

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Jana Horáčková

**Exosomy u parazitických prvoků**  
Exosomes in parasitic protists

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Školitel: prof. RNDr. Jan Tachezy, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Petr Rada, Ph.D.

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 7. 8. 2019

**Poděkování:** Chtěla bych poděkovat RNDr. Petru Radovi, Ph.D. a prof. RNDr. Janu Tachezemu, Ph.D. za odborné vedení, za pomoc, cenné připomínky a oběma především za trpělivost při zpracování této práce.

## **Abstrakt**

Většina buněk uvolňuje do prostředí extracelulární váčky. Tyto váčky jsou exosomy, ektosomy a apoptotická tělíska. Hlavní funkcí ektosomů a exosomů je mezibuněčná komunikace a transport molekul mezi buňkami. Cílem této bakalářské práce je shrnutí dosavadních poznatků o exosomech a ektosomech a shrnutí toho, jak se tyto váčky podílejí na patogenitě parazitických prvoků. Parazitičtí prvoci vylučují exosomy a ektosomy, které parazitovi umožňují přežít v hostiteli. Tyto váčky parazita mohou ovlivnit imunitní systém hostitele a také usnadnit invazi intracelulárních prvoků do hostitelských buněk.

**Klíčová slova:** exosom, ektosom, parazit, prvok, mikrováček, buňka, komunikace

## **Abstract**

Most cells release extracellular vesicles. These vesicles are exosomes, ectosomes and apoptotic bodies. The main function of ectosomes and exosomes is the intracellular communication and transport of molecules between cells. The goal of this bachelor thesis is to review the current knowledge about exosomes and ectosomes and how these vesicles contribute to the pathogenicity of parasitic protists. The parasitic protists release exosomes and ectosomes that contribute to their development in the host and play a key role in their pathogenicity. Exosomes and ectosomes can also affect the immune system of the host and facilitate the invasion of parasitic protists into the host cells.

**Keywords:** exosome, ectosome, parasite, protist, microvesicles, host cell, pathogenicity

## Seznam zkratek

TNF (tumor necrosis factor)	TGF- $\beta$ (transforming growth factor $\beta$ )
NK (natural killer cells)	TNF (tumor necrosis factor)
ILVs (intraluminal vesicles)	FCaBP (flagellar calcium binding protein)
MFSD2a (major facilitator superfamily domain 2a)	MASP (mucin-associated surface protein)
ESCRT (endosomal sorting complexes)	cAMP (cyclic adenosine monophosphate)
Required for transport machinery)	TLF (trypanosome lytic factor)
Hrs (hepatocyte growth factor – regulated tyrosin kinase substrate)	GP63 (glycoprotein 63)
STAM (signal transducing adaptor molecule)	GRA (dense granule protein)
TSG101 (tumor susceptibility 101)	MIC (major histocompatibility complex class I chain-related gene)
Vps (vacuolar protein sorting)	INF - $\gamma$ (interferon $\gamma$ )
Mvb12 (multivesicular body sorting factor 12)	miRNA (micro RNA)
Snf7 (sucrose nonfermenting 7)	
Doa4 (degradation of alpha 4)	
ALIX (apoptosis-linked gene 2-interacting protein x)	
ATP (adenosine triphosphate)	
hnRNPA2B1 (heterogenous nuclear ribonucleo protein A2B1)	
CD (cluster of differentiation)	
ICAM-1 (intercellular adhesion molecule)	
MHC (major histocompatibility complex)	
HSP (heatshock protein)	
ARF6 (ADP ribosylation factor 6)	
LVs (large vesicles)	
IMC (inner membrane complex)	
SAG (major surface antigen)	
PfEMP1 ( <i>Plasmodium falciparum</i> erythrocyte Membrane protein 1)	
SBP1 (skeleton binding protein 1)	
RESA (ring-infected erythrocyte surface antigen)	
ATF2 (activating transcriptional factor 2)	
HMGB1 (high mobility group box 1)	
gRNA (guide RNA)	
VSG (variable surface glycoproteins)	
SRA (serum-resistance associated protein)	

