**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**

**Přírodovědecká fakulta**

# Příprava fluorescenčně značených extracelulárních vezikul z myších makrofágů

Bakalářská práce

**Barbora Bačová**

Školitel: doc. Mgr. Jaroslava Lieskovská, Ph.D.

České Budějovice 2026

**Bibliografické údaje:**

B. Bačová, 2026: Příprava fluorescenčně značených extracelulárních vezikul z myších makrofágů [Preparation of fluorescently labeled extracellular vesicles from mouse macrophages, Bc. Thesis, in Czech] – 55 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

**Anotace:**

This bachelor thesis focuses on the role of extracellular vesicles in flavivirus infection in its theoretical section. The experimental part is dedicated to the preparation of fluorescently labeled extracellular vesicles. Two transfection methods for mouse macrophages were tested to achieve the expression of the CD9 tetraspanin fused with GFP, and electroporation conditions were optimized. Finally, the extracellular vesicles were detected using flow cytometry and fluorescence spectrophotometry.

**Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

V Českých Budějovicích, dne ..... .....

Barbora Bačová

**Poděkování**

V první řadě bych ráda poděkovala své školitelce paní doc. Mgr. Jaroslavě Lieskovské, Ph.D., za vedení této práce, laskavý přístup, trpělivost a čas, který mi věnovala. Také bych chtěla poděkovat panu Dr. Šinkorovi za pomoc s nastavením průtokového cytometru. Děkuji i svým blízkým a především rodině, která mi byla po celou dobu dosavadního studia oporou.

# Obsah

Seznam zkratek ... 1
1 Úvod ... 4
1.1 Extracelulární vezikuly ... 4
1.1.1 Klasifikace EVs ... 5
1.2 Flaviviry ... 8
1.2.1 Struktura ... 8
1.2.2 Replikační cyklus ... 9
1.3 Role EVs ve flavivirové infekci ... 9
1.3.1 Přenos flavivirů na hostitele prostřednictvím EVs vektora ... 10
1.3.2 Šíření a překonávání biologických bariér pomocí hostitelských EVs ... 11
1.3.3 Imunomodulace a rozvoj neurozánětu ... 12
1.3.4 Mechanizmy úniku před imunitním systémem ... 12
1.3.5 Využití drah biogeneze EVs flaviviry ... 13
1.3.6 Antivirová funkce EVs ... 14
2 Cíle práce ... 16
3 Materiály a metody ... 17
3.1 Materiály ... 17
3.1.1 Buněčné linie ... 17
3.1.2 Chemicky kompetentní buňky ... 17
3.1.3 Plazmidy ... 17
3.2 Metody ... 17
3.2.1 Příprava agarových ploten ... 17
3.2.2 Transformace kompetentních buněk ... 18
3.2.3 Izolace plazmidu ... 18
3.2.4 Elektroporace ... 18
3.2.5 Transfekce pomocí GenJet™ ... 19
3.2.6 Analýza transfekční účinnosti a viability buněk ... 20
3.2.7 Příprava média z PMJ2-R k detekci GFP-pozitivních EVs ... 20
3.2.8 Ultrafiltrace EVs ... 20
3.2.9 Značení EVs s CTV450 ... 21
3.2.10 Izolace EVs ... 21
3.2.11 Fluorescenční spektrofotometrie ... 22
3.2.12 Průtoková cytometrie – detekce EVs ... 22

3.2.13 SDS-PAGE ... 23
3.2.14 Western blot ... 24
4 Výsledky ... 25
4.1. Elektroporace ... 25
4.1.1 Vliv napětí na účinnost elektroporace PMJ2-R ... 25
4.1.2 Vliv koncentrace plazmidové DNA na účinnost elektroporace PMJ2-R ... 26
4.1.3 Vliv kapacity na účinnost elektroporace PMJ2-R ... 26
4.1.4 Vliv napětí na účinnost elektroporace IC-21 ... 27
4.1.5 Vliv koncentrace DNA na účinnost elektroporace IC-21 ... 28
4.1.6 Nejúčinnější parametry elektroporace ... 29
4.2 Transfekce pomocí GenJet™ ... 29
4.2.1 Transfekce PMJ2-R ... 30
4.2.2 Transfekce IC-21 ... 30
4.2.3 Transfekce HEK293T ... 31
4.2.4 Výsledky transfekce ... 31
4.3 Detekce CD9-emGFP značených EVs z PMJ2-R ... 31
4.4 Detekce fluorescenčně značených EVs z HEK293T ... 32
4.4.1 Spektrofotometrické měření fluorescence ... 32
4.4.2 Detekce EVs pomocí průtokové cytometrie ... 34
4.4.3 Detekce CD9 ... 37
5 Diskuze ... 39
6 Souhrn ... 43
Seznam literatury ... 44

# Seznam zkratek

| | |
|---|---|
| ADE | Antibody-dependent enhancement |
| ALIX | Apoptosis linked gene-2-interacting protein X |
| AMP | Ampicilin |
| APS | Ammonium Persulfate |
| ARRDC1 | Arrestin domain-containing protein 1 |
| ATB | Antibiotikum |
| ATF3 | AMP-dependent transcription factor 3 |
| ATPase | Adenosine Triphosphatase |
| BBB | Blood-brain barrier |
| $Ca^{2+}$ | Vápenatý ion |
| CD | Cluster of differentiation |
| CNS | Central nervous system |
| CTV450 | Cell Trace Violet 450 |
| DENV | Dengue virus |
| DMEM hg | Dulbecco's Modified Eagle's Medium high glucose |
| DNA | Deoxyribonucleic acid |
| ELFO | Electrophoresis |
| emGFP | Emerald GFP |
| ER | Endoplasmic reticulum |
| ESCRT | Endosomal sorting complex required for transport |
| EVs | Extracelulární vezikuly |
| FBS | Fetal bovine serum |
| GFP | Green fluorescent protein |

| | |
|---|---|
| CHMP4A | charged multivesicular body protein 4A |
| IFITM3 | Interferon-induced transmembrane protein 3 |
| IFN | Interferon |
| IL | Interleukin |
| ILV | Intraluminal vesicles |
| ISEV | International Society for Extracellular Vesicles |
| ISG15 | Interferon-stimulated gene 15 |
| JEV | Japanese encephalitis virus |
| LB | Luria-Bertani |
| LGTV | Langat virus |
| miRNA | Micro ribonucleic acid |
| mRNA | Messenger ribonucleic acid |
| MVB | Multivesicular body |
| ncRNA | Non-coding ribonucleic acid |
| NS | Non-structural proteins |
| NTA | Nanoparticle tracking analysis |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| prM | Premembrane protein M |
| PRR | Pattern recognition receptors |
| PS | Phosphatidylserine |
| PVDF | Polyvinylidenfluorid |
| Rab | Ras-related protein |
| Rho GTPase | Ras-homologous Guanosine Triphosphatase |
| RNA | Ribonucleic acid |

| | |
|---|---|
| ROCK | Rho-associated coiled-coil containing protein kinase |
| RPMI 1640 | Roswell Park Memorial Institute 1640 |
| rRNA | Ribosomal ribonucleic acid |
| S. O. C. | Super Optimal Broth with Catabolite repression |
| SDS-PAGE | Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis |
| SEC | Size exclusion chromatography |
| sfRNA | Subgenomic flaviviral ribonucleic acid |
| SMPD3 | Sphingomyelin phosphodiesterase 3 |
| SNARE | Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor |
| SPSSC | Small particle side scatter |
| ssRNA | Single-stranded ribonucleic acid |
| TBEV | Tick-borne encephalitis virus |
| TBS | Tris-buffered saline |
| TEM | Tetraspanin-enriched microdomains |
| TEMED | N,N,N′,N′-tetramethylethylendiamin |
| TNF | Tumor necrosis factor |
| TSG101 | Tumor susceptibility gene 101 |
| Tsp29Fb | Tetraspanin 29Fb |
| UF | Ultrafiltration |
| USP33 | Ubiquitin-specific peptidase 33 |
| Vps | Vacuolar protein sorting |
| WNV | West Nile virus |
| YFV | Yellow fever virus |
| ZIKV | Zika virus |

# 1 Úvod

## 1.1 Extracelulární vezikuly

Extracelulární vezikuly (EVs) jsou heterogenní částice ohraničené lipidovou dvojvrstvou, které jsou sekretovány téměř všemi typy buněk a organizmů do extracelulárního prostoru (Welsh et al., 2024; Théry et al., 2018). Jsou přítomny v celé řadě biologických materiálů, mezi které patří krev, mateřské mléko, sliny, moč a další tělní tekutiny (Qin a Xu, 2014). Lipidová membrána zabraňuje enzymatické degradaci obsahu EVs a umožňuje transport cirkulujícími tekutinami i do vzdálených míst organizmu (Yáñez-Mo et al., 2015). Jejich složení je závislé na typu a stavu buňky, kterou jsou produkovány (Velandia-Romero et al., 2020).

Pohled na EVs se v posledních několika desetiletích zásadně proměnil, poté co se ukázalo, že se nejedná pouze o odpadní buněčný produkt, ale o částice, které zasahují do mnoha biologických procesů (Théry et al., 2018). EVs představují důležitý nástroj mezibuněčné komunikace, neboť mohou přenášet nukleové kyseliny, lipidy a proteiny mezi buňkami (Graça a Willem, 2013). K uvolnění tohoto obsahu do cílové buňky dochází nejčastěji po internalizaci endocytózou a méně často fúzí s plazmatickou membránou (Joshi et al., 2020). Kromě přenosu molekul mohou povrchové ligandy EVs interagovat s buněčnými receptory a aktivovat tak signální dráhy, aniž by došlo k uvolnění jejich nákladu (Latanova et al., 2024).

Funkce EVs v organizmu je velmi různorodá. Podílejí se na mnoha fyziologických i patologických procesech od hojení tkání až po podporu progrese nádorů pomocí přenosu onkogenních molekul do dalších buněk (Skog et al., 2008; Zhang et al., 2015). Další vlastností EVs je schopnost ovlivňovat imunitní systém, který mohou stimulovat i tlumit (Robbins a Morelli, 2014). Jsou také spjaty s virovými infekcemi, jelikož některé viry využívají podobné strukturní a funkční vlastnosti, které jim umožňují využívat přirozené biogenetické dráhy EVs. Usnadňují diseminaci viru v hostiteli a napomáhají úniku před imunitním systémem (Goul et al., 2003).

Současný výzkum se zaměřuje na využití EVs jako biomarkerů při diagnostice z tělních tekutin či na potenciální terapeutické aplikace (Welsh et al., 2024). Slibný nástroj představuje izolace EVs z krevní plazmy a následná analýza molekulárního složení otevírá

cestu k novému způsobu monitorování stavu pacienta (Hong et al., 2016). Schopnost těchto částic překonávat hematoencefalickou a placentální bariéru by v budoucnu mohla přispět k efektivnímu podávání antivirových či imunomodulačních látek přímo do zasažených tkání (Agudelo et al., 2025).

### 1.1.1 Klasifikace EVs

Na základě velikosti a biogeneze jsou EVs děleny do tří hlavních skupin na exozomy (30-150 nm), mikrovezikuly (100-1000 nm) a apoptotická tělíska (1000-5000 nm) (Crescitelli et al., 2013; Marca et al., 2025). Přestože se EVs standardně rozdělují do těchto kategorií, International Society for Extracellular Vesicles (ISEV) doporučuje dělení podle fyzikálních vlastností, např. na malé EVs (<200 nm) a velké EVs, jelikož je obtížné prokázat jejich biogenetický původ. Přesné hranice mezi jednotlivými subtypy však nejsou striktně stanoveny (Welsh et al., 2024). Vedle zmíněných kategorií bylo popsáno několik dalších typů EVs, jako např. migrazomy či onkozomy (Latanova et al., 2024).

#### 1.1.1.1 Exozomy

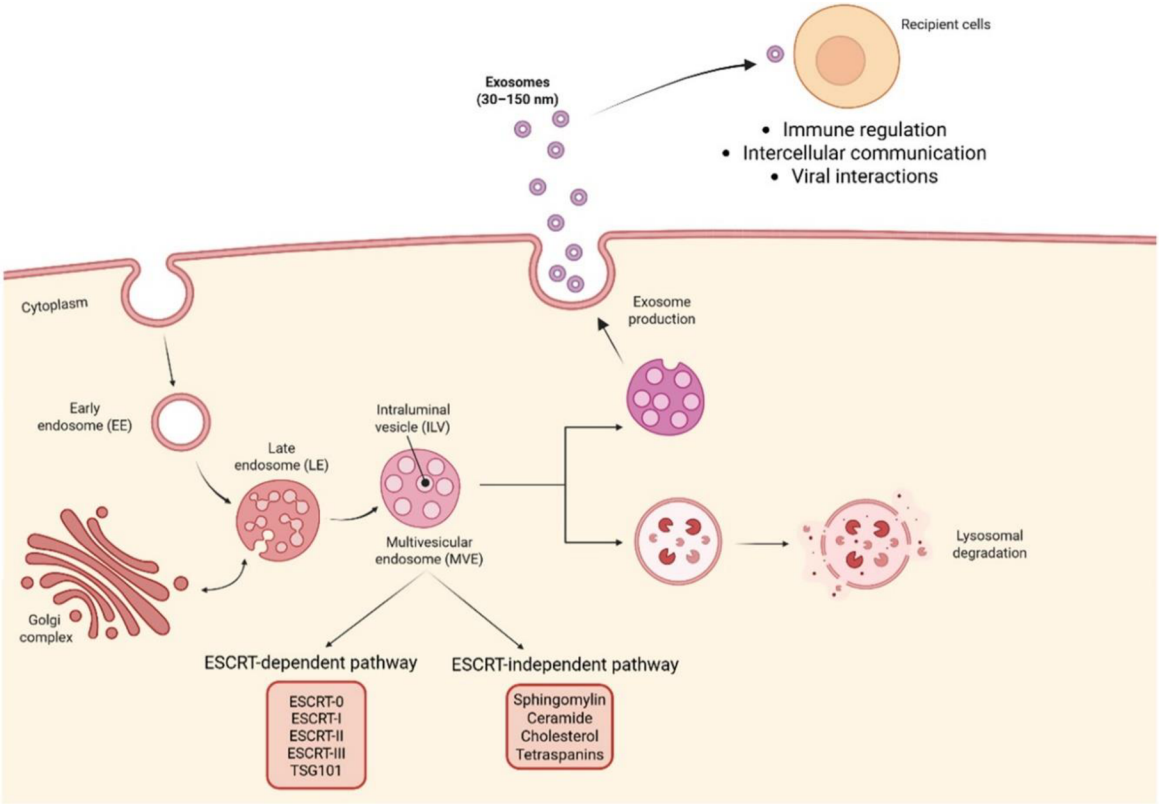
Exozomy vznikají z časných endozomů, ze kterých se postupně transformují v pozdní endozomy a poté v multivezikulární tělíska (MVB), jak je znázorněno na obr. 1. Během tohoto procesu se membrána endozomu vchlipuje směrem dovnitř, čímž vznikají intraluminální vezikuly (ILVs) (Stoorvogel et al., 1991; Arya et al., 2024). Klíčovou roli v tvorbě ILVs zastává systém proteinových komplexů ESCRT (endozomální třídící komplex vyžadovaný pro transport), který funguje kaskádovitě (Babst et al., 2002).

Proces tvorby ILV je zahájen komplexem ESCRT-0, jehož funkcí je rozpoznávat a zachycovat ubikvitinovaný náklad. Rovněž zprostředkovává ukotvení ESCRT-I na endozomální membránu pomocí interakce podjednotky Vps27 (Katzmann et al., 2003; Fader a Colombo, 2009). Po vazbě na membránu interaguje ESCRT-I s ubikvitinovaným nákladem prostřednictvím podjednotky Vps23. Tato interakce je nutná pro třídění proteinů do dráhy MVB a iniciaci invaginace membrány vedoucí k formování ILVs (Katzmann et al., 2001; Katzmann et al., 2003). V následujícím kroku se do procesu zapojuje komplex ESCRT-II, který se váže na povrch endozomu a rekrutuje ESCRT-III při sníženém membránovém napětí. Tento komplex zajišťuje odškrcení membrány a dokončení tvorby ILVs uvnitř endozomu (Mercier et al., 2020). Nakonec Vps4 ATPáza katalyzuje disociaci ESCRT-III a jednotlivé podjednotky tak mohou být recyklovány pro další biogenezi (Babst et al., 2002).

Další dráha biogeneze není závislá na všech ESCRT komplexech, ale pouze na ESCRT-III. Tato dráha využívá k tvorbě ILV komplex proteinů, syntenin a ALIX, které zajišťují třídění nákladu, zejména tetraspaninů, do ILV a rekrutují komplex ESCRT-III, jenž zajišťuje odškrcení ILV (Baietti et al., 2012; Larios et al., 2020).

ILVs mohou rovněž vznikat cestami, které nejsou závislé na ESCRT mechanizmech. Jeden ze způsobů je řízení tvorby ILVs v MVB pomocí proteinu Rab31, který současně zabraňuje jejich degradaci v lyzozomech (Wei et al., 2021). Tvorba ILVs může být regulována také tetraspaniny, převážně CD63 (Niel et al., 2011). Dalším z procesů vedoucích k tvorbě ILVs v MVB je lipidový mechanismus, při kterém sfingolipidy (zejména ceramidy) indukují zakřivení membrány (Trajkovic et al., 2008).

Zralé MVB může v buňce pokračovat dvěma hlavními směry. První možností je fúze s lyzozomem a následná enzymatická degradace jeho obsahu (Futter et al., 1996). Druhou cestou je fúze MVB s plazmatickou membránou buňky. Pohyb MVB k plazmatické membráně je regulován Rab GTPázami, zatímco fúzi membrán zajišťují SNARE proteiny (z angl. soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor). Tímto procesem dochází k sekreci ILVs do extracelulárního prostoru, kde jsou již tyto částice označovány jako exozomy (Pegtel a Gould, 2019; Liu et al., 2023).




*Obrázek 1: Schéma biogeneze exozomů (převzato z Marca et al., 2025)*

Složení membrány exozomů se liší od složení membrány mateřské buňky. Ačkoli je zastoupení cholesterolu a fosfolipidů v obou případech obdobné, exozomální membrána vykazuje vyšší podíl sfingomyelinu a nižší obsah fosfatidylcholinu. Po uvolnění exozomů do extracelulárního prostoru dochází vlivem nárůstu pH ke zvýšení rigidity a odolnosti membrány, díky čemuž jsou tyto částice velmi stabilní (Laulagnier et al., 2004). Důležitou součástí membrány jsou transmembránové proteiny tetraspaniny (zejména CD9, CD63 a CD81). Právě výskyt CD63 v kombinaci s dalšími tetraspaniny slouží jako marker, který naznačuje endozomální původ exozomů (Mathieu et al., 2021). Uvnitř exozomů se vyskytují proteiny teplotního šoku, cytoskeletální proteiny, ESCRT komplexy, ALIX, TSG101, membránové transportní a fúzní proteiny, růstové faktory, cytokiny a nukleové kyseliny (mRNA, miRNA, ncRNA, DNA) (Gurung et al., 2021; Latanova et al., 2024). Prostřednictvím přenosu těchto RNA molekul dokážou exozomy ovlivňovat genovou expresi v cílových buňkách (Marca et al., 2025).

#### 1.1.1.2 Mikrovezikuly

Na rozdíl od exozomů, mikrovezikuly vznikají pučením z plazmatické membrány mateřské buňky do extracelulárního prostoru. Tvorba mikrovezikul začíná přestavbou lipidové dvojvrstvy. Tento proces je řízený vápníkem ($Ca^{2+}$), který reguluje enzymy jako flipázy, flopázy, skramblázy a kalpainy. Vlivem působení těchto enzymů dochází k přestavbě cytoskeletu a následnému zakřivení plazmatické membrány (van Niel et al., 2018). Proces pučení je pak řízen interakcí ARRDC1 (protein 1 obsahující arestinovou doménu) s proteinem TSG101 (z ESCRT-I komplexu). Finální oddělení mikrovezikul od mateřské buňky zajišťuje VPS4 ATPáza, která zprostředkovává odškrcení membrány (Nabhan et al., 2012; Hsu et al., 2012).

