2024-08-14]. ISSN 0302-766X. Dostupné z: doi:10.1007/s00441-015-2155-2

STRADAL, Theresia E. B. a Mario SCHELHAAS, 2018. Actin dynamics in host–pathogen interaction. *Febs Letters* [online]. **592**(22), 3658–3669 [vid. 2024-08-14]. ISSN 0014-5793. Dostupné z: doi:10.1002/1873-3468.13173

THÉRY, Clotilde, Sebastian AMIGORENA, Graça RAPOSO a Aled CLAYTON, 2006. Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. *Current Protocols in Cell Biology* [online]. **30**(1), 3.22.1-3.22.29 [vid. 2024-08-16]. ISSN 1934-2616. Dostupné z: doi:10.1002/0471143030.cb0322s30

ULU-KILIC, Aysegul a Mehmet DOGANAY, 2014. An overview: Tularemia and travel medicine. *Travel Medicine and Infectious Disease* [online]. **12**(6, Part A), Special Issue: Zoonoses and Travel medicine, 609–616 [vid. 2024-08-13]. ISSN 1477-8939. Dostupné z: doi:10.1016/j.tmaid.2014.10.007

VOZANDYCHOVA, Vera, Pavel REHULKA, Kamil HERCIK, Petra SPIDLOVA, Pavla PAVLIK, Jaroslav HANUS, Romana HADRAVOVA a Jiri STULIK, 2023. Modified activities of macrophages' deubiquitinating enzymes after Francisella infection. *Frontiers in Immunology* [online]. **14**, 1252827 [vid. 2024-08-12]. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2023.1252827

WANG, Fangyu, Richard A. CERIONE a Marc A. ANTONYAK, 2021. Isolation and characterization of extracellular vesicles produced by cell lines. *STAR Protocols* [online]. **2**(1) [vid. 2024-08-13]. Dostupné z: doi:10.1016/j.xpro.2021.100295

ZARJOU, Abolfazl, Laurence M. BLACK, Kayla R. MCCULLOUGH, Travis D. HULL, Stephanie K. ESMAN, Ravindra BODDU, Sooryanarayana VARAMBALLY, Darshan S. CHANDRASHEKAR, Wenguang FENG, Paolo AROSIO, Maura POLI, Jozsef BALLA a Subhashini BOLISETTY, 2019. Ferritin Light Chain Confers Protection Against Sepsis-Induced Inflammation and Organ Injury. *Frontiers in Immunology* [online]. **10**, 131 [vid. 2024-08-14]. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2019.00131

ZHANG, Xin, Dong REN, Ling GUO, Lan WANG, Shu WU, Chuyong LIN, Liping YE, Jinrong ZHU, Jun LI, Libing SONG, Huanxin LIN a Zhenyu HE, 2017. Thymosin beta 10 is a key regulator of tumorigenesis and metastasis and a novel serum marker in breast cancer. *Breast Cancer Research : BCR* [online]. **19**, 15 [vid. 2024-08-14]. ISSN 1465-5411. Dostupné z: doi:10.1186/s13058-016-0785-2

ZHANG, Yi, Jiayao BI, Jiayi HUANG, Yanan TANG, Shouying DU a Pengyue LI, 2020. <p>Exosome: A Review of Its Classification, Isolation Techniques, Storage, Diagnostic and Targeted Therapy Applications</p>. *International Journal of Nanomedicine* [online]. **15**, 6917–6934 [vid. 2024-08-13]. Dostupné z: doi:10.2147/IJN.S264498

ZHANG, Yuan, Yunfeng LIU, Haiying LIU a Wai Ho TANG, 2019. Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell & Bioscience* [online]. **9**, 19 [vid. 2024-08-06]. ISSN 2045-3701. Dostupné z: doi:10.1186/s13578-019-0282-2

ZOU, Zaijun, Han LI, Gang XU, Yunxiang HU, Weiguo ZHANG a Kang TIAN, 2023. Current Knowledge and Future Perspectives of Exosomes as Nanocarriers in Diagnosis and Treatment of Diseases. *International Journal of Nanomedicine* [online]. **18**, 4751 [vid. 2024-08-06]. Dostupné z: doi:10.2147/IJN.S417422