# Obsah

Obsah.....	1
1. Úvod.....	2
2. Extracelulární váčky.....	3
2.1. Apoptotická tělíska.....	3
2.2. Exosomy.....	5
2.2.1. Biogeneze exosomů.....	5
2.2.2. Transport molekul do exosomů.....	7
2.2.3. Obsah exosomů.....	9
2.2.4. Funkce exosomů.....	9
2.3. Ektosomy.....	10
3. Extracelulární váčky parazitických prvoků.....	11
3.1. Řád <i>Trichomonadida</i> .....	11
3.1.1. <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	11
3.2. Kmen <i>Apicomplexa</i> .....	13
3.2.1. <i>Toxoplasma gondii</i> .....	14
3.2.2. Rod <i>Plasmodium</i> .....	16
3.2.3. <i>Cryptosporidium parvum</i> .....	18
3.3. Třída <i>Kinetoplastida</i> .....	19
3.3.1. <i>Trypanosoma brucei</i> .....	19
3.3.2. <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	21
3.3.3. Rod <i>Leishmania</i> .....	22
4. Závěr.....	24
5. Použitá literatura.....	25

# 1. Úvod

Exosomy jsou extracelulární váčky, které uvolňuje buňka do extracelulárního prostoru. Uvnitř těchto váček se nachází specifický obsah, který je uzavřen membránou. Exosomy se nacházejí ve všech tělních tekutinách a pohybují se prakticky po celém těle. Mezi extracelulární váčky se dále řadí ektosomy a apoptotická tělíška. Každý z těchto váček vzniká jiným způsobem a má různou velikost. V posledních pěti letech se intenzivně zkoumá význam ektosomů a exosomů v kontextu parazitizmu. Tyto extracelulární váčky napomáhají parazitům k přežití uvnitř hostitele a zvyšují tak virulenci parazita (Coakley, Maizels and Buck 2015). Do dnešní doby byly ektosomy a exosomy prozkoumané u některých parazitů ze skupin organismů *Opisthokonta*, *Chromalveolata* a *Excavata*.

## 2. Extracelulární váčky

Extracelulární váčky jsou útvary, které se uvolňují do extracelulárního prostoru exocytózou. Tento proces probíhá u většiny eukaryotických buněk a hraje roli v různých fyziologických procesech. Buňky pomocí extracelulárních váček odstraňují proteiny, které již nejsou potřebné, recyklují receptory a komunikují mezi sebou. Každý váček nese specifický náklad, který je uvolněn do cytoplasmy cílové buňky a indukuje v ní buněčnou odpověď. Je několik typů extracelulárních váček, které mají různý obsah, jsou jinak veliké a vznikají rozdílnými způsoby. Extracelulární váčky jsou apoptotická tělíska, exosomy a ektosomy (Caruso and Poon 2018).

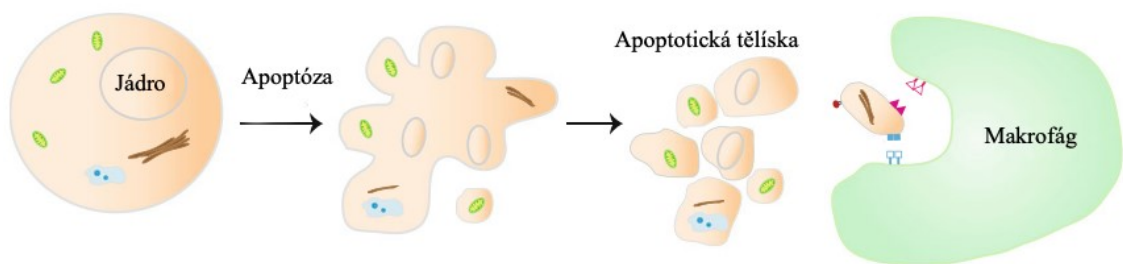
### 2.1. Apoptotická tělíska

Apoptotická tělíska neboli apoptosomy vznikají během programované buněčné smrti (Akers et al. 2013). Během tohoto řízeného fyziologického procesu dochází k rozpadu buňky na jednotlivá apoptotická tělíska o velikosti 50 nm až 500 nm (obr.1) (Dreyer and Baur 2016). Apoptotická tělíska se nacházejí v extracelulárním prostředí a mohou obsahovat celé buněčné organely (Taylor, Cullen, and Martin 2008). Tím se liší od exosomů a ektosomů, kde se nacházejí pouze proteiny, lipidy a nukleové kyseliny.