V membráně těchto vezikul převažují tetraspaniny CD9 a CD81. Složení membrány reflektuje složení membrány buňky, ze které mikrovezikuly pocházejí (Mathieu et al., 2021).

#### 1.1.1.3 Apoptotická tělíska

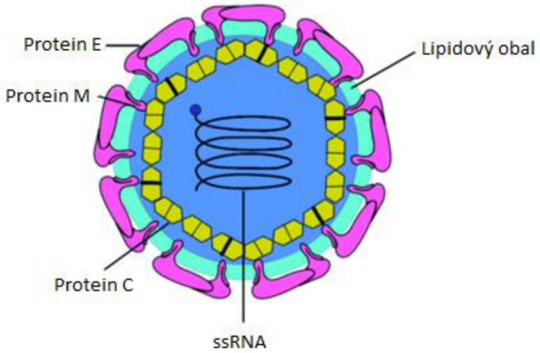
Apoptotická tělíska vznikají při programované buněčné smrti (apoptóze), během níž dochází k pučení cytoplazmatické membrány buňky a fragmentaci DNA. Membránové pučení při tvorbě apoptotických tělísek zajišťuje aktin-myosinový komplex, který je regulován ROCK kinázami. Ty jsou aktivovány buď prostřednictvím Rho GTPáz, nebo štěpením kaspázami (Coleman et al., 2001).

## 1.2 Flaviviry

Flaviviry, patřící do čeledi Flaviviridae, představují skupinu obalených RNA virů. Většina zástupců tohoto rodu je řazena mezi arboviry, jelikož jsou přenášeny zejména hematofágními členovci, a to komáry a klíšťaty (Marklewitz et al., 2019; Cody et al., 2024). Vedle tohoto přenosu se mohou některé flaviviry šířit také vertikálně (z matky na plod), sexuálně (York et al., 2021), nebo alimentární cestou po požití mléka z infikovaného zvířete (v případě TBEV) (Ličková et al., 2021). Flaviviry představují závažné patogeny rozšířené po celém světě. Patogeneze onemocnění, která způsobují, není dosud plně objasněna (Tiberti et al., 2025). Mezi zástupce patří virus klíšťové encefalitidy (TBEV), virus Zika (ZIKV), virus západonilské horečky (WNV), dengue virus (DENV), virus japonské encefalitidy (JEV) či virus žluté zimnice (YFV) (Latanova et al., 2024). Tyto viry mají široké spektrum hostitelů, s výjimkou DENV, pro který je člověk tím primárním (Tiberti et al., 2025). Onemocnění vyvolaná těmito viry mají variabilní průběh, od asymptomatického až po velice závažný. Na počátku infekce dochází k replikaci viru v místě vstupu, odkud se dále šíří do lymfatických uzlin a následně způsobuje virémii. Zatímco u části jedinců se onemocnění projevuje krátkodobým horečnatým stavem, u jiných může dojít až k proniknutí viru do centrálního nervového systému (CNS) a rozvoji závažných neuroinfekcí (Maximova a Pletnev, 2018)

### 1.2.1 Struktura

Genom flavivirů je tvořen lineární jednovláknovou RNA (ssRNA) pozitivní polarity o velikosti přibližně 11 kb. Protein C s genomovou ssRNA formuje nukleokapsidu, která tvoří vnitřní jádro infekční virové částice (virionu). Nukleokapsida je obalena lipidovou dvojvrstvou, jež pochází z endoplazmatického retikula (ER) hostitelské buňky. V tomto lipidovém obalu jsou ukotveny proteiny E a M pomocí C-terminální domény. (Huber et al., 2019; Zhang et al., 2019). Struktura flaviviru je znázorněna na obr. 2.




*Obrázek 2: Struktura flaviviru (upraveno podle Mourosi et al., 2022)*

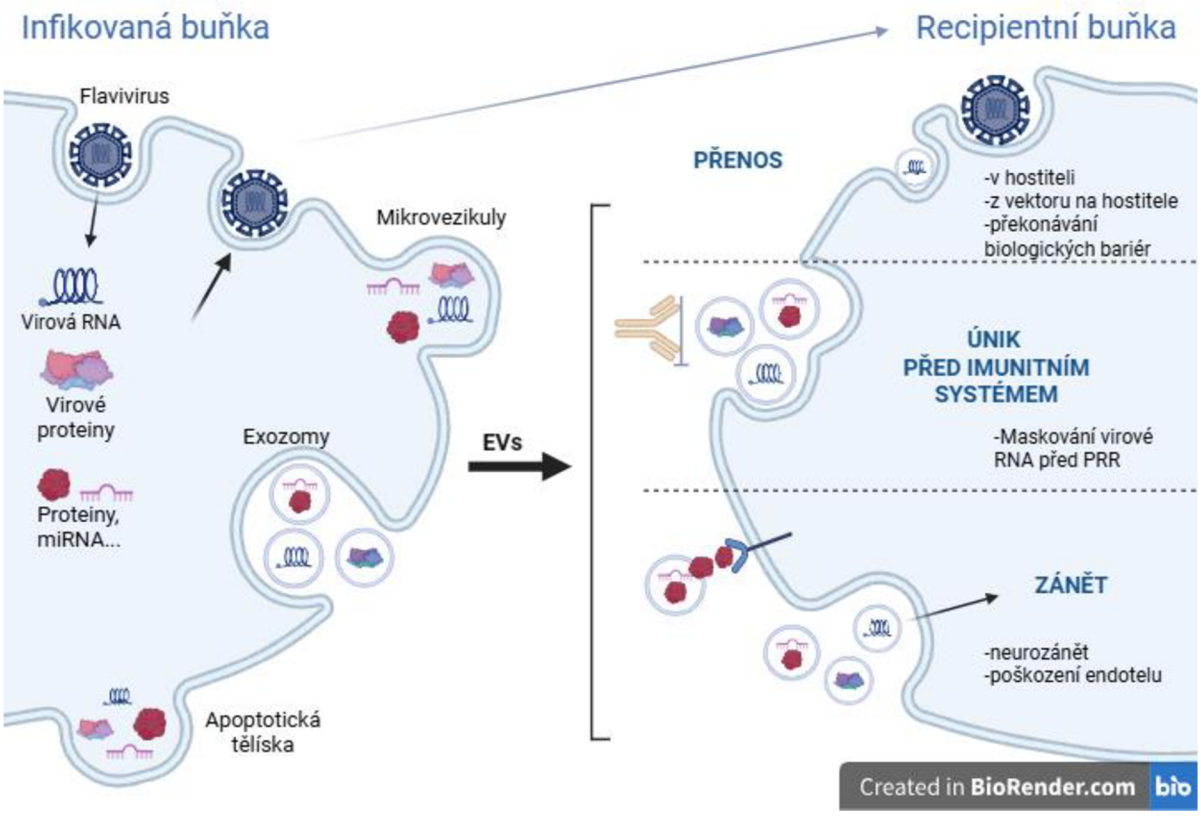
### 1.2.2 Replikační cyklus

Pro vstup viru do buňky je zásadní protein E, který interaguje s povrchovým receptorem a koreceptory hostitelské buňky (Yu et al., 2022). Receptorem pro TBEV je LRP8, apolipoprotein E, který vykazuje vysokou expresi v nervové tkáni (Li et al., 2025). Virus je po navázání na tyto receptory internalizován endocytózou zprostředkovanou klatriny. Kvůli kyselému pH v endozomu dochází k disociaci dimerů E proteinu, k zakotvení fúzní smyčky do endozomální membrány a k sestavení monomerů E proteinu do trimerů (Stiasny et al., 2007; Yu et al., 2022). Vstup viru je dokončen fúzí virového obalu s endozomální membránou a uvolněním virové nukleokapsidy do cytosolu hostitelské buňky. Zde dochází k jejímu rozložení a následnému uvolnění genomové ssRNA (Ramanathan et al., 2020).

Tato ssRNA slouží jako templát pro replikaci genomu a následnou translaci. Translací ssRNA dochází k syntéze jediného polyproteinu, ze kterého vzniká post-translačním štěpením 10 proteinů, z toho tři strukturní (C, E, prM) a sedm nestrukturních (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) (Huber et al., 2019; Zhang et al., 2019). Replikace flavivirové ssRNA probíhá v replikačních organelách, které se tvoří v důsledku zakřivení ER (Dahmane et al., 2026). Poté dochází k sestavování virionů v ER, na čemž se podílí protein NS2A. Po transportu do Golgiho aparátu dochází ke štěpení prekurzoru prM proteázou furinem. Tento proces vytváří zralý protein M a vede k maturaci virových částic (Huber et al., 2019; Dahmane et al., 2026). Zralé viriony jsou nakonec uvolněny exocytózou (Welsh et al., 2009).

## 1.3 Role EVs ve flavivirové infekci

Viry a EVs sdílejí určité biochemické a biofyzikální vlastnosti, které virům umožňují využívat přirozené mechanizmy hostitelské buňky ve svůj prospěch. EVs i obalené viry jsou obklopeny lipidovou membránu, jejíž součástí jsou membránové proteiny. Obě částice dosahují podobné velikosti v řádech desítek až stovek nanometrů. Tyto společné znaky, včetně částečně podobných procesů biogeneze, usnadňují virům vstup do hostitelských buněk, sbalení do EVs a diseminaci v hostiteli (Hoen et al., 2016). EVs se tak významně podílejí na patogenezi virových onemocnění na několika úrovních (York et al., 2021). Schéma na obr. 3 znázorňuje klíčové role EVs během flavivirové infekce, zejména jejich funkci v přenosu virových komponent, imunitním úniku a zánětu.




*Obrázek 3: Role EVs ve flavivirové infekci (vytvořeno v BioRender.com podle Latanova et al., 2024)*

### 1.3.1 Přenos flavivirů na hostitele prostřednictvím EVs vektora

Během sání krve hematofágními členovci jsou slinami do místa kousnutí vylučovány antikoagulační, antivazokonstrikční a protizánětlivé faktory, které zabraňují aktivaci imunitního systému (Zhou et al., 2020). Kromě těchto látek sliny klíšťat a komárů obsahují také EVs, které transportují flavivirovou RNA, proteiny a subgenomickou RNA (sfRNA) do hostitelských buněk. Uzavření těchto molekul do EVs brání rozpoznání imunitním systémem a degradaci hostitelskými nukleázami (Zhou et al., 2018; Yeh et al., 2023).

Mechanizmus využití komářích a klíštěcích EVs flaviviry byl popsán u konkrétních zástupců. Modelový patogen Langat virus (LGTV), blízký příbuzný TBEV, využívá exozomy produkované klíšťaty ke svému přenosu do keratinocytů lidské kůže a endotelových buněk (Zhou et al., 2018). Podobný proces byl pozorován u ZIKV. Během infekce dochází k přenosu EVs nesoucích virovou RNA a E proteiny z komářích slin do lidských buněk, zejména monocytů a endotelových buněk. Tyto EVs se následně mohou podílet na vyvolání zánětlivé

odpovědi a poškození endotelových buněk cév s následným zvýšením cévní permeability (Martínez-Rojas et al., 2020).

Důležitou roli v modulaci hostitelského prostředí hraje sfRNA obsažená v EVs ze slin komárů infikovaných DENV. Tato RNA zvyšuje přenos viru a inhibuje vrozenou imunitu v místě sání krve. Vzniká neúplnou degradací virového genomu exoribonukleázami a jejím přenosem virus moduluje hostitelské prostředí pro své efektivní šíření (Yeh et al., 2023; Liu et al., 2023). Exozomy vylučované do lidské kůže zároveň zabraňují regeneraci a zpomalují migraci imunitních buněk do postiženého místa. Tyto exozomy jsou rovněž obohacené o silně glykosylovaný tetraspanin CD63, který pravděpodobně zvyšuje integritu exozomální membrány a usnadňuje interakci s keratinocyty lidské kůže (Zhou et al., 2020).

### 1.3.2 Šíření a překonávání biologických bariér pomocí hostitelských EVs

EVs přispívají k šíření infekce také v rámci hostitele. Tyto částice, sekretované buňkami infikovanými flaviviry, mohou přenášet viriony a virové složky do neinfikovaných buněk, čímž se podílejí na patogenezi onemocnění (Martínez-Rojas et al., 2020; Latanova et al., 2024). I když EVs mohou přenášet více než jeden virion současně, předpokládá se, že je spíše preferován přenos genomové RNA než celých virionů (Sultana et al., 2020). K doručení nákladu využívají EVs různé způsoby vstupu do buněk. V případě flavivirů JEV a DENV se ukázalo, že dominantním způsobem vstupu EVs je makropinocytóza, tedy druh endocytózy, při kterém buňka pohltí okolní tekutinu i s EVs do velkých váčků, tzv. makropinozomů (Salloum et al., 2023; Ishikawa et al., 2024). Vstup exozomů nesoucích LGTV do hostitelské buňky je zprostředkován endocytózou závislou na klatrinech, kterou flaviviry běžně využívají k proniknutí do hostitelské buňky (Zhou et al., 2018; Yu et al., 2022).

Schopnost EVs vstupovat do buněk usnadňuje překonávání biologických bariér. EVs napomáhají pronikání virů také hematoencefalickou bariérou (BBB) a účastní se tak neuroinvaze. Infikované endotelové buňky, vystýlající BBB, produkují infekční EVs nesoucí virový náklad. Vysoká sekrece těchto EVs usnadňuje šíření viru do dalších buněk a tkání CNS (Zhou et al., 2018). Není vyloučeno, že díky schopnosti EVs prostupovat biologickými bariérami je ZIKV schopen proniknout z těla matky až do mozku plodu (York et al., 2021). Infekce neuronů může být regulována neutrální sfingomyelinázou (SMPD3), jak bylo zjištěno u ZIKV. Buňky infikované tímto virem vykazují vyšší produkci exozomů nesoucích virovou RNA a proteiny, v důsledku zvýšené exprese *SMPD3* (Zhou et al., 2019). Po rozsáhlé infekci

neuronů je tento proces doprovázen zvýšením prostupnosti BBB, která umožní flavivirům a imunitním buňkám z periferie lépe prostupovat do nervové tkáně (Zhou et al., 2018).

### 1.3.3 Imunomodulace a rozvoj neurozánětu

Průběh flavivirové infekce je také spojen s aktivací zánětlivé reakce, jež je spuštěna v infikovaných buňkách. Na to reagují také imunitní buňky jako makrofágy, žírné buňky, T lymfocyty či neutrofily, které jsou schopny uvolňovat EVs při imunitní odpovědi (Latanova et al., 2024). EVs uvolňované infikovanými buňkami mohou nejen stimulovat, ale i potlačovat funkci některých imunitních buněk, např. $CD4^+$ T-buněk a mohou tak přispívat k progresi onemocnění (Kumari et al., 2023). Makrofágy infikované virem DENV produkují EVs, jejichž obsah je obohacený o protein NS3 a miRNA. Tyto molekuly způsobují zvýšenou sekreci zánětlivých cytokinů (TNF-α, IL-10) a změny ve fyziologii endotelu. EVs jsou tedy důležité pro vyvolání včasné imunitní odpovědi a hrají roli v raných stádiích infekce v místech, kam samotný virus doposud nepronikl (Velandia-Romero et al., 2020).

Příkladem rozvoje neurozánětu za účasti EVs je infekce virem DENV. Při tomto onemocnění produkují monocyty EVs s pozměněným molekulárním obsahem a dochází k transportu miRNA-148a do mikroglií. Zde tato molekula ovlivňuje expresi ubikvitin-specifické peptidázy 33 (USP33), která má vliv na stabilitu proteinu ATF3. Tento protein funguje jako supresor prozánětlivých drah a potlačení jeho funkce přispívá k rozvoji neurozánětu v CNS organizmu (Mishra et al., 2020). Dalším příkladem je protein NS1, jehož exprese v buňce zvyšuje sekreci EVs, které stimulují produkci interleukinu-1β (IL-1β). Tyto mechanizmy indukují neurozánět doprovázející infekci TBEV (Starodubova et al., 2025).

### 1.3.4 Mechanizmy úniku před imunitním systémem

Konkrétní mechanizmy obcházení imunitního systému byly zkoumány např. u DENV. Tento virus využívá EVs nejen k transportování virového nákladu, ale také k přenosu imunosupresivních molekul a některých cytokinů (IL-6, IL-7) do dalších buněk. To usnadňuje perzistenci viru v organizmu. EVs navíc transportují molekuly miRNA, které ovlivňují signální dráhy v hostitelské buňce. Tyto procesy napomáhají úniku viru před imunitním systémem (Agudelo et al., 2025). Výzkum zaměřený na WNV odhalil jeho schopnost měnit RNA složení produkovaných exozomů. Tyto změny, řízené interferonem alfa (IFN-α), ovlivňují antivirové procesy v dalších buňkách (Slonchak et al., 2019).

Flaviviry využívají i další buněčné procesy, jako je například autofagie. Šíření DENV zabraňují neutralizační protilátky produkované hostitelem. Tento virus dokáže využívat

autofagii buňky, díky které těmto protilátkám uniká. Ačkoli je proces autofagie primárně určen k degradaci poškozených organel, viry ho využívají ke sbalování vlastních částic do autofagozomu ohraničeného dvěma membránami. Virus uvnitř autofagozomu brání fúzi s lyzozomem, čímž předchází degradaci. Namísto toho je autofagozom směrován k plazmatické membráně buňky, kde dochází k exocytóze do extracelulárního prostoru. Zde jsou virové částice chráněny membránou před neutralizačními protilátkami (Wu et al., 2016).

Roli při efektivním šíření viru v hostiteli zastává také protein NS1, který se při flavivirové infekci vyskytuje v rozpustné formě v tělních tekutinách. Je považován za toxin se schopností narušovat mezibuněčné spoje endotelových buněk tvořících BBB. Při infekci viry DENV a ZIKV se ukázalo, že protein NS1 vykazuje afinitu k lipidovým membránám, díky které se tento protein snadno váže k povrchu exozomů. Toto spojení přispívá k vyšší stabilitě NS1 v tělních tekutinách a usnadňuje transport k cílovým buňkám (Safadi et al., 2023).

### 1.3.5 Využití drah biogeneze EVs flaviviry

Ačkoli ESCRT komplexy slouží primárně k tvorbě ILVs v biogenezi exozomů, některé viry jsou schopny zneužívat proteiny z těchto komplexů ve vlastní prospěch, a to např. k usnadnění procesu pučení nebo uzavření virionů do ILVs. Sbalením do EVs získávají viry dodatečný lipidový obal, kterým jsou po uvolnění do extracelulárního prostředí chráněny před degradací (Tran et al., 2022; Calderón-Peláez et al., 2025).

Klíčovou roli v tomto procesu hraje protein TSG101. Studie zabývající se DENV a JEV prokázala, že inhibice tohoto proteinu v buňce vede ke snížené sekreci viru. TSG101 je tedy důležitý pro uvolňování virů z hostitelské buňky (Tabata et al., 2016). Flaviviry přenášené klíšťaty využívají proteiny ALIX a CHMP4A, které jsou rekrutovány L-doménou proteinu NS3. Protein ALIX napomáhá replikaci viru a CHMP4A jeho sestavování (Tran et al., 2022). ALIX je zároveň využíván DENV na počátku replikace, kde napomáhá úniku viru z endozomu do cytoplazmy (Pattanakitsakul et al., 2010). Reakcí buňky na zneužívání těchto proteinů je zahájení exprese genu 15 stimulovaného interferonem (*ISG15*), který viru brání využívat ESCRT (Tran et al., 2022).

Vedle ESCRT komplexů mohou flaviviry využívat také tetraspaniny, které se podílejí na biogenezi EVs, transportu molekul do organel a interakci s cílovými buňkami (York et al., 2021). Tetraspaniny jsou proteiny charakteristické čtyřmi transmembránovými doménami, dvěma extracelulárními smyčkami a třemi intracelulárními úseky (Boucheix et al., 2001).

Souvislost mezi těmito proteiny a flaviviry byla zkoumána u ZIKV. Tetraspaniny na membráně organizují proteiny a lipidy do shluků, známých jako tetraspaninem obohacené mikrodomény (TEM). Jejich hlavní funkcí je shromažďování nákladu do EVs, ale mohou být zneužívány viry ke vstupu do buňky a ke sbalování virových částic do EVs. Předpokládá se, že nerovnováha mezi tetraspaniny CD9, CD63 a CD81 může vést ke změnám složení TEM. Tato změna může usnadňovat nebo naopak bránit vstupu viru do buňky. Zvýšená exprese tetraspaninů navíc způsobuje zvýšenou inkorporaci molekul do EVs a virus tak nemá dostatek materiálu pro svou replikaci (York et al., 2021). Vliv tetraspaninů na šíření virů byl popsán také u infekce virem DENV, u kterého zablokování komářího tetraspaninu Tsp29Fb vedlo ke sníženému přenosu viru do lidských buněk (Vora et al., 2018).

### 1.3.6 Antivirová funkce EVs

EVs nepředstavují pouze nástroj využívaný viry k jejich šíření, ale mohou plnit také funkci znesnadňující jejich diseminaci v hostiteli. Bylo zjištěno, že exozomy ve slinách infikovaného organizmu kompetitivně omezují navázání některých flavivirů na receptory hostitelské buňky (Conzelmann et al., 2020). ZIKV a DENV pro vstup do buňky mohou využívat strategii tzv. apoptotické mimikry, která je založena na přítomnosti fosfatidylserinu (PS) na povrchu virionů. Tento fosfolipid získávají z membrány ER hostitele (Amara a Mercer, 2015). PS se v buňkách běžně vyskytuje na vnitřní straně membrány a na vnější stranu je transportován během apoptózy, jako signál k pohlcení (Groß et al., 2024). Tímto způsobem virus využívá přirozený mechanizmus buňky, pomocí kterého je PS rozpoznán fosfatidylserinovými receptory buňky a virus je tak internalizován endocytózou (Amara a Mercer, 2015). Jelikož jsou EVs v některých tělních tekutinách organizmu (sliny, sperma) bohaté na PS, mohou se vázat na PS receptory a snižovat tak šanci navázání viru. Tento proces může vysvětlovat, proč jsou DENV a ZIKV přenášeny primárně krví a jen výjimečně jinými tělními tekutinami, ve kterých jsou rovněž viry hojně přítomny (Groß et al., 2024). Buňky infikované ZIKV sekretují EVs obsahující E protein na svém povrchu. Tyto EVs mohou vychytávat protilátky cílené na virový protein E a snižovat tak protilátkami podporované zesílení (ADE) (Zhao et al., 2023). Při tomto jevu subneutralizující protilátky váží virus a zprostředkovávají jeho vstup do buněk, a to i pomocí zkříženě reagujících protilátek (Narayan, Tripathi, 2020).

Při infekci ZIKV a DENV transportují exozomy interferonem indukovaný transmembránový protein 3 (IFITM3) z infikovaných buněk do neinfikovaných. Protein IFITM3 blokuje vstup viru do buněk a podílí se tak na snížení virémie. Exozomy s tímto

proteinem mohou prostupovat placentální bariérou a chránit plod před infekcí během těhotenství. Tento mechanismus výrazně omezuje riziko přenosu infekce z matky na plod (Zhu et al., 2014; Zou et al., 2020).

Vedle již zmíněného přímého transportu molekul s antivirovým účinkem se ukázalo, že EVs mohou přenášet signální molekuly stimulované interferonem (IFN) a tím omezovat diseminaci viru v hostiteli. Takto stimulované infikované buňky produkují EVs nesoucí mRNA specifických IFN-stimulovaných genů. Tyto EVs jsou schopny v sousedních buňkách aktivovat antivirový stav ještě předtím, než DENV do samotné buňky dorazí. Infikovaná buňka tedy může zároveň sekretovat EVs s antivirovým i provirovým účinkem a poměr mezi těmito vezikulami může ovlivňovat závažnost průběhu infekce u pacienta (Martins et al., 2018).

# 2 Cíle práce

- Vypracovat rešerši na téma role EVs ve flavivirové infekci

- Optimalizovat metodu pro expresi tetraspaninu CD9 fúzovaného se zeleným fluorescenčním proteinem (GFP) v myších makrofágových liniích

- Detekovat GFP-značené extracelulární vezikuly pomocí průtokové cytometrie

# 3 Materiály a metody

## 3.1 Materiály

### 3.1.1 Buněčné linie

Při transfekci byly použity dvě adherentní buněčné linie, IC-21 a HEK293T, a jedna suspenzní linie, PMJ2-R. Pasážování probíhalo pravidelně třikrát týdně. Buňky PMJ2-R byly kultivovány v médiu RPMI 1640 (Biosera), s přídavkem 10 % FBS (Biosera), 1 % antibiotik (ATB), 50 μM β-mercaptoethanolu a 2 mM L-glutaminu, zatímco buňky IC-21 a HEK293T byly kultivovány v médiu DMEM high glucose (DMEM hg) (Biosera), doplněném o 10 % FBS (Biosera), 1 % ATB a 2 mM L-glutamin. Při pasážování byly buňky IC-21 z povrchu uvolňovány mechanicky pomocí škrabky, zatímco HEK293T byly trypsinizovány po oplachu s PBS a účinek trypsinu byl inhibován přídavkem kompletního média. Adherentní buněčné linie byly kultivovány v inkubátoru při teplotě 37 °C, v 5 % atmosféře $CO_2$ a linie PMJ2-R byla kultivována při 37 °C bez $CO_2$.

### 3.1.2 Chemicky kompetentní buňky

Pro účely transformace byly použity chemicky kompetentní buňky Top10 *E. coli* (Invitrogen), uchovávané při teplotě -80 °C.

### 3.1.3 Plazmidy

Pro fluorescenční značení byl zvolen plazmid pcDNA6.2 nesoucí kódující sekvenci pro tetraspanin CD9 fúzovaný s emGFP, který byl poskytnut prof. Nicole Meisner-Kober (Paris Lodron University, Salzburg). Tento plazmid byl již dříve úspěšně použit k produkci CD9-emGFP pozitivních EVs v buňkách HEK293T (Schürz et al., 2022). Jako kontrola sloužil prázdný vektor pcDNA6.2. Plazmidová DNA byla uchovávána při teplotě -20 °C.

## 3.2 Metody

### 3.2.1 Příprava agarových ploten

Agarové plotny byly vytvořeny z LB agaru (Carl ROTH) o koncentraci 35 g/l, rozpuštěného v $H_2O$. Tento roztok byl po sterilizaci autoklávováním ochlazen na teplotu cca 50 °C a byl doplněn o antibiotikum ampicilin (AMP) tak, aby jeho výsledná koncentrace byla 50 μg/ml. Takto připravený agar byl rozlit do Petriho misek a po ztuhnutí byly plotny uchovávány v chladové místnosti.

### 3.2.2 Transformace kompetentních buněk

Plazmidová DNA byla amplifikována v chemicky kompetentních buňkách *E. coli* Top10. Transformace byla provedena za použití 25 µl kompetentních buněk a 50 ng plazmidu pcDNA6.2/CD9-emGFP nebo pcDNA6.2. Nejprve byly buňky s plazmidem umístěny na 30 minut na led. Následně byla směs inkubována při teplotě 42 °C po dobu 45 sekund a poté 2 minuty na ledu. Po přidání 80 µl S.O.C. média (Invitrogen) proběhla hodinová inkubace při 37 °C. Buňky byly naneseny na připravené LB agarové plotny a kultivovány přes noc při 37 °C. Následující den byly narostlé kolonie naočkovány do LB média s AMP o koncentraci 50 µg/ml a kultivovány do druhého dne na třepačce při teplotě 37 °C, při 150 rpm, po dobu cca 16 hodin.

### 3.2.3 Izolace plazmidu

Plazmid byl z buněk *E. coli* Top10 vyizolován pomocí izolačního kitu NucleoBond Xtra Midi (Macherey-Nagel) podle instrukcí výrobce. Pelet s DNA byl resuspendován ve 100 µl nuclease-free $H_2O$. Koncentrace a čistota ($A_{260}/A_{280}$ a $A_{260}/A_{230}$) vyizolované DNA byla stanovena spektrofotometricky na přístroji Nanophotometer P330 (Implen).

### 3.2.4 Elektroporace

Elektroporace byla testována na makrofágových buněčných liniích PMJ2-R a IC-21, které byly pasážovány den před elektroporací. Další den byly buňky uvolněny do kultivačního média a centrifugovány při 250 × g, po dobu 10 minut, při teplotě 10 °C. Buněčný pelet byl promyt resuspendováním v základním médiu RPMI-1640 (u linie PMJ2-R), respektive ve DMEM hg (u linie IC-21). Pro určení počtu buněk bylo odebráno 50 µl suspenze, která byla obarvena trypanovou modří v poměru 1:1 a buňky byly spočítány v Bürkerově komůrce.

Po další centrifugaci za stejných podmínek byl pelet resuspendován v příslušném základním médiu na koncentraci $2 \times 10^6$ buněk/ml. Z této suspenze bylo odebráno 250 µl vzorku ($5 \times 10^5$ buněk), do kterého byla přidána plazmidová DNA. Směs byla vystavena elektrickým pulzům v BTX kyvetě se štěrbinou o velikosti 4 mm. Elektroporace byla provedena na přístroji ECM® 630 Exponential Decay Wave Electroporation System (BTX Harvard Apparatus) s nastavením parametrů podle Jordan et al., 2008. V tabulce I jsou uvedena konkrétní nastavení elektroporátoru a koncentrace plazmidové DNA, které byly otestovány při elektroporaci.

**Tab. I**: Testované parametry při elektroporaci PMJ2-R a IC-21 plazmidem pcDNA6.2/CD9-emGFP

| Buněčná linie | Napětí [V] | Odpor [Ω] | Kapacita [µF] | Koncentrace plazmidu [µg DNA/1×$10^6$ buněk] |
|---|---|---|---|---|
| PMJ2-R | 250/350/400/450 | 1000 | 350/500 | 1/2,5/5 |
| IC-21 | 200/250/350/400 | 1000 | 350 | 1/2,5/5 |

Jako negativní kontrola byly použity buňky elektroporováné s plazmidem pcDNA6.2. Nastavení elektroporátoru pro obě buněčné linie jsou shrnuta v Tab II.

**Tab. II**: Parametry elektroporace buněčných linií s plazmidem pcDNA6.2.

| Buněčná linie | Napětí [V] | Odpor [Ω] | Kapacita [µF] | Koncentrace plazmidu [µg DNA/1×$10^6$ buněk] |
|---|---|---|---|---|
| PMJ2-R | 350 | 1000 | 350 | 5 |
| IC-21 | 250 | 1000 | 350 | 5 |

Po elektroporaci byly buňky nasazeny do 24jamkového panelu, přičemž jedna jamka obsahovala 8,4 × $10^4$ buněk v 800 µl příslušného kompletního média, jehož složení je uvedeno v kapitole 3.1.1. Po nasazení byly buňky inkubovány při 37 °C v 5 % atmosféře $CO_2$ po dobu 24 a 48 hodin.

Elektroporace buněk PMJ2-R byla provedena třikrát, přičemž ve dvou případech byly vzorky měřeny v technickém triplikátu. U buněk IC-21 byla elektroporace rovněž provedena třikrát a všechny vzorky byly měřeny v technickém triplikátu.

### 3.2.5 Transfekce pomocí GenJet™

Buněčné linie IC-21 a HEK293T byly nasazeny 24 hodin před transfekcí do 24jamkového panelu v hustotě 2 × $10^5$ buněk/jamku (v kompletním médiu dle kapitoly 3.1.1) tak, aby v den experimentu dosáhly 70 % konfluence. Transfekce byla provedena pomocí transfekčního reagentu GenJet™ (SignaGen Laboratories), který byl použit v poměru 1 µg DNA:3 µl GenJet™ podle instrukcí výrobce, přičemž na jednu jamku bylo použito 0,5 µg plazmidu. Médium obsahující komplexy DNA/GenJet™ bylo po 7 hodinách odstraněno a nahrazeno kompletním DMEM hg médiem nebo kompletním médiem DMEM hg bez FBS, aby bylo možné porovnat vliv přítomnosti a absence séra na účinnost transfekce a na viabilitu buněk. V případě, že byla plánována detekce EVs, bylo médium vyměněno za bezbarvé DMEM médium bez fenolové červeně (Gibco™), doplněné o 1 % ATB a glutamin.

Suspenzní buněčná linie PMJ2-R byla nasazena v den samotné transfekce do 24jamkového panelu o hustotě $2 \times 10^5$ buněk/jamku v kompletním médiu RPMI s 5 % FBS, nebo v kompletním médiu RPMI bez FBS. GenJet™ a DNA byly naředěny v základním DMEM hg médiu podle instrukcí výrobce. Transfekce byla provedena v poměru 1 µg DNA:3 µl GenJet™.

Po nasazení a transfekci byly buňky inkubovány při 37 °C v 5 % atmosféře $CO_2$ po dobu 24 a 48 hodin. Kontrolní vzorky byly transfekovány plazmidem pcDNA6.2 stejným postupem. Transfekce HEK293T a PMJ2-R byla provedena třikrát, zatímco transfekce IC-21 dvakrát.

### 3.2.6 Analýza transfekční účinnosti a viability buněk

Před měřením byly buňky 24 a 48 hodin po transfekci odebrány z jamek, umístěny na led a centrifugovány při 300 × g, 4 °C, po dobu 5 minut. Po centrifugaci byl supernatant odebrán a pelet byl resuspendován ve 200 µl PBS. Pro stanovení viability buněk bylo k suspenzi přidáno 5 µl propidium iodidu (PI) (Thermo Fisher Scientific), který barví mrtvé buňky. Na průtokovém cytometru NovoCyte3000 (Agilent Technologies) byla měřena fluorescence z GFP a viabilita buněk. Analýza dat byla prováděna s využitím softwaru NovoExpress. Po označení singletů byly buňky (podle GFP a PI pozitivity) rozděleny na kvadranty. Viabilita byla měřena ze všech singletů, zatímco procento GFP-pozitivních buněk bylo stanoveno ze živých buněk. Signál z GFP byl měřen v kanále FITC a signál z PI v kanále PE-Texas Red.

Na základě naměřených hodnot byly sestaveny grafy v programu Excel 2016, které sloužily k optimalizaci transfekčních podmínek s cílem dosáhnout maximální exprese CD9-emGFP při zachování dostatečné viability.

### 3.2.7 Příprava média z PMJ2-R k detekci GFP-pozitivních EVs

Médium odebrané transfekovaným buňkám PMJ2-R po 48 hodinách od elektroporace bylo nejprve centrifugováno při 300 × g, 4 °C, po dobu 5 minut. Poté bylo 500 µl odebraného supernatantu naneseno na 0,2 µm filtr a centrifugováno při 14 000 × g, 4 °C, po dobu 20 minut. Přefiltrované médium bylo měřeno na průtokovém cytometru BD FACSymphony™ A1 Cell Analyzer (BD Biosciences).

### 3.2.8 Ultrafiltrace EVs

K produkci EVs byla použita buněčná linie HEK293T, transfekována dle postupu v kapitole 3.2.5. Po 48 hodinách od transfekce bylo buňkám odebráno médium, které bylo

následně centrifugováno dvakrát při 300 × g, 5 minut, při 4 °C a nakonec při 3000 × g, 5 minut, při 4 °C. Po každém kroku byl k následné centrifugaci odebrán supernatant. Dále byla provedena vakuová filtrace za využití jednotky Steriflip® Vacuum Tube Top Filter (0,22 µm membrána Millipore Express; Merck KGaA). Před ultrafiltrací bylo médium s EVs uchováváno při 4 °C.

Ultrafiltrace (UF) byla provedena pomocí Amicon® Ultra Centrifugal Filter, 30 kDa MWCO (Millipore). Ultrafiltrační jednotka byla nejprve promyta 2 ml PBS a centrifugována při 3800 × g, po dobu 10 minut a zbytky PBS byly odstraněny. Na filtr bylo naneseno 15 ml přefiltrovaného média odebraného HEK293T a byla provedena centrifugace při 3500 × g, po dobu 40 minut. Tímto procesem byl vzorek zakoncentrován na objem cca 500 µl.

### 3.2.9 Značení EVs s CTV450

Ke 2 µl fluorescenčního barviva CTV450 (CellTrace™ Violet Proliferation kit; Invitrogen) bylo přidáno 500 µl PBS. Takto naředěná CTV450 byla přidána k 500 µl EVs (v médiu nebo po UF) v poměru 1 : 1 a poté proběhla inkubace ve tmě při 37 °C, po dobu 30 minut.

### 3.2.10 Izolace EVs

K izolaci EVs byla použita kolona qEVoriginal Column 35 nm (Izon Science), jejíž princip je založen na velikostně vylučovací chromatografii (SEC). Kolona byla nejprve promyta 17 ml PBS, přefiltrovaného přes 0,2 µm filtr. Na promytou kolonu bylo naneseno 0,5 ml vzorku po ultrafiltraci, značeného s CTV450. Ihned po nanesení byly sbírány frakce po 0,4 ml. Po absorpci vzorku kolonou byly naneseny dvakrát 2 ml PBS. Po odběru 12 frakcí byla kolona promyta chemikáliemi v pořadí uvedeném v tabulce III. Všechny použité roztoky byly předem přefiltrovány přes 0,2 µm filtr.

**Tab. III**: Přehled promývacích roztoků a jejich objemů.

| Roztok | Objem |
|---|---|
| 0,5 M NaOH (Carl ROTH) | 8,5 ml |
| PBS | 17 ml |
| $H_2O$ | 17 ml |
| 20 % Ethanol (naředěn v $H_2O$) | 17 ml |

### 3.2.11 Fluorescenční spektrofotometrie

Fluorescence byla analyzována v jednotlivých frakcích odebraných po SEC. Z každého vzorku bylo naneseno 100 µl do 96jamkové černé destičky (SARSTEDT AG & Co. KG) a intenzita fluorescence byla měřena pomocí přístroje Synergy H1 Plate Reader (BioTek). Detekce probíhala při nastavení excitačního a emisního spektra 485 nm/515 nm (GFP) a 405 nm/450 nm (CTV450).

### 3.2.12 Průtoková cytometrie – detekce EVs

Pro detekci fluorescenčně značených EVs byl použit průtokový cytometer BD FACSymphony™ A1 Cell Analyzer (BD Biosciences), který je vybaven detektorem pro malé částice (SPSSC).

Před měřením byl přístroj kalibrován pomocí BD CellView™ Calibration Beads (BD Biosciences) dle instrukcí výrobce. Vezikuly byly měřeny pomocí detektoru SPSSC (small particle side scatter) v kombinaci s fluorescencí. Fluorescence GFP byla detekována v pásmovém filtru 530/30 a fluorescence CTV450 byla detekována v pásmovém filtru V450/30. Před měřením vezikul byly nastaveny následující parametry: logaritmická škála pro používané detektory, prahová hodnota tzv. ‚threshold‘ byla nastavena na hodnotu 200 na detektoru SPSSC i v pasmovém filtru B530/30, a ‚window extension‘ na hodnotu 4. Naměřené signály byly zobrazovány v dvouparametrových bodových grafech tzv. dot plotech a byla měřena maximální intenzita signálu (SPSSC-H, BB515-H a V450-H). Bodové grafy byly pro lepší ilustraci nahrazeny konturovými dot ploty. Samotné měření vzorků probíhalo při nejnižší možné rychlosti. Data byla analyzována softwarem BD FACSDiva™ Software.