Programovaná buněčná smrt může být spuštěna vnější nebo vnitřní dráhou. Dráha vnější je aktivována ligandy, které pocházejí z extracelulárního prostoru. Navázáním ligandu například TNF (tumor necrosis factor) na buněčný receptor se spustí dráha, která aktivuje protein kaspázu 8 (S. Elmore 2007; Locksley, Killeen, and Lenardo 2004). Vnitřní dráhu aktivuje cytochrom c, který se uvolní z mitochondrií do cytoplazmy a spouští dráhu, která aktivuje kaspázu 9 (Li et al. 1997). Existuje ještě jedna dráha, která aktivuje apoptózu v buňce. Tuto dráhu aktivuje serinová proteáza granzym, kterou uvolňují cytotoxické T-lymfocyty a NK buňky (natural killer cells) (Trapani and Smyth 2002). Granzym spouští dráhu, která aktivuje kaspázu 10. Každá z těchto tří kaspáz (8,9 a 10) aktivuje kaspázu 3, která způsobí rozpad DNA, degradaci cytoskeletu a indukuje vznik apoptotických tělísek (S. Elmore 2007).

V extracelulárním prostoru jsou pak apoptosomy odstraněny makrofágy (Erwig and Henson 2008). Makrofágy jsou aktivovány specifickými molekulami, které se nachází na membráně apoptotických tělísek. Musí dojít ke strukturální změně membrány apoptotického tělíska, aby se

na ni mohly tyto specifické molekuly navázat. Jedna z těchto změn je oxidace molekul na povrchu apoptotických tělísek. Díky oxidaci se může navázat na membránu komplementový protein C3b a trombospondin, které rozeznávají receptory makrofágů (Friedl, Vischer, and Freyberg 2002; Mevorach et al. 1998). Další strukturální změnou je přeuspořádání fosfolipidů v membráně apoptotického tělíska. Fosfatidylserin, který se nachází na cytosolické straně dvojvrstvy membrány tělíska se přesouvá do vnější části membrány (Fadok et al. 1992). Tato strukturální změna na membráně apoptotického tělíska je rozeznávána makrofágy. Makrofágy se aktivují a fagocytují apoptotická tělíska (obr.1).

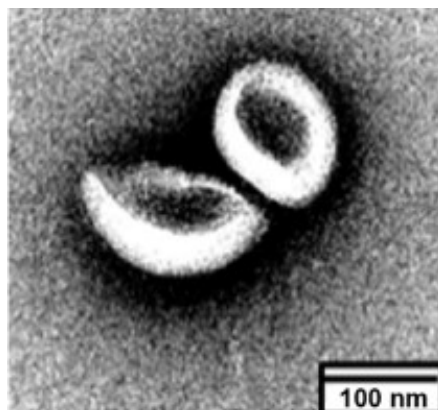


Obr. 1: Na obrázku je znázorněná biogeneze apoptotických tělísek. V pravo na obrázku je makrofág, jehož receptory rozeznávají specifické molekuly na apoptotických tělískách a dochází k fagocytóze (Akers et al. 2013).