Fluorescence byla měřena u vzorků obsahujících fluorescenční EVs před a po ultrafiltraci, před a po značení CTV450 a v jednotlivých frakcích po izolaci pomocí SEC připravených v kapitole 3.2.8, 3.2.9 a 3.2.10, jejichž označení je shrnuto v tabulce IV.

**Tab. IV:** Označení vzorků pro měření fluorescence.

| Vzorek | Označení |
|---|---|
| Médium z HEK293T před UF s PBS (1 : 1) | před UF |
| Médium z HEK293T před UF s CTV450 (1 : 1) | před UF + CTV450 |
| Médium z HEK293T po UF s PBS (1 : 1) | po UF |
| Médium z HEK293T po UF s CTV450 (1 : 1) | po UF + CTV450 |
| Frakce 1-12 ze SEC | D1-D12 |

Před měřením byly vzorky naředěny pomocí PBS (přefiltrovaného přes 0,2 μm filtr). Frakce D1, D7-D12 byly 5× ředěny a měřeny po dobu 10 s, vzorky odebrané před UF byly 10× ředěny a měřeny po dobu 10 s, zatímco vzorky odebrané po UF byly ředěny 50× a měřeny 2 s.

### 3.2.13 SDS-PAGE

Nejprve byly připraveny polyakrylamidové gely pro separaci proteinů pomocí SDS-PAGE. Do připravené aparatury byla nalita 12,5 % separační část gelu, která byla převrstvena 1 ml isopropanolu. Po cca 30 minutách byl isopropanol odstraněn a povrch zpolymerizovaného gelu byl opláchnut destilovanou vodou. Poté byla nanesena směs pro zaostřovací gel, do které byl vložen hřebínek a po cca 20 minutách byl gel připraven k použití. Chemikálie potřebné pro přípravu dvou gelů jsou uvedeny v tabulce V.

**Tab. V**: Složení 12,5 % separačního (running) gelu a zaostřovacího (stacking) gelu.

| **12,5 % running gel** | | |
|---|---|---|
| **Chemikálie** | **Množství** | **Výrobce** |
| 40 % acrylamid | 4,7 ml | Thermo Fisher Scientific |
| 4×Tris-Cl/SDS pH 8,8 (1,59 M Tris base, 0,29 M Tris-HCl, 0,017 M SDS, pH 8,8) | 3,75 ml | - |
| $H_2O$ | 6,55 ml | - |
| 2,2,2-trichlorethanol | 75 μl | Sigma Aldrich |
| 10 % APS | 60 μl | Sigma Aldrich |
| TEMED | 12 μl | Carl ROTH |
| **Stacking gel** | | |
| **Chemikálie** | **Množství** | **Výrobce** |
| 40 % bisacrylamid | 0,49 ml | Thermo Fisher Scientific |
| 4×Tris-Cl/SDS pH 6,8 (1,25 M Tris-HCl, 0,017 M SDS, pH 6,8) | 1,25 ml | - |
| $H_2O$ | 3,2 ml | - |
| 2,2,2-trichlorethanol | 25 μl | Sigma Aldrich |
| 10 % APS | 30 μl | Sigma Aldrich |
| TEMED | 6 μl | Carl ROTH |

Při přípravě vzorků byl 4× Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad Laboratories) smíchán s 2-merkaptoethanolem (SERVA Electrophoresis GmbH) v poměru 9 : 1. Následně byly vzorky A, B, D7-D12 (uvedeny v tabulce IV) smíchány s Laemmli Sample Bufferem s ME v poměru 3 : 1 a 40 μl vzorku bylo naneseno do jamek. Do jedné jamky byly napipetovány 4 μl markeru (Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder; Thermo Fisher Scientific).

Elektroforéza probíhala v ELFO aparatuře naplněné 1× ELFO pufrem (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS). Aparatura byla zapojena do zdroje a nastavena na 150 V, 50 mA na dobu 75 minut. Po uplynutí tohoto času byl gel vložen do Milli-Q $H_2O$. Následně byl gel vizualizován pod UV světlem na přístroji ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad Laboratories).

### 3.2.14 Western blot

Za účelem detekce proteinu CD9 byla provedena metoda Western blot. Proteiny byly z polyakrylamidového gelu (kapitola 3.2.9) přeneseny na membránu pomocí systému Trans-Blot® Turbo™ Mini PVDF Transfer Pack (Bio-Rad Laboratories), který obsahuje PVDF membránu i filtrační papíry navlhčené transferovým pufrem. Po sestavení sendviče a odstranění vzduchových bublin byl proveden přenos proteinů na membránu pomocí přístroje Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad Laboratories), který byl nastaven na 7 minut.

Přeblotovaná membrána byla promyta roztokem 1× koncentrovaného TBS s Tweenem-20 (20 mM Tris, 137 mM NaCl, s pH 7,6 upraveným pomocí HCl, 0,1 % Tween-20). Poté bylo provedeno blokování nespecifických vazeb ponořením membrány do 5 % odtučněného mléka v 1×TBS s 0,1 % Tweenem-20 a inkubací na třepačce po dobu 1 hodiny. Následně byla membrána inkubována v mléce s 1000× naředěnou primární monoklonální protilátkou proti CD9 (SA35-08, Thermo Fisher Scientific). Inkubace probíhala přes noc, při 4 °C.

Další den byla membrána promyta v 1× TBS s 0,1 % Tweenem-20 (dvakrát krátce, poté po dobu 15 minut a dvakrát 5 minut) při pokojové teplotě na třepačce. Po promytí byla membrána inkubována se sekundární anti-králičí protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidázou, po dobu 40 minut, při pokojové teplotě. Sekundární protilátka byla naředěna 2000× v 5 % odtučněném mléce naředěném v 1× TBS s 0,1 % Tweenem-20. Po inkubaci následovalo promytí membrány (třikrát 5 minut) v 1× TBS s 0,1 % Tweenem-20 za stejných podmínek.

K vizualizaci proteinů byl použit detekční roztok z kitu Western Bright Quantum (Advansta). Roztok byl připraven krátce před použitím smícháním roztoků v poměru 1 : 1. Poté byl rovnoměrně nakapán na membránu, která byla po 1 minutě přiklopena folií. K vizualizaci chemiluminiscence byl využit přístroj ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad Laboratories).

# 4 Výsledky

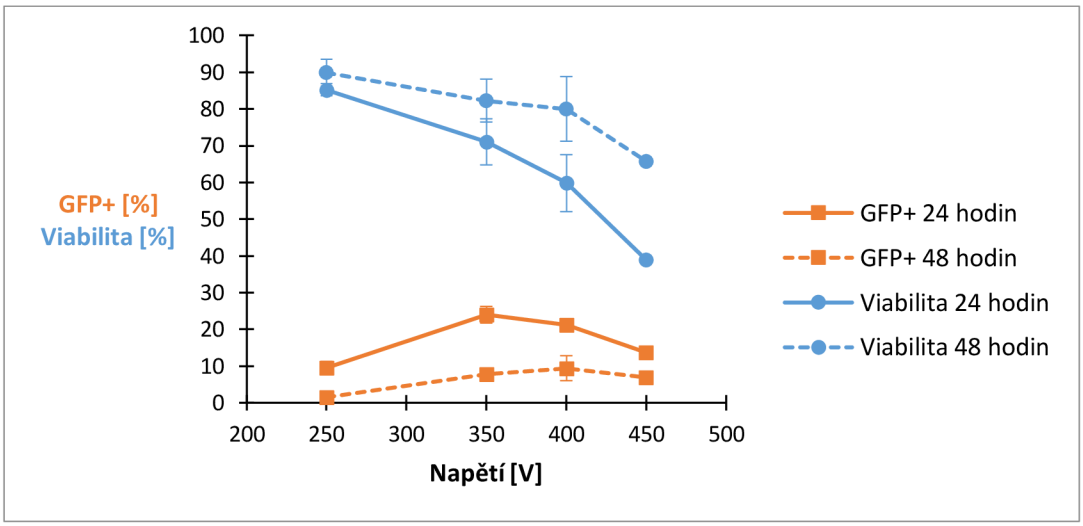
Pro expresi tetraspaninu CD9 (fúzovaného s GFP) v myších makrofágových líních byly vybrány dvě transfekční metody, elektroporace a transfekce s GenJet™ reagencií.

V rámci optimalizace metody elektroporace byly testovány tři parametry, vliv napětí, kapacity a koncentrace DNA na účinnost transfekce a viabilitu.

## 4.1. Elektroporace

### 4.1.1 Vliv napětí na účinnost elektroporace PMJ2-R

Na obr. 4 je znázorněn graf závislosti účinnosti elektroporace, vyjádřené jako procento GFP-pozitivních živých buněk PMJ2-R, a viability buněk na napětí po 24 a 48 hodinách. Při elektroporaci byla použita koncentrace 5 µg DNA/$1\times10^6$ buněk a kapacita 350 µF.

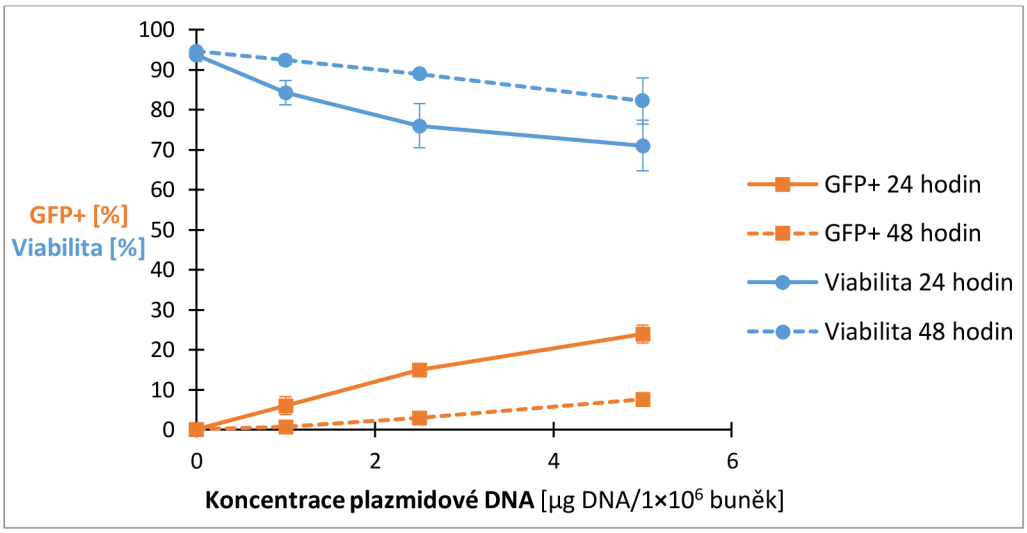



*Obrázek 4: Graf závislosti procenta GFP-pozitivních živých buněk PMJ2-R a viability na napětí po 24 a 48 hodinách od elektroporace*

Z grafu (obr. 4) vyplývá, že viabilita buněk se s rostoucím napětím snižovala. Účinnost elektroporace po 24 hodinách se s rostoucím napětím zvyšovala až do napětí 350 V, při vyšším napětí účinnost klesala. Po 48 hodinách se procento GFP-pozitivních živých buněk snížilo a viabilita se zvýšila. Nejvyšší účinnost elektroporace vykazovaly vzorky při použitém napětí 350 V (24,03 ± 2,23 % GFP-pozitivních živých buněk, viabilita 71,09 ± 6,25 %) po 24 hodinách.

### 4.1.2 Vliv koncentrace plazmidové DNA na účinnost elektroporace PMJ2-R

Závislost procenta GFP-pozitivních živých buněk PMJ2-R a viability na koncentraci plazmidové DNA po 24 a 48 hodinách je zobrazena na obr. 5. Při elektroporaci bylo použito napětí 350 V a kapacita 350 µF.

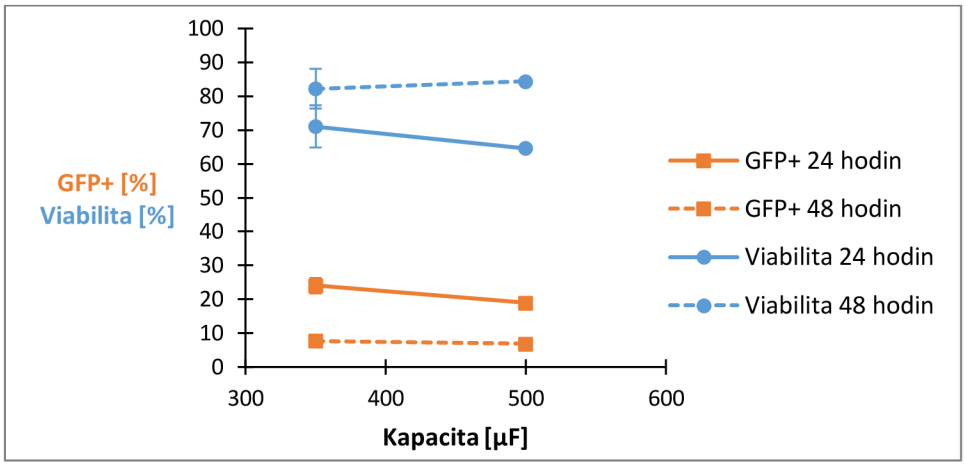



*Obrázek 5: Graf závislosti procenta GFP-pozitivních živých buněk PMJ2-R a viability na koncentraci plazmidové DNA po 24 a 48 hodinách od elektroporace*

Graf (obr. 5) ukazuje, že s rostoucí koncentrací plazmidové DNA se zvyšovala účinnost elektroporace, jelikož se zvyšovalo procento GFP-pozitivních živých buněk. Viabilita buněk se s rostoucí koncentrací plazmidové DNA snižovala. Po 48 hodinách se procento GFP-pozitivních živých buněk snížilo a viabilita buněk se mírně zvýšila. Nejvyšší účinnost elektroporace byla zaznamenána u vzorků, u kterých byla použita koncentrace plazmidové DNA 5 µg DNA/$1\times10^6$ buněk.

### 4.1.3 Vliv kapacity na účinnost elektroporace PMJ2-R

Obr. 6 zobrazuje graf závislosti procenta GFP-pozitivních živých buněk a viability na napětí po 24 a 48 hodinách. Při elektroporaci byla použita koncentrace plazmidové DNA 5 µg DNA/$1x10^6$ buněk a napětí 350 V.

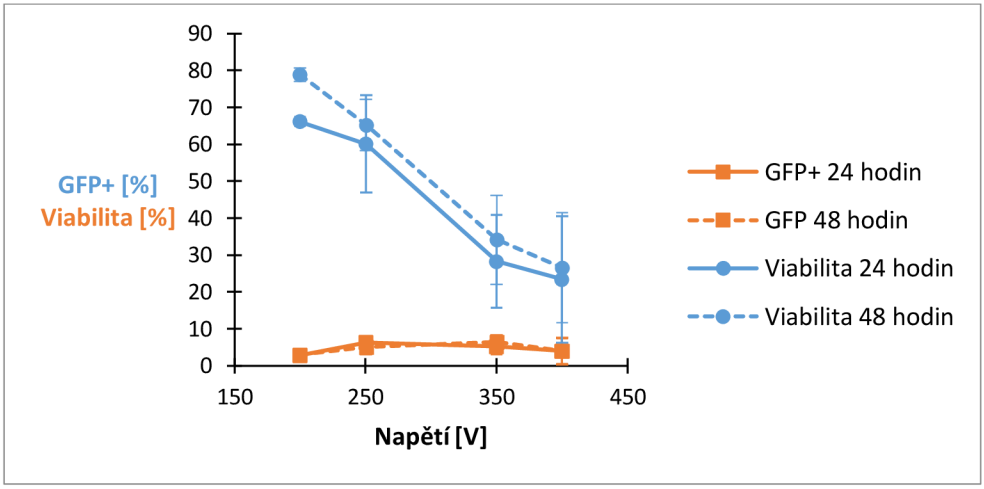



*Obrázek 6: Graf závislosti procenta GFP-pozitivních živých buněk PMJ2-R a viability na kapacitě po 24 a 48 hodinách od elektroporace*

Z grafu (obr. 6) vyplývá, že po 24 hodinách bylo procento GFP-pozitivních živých buněk přibližně o 5 % vyšší při kapacitě 350 µF než při kapacitě 500 µF. Po 48 hodinách se procento GFP-pozitivních živých buněk téměř nelišilo. Viabilita buněk při kapacitě 350 µF byla přibližně o 2 % vyšší než při kapacitě 500 µF. Změna kapacity v tomto rozsahu měla pouze malý vliv na účinnost elektroporace. Vyšší transfekční účinnost byla zaznamenána u vzorků, u kterých byla použita kapacita 350 µF.

### 4.1.4 Vliv napětí na účinnost elektroporace IC-21

Na obr. 7 je znázorněn graf závislosti procenta GFP-pozitivních živých buněk IC-21 a viability na použitém napětí po 24 a 48 hodinách. Při elektroporaci těchto vzorků byla použita koncentrace plazmidové DNA 5 µg DNA/$1\times10^6$ buněk.



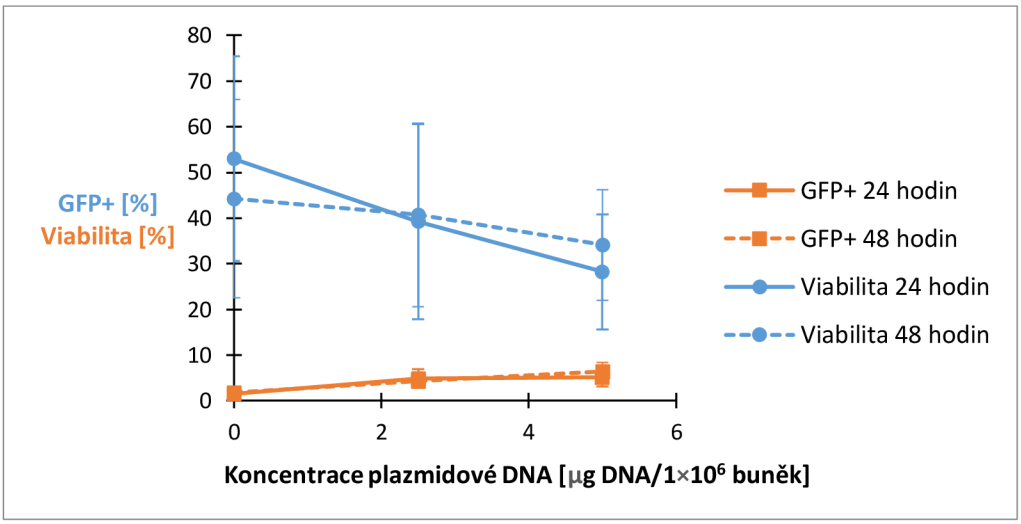

*Obrázek 7: Graf závislosti procenta GFP-pozitivních živých buněk IC-21 a viability na napětí po 24 a 48 hodinách od elektroporace*

Z grafu na obr. 7 je patrné, že účinnost transfekce po 24 hodinách se zvyšovala se vzrůstajícím napětím až do hodnoty 250 V, při vyšších napětích účinnost klesala. Viabilita buněk se s rostoucím napětím postupně snižovala, přičemž k největšímu poklesu došlo mezi napětími 250 V a 350 V. Účinnost transfekce po 48 hodinách se zvyšovala se vzrůstajícím napětím do hodnoty 350 V, při vyšším napětí účinnost klesala. Viabilita buněk se se vzrůstajícím napětím snižovala. Procento GFP-pozitivních živých buněk se 48 hodin po transfekci téměř nezměnilo.

Jako nejvhodnější parametr se ukázalo napětí 250 V s nejvyšší účinností transfekce (6,32 ± 1,13 %) při stále dostatečné viabilitě (60,05 ± 13,19 %).

### 4.1.5 Vliv koncentrace DNA na účinnost elektroporace IC-21

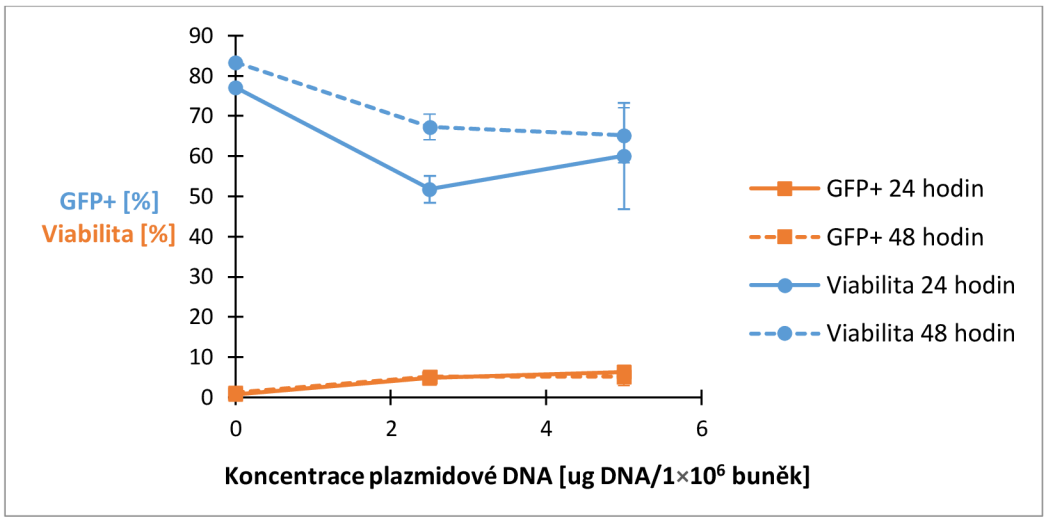
Obr. 8 ukazuje graf závislosti procenta GFP-pozitivních živých buněk a viability na koncentraci plazmidové DNA po 24 a 48 hodinách. Při elektroporaci těchto buněk bylo použito napětí 350 V.




*Obrázek 8: Graf závislosti procenta GFP-pozitivních živých buněk a viability na koncentraci plazmidové DNA po 24 a 48 hodinách od elektroporace, při použitém napětí 350 V*

Graf na obr. 8 ukazuje, že vyšší účinnost transfekce vykazoval vzorek při použití koncentrace 5 µg plazmidové DNA/1×$10^6$ buněk. Viabilita buněk byla při všech použitých koncentracích DNA nižší než 41 %. Napětí bylo tedy příliš vysoké.

Závislost procenta GFP-pozitivních buněk a viability na koncentraci plazmidové DNA po 24 a 48 hodinách zachycuje graf na obr. 9. Při elektroporaci těchto vzorků bylo použito napětí 250 V.




*Obrázek 9: Graf závislosti procenta GFP-pozitivních živých buněk a viability na koncentraci plazmidové DNA po 24 a 48 hodinách od elektroporace, při použitém napětí 250 V*

Z grafu na obr. 9 vyplývá, že vyšší účinnost transfekce vykazovaly buňky při použití koncentrace 5 µg plazmidové DNA/1×$10^6$ buněk. Viabilita buněk byla při této koncentraci DNA vyšší než 60 %.

### 4.1.6 Nejúčinnější parametry elektroporace

V tabulce VI jsou shrnuty parametry, které představují kompromis mezi maximální účinností elektroporace při zachování dostatečné viability buněk. Zároveň jsou zde uvedeny hodnoty GFP-pozitivních živých buněk a viability, kterých bylo při tomto nastavení dosaženo u každé buněčné linie.

**Tab. VI:** Optimalizované podmínky elektroporace a jejich účinnost po 24 hodinách.

| **Buněčná linie** | **Napětí** [V] | **Odpor** [Ω] | **Kapacita** [µF] | **Koncentrace plazmidu** [µg DNA/1x$10^6$ buněk] | **GFP+** [%] | **Viabilita** [%] |
|---|---|---|---|---|---|---|
| PMJ2-R | 350 | 1000 | 350 | 5 | **24,03** ± 2,23 | **71,09** ± 6,25 |
| IC-21 | 250 | 1000 | 350 | 5 | **5,15** ± 2,16 | **65,20** ± 6,89 |

## 4.2 Transfekce pomocí GenJet™

Další transfekční metodou, která byla testována, byla transfekce pomocí GenJet™. Očekávalo se, že tato metoda bude šetrnější k buňkám, proto byl zároveň testován vliv absence

séra na účinnost transfekce a viabilitu buněk. Sérum je zdrojem vezikul, proto je jeho přítomnost nežádoucí.

### 4.2.1 Transfekce PMJ2-R

V tabulce VII jsou uvedeny výsledky transfekce buněčné linie PMJ2-R plazmidem pcDNA6.2/CD9-emGFP, kontrolní vzorky byly transfekovány plazmidem pcDNA6.2.

**Tab. VII**: Výsledky transfekce PMJ2-R po 24 a 48 hodinách.

| Vzorek | 24 hodin | | 48 hodin | |
|---|---|---|---|---|
| | GFP + [%] | Viabilita [%] | GFP + [%] | Viabilita [%] |
| Kontrola - bez FBS | 0,34 | 52,06 | 0,06 | 23,65 |
| CD9-GFP - bez FBS | 3,03 | 44,33 | 0,52 | 21,87 |
| Kontrola - 5 % FBS | 0,47 ± 0,12 | 78,49 ± 0,33 | 0,78 ± 0,02 | 67,88 ± 12,25 |
| CD9-GFP - 5 % FBS | 8,22 ± 4,02 | 81,44 ± 1,31 | 2,80 ± 1,02 | 67,59 ± 15,16 |

Naměřené hodnoty v tabulce VII ukazují, že účinnost transfekce buněk PMJ2-R dosahovala 8,22 ± 4,02 % v médiu s 5 % FBS. U buněk v médiu bez séra byla viabilita buněk výrazně nižší než u buněk v médiu s 5 % FBS. Viabilita a podíl GFP-pozitivních živých buněk se po 48 hodinách snížily.

### 4.2.2 Transfekce IC-21

V tabulce VIII jsou uvedeny výsledky transfekce buněčné linie IC-21 plazmidem pcDNA6.2/CD9-emGFP, kontrolní vzorky byly transfekovány plazmidem pcDNA6.2.

**Tab. VIII**: Výsledky transfekce IC-21 po 24 a 48 hodinách.

| Vzorek | 24 hodin | | 48 hodin | |
|---|---|---|---|---|
| | GFP + [%] | Viabilita [%] | GFP + [%] | Viabilita [%] |
| Kontrola - bez FBS | 0,62 ± 0,14 | 85,88 ± 1,54 | 0,79 ± 0,07 | 76,40 ± 1,45 |
| CD9-GFP bez FBS | 0,92 ± 0,15 | 87,08 ± 0,73 | 0,94 ± 0,18 | 79,44 ± 0,02 |
| Kontrola - s 10 % FBS | 0,52 ± 0,09 | 86,76 ± 0,54 | 0,53 ± 0,03 | 89,55 ± 1,66 |
| CD9-GFP s 10 % FBS | 1,17 ± 0,13 | 85,29 ± 2,57 | 0,69 ± 0,01 | 91,10 ± 0,17 |

Z tabulky VIII vyplývá, že podíl GFP-pozitivních živých buněk u vzorků CD9-GFP (s 10 % FBS i bez séra) se od příslušných kontrolních vzorků lišil o méně než 1 %. Účinnost transfekce byla tedy velmi nízká. Viabilita buněk se po 24 hodinách mezi vzorky s 10 % FBS a bez séra výrazně nelišila. Po 48 hodinách od transfekce byla viabilita buněk v médiu bez séra nižší než v médiu s 10 % FBS.

### 4.2.3 Transfekce HEK293T

Pro srovnání byla provedena i transfekce buněčné linie HEK293T, která je účinně transfekovatelná. Opět byl ověřen i vliv absence séra na účinnost transfekce a viabilitu buněk. V tabulce IX jsou uvedeny výsledky transfekce buněčné linie HEK293T plazmidem pcDNA6.2/CD9-emGFP, kontrolní vzorky byly transfekovány plazmidem pcDNA6.2.

**Tab. IX**: Výsledky transfekce HEK293T po 24 a 48 hodinách.

| Vzorek | 24 hodin | | 48 hodin | |
|---|---|---|---|---|
| | GFP + [%] | Viabilita [%] | GFP + [%] | Viabilita [%] |
| Kontrola-bez séra | 0,74 ± 0,44 | 97,97 ± 1,89 | 0,37 ± 0,25 | 95,15 ± 0,70 |
| CD9-emGFP- bez séra | 74,71 ± 3,55 | 92,54 ± 0,01 | 67,82 ± 4,26 | 70,74 ± 3,60 |
| Kontrola – 5 % FBS | 1,12 ± 0,24 | 98,08 ± 1,87 | 0,31 ± 0,18 | 93,85 ± 0,65 |
| CD9-emGFP – 5 % FBS | 67,34 ± 3,14 | 79,32 ± 14,29 | 74,06 ± 3,80 | 80,87 ± 2,89 |

Z naměřených dat v tabulce IX vyplývá, že účinnost transfekce HEK293T byla za všech testovaných podmínek vysoká (67,34 - 74,71 %). Po 48 hodinách vysoké procento GFP-pozitivních živých buněk přetrvávalo a viabilita buněk v médiu bez séra se lehce snížila, zatímco v médiu s 5 % FBS zůstala téměř beze změny. Exprese CD9-GFP měla vliv na viabilitu buněk. Tento trend byl pozorován v obou časových intervalech, v přítomnosti séra i v jeho absenci.

### 4.2.4 Výsledky transfekce

V tabulce X jsou shrnuty výsledky transfekce buněk PMJ2-R, IC-21 a HEK293T pomocí GenJet™.

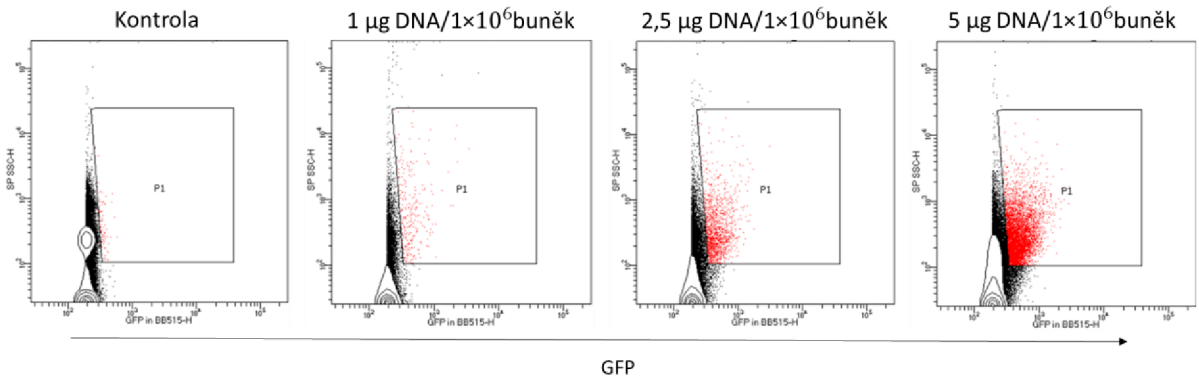
**Tab. X**: Souhrn výsledků transfekce buněk v médiu s FBS.

| Buněčná linie | 24 hodin | | 48 hodin | |
|---|---|---|---|---|
| | GFP + [%] | Viabilita [%] | GFP + [%] | Viabilita [%] |
| PMJ2-R | 8,22 ± 4,02 | 81,44 ± 1,31 | 2,80 ± 1,02 | 67,59 ± 15,16 |
| IC-21 | 1,17 ± 0,13 | 85,24 ± 2,57 | 0,69 ± 0,01 | 91,10 ± 0,17 |
| HEK293T | 67,34 ± 3,14 | 79,32 ± 14,29 | 74,06 ± 3,80 | 80,87 ± 2,89 |

## 4.3 Detekce CD9-emGFP značených EVs z PMJ2-R

Buňky produkující fúzní protein CD9-GFP sekretují fluorescenční vezikuly, které je možné měřit na průtokovém cytometru vybaveném detektorem pro malé částice (SPSSC). V pilotním experimentu byly vezikuly měřeny přímo z kultivačního média po elektroporaci PMJ2-R plazmidem pcDNA6.2/CD9-emGFP. Na obr. 10 jsou výsledky z průtokové

cytometrie, které zobrazují detekci GFP-pozitivních EVs v závislosti na koncentraci plazmidové DNA použité při elektroporaci.




*Obrázek 10: Detekce GFP-pozitivních vezikul z PMJ2R/CD9-emGFP pomocí průtokové cytometrie*

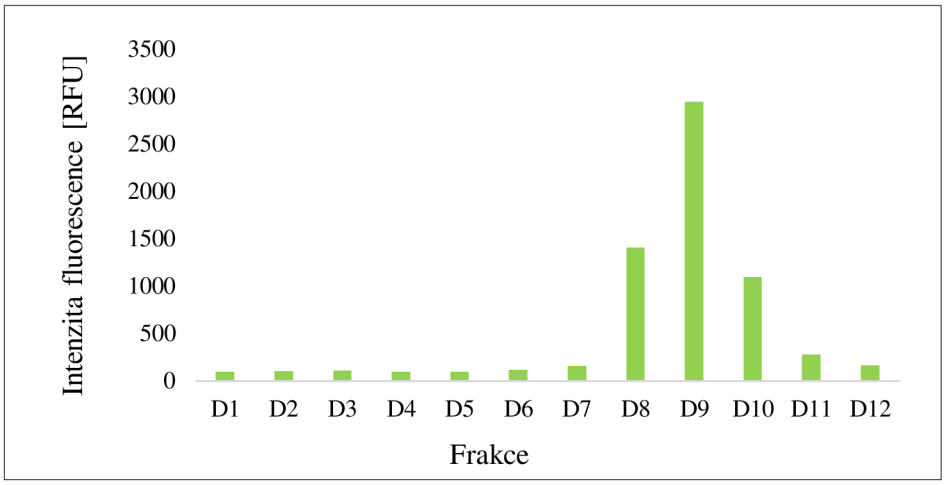
Obr. 10 ukazuje, že s rostoucí koncentrací plazmidové DNA se množství GFP-pozitivních vezikul v oblasti P1 zvyšovalo.

## 4.4 Detekce fluorescenčně značených EVs z HEK293T

Z důvodu vysoké účinnosti transfekce HEK293T, byly pro účel detekce vezikul vybrány právě tyto buňky. EVs byly měřeny přímo z média (přečišteny diferenciální centrifugací), nebo po zakoncentrování ultrafiltrací (UF), nebo po následném přečištění pomocí velikostně vylučovací chromatografie (UF/SEC). Pro spolehlivější detekci byly EVs navíc značeny fluorescenčním barvivem CTV450, které proniká membránou a vlivem esteráz přítomných ve vezikulech se mění na fluorescenční produkt, který umožňuje rovněž jejich detekci. Fluorescenční vezikuly byly měřeny nejdříve na fluorescenčním spektrofotometru a poté na průtokovém cytometru.

### 4.4.1 Spektrofotometrické měření fluorescence

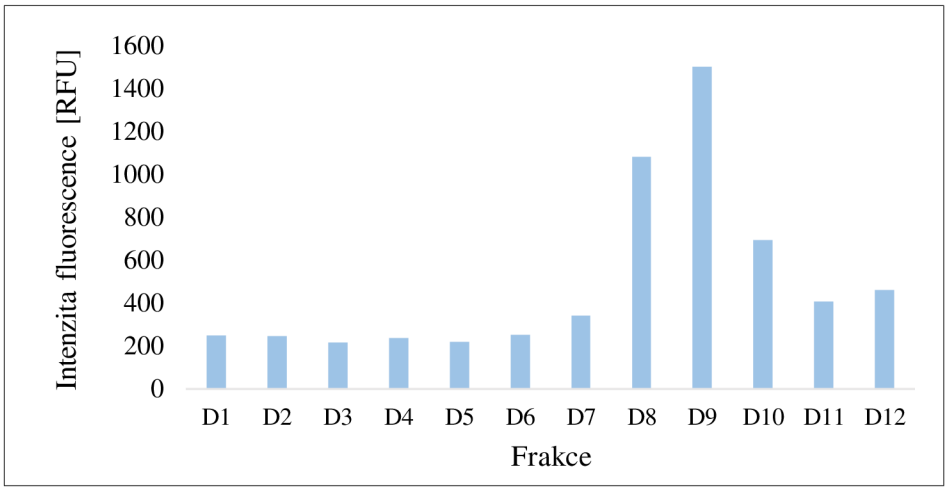
Na obr. 11 je znázorněna intenzita fluorescence GFP, která byla naměřena v jednotlivých frakcích z média HEK293T po UF/SEC pomocí fluorescenční spektrofotometrie.




*Obrázek 11: Intenzita fluorescence z GFP v jednotlivých frakcích*

Graf na obr. 11 ukazuje, že frakce 1-6 vykazovaly pouze minimální fluorescenční signál. Intenzita fluorescence se začala mírně zvyšovat ve frakci 7 a nejvyšší hodnoty dosáhla ve frakci 9. S dalšími frakcemi fluorescence klesala. Nejvyšší signál byl detekován ve frakcích 8, 9 a 10, což zde naznačuje nejvyšší přítomnost GFP-značených EVs.

Na obr. 12 je znázorněna intenzita fluorescence CTV450, která byla naměřena v jednotlivých frakcích z média HEK293T po UF/SEC.



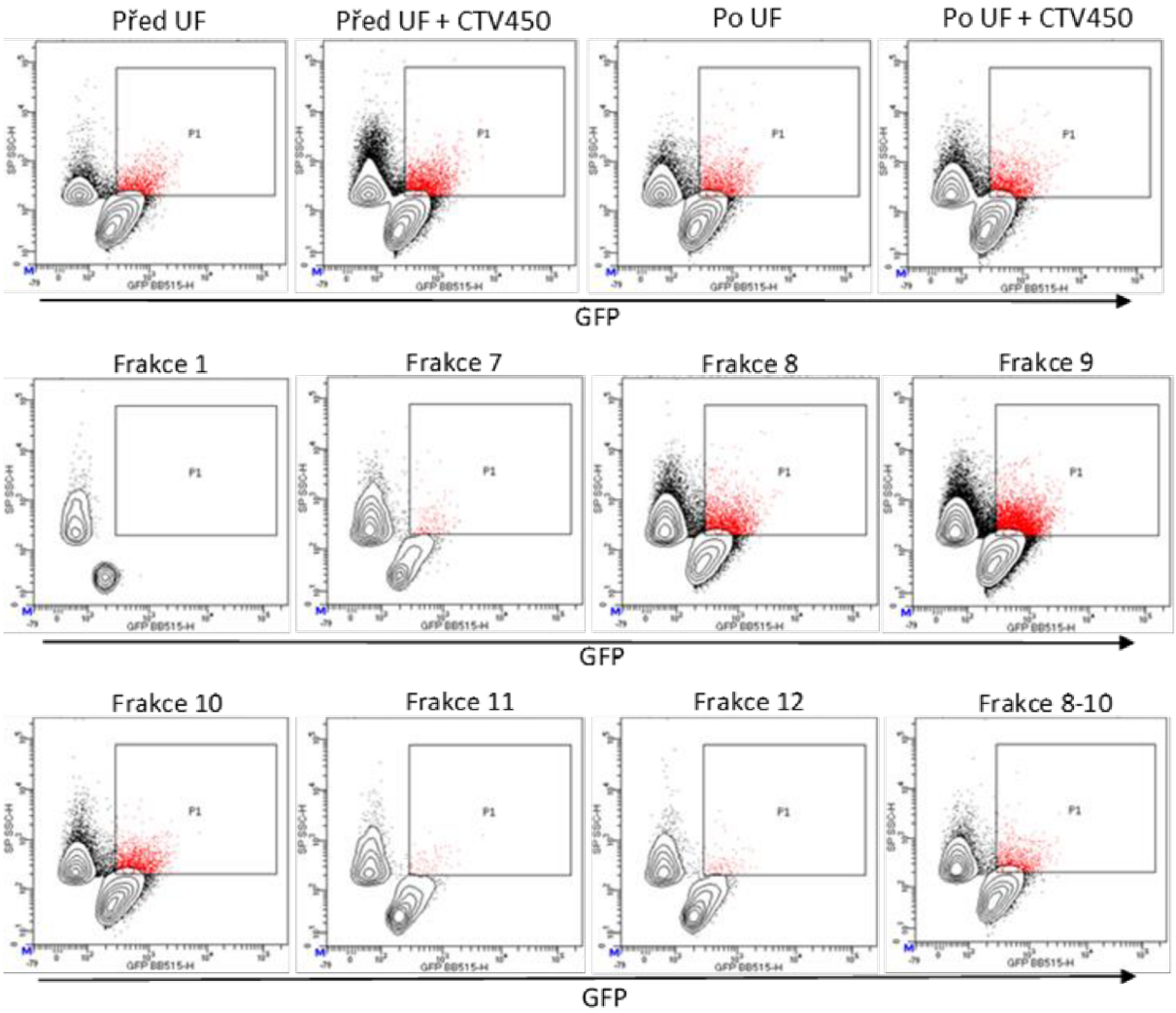

*Obrázek 12: Intenzita fluorescence z CTV450 v jednotlivých frakcích*

Intenzita fluorescence byla ve frakcích 1-6 nejnižší (obr. 12). Míra fluorescence začala mírně vrůstat ve frakci 7, přičemž svého maxima dosáhla ve frakci 9. Nejvyšší fluorescence byla detekována u frakce 8-10, což naznačuje nejvyšší přítomnost EVs v těchto frakcích. V následujících frakcích (11 a 12) byl zaznamenán pokles signálu, který však zůstával vyšší než u úvodních frakcí.