## 2.2.Exosomy

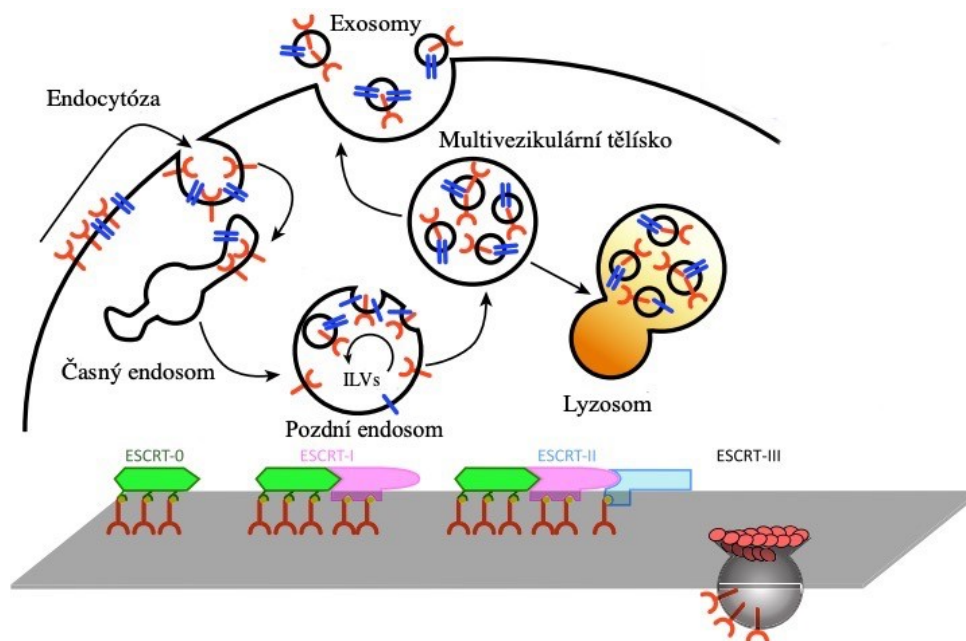
Exosomy jsou váčky o velikosti 50 až 150 nm (Meldolesi 2016), které uvolňuje buňka do extracelulárního prostoru (obr.2). Tyto váčky splývají s cílovou buňkou a jejich obsah se uvolňuje do cytosolu. Exosomy transportují různé molekuly mezi buňkami (např. proteiny, RNA), a ty mohou indukovat příslušné změny v cílové buňce. Také se podílí na mezibuněčné komunikaci.



Obr. 2: Na obrázku jsou exosomy zachycené elektronovým mikroskopem (Twu et al. 2013).

### 2.2.1. Biogeneze exosomů

Biogeneze exosomů začíná v pozdním endosomu, kde dochází k invaginaci endosomální membrány. Vznikají intraluminální váčky a vytváří se tak multivezikulární tělísko (obr.4) (Anand et al. 2019). Intraluminální váčky jsou membránové útvary, které jsou později uvolňovány z buňky jako exosomy. Během vzniku intraluminálních váček se do nich transportují různé molekuly z cytoplazmy, ale mohou se do nich transportovat i membránové proteiny. Osud vzniklého multivezikulárního tělíska je různý. Může splývat s plazmatickou membránou a dochází tak k uvolněním exosomů do extracelulárního prostoru nebo se spojí s lysozomem a dochází k degradaci jeho obsahu (Akers et al. 2013). Osud multivezikulárního tělíska je řízen Rab GTPázami, které jsou navázané na membránu tělíska. Tyto GTPázy se vážou na molekulární motory, které se pohybují po buněčném cytoskeletu (Kelly et al. 2012). Díky těmto molekulárním motorům se multivezikulární tělísko transportuje k lysozomu nebo k plazmatické membráně. Když se multivezikulární tělísko dostane k plazmatické membráně nastává fúze na které se podílejí SNARE proteiny a Rab GTPázy (Wei et al. 2017).