Na základě naměřených hodnot byly frakce 7-12 měřeny také na průtokovém cytometru a frakce 1 byla využita jako kontrola.

### 4.4.2 Detekce EVs pomocí průtokové cytometrie

Na obr. 13 jsou znázorněny výsledky detekce fluorescence GFP, které byly získány měřením vzorků před a po UF a měřením jednotlivých frakcí po UF/SEC z média buněk HEK293T (transfekovaných plazmidem pcDNA6.2/CD9-emGFP). Signál z GFP je znázorněn na x-ové ose.

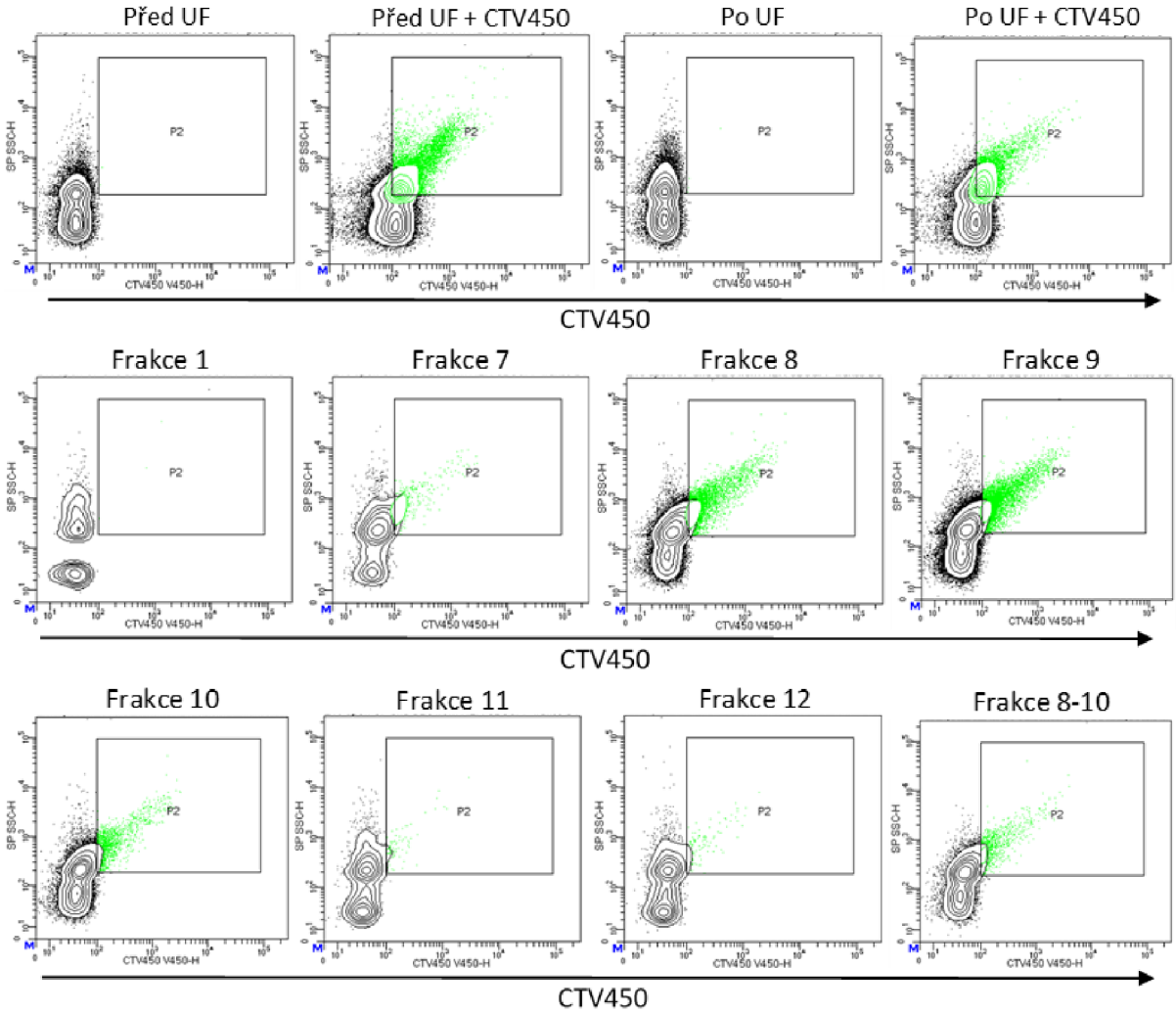



*Obrázek 13: Detekce emGFP-pozitivních EVs pomocí průtokové cytometrie*

Z obr. 13 je patrné, že GFP-pozitivní vezikuly (oblast P1) byly ve vzorcích detekovány před UF i po UF. Ve frakci 1 nebyla zaznamenána fluorescence z GFP, což odpovídá tomu, že se zde EVs ještě nenacházejí. Ve frakci 7 začala fluorescence vzrůstat, přičemž nejvyšší intenzity dosáhla ve frakci 9, kde byl posun populace do oblasti P1 nejvýraznější. V následujících frakcích (10, 11 a 12) fluorescence postupně klesala, a to naznačuje snižující

se koncentraci GFP-značených EVs v těchto frakcích. Kvůli vysoké intenzitě fluorescence v předchozím měření pomocí fluorescenční spektrofotometrie byly frakce 8-10 spojeny a vysoká fluorescence v těchto frakcích byla prokázána také pomocí průtokové cytometrie.

Na obr. 14 jsou znázorněny výsledky měření fluorescence CTV450, které byly získány měřením vzorků před a po UF a měřením jednotlivých frakcí po UF/SEC z média buněk HEK293T (transfekovaných plazmidem pcDNA6.2/CD9-emGFP). Signál z CTV450 je znázorněn na x-ové ose.

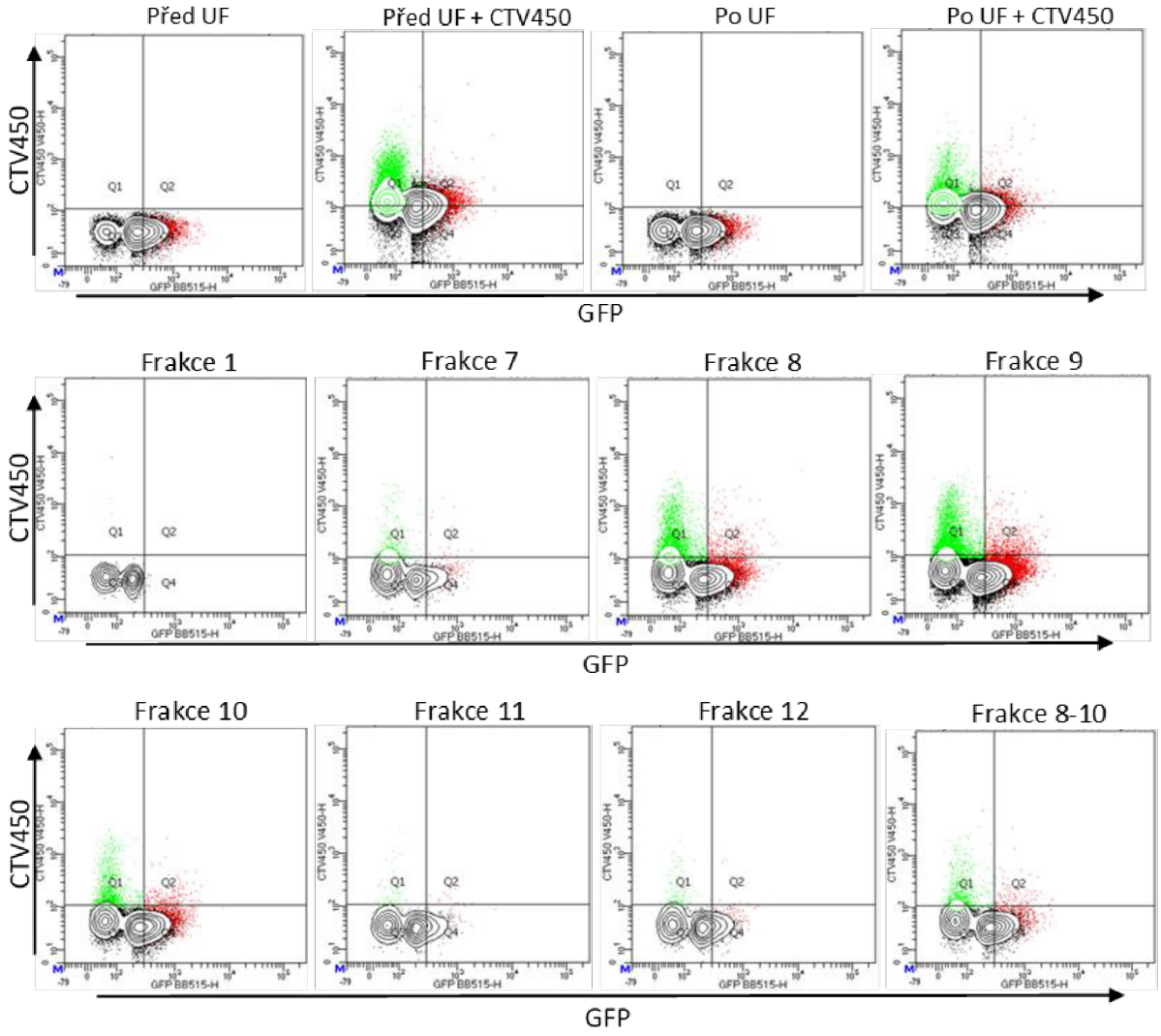



*Obrázek 14: Detekce CTV450 pomocí průtokové cytometrie*

Z obr. 14 vyplývá, že v neznačených vzorcích před a po UF CTV450-pozitivní vezikuly detekovány nebyly, zatímco ve značených vzorcích před i po UF se přítomnost pozitivních vezikul potvrdila. Ve frakci 1 nebyla zaznamenána téměř žádná fluorescence z CTV450 (oblast P2). Počínaje frakcí 7 se intenzita fluorescence zvyšovala až do frakce 9,

ve které byla fluorescence nejvyšší. S dalšími frakcemi se fluorescenční signál postupně snižoval. U frakcí 8-10, které byly spojeny, byla rovněž detekována intenzivní fluorescence.

Na obr. 15 je opět analýza frakcí získaných po UF/SEC z média buněk HEK293T (transfekovaných plazmidem pcDNA6.2/CD9-emGFP) a vzorků před a po UF (viz tabulka IV). Tentokrát analýza umožňuje rozlišit vezikuly, které jsou dvojitě pozitivní (GFP+/ CTV450+), pozitivní na GFP nebo jenom na CTV450.




*Obrázek 15: Detekce GFP a CTV450 pomocí průtokové cytometrie*

V kvadrantu Q1 je zobrazena populace pozitivní na fluorescenci z CTV450, zatímco v kvadrantu Q4 jsou částice pozitivní na signál z GFP. Kvadrant Q2 zachycuje populaci částic, která vykazuje pozitivní signál pro GFP i CTV450. Vzorky před a po UF, které nebyly s CTV450 inkubovány, vykazovaly fluorescenci pouze z GFP. Ve vzorcích před i po UF značených s CTV450 byl fluorescenční signál v kvadrantu Q2 detekován.

Přítomnost EVs byla zachycena ve frakcích 7-12, přičemž nejvyšší intenzity fluorescenčního signálu bylo dosaženo ve frakcích 8-10.

V tabulce XIII je uveden počet událostí, které byly naměřeny průtokovou cytometrií.

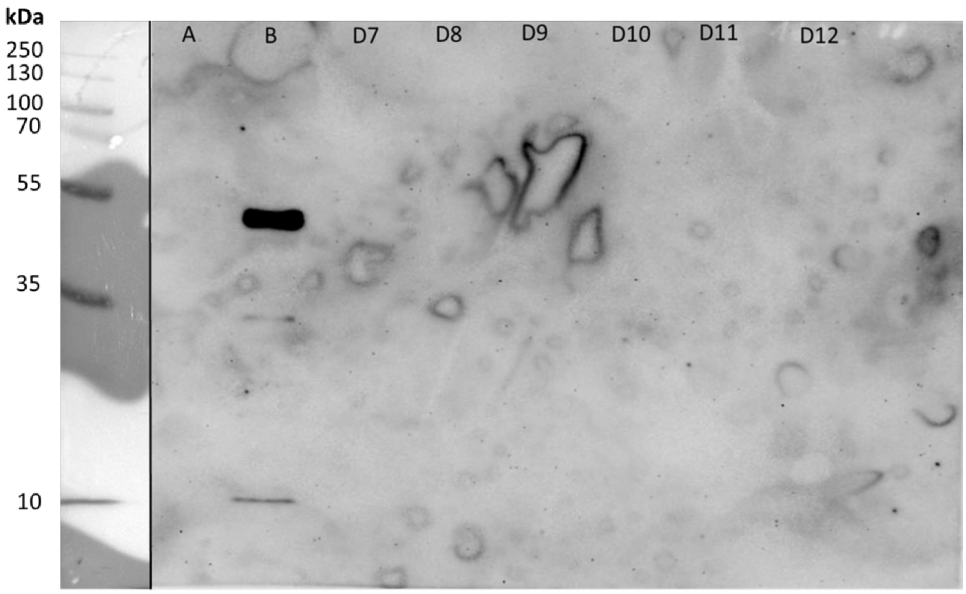
**Tab. XIII:** Počet událostí detekováných na průtokovém cytometru při měření fluorescence z GFP a CTV450

| Vzorek | Ředění | Doba měření | Počet událostí GFP+ | Počet událostí CTV450+ | Počet událostí GFP+, CTV450+ |
|---|---|---|---|---|---|
| Frakce 1 | 5× | 10 s | 0 | 3 | 0 |
| Frakce 7 | 5× | 10 s | 127 | 361 | 19 |
| Frakce 8 | 5× | 10 s | 2454 | 4984 | 322 |
| Frakce 9 | 5× | 10 s | 5023 | 7550 | 655 |
| Frakce 10 | 5× | 10 s | 1635 | 1763 | 211 |
| Frakce 11 | 5× | 10 s | 67 | 78 | 16 |
| Frakce 12 | 5× | 10 s | 91 | 134 | 10 |
| Frakce 8-10 | 5× | 10 s | 3918 | 5675 | 541 |
| před UF | 10× | 10 s | 1337 | 4 | 1 |
| před UF + CTV450 | 10× | 10 s | 2491 | 14145 | 7283 |
| po UF | 50× | 2 s | 1422 | 4 | 1 |
| po UF + CTV450 | 50× | 2 s | 1751 | 8475 | 3668 |

Nejvyšší počet dvojitě pozitivních částic byl detekován ve frakcích 8-10, s maximem ve frakci 9. Vzorky značené s CTV450 vykazovaly vysoký nárůst počtu GFP+ i CTV450+ událostí. Přestože byl vzorek po UF měřen při 50násobném ředění pouhé 2 s, dosáhl vysokého počtu detekovaných událostí, což naznačuje účinné zakoncentrování EVs ultrafiltrací.

### 4.4.3 Detekce CD9

Pro ověření přítomnosti CD9-pozitivních EVs ve vzorcích A (před UF), B (po UF) a v jednotlivých frakcích ze SEC byla využita metoda Western blot (obr. 16).




*Obrázek 16: Detekce CD9 pomocí Western blotingu*

Ve vzorku B (po UF) byly detekovány dva bandy, větší o velikosti přibližně 50 kDa a menší o velikosti cca 27 kDa (obr. 16). Slabší band odpovídá tetraspaninu CD9 o velikosti 24-27 kDa (Yubero et al., 2011). Větší protein odpovídá fúznímu proteinu CD9-emGFP, jehož velikost se pohybuje v rozmezí 50-60 kDa. Ve vzorku A a v jednotlivých frakcích ze SEC nebyl detekován žádný chemiluminiscenční signál.

# 5 Diskuze

Fluorescenční značení EVs představuje nástroj pro jejich vizualizaci. Umožňuje nejen jejich zobrazení pod konfokálním či fluorescenčním mikroskopem, ale také jejich měření průtokovou cytometrií a dalšími metodami. Toto značení umožňuje např. testování jejich pohlcení (uptaku) živými buňkami (Schürz et al., 2022). Značené EVs jsou také využívány pro studium mezibuněčné komunikace a při využití více fluorescenčních značek je možné sledovat výměnu EVs mezi různými buněčnými liniemi (Boudna et al., 2024). Takto značené vezikuly mohou být uplatněny při metodě NTA (Analýza sledování nanočástic), která slouží k charakterizaci EVs na několika úrovních, jelikož měří jejich velikost, distribuci velikostí, koncentraci a umožňuje rozlišení subpopulací (Kowkabany et al., 2024).

Kromě fluorescenčního značení membránových proteinů, jako jsou tetraspaniny CD9, CD63, CD81, jsou v některých studiích aplikována značení pomocí lipidových či RNA specifických barviv. Tyto metody jsou široce využívány, avšak jejich nevýhodou je tendence k tvorbě micel a artefaktů, které mohou zkreslovat výsledky analýzy (Morales-Kastresana et al., 2017). Další alternativou je využití fluorescenčních proteinů fúzovaných s proteiny, které vykazují afinitu k membránovým lipidům (např. fosfatidylserinu). Zatímco značení tetraspaninů umožňuje identifikaci na základě jejich biogeneze, tento alternativní přístup napomáhá určení jednotlivých subpopulací podle lipidového složení (Mathieu et al., 2021; Kobayashi et al., 2026). Značení fúzními proteiny, které bylo využito i v této práci, má však také jistá omezení, jelikož zvýšená produkce fúzního proteinu může ovlivňovat biogenezi EVs a jejich přítomnost na povrchu membrány může tvořit sterickou zábranu a ovlivnit vazbu EVs na cílovou buňku (Boudna et al., 2024). V rámci experimentů byl využit fúzní protein CD9-emGFP, který sloužil jako marker pro detekci EVs a pro dvouparametrovou analýzu bylo využito také barvivo CTV450. Duální značení bylo zvoleno pro přesnější detekci a minimalizaci falešně pozitivních výsledků.

Za účelem exprese fúzního proteinu CD9-emGFP byly testovány dvě transfekční metody, a to elektroporace a transfekce pomocí reagentu GenJet$^{TM}$. Elektroporace se ukázala jako účinnější transfekční metoda obou myších makrofágových linií PMJ2-R i IC-21. Optimalizované parametry elektroporace představují kompromis mezi maximální expresí proteinu CD9-emGFP a viabilitou buněk. U linie PMJ2-R bylo dosaženo účinnosti 24,03 % a u linie IC-21 5,15 %. Z důvodu rozdílné citlivosti buněk k elektrickým pulzům bylo nutné

optimalizovat podmínky elektroporace individuálně pro každou buněčnou linii. Parametry účinné elektroporace jsou závislé mimo jiné na velikosti buněk a na složení média, ve kterém jsou buňky elektroporovány (Gehl, 2003).

Dosažené výsledky odpovídají poznatkům o makrofázích, jelikož jsou považovány za buňky, které jsou obtížně transfekovatelné a odolné mnohým transfekčním metodám, což potvrzuje i fakt, že u linie IC-21 byla účinnost transfekce s GenJet™ téměř nulová. Tato jejich vlastnost je zapříčiněna fagocytární aktivitou, obsahem nukleáz a degradačních enzymů, kvůli kterým je DNA po vstupu do buňky náchylná k degradaci. Výhodou elektroporace, v porovnání s metodami založenými na endocytóze a fagocytóze, je obcházení lyzozomů a omezení degradace cizorodé DNA v cytoplazmě makrofágů (Zhang et al., 2009).

Nevýhodou elektroporace jsou však doprovodné fyzikální a chemické jevy, které negativně ovlivňují integritu buněk. Při aplikaci elektrických pulzů dochází ke generování Jouleova tepla v suspenzi, změnám pH a uvolňování kovových iontů z elektrod. Všechny tyto faktory přispívají ke snižování životaschopnosti buněk (Grys et al., 2017). V naměřených datech byl tento jev patrný, jelikož se vzrůstajícím napětím se snižovala viabilita buněk. Právě optimalizace elektroporačních podmínek umožnila dosáhnout přechodné permeabilizace membrány a následné exprese proteinu CD9-emGFP při zachování dostatečné viability buněk (Zhang et al., 2009).

Transfekce pomocí reagentu GenJet™ je založena na tvorbě komplexů s negativně nabitou DNA. Komplexy se vážou na buněčnou membránu a do buňky vstupují endocytózou. Tato transfekční metoda byla u PMJ2-R velmi málo účinná (8,2 %) a u IC-21 téměř neúčinná (< 1,2 %). Transfekce pomocí reagentu GenJet™ byla zvolena s ohledem na předpokládanou šetrnost k buňkám. Tento předpoklad se potvrdil, neboť viabilita myších makrofágů u obou linií přesahovala 81 % po 24 hodinách, ale transfekční účinnost byla nízká. Jako pozitivní kontrola transfekce byla využita buněčná linie HEK293T, která je známa svou účinnou transfekovatelností. Dosažení vysoké transfekční účinnosti (74 %) u těchto buněk naznačuje, že nízká účinnost u myších makrofágů nebyla způsobena selháním metody, ale zřejmě vlastnostmi těchto buněk. Kromě elektroporace mohou být k transfekci makrofágů využity další metody, jako např. transfekční činidlo Lipofectamin v kombinaci s protamin sulfátem, který kondenzuje DNA (Dokka et al., 2000).

Za účelem snažší detekce EVs na průtokovém cytometru byla pro přípravu fluorescenčně značených vezikul využita buněčná linie HEK293T, ale stejný postup může být aplikován také na myší makrofágové linie. Vysoká transfekční účinnost zajistila dostatečný podíl CD9-emGFP značených EVs pro jejich detekci. Při analýze jednotlivých frakcí po UF a SEC bylo nezbytné frakce naředit, aby se předešlo detekci shluků. Jelikož jsou EVs velmi malé částice, při nedostatečném ředění může cytometr několik z nich měřit současně a chybně je vyhodnotit jako jeden signál (Buntsma et al., 2023). Na rozdíl od lipidových barviv, která mají tendenci k tvorbě micel, bylo využito barvivo CTV450 (Morales-Kastresana et al., 2017). K jeho aktivaci dochází po penetraci do vezikul (nebo buněk), kde je štěpeno esterázami a tvoří nerozpustný fluorescenční produkt, který se kovalentně váže na aminové skupiny proteinů (Lacy et al., 2020). Metoda SEC, která je ve srovnání např. s ultracentrifugací považována za šetrnější přístup pro izolaci vezikul, byla do protokolu přípravy EVs zařazena nejen za účelem jejich separace, ale také kvůli eliminaci volného barviva CTV450, které má tendenci tvořit agregáty. Tyto agregáty mohou podléhat hydrolýze a výsledný fluorescenční signál komplikuje detekci EVs pomocí průtokové cytometrie. Účinnost tohoto postupu byla prokázána u analogického barviva CFSE (Morales-Kastresana et al., 2017). Data z průtokového cytometru odpovídají výsledkům naměřeným pomocí fluorescenční spektrofotometrie, a to naznačuje účinnou izolaci EVs metodou SEC. Dvojitě pozitivní signál (GFP+, CTV450+) ve frakcích 8-10 potvrzuje přítomnost intaktních vezikul nesoucích sledovaný fúzní protein CD9-emGFP a oddělení od agregátů volného barviva. Obsah EVs v těchto frakcích je v souladu s elučním profilem uváděným výrobcem kolony.

Dvouparametrová analýza dat z průtokové cytometrie také ukázala, že jen určitá část detekovaných částic byla pozitivní jak na GFP, tak na CTV450. Příkladem je frakce 9, ve které bylo detekováno 5023 GFP-pozitivních částic, ale pouze 655 bylo zároveň CTV450-pozitivních. Příčinou by mohla být vysoká úroveň exprese fúzního proteinu, která negativně ovlivňuje integritu buněk, a ty mohou tvořit defektní vezikuly, které se pak nebarví CTV450. Tomuto předpokladu nasvědčují data v tabulce IX, ze kterých je patrné, že exprese CD9-emGFP v buňkách HEK293T vedla ke snížení jejich viability. Je také známo, že exprese fúzního proteinu může narušovat přirozenou biogenezi EVs (Boudna et al., 2024), přičemž nadměrná inkorporace tetraspaninů zvyšuje průměrnou velikost EVs a mění jejich molekulární profil, včetně exprese jiných tetraspaninů (Zhang et al., 2022). Přesný vliv na složení EVs, produkci a vlastnosti zůstává předmětem dalšího zkoumání (Zhang et al., 2026). Vzhledem k tomu, že fluorescenční značení může způsobovat sterickou zábranu (Dörner et al., 2025), lze

předpokládat, že GFP připojený k tetraspaninům může stínit přilehlé aminové skupiny. To může omezovat přístupnost těchto skupin pro vazbu CTV450 a v důsledku vést ke snížení celkové intenzity fluorescence u značených vezikul.

Přítomnost fúzního proteinu CD9-emGFP a endogenního CD9 v EVs byla detekována metodou Western blot ve vstupním vzorku po UF před SEC. Negativní výsledek v jednotlivých frakcích a ve vzorku před UF může souviset s nedostatečnou koncentrací proteinu ve vzorku a výrazným naředěním během chromatografického procesu, v jehož důsledku klesla koncentrace proteinů v jednotlivých frakcích pod detekční limit.

Příprava fluorescenčně značených EVs je důležitá pro jejich další experimentální využití. Takto značené EVs mohou být použity např. při testování vlivu flavivirové infekce či klíštěcích slin na pohlcení EVs buňkami, případně pro sledování vlivu vyizolovaných EVs na imunitní buňky. Detailní objasnění role EVs ve virové infekci by mohlo usnadnit vývoj terapeutických vezikul schopných transportovat antivirové látky do postižených buněk i přes biologické bariéry. Přítomnost EVs v tělních tekutinách z nich činí snadno dostupné zdroje biomarkerů, které lze využít při neinvazivní diagnostice. Jejich složení obohacené o virovou RNA, proteiny či miRNA má navíc potenciální využití při určování prognózy a může napomoci při odhadu průběhu onemocnění (Saleem et al., 2025). Dále mohou nové poznatky o interakcích virů s EVs potenciálně umožnit tvorbu účinnějších vakcín či vést k využití EVs v imunoterapii (Hoen et al., 2016).

# 6 Souhrn

- Myší makrofágové linie PMJ2-R a IC-21 exprimující CD9-GFP se podařilo připravit.

- Elektroporace se ukázala jako účinnější transfekční metoda myších makrofágových linií a její parametry byly optimalizovány.

- Fluorescenčně značené EVs byly připraveny a detekovány pomocí průtokové cytometrie a fluorescenční spektrofotometrie.

# Seznam literatury

Agudelo, Juan Sebastian Henao, Gabriel Pereira, a Célio Junior Da Costa Fernandes. „Role of Extracellular Vesicles in Severe Dengue: Virus–Host Interactions and Biomarker Potential“. Viruses 17, č. 6 (2025): 807. https://doi.org/10.3390/v17060807.

Amara, Ali, a Jason Mercer. „Viral Apoptotic Mimicry“. Nature Reviews Microbiology 13, č. 8 (2015): 461–69. https://doi.org/10.1038/nrmicro3469.

Arya, Subhash B., Samuel P. Collie, a Carole A. Parent. „The Ins-and-Outs of Exosome Biogenesis, Secretion, and Internalization“. Trends in Cell Biology 34, č. 2 (2024): 90–108. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2023.06.006.

Babst, Markus, David J. Katzmann, William B. Snyder, Beverly Wendland, a Scott D. Emr. „Endosome-Associated Complex, ESCRT-II, Recruits Transport Machinery for Protein Sorting at the Multivesicular Body“. Developmental Cell 3, č. 2 (2002): 283–89. https://doi.org/10.1016/S1534-5807(02)00219-8.

Baietti, Maria Francesca, Zhe Zhang, Eva Mortier, et al. „Syndecan–Syntenin–ALIX Regulates the Biogenesis of Exosomes“. Nature Cell Biology 14, č. 7 (2012): 677–85. https://doi.org/10.1038/ncb2502.

Boudna, Marie, Andres Delgado Campos, Petra Vychytilova-Faltejskova, Tana Machackova, Ondrej Slaby, a Kamila Souckova. „Strategies for Labelling of Exogenous and Endogenous Extracellular Vesicles and Their Application for in Vitro and in Vivo Functional Studies“. Cell Communication and Signaling 22, č. 1 (2024): 171. https://doi.org/10.1186/s12964-024-01548-3.

Boucheix, C., a E. Rubinstein. „Tetraspanins“: Cellular and Molecular Life Sciences 58, č. 9 (2001): 1189–205. https://doi.org/10.1007/PL00000933.

Buntsma, Naomi C., Mona Shahsavari, Aleksandra Gąsecka, Rienk Nieuwland, Ton G. Van Leeuwen, a Edwin Van Der Pol. „Preventing Swarm Detection in Extracellular Vesicle Flow Cytometry: A Clinically Applicable Procedure“. Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis 7, č. 4 (2023): 100171. https://doi.org/10.1016/j.rpth.2023.100171.

Calderón-Peláez, María-Angélica, Jaime E. Castellanos, a Myriam L. Velandia-Romero. „Extracellular Vesicles in ZIKV Infection: Carriers and Facilitators of Viral

Pathogenesis?“ Science Progress 108, č. 1 (2025): 00368504241312073. https://doi.org/10.1177/00368504241312073.

Cody, Samantha Gabrielle, Awadalkareem Adam, Andrei Siniavin, Sam S. Kang, a Tian Wang. „Flaviviruses—Induced Neurological Sequelae“. Pathogens 14, č. 1 (2024): 22. https://doi.org/10.3390/pathogens14010022.

Coleman, Mathew L., Erik A. Sahai, Margaret Yeo, Marta Bosch, Ann Dewar, a Michael F. Olson. „Membrane Blebbing during Apoptosis Results from Caspase-Mediated Activation of ROCK I“. Nature Cell Biology 3, č. 4 (2001): 339–45. https://doi.org/10.1038/35070009.

Conzelmann, Carina, Rüdiger Groß, Min Zou, et al. „Salivary Extracellular Vesicles Inhibit Zika Virus but Not SARS-CoV-2 Infection“. Journal of Extracellular Vesicles 9, č. 1 (2020): 1808281. https://doi.org/10.1080/20013078.2020.1808281.

Crescitelli, Rossella, Cecilia Lässer, Tamas G. Szabó, et al. „Distinct RNA Profiles in Subpopulations of Extracellular Vesicles: Apoptotic Bodies, Microvesicles and Exosomes“. Journal of Extracellular Vesicles 2, č. 1 (2013): 20677. https://doi.org/10.3402/jev.v2i0.20677.

Dahmane, Selma, Erin Schexnaydre, Jianguo Zhang, et al. „Cryo-Electron Tomography Reveals Coupled Flavivirus Replication, Budding and Maturation“. Nature Communications 17, č. 1 (2026): 828. https://doi.org/10.1038/s41467-026-68483-4.

Dokka, Sujatha, David Toledo, Xianglin Shi, Jianping Ye, a Yon Rojanasakul. „High-Efficiency Gene Transfection of Macrophages by Lipoplexes“. International Journal of Pharmaceutics 206, č. 1–2 (2000): 97–104. https://doi.org/10.1016/S0378-5173(00)00531-7.

Dörner, Kerstin, Michelle Jennifer Gut, Daan Overwijn, et al. „Fluorescent Protein and Peptide Tags Alter Condensate Formation and Dynamics in Vivo and in Vitro“. EMBO Reports 27, č. 1 (2025): 89–121. https://doi.org/10.1038/s44319-025-00626-y.

Fader, C. M., a M. I. Colombo. „Autophagy and Multivesicular Bodies: Two Closely Related Partners“. Cell Death & Differentiation 16, č. 1 (2009): 70–78. https://doi.org/10.1038/cdd.2008.168.

Futter, C. E., A. Pearse, L. J. Hewlett, a C. R. Hopkins. „Multivesicular Endosomes Containing Internalized EGF-EGF Receptor Complexes Mature and Then Fuse Directly with Lysosomes.“ The Journal of Cell Biology 132, č. 6 (1996): 1011–23. https://doi.org/10.1083/jcb.132.6.1011.

Gehl, J. „Electroporation: Theory and Methods, Perspectives for Drug Delivery, Gene Therapy and Research“. Acta Physiologica Scandinavica 177, č. 4 (2003): 437–47. https://doi.org/10.1046/j.1365-201X.2003.01093.x.

Gould, Stephen J., Amy M. Booth, a James E. K. Hildreth. „The Trojan Exosome Hypothesis“. Proceedings of the National Academy of Sciences 100, č. 19 (2003): 10592–97. https://doi.org/10.1073/pnas.1831413100.

Groß, Rüdiger, Hanna Reßin, Pascal Von Maltitz, et al. „Phosphatidylserine-Exposing Extracellular Vesicles in Body Fluids Are an Innate Defence against Apoptotic Mimicry Viral Pathogens“. Nature Microbiology 9, č. 4 (2024): 905–21. https://doi.org/10.1038/s41564-024-01637-6.

Grys, Maciej, Zbigniew Madeja, a Włodzimierz Korohoda. „Avoiding the Side Effects of Electric Current Pulse Application to Electroporated Cells in Disposable Small Volume Cuvettes Assures Good Cell Survival“. Cellular & Molecular Biology Letters 22, č. 1 (2017): 1. https://doi.org/10.1186/s11658-016-0030-0.

Gurung, Sonam, Dany Perocheau, Loukia Touramanidou, a Julien Baruteau. „The Exosome Journey: From Biogenesis to Uptake and Intracellular Signalling“. Cell Communication and Signaling 19, č. 1 (2021): 47. https://doi.org/10.1186/s12964-021-00730-1.

Hong, Chang-Sook, Sonja Funk, Laurent Muller, Michael Boyiadzis, a Theresa L. Whiteside. „Isolation of Biologically Active and Morphologically Intact Exosomes from Plasma of Patients with Cancer“. Journal of Extracellular Vesicles 5, č. 1 (2016): 29289. https://doi.org/10.3402/jev.v5.29289.

Hsu, Shih-Fang, Yih-Gang Goan, Hsien-Yu Tsai, Yi-Ru Lin, Rue-Tsuan Liu, a Jiin-Tsuey Cheng. „An Upstream Regulatory Element Confers Orientation-Independent Enhancement of the TSG101 Promoter Activity in Transformed Cells“. Molecular Biology Reports 39, č. 1 (2012): 517–25. https://doi.org/10.1007/s11033-011-0766-6.

Huber, Roland G., Xin Ni Lim, Wy Ching Ng, et al. „Structure Mapping of Dengue and Zika Viruses Reveals Functional Long-Range Interactions“. Nature Communications 10, č. 1 (2019): 1408. https://doi.org/10.1038/s41467-019-09391-8.

Ishikawa, Tomohiro, Kentaro Narita, Kinichi Matsuyama, a Michiaki Masuda. „Dissemination of the Flavivirus Subgenomic Replicon Genome and Viral Proteins by Extracellular Vesicles“. Viruses 16, č. 4 (2024): 524. https://doi.org/10.3390/v16040524.

Jordan, Elizabeth T., Michelle Collins, Joseph Terefe, Luis Ugozzoli, a Teresa Rubio. „Optimizing Electroporation Conditions in Primary and Other Difficult-to-Transfect Cells“. Journal of Biomolecular Techniques: JBT 19, č. 5 (2008): 328–34.

Joshi, Bhagyashree S., Marit A. De Beer, Ben N. G. Giepmans, a Inge S. Zuhorn. „Endocytosis of Extracellular Vesicles and Release of Their Cargo from Endosomes“. ACS Nano 14, č. 4 (2020): 4444–55. https://doi.org/10.1021/acsnano.9b10033.

Katzmann, David J., Markus Babst, a Scott D. Emr. „Ubiquitin-Dependent Sorting into the Multivesicular Body Pathway Requires the Function of a Conserved Endosomal Protein Sorting Complex, ESCRT-I“. Cell 106, č. 2 (2001): 145–55. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00434-2.

Katzmann, David J., Christopher J. Stefan, Markus Babst, a Scott D. Emr. „Vps27 Recruits ESCRT Machinery to Endosomes during MVB Sorting“. The Journal of Cell Biology 162, č. 3 (2003): 413–23. https://doi.org/10.1083/jcb.200302136.

Kobayashi, Yuki, Yuki Takahashi, Hiroto Otera, Yuriko Higuchi, a Yoshinobu Takakura. „Development of a Simple Labeling Method Using Fluorescent Protein Fusion Proteins Targeting the Membrane Lipids of Small Extracellular Vesicles“. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 272 (květen 2026): 117356. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2026.117356.

Kowkabany, Gabrielle, a Yuping Bao. „Nanoparticle Tracking Analysis: An Effective Tool to Characterize Extracellular Vesicles“. Molecules 29, č. 19 (2024): 4672. https://doi.org/10.3390/molecules29194672.

Kumari, Sharda, Bhaswati Bandyopadhyay, Anamika Singh, et al. „Extracellular Vesicles Recovered from Plasma of Severe Dengue Patients Induce CD4+ T Cell

Suppression through PD-L1/PD-1 Interaction“. mBio 14, č. 6 (2023): e01823-23. https://doi.org/10.1128/mbio.01823-23.

Larios, Jorge, Vincent Mercier, Aurélien Roux, a Jean Gruenberg. „ALIX- and ESCRT-III–Dependent Sorting of Tetraspanins to Exosomes“. Journal of Cell Biology 219, č. 3 (2020). https://doi.org/10.1083/jcb.201904113.