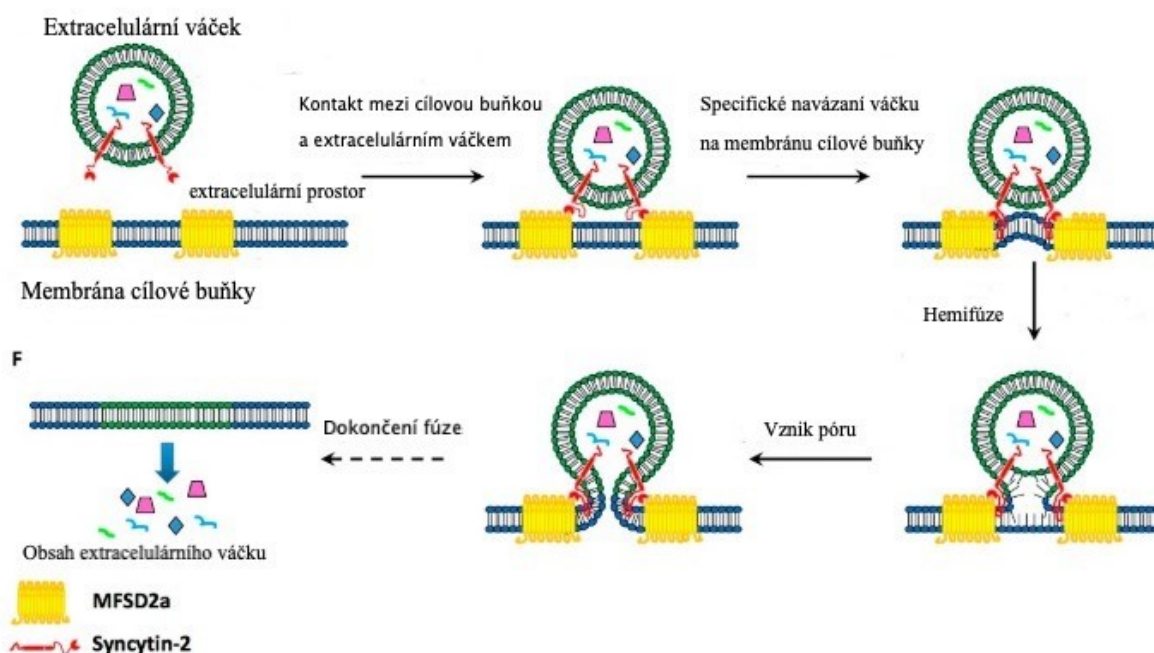
Obr. 3: Vznik exosomů (Meldolesi 2016).

Na obrázku je znázorněný vznik exozomů z multivezikulárního tělíska, které vzniká invaginací membrány pozdního endosomu. V pozdním endosomu vznikají ILVs (intraluminal vesicles), které jsou následně uvolňovány buňkou jako exosomy, nebo jsou degradovány v lyzozomu. V dolní části obrázku jsou znázorněné komplexy ESCRT (endosomal sorting complexes required for transport machinery) dráhy.

Po uvolnění exosomů do extracelulárního prostoru mají tyto váčky různý osud. Jejich membrána se může rozpustit a obsah váček putuje samostatně extracelulárním prostorem, nebo se nerozpustí a obsah zůstává v exosomech (Prada and Meldolesi 2016). Molekuly, které putují mimo váček jsou například: TNF, interleukin- $\beta$ 1 a různé růstové faktory (Meldolesi 2016). Tyto molekuly se vážou na receptory cílových buněk a indukují v nich příslušnou odpověď.

Exosomy uvolněné buňkou splývají s membránou cílové buňky. Tento děj se jmenuje fúze. Nejprve musí dojít k navázání exosomu na membránu cílové buňky. To je možné díky transmembránovému proteinu syncytinu, který se nachází na povrchu exosomu a jeho receptoru MFSD2a (major facilitator super family domain 2a) na cílové buněčné membráně (Prada and Meldolesi 2016). Po interakci tohoto proteinu a receptoru dojde ke změně konformace syncytinu, který vnoří svou hydrofobní smyčku do plazmatické membrány (Podbilewicz 2014). V membráně díky tomu dojde ke změně uspořádání lipidů a proteinů

(Prada and Meldolesi 2016). Po těchto procesech nastává tzv. hemifúze (obr.3). Při hemifúzi dochází ke spojení extracelulárních membrán exosomu a plazmatické membrány cílové buňky. Po hemifúzi se vytvoří pór a obě vrstvy membrán jsou spojeny. Po vytvoření póru se do cílové buňky dostane obsah exosomu a váček splyne s membránou.



Obr.4: Fúze extracelulárního váčku s plazmatickou membránou cílové buňky (Prada and Meldolesi 2016).