Latanova, Anastasia, Vadim Karpov, a Elizaveta Starodubova. „Extracellular Vesicles in Flaviviridae Pathogenesis: Their Roles in Viral Transmission, Immune Evasion, and Inflammation“. International Journal of Molecular Sciences 25, č. 4 (2024): 2144. https://doi.org/10.3390/ijms25042144.

Laulagnier, Karine, Claude Motta, Safouane Hamdi, et al. „Mast Cell- and Dendritic Cell-Derived Exosomes Display a Specific Lipid Composition and an Unusual Membrane Organization“. Biochemical Journal 380, č. 1 (2004): 161–71. https://doi.org/10.1042/bj20031594.

Li, Pengfei, Sean Hui, Zhenlu Chong, et al. „LRP8 Is an Entry Receptor for Tick-Borne Encephalitis Viruses“. Proceedings of the National Academy of Sciences 122, č. 44 (2025): e2525771122. https://doi.org/10.1073/pnas.2525771122.

Ličková, Martina, Sabína Fumačová Havlíková, Monika Sláviková, a Boris Klempa. „Alimentary Infections by Tick-Borne Encephalitis Virus“. Viruses 14, č. 1 (2021): 56. https://doi.org/10.3390/v14010056.

Liu, Chuqi, Dexiang Liu, Shen Wang, Lu Gan, Xiangliang Yang, a Cong Ma. „Identification of the SNARE Complex That Mediates the Fusion of Multivesicular Bodies with the Plasma Membrane in Exosome Secretion“. Journal of Extracellular Vesicles 12, č. 9 (2023): 12356. https://doi.org/10.1002/jev2.12356.

Liu, Yi, Wuxiang Guan, a Haibin Liu. „Subgenomic Flaviviral RNAs of Dengue Viruses“. Viruses 15, č. 12 (2023): 2306. https://doi.org/10.3390/v15122306.

Marca, Roberta Della, Rosa Giugliano, Carla Zannella, et al. „Role of Exosomes in Viral Infections: A Narrative Review“. Virus Research 361 (listopad 2025): 199644. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2025.199644.

Marklewitz, Marco, a Sandra Junglen. „Evolutionary and Ecological Insights into the Emergence of Arthropod-Borne Viruses“. Acta Tropica 190 (únor 2019): 52–58. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.10.006.

Martínez-Rojas, Pedro Pablo, Elizabeth Quiroz-García, Verónica Monroy-Martínez, Lourdes Teresa Agredano-Moreno, Luis Felipe Jiménez-García, a Blanca H. Ruiz-Ordaz. „Participation of Extracellular Vesicles from Zika-Virus-Infected Mosquito Cells in the Modification of Naïve Cells' Behavior by Mediating Cell-to-Cell Transmission of Viral Elements“. Cells 9, č. 1 (2020): 123. https://doi.org/10.3390/cells9010123.

Martins, Sharon De T., Diogo Kuczera, Jan Lötvall, Juliano Bordignon, a Lysangela R. Alves. „Characterization of Dendritic Cell-Derived Extracellular Vesicles During Dengue Virus Infection“. Frontiers in Microbiology 9 (srpen 2018): 1792. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01792.

Mathieu, Mathilde, Nathalie Névo, Mabel Jouve, et al. „Specificities of Exosome versus Small Ectosome Secretion Revealed by Live Intracellular Tracking of CD63 and CD9“. Nature Communications 12, č. 1 (2021): 4389. https://doi.org/10.1038/s41467-021-24384-2.

Maximova, Olga A., a Alexander G. Pletnev. „Flaviviruses and the Central Nervous System: Revisiting Neuropathological Concepts“. Annual Review of Virology 5, č. 1 (2018): 255–72. https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092917-043439.

Mercier, Vincent, Jorge Larios, Guillaume Molinard, et al. „Endosomal Membrane Tension Regulates ESCRT-III-Dependent Intra-Lumenal Vesicle Formation“. Nature Cell Biology 22, č. 8 (2020): 947–59. https://doi.org/10.1038/s41556-020-0546-4.

Mishra, Ritu, Anismrita Lahon, a Akhil C. Banerjea. „Dengue Virus Degrades USP33–ATF3 Axis via Extracellular Vesicles to Activate Human Microglial Cells“. The Journal of Immunology 205, č. 7 (2020): 1787–98. https://doi.org/10.4049/jimmunol.2000411.

Morales-Kastresana, Aizea, Bill Telford, Thomas A. Musich, et al. „Labeling Extracellular Vesicles for Nanoscale Flow Cytometry“. Scientific Reports 7, č. 1 (2017): 1878. https://doi.org/10.1038/s41598-017-01731-2.

Nabhan, Joseph F., Ruoxi Hu, Raymond S. Oh, Stanley N. Cohen, a Quan Lu. „Formation and Release of Arrestin Domain-Containing Protein 1-Mediated Microvesicles

(ARMMs) at Plasma Membrane by Recruitment of TSG101 Protein“. Proceedings of the National Academy of Sciences 109, č. 11 (2012): 4146–51. https://doi.org/10.1073/pnas.1200448109.

Narayan, Rohan, a Shashank Tripathi. „Intrinsic ADE: The Dark Side of Antibody Dependent Enhancement During Dengue Infection“. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 10 (říjen 2020): 580096. https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.580096.

Nolte-‘t Hoen, Esther, Tom Cremer, Robert C. Gallo, a Leonid B. Margolis. „Extracellular Vesicles and Viruses: Are They Close Relatives?“ Proceedings of the National Academy of Sciences 113, č. 33 (2016): 9155–61. https://doi.org/10.1073/pnas.1605146113.

Pattanakitsakul, Sa-nga, Jesdaporn Poungsawai, Rattiyaporn Kanlaya, Supachok Sinchaikul, Shui-Tein Chen, a Visith Thongboonkerd. „Association of Alix with Late Endosomal Lysobisphosphatidic Acid Is Important for Dengue Virus Infection in Human Endothelial Cells“. Journal of Proteome Research 9, č. 9 (2010): 4640–48. https://doi.org/10.1021/pr100357f.

Pegtel, D. Michiel, a Stephen J. Gould. „Exosomes“. Annual Review of Biochemistry 88, č. 1 (2019): 487–514. https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-013118-111902.

Qin, Jun, a Qing Xu. „Functions and Application of Exosomes“. Acta Poloniae Pharmaceutica 71, č. 4 (2014): 537–43.

Ramanathan, Harish N., Shuo Zhang, Florian Douam, et al. „A Sensitive Yellow Fever Virus Entry Reporter Identifies Valosin-Containing Protein (VCP/P97) as an Essential Host Factor for Flavivirus Uncoating“. mBio 11, č. 2 (2020): e00467-20. https://doi.org/10.1128/mBio.00467-20.

Raposo, G., H. W. Nijman, W. Stoorvogel, et al. „B Lymphocytes Secrete Antigen-Presenting Vesicles.“ The Journal of Experimental Medicine 183, č. 3 (1996): 1161–72. https://doi.org/10.1084/jem.183.3.1161.

Robbins, Paul D., a Adrian E. Morelli. „Regulation of Immune Responses by Extracellular Vesicles“. Nature Reviews Immunology 14, č. 3 (2014): 195–208. https://doi.org/10.1038/nri3622.

Safadi, Daed El, Grégorie Lebeau, Alisé Lagrave, et al. „Extracellular Vesicles Are Conveyors of the NS1 Toxin during Dengue Virus and Zika Virus Infection“. Viruses 15, č. 2 (2023): 364. https://doi.org/10.3390/v15020364.

Saleem, Muhammad, Chieh-Wei Chang, Abdul Qadeer, et al. „The emerging role of extracellular vesicles in viral transmission and immune evasion“. Frontiers in Immunology 16 (září 2025): 1634758. https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1634758.

Salloum, Gilbert, Anne R. Bresnick, a Jonathan M. Backer. „Macropinocytosis: Mechanisms and Regulation“. Biochemical Journal 480, č. 5 (2023): 335–62. https://doi.org/10.1042/BCJ20210584.

Schürz, Melanie, Joachim Danmayr, Maria Jaritsch, et al. „EVAnalyzer: High Content Imaging for Rigorous Characterisation of Single Extracellular Vesicles Using Standard Laboratory Equipment and a New Open-source ImageJ/Fiji Plugin“. Journal of Extracellular Vesicles 11, č. 12 (2022): 12282. https://doi.org/10.1002/jev2.12282.

Skog, Johan, Tom Würdinger, Sjoerd Van Rijn, et al. „Glioblastoma Microvesicles Transport RNA and Proteins That Promote Tumour Growth and Provide Diagnostic Biomarkers“. Nature Cell Biology 10, č. 12 (2008): 1470–76. https://doi.org/10.1038/ncb1800.

Slonchak, Andrii, Brian Clarke, Jason Mackenzie, Alberto Anastacio Amarilla, Yin Xiang Setoh, a Alexander A. Khromykh. „West Nile Virus Infection and Interferon Alpha Treatment Alter the Spectrum and the Levels of Coding and Noncoding Host RNAs Secreted in Extracellular Vesicles“. BMC Genomics 20, č. 1 (2019): 474. https://doi.org/10.1186/s12864-019-5835-6.

Starodubova, E. S., Anastasia Latanova, Y. V. Kuzmenko, a Popenko V.I. „Expression of tick-borne encephalitis virus nonstructural protein 1 stimulates the secretion of extracellular vesicles capable of activating IL-1β production“. Č. 415-425. Sek. 59. Molekulyarnaya Biologiya 2025, č. 3 (b.r.).

Stiasny, Karin, Christian Kössl, Jean Lepault, Félix A. Rey, a Franz X. Heinz. „Characterization of a Structural Intermediate of Flavivirus Membrane Fusion“. PLoS Pathogens 3, č. 2 (2007): e20. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030020.

Stoorvogel, Willem, Ger J. Strous, Hans J. Geuze, Viola Oorschot, a Alan L. Schwartzt. „Late Endosomes Derive from Early Endosomes by Maturation“. Cell 65, č. 3 (1991): 417–27. https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90459-C.

Sultana, Hameeda, a Girish Neelakanta. „Arthropod Exosomes as Bubbles with Message(s) to Transmit Vector-Borne Diseases“. Current Opinion in Insect Science 40 (srpen 2020): 39–47. https://doi.org/10.1016/j.cois.2020.05.017.

Tabata, Keisuke, Masaru Arimoto, Masashi Arakawa, et al. „Unique Requirement for ESCRT Factors in Flavivirus Particle Formation on the Endoplasmic Reticulum“. Cell Reports 16, č. 9 (2016): 2339–47. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.07.068.

Taslem Mourosi, Jarin, Ayobami Awe, Swati Jain, a Himanshu Batra. „Nucleic Acid Vaccine Platform for DENGUE and ZIKA Flaviviruses“. Vaccines 10, č. 6 (2022): 834. https://doi.org/10.3390/vaccines10060834.

Théry, Clotilde, Kenneth W. Witwer, Elena Aikawa, et al. „Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles 2018 (MISEV2018): A Position Statement of the International Society for Extracellular Vesicles and Update of the MISEV2014 Guidelines“. Journal of Extracellular Vesicles 7, č. 1 (2018): 1535750. https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750.

Tiberti, Natalia, Concetta Castilletti, a Federico Giovanni Gobbi. „Extracellular vesicles in arbovirus infections: from basic biology to potential clinical applications“. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 15 (duben 2025): 1558520. https://doi.org/10.3389/fcimb.2025.1558520.

Trajkovic, Katarina, Chieh Hsu, Salvatore Chiantia, et al. „Ceramide Triggers Budding of Exosome Vesicles into Multivesicular Endosomes“. Science 319, č. 5867 (2008): 1244–47. https://doi.org/10.1126/science.1153124.

Tran, Pham-Tue-Hung, Abhilash I. Chiramel, Magnus Johansson, a Wessam Melik. „Roles of ESCRT Proteins ALIX and CHMP4A and Their Interplay with Interferon-Stimulated Gene 15 during Tick-Borne Flavivirus Infection“. Journal of Virology 96, č. 3 (2022): e01624-21. https://doi.org/10.1128/JVI.01624-21.

Van Niel, Guillaume, Gisela D’Angelo, a Graça Raposo. „Shedding Light on the Cell Biology of Extracellular Vesicles“. Nature Reviews Molecular Cell Biology 19, č. 4 (2018): 213–28. https://doi.org/10.1038/nrm.2017.125.

van Niel, Guillaume, Stéphanie Charrin, Sabrina Simoes, et al. „The Tetraspanin CD63 Regulates ESCRT-Independent and -Dependent Endosomal Sorting during Melanogenesis“. Developmental Cell 21, č. 4 (2011): 708–21. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.08.019.

Velandia-Romero, Myriam Lucia, María Angélica Calderón-Peláez, Arturo Balbás-Tepedino, et al. „Extracellular Vesicles of U937 Macrophage Cell Line Infected with DENV-2 Induce Activation in Endothelial Cells EA.Hy926“. PLOS ONE 15, č. 1 (2020): e0227030. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227030.

Vora, Ashish, Wenshuo Zhou, Berlin Londono-Renteria, et al. „Arthropod EVs Mediate Dengue Virus Transmission through Interaction with a Tetraspanin Domain Containing Glycoprotein Tsp29Fb“. Proceedings of the National Academy of Sciences 115, č. 28 (2018). https://doi.org/10.1073/pnas.1720125115.

Wei, Denghui, Weixiang Zhan, Ying Gao, et al. „RAB31 Marks and Controls an ESCRT-Independent Exosome Pathway“. Cell Research 31, č. 2 (2021): 157–77. https://doi.org/10.1038/s41422-020-00409-1.

Welsh, Joshua A., Deborah C. I. Goberdhan, Lorraine O'Driscoll, et al. „Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles (MISEV2023): From Basic to Advanced Approaches“. Journal of Extracellular Vesicles 13, č. 2 (2024): e12404. https://doi.org/10.1002/jev2.12404.

Welsch, Sonja, Sven Miller, Ines Romero-Brey, et al. „Composition and Three-Dimensional Architecture of the Dengue Virus Replication and Assembly Sites“. Cell Host & Microbe 5, č. 4 (2009): 365–75. https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.03.007.

Wu, Yan-Wei, Clément Mettling, Shang-Rung Wu, et al. „Autophagy-Associated Dengue Vesicles Promote Viral Transmission Avoiding Antibody Neutralization“. Scientific Reports 6, č. 1 (2016): 32243. https://doi.org/10.1038/srep32243.

Yáñez-Mó, María, Pia R. -M. Siljander, Zoraida Andreu, et al. „Biological Properties of Extracellular Vesicles and Their Physiological Functions“. Journal of Extracellular Vesicles 4, č. 1 (2015): 27066. https://doi.org/10.3402/jev.v4.27066.

Yeh, Shih-Chia, Tania Strilets, Wei-Lian Tan, et al. „The Anti-Immune Dengue Subgenomic Flaviviral RNA Is Present in Vesicles in Mosquito Saliva and Is Associated with

Increased Infectivity“. PLOS Pathogens 19, č. 3 (2023): e1011224. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011224.

York, Sara B., Li Sun, Allaura S. Cone, Leanne C. Duke, Mujeeb R. Cheerathodi, a David G. Meckes. „Zika Virus Hijacks Extracellular Vesicle Tetraspanin Pathways for Cell-to-Cell Transmission“. mSphere 6, č. 3 (2021): e00192-21. https://doi.org/10.1128/mSphere.00192-21.

Yu, Yufeng, Lulu Si, a Yu Meng. „Flavivirus Entry Inhibitors“. In Virus Entry Inhibitors, roč. 1366, editoval Shibo Jiang a Lu Lu. Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer Singapore, 2022. https://doi.org/10.1007/978-981-16-8702-0_11.

Yubero, Noemí, Ángeles Jiménez-Marín, Concepción Lucena, Manuel Barbancho, a Juan J. Garrido. „Immunohistochemical Distribution of the Tetraspanin CD9 in Normal Porcine Tissues“. Molecular Biology Reports 38, č. 2 (2011): 1021–28. https://doi.org/10.1007/s11033-010-0198-8.

Zhang, Bin, Mei Wang, Aihua Gong, et al. „HucMSC-Exosome Mediated-Wnt4 Signaling Is Required for Cutaneous Wound Healing“. Stem Cells 33, č. 7 (2015): 2158–68. https://doi.org/10.1002/stem.1771.

Zhang, Chaofan, Yue Wu, Yuezhou Wang, et al. „Bioengineering of Extracellular Vesicles with Scaffold Proteins for Drug Delivery“. Journal of Nanobiotechnology 24, č. 1 (2026): 160. https://doi.org/10.1186/s12951-026-04142-6.

Zhang, Jiayi, Annie Brown, Brendan Johnson, et al. „Genetically Engineered Extracellular Vesicles Harboring Transmembrane Scaffolds Exhibit Differences in Their Size, Expression Levels of Specific Surface Markers and Cell-Uptake“. Pharmaceutics 14, č. 12 (2022): 2564. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14122564.

Zhang, Xia, Justin P. Edwards, a David M. Mosser. „The Expression of Exogenous Genes in Macrophages: Obstacles and Opportunities“. In Macrophages and Dendritic Cells, roč. 531, editoval Neil E. Reiner. Methods in Molecular BiologyTM. Humana Press, 2009. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-396-7_9.

Zhang, Xianwen, Xuping Xie, Hongjie Xia, et al. „Zika Virus NS2A-Mediated Virion Assembly“. mBio 10, č. 5 (2019): e02375-19. https://doi.org/10.1128/mBio.02375-19.

Zhang, Y. „Structures of immature flavivirus particles“. The EMBO Journal 22, č. 11 (2003): 2604–13. https://doi.org/10.1093/emboj/cdg270.

Zhao, Fanfan, Yongfen Xu, Na Liu, et al. „Extracellular Vesicles from Zika Virus-infected Cells Display Viral E Protein That Binds ZIKV-neutralizing Antibodies to Prevent Infection Enhancement“. The EMBO Journal 42, č. 6 (2023): e112096. https://doi.org/10.15252/embj.2022112096.

Zhou, Wenshuo, Faizan Tahir, Joseph Che-Yen Wang, et al. „Discovery of Exosomes From Tick Saliva and Salivary Glands Reveals Therapeutic Roles for CXCL12 and IL-8 in Wound Healing at the Tick–Human Skin Interface“. Frontiers in Cell and Developmental Biology 8 (červenec 2020): 554. https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00554.

Zhou, Wenshuo, Michael Woodson, Biswas Neupane, et al. „Exosomes Serve as Novel Modes of Tick-Borne Flavivirus Transmission from Arthropod to Human Cells and Facilitates Dissemination of Viral RNA and Proteins to the Vertebrate Neuronal Cells“. PLOS Pathogens 14, č. 1 (2018): e1006764. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006764.

Zhou, Wenshuo, Michael Woodson, Michael B. Sherman, Girish Neelakanta, a Hameeda Sultana. „Exosomes Mediate Zika Virus Transmission through SMPD3 Neutral Sphingomyelinase in Cortical Neurons“. Emerging Microbes & Infections 8, č. 1 (2019): 307–26. https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1578188.

Zhu, Xun, Zhenjian He, Jie Yuan, et al. „IFITM3-Containing Exosome as a Novel Mediator for Anti-Viral Response in Dengue Virus Infection: Antiviral Effect of IFITM3 Mediated by Exosome“. Cellular Microbiology 17, č. 1 (2015): 105–18. https://doi.org/10.1111/cmi.12339.

Zou, Xue, Meng Yuan, Tongyu Zhang, Nan Zheng, a Zhiwei Wu. „EVs Containing Host Restriction Factor IFITM3 Inhibited ZIKV Infection of Fetuses in Pregnant Mice through Trans-Placenta Delivery“. Molecular Therapy 29, č. 1 (2021): 176–90. https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.09.026.