## 2.2.2. Transport molekul do exosomů

Na transportu proteinů do intraluminálních váčků a na vzniku multivezikulárního tělíska se podílí komplexy tzv. ESCRT dráhy (endosomal sorting complexes required for transport machinery). ESCRT dráha se skládá z pěti komplexů ESCRT 0, I, II, III a vps4-Vta1 (Henne, Buchkovich, and Emr 2011). Komplex ESCRT-0 se váže na fosfatidylinositol-3-fosfát, který je na povrchu membrány endozomu (Raiborg et al. 2001). Tento komplex se přímo nepodílí na vzniku multivezikulárního tělíska, ale hraje důležitou roli při transportu proteinů do intraluminálních váčků (Wollert and Hurley 2010). Na proteiny, které jsou určeny k transportu do intraluminálního váčku se váže ubiquitin (Piper and Katzmann 2007). Takto značené proteiny jsou rozeznávané všemi podjednotkami komplexu ESCRT-0. Podjednotky

tohoto komplexu jsou Hrs (hepatocyte growth factor – regulated tyrosin kinase substrate) a STAM (signal transducing adaptor molekule) (Henne, Buchkovich, and Emr 2011). Na podjednotku Hrs se váže komplex ESCRT-I pomocí své podjednotky TSG101 (tumor susceptibility gene 101). Komplex ESCRT-I obsahuje ještě další tři podjednotky vps28 (vacuolar protein sorting), vps37 a Mvb12 (multivesicular body 12) (Chu et al. 2006; Katzmann, Babst, and Emr 2001). Podjednotka vps36 komplexu ESCRT-II se váže na podjednotku vps28 komplexu ESCRT-I. Komplex ESCRT-II se skládá z dalších dvou podjednotek: vps25 a vps22 (Babst et al. 2002; Henne, Buchkovich, and Emr 2011). Komplexy ESCRT I a II indukují invaginaci endozomální membrány, vážou svými podjednotkami ubiquitinované proteiny a transportují je do vznikajícího intraluminálního váčku (Babst 2011). Dalším komplexem, který se účastní této dráhy je komplex ESCRT-III. Tento komplex se váže na podjednotku vps25 komplexu ESCRT-I/II pomocí své podjednotky vps20 (Henne, Buchkovich, and Emr 2011). Stejně jako předchozí komplexy i komplex ESCRT III obsahuje další podjednotky. Jsou to proteiny: vps24, vps2 a snf7 (sucrose non-fermenting 7) (Babst et al. 2002). Funkcí tohoto komplexu je odstranění ubiquitinů z proteinů a následné odštěpení vznikajících váčků od membrány endozomu. Odstranění ubiquitinů zajišťuje enzym Doa4 (degradation of α-4), který se přes protein ALIX (apoptosis-linked gene 2-interacting protein x) váže na podjednotku snf7 (Henne, Buchkovich, and Emr 2011; Luhtala and Odorizzi 2004). Posledním krokem ESCRT dráhy je odstranění komplexu ESCRT-III z membrány endozomu. Tento krok zajišťuje komplex vps4-vta1 s ATPázovou aktivitou, který hydrolyzuje ATP (adenosine triphosphate) a díky tomu se uvolní potřebná energie pro odštěpení ESCRT-III (Alonso Y Adell and Teis 2011).

Mimo dráhu ESCRT se na transportu proteinů do intraluminálních váčků podílí tetraspaniny a lipidy (Anand et al. 2019). Tetraspaniny jsou transmembránové proteiny a jsou schopné transportovat některé proteiny do intraluminálních váčků bez komplexů ESCRT dráhy (Verweij et al. 2011). Lipidy, které jsou schopné transportovat proteiny do intraluminálních váčků se jmenují ceramidy (Trajkovic et al. 2008). Ceramidy se nacházejí na membráně endozomu a vznikají ze sfingomyelinu díky enzymu sfingomyelináza (Airola and Hannun 2013).

Do intraluminálních váčků se také transportují lipidy, ale není příliš jasné jakým způsobem (Haraszti et al. 2016).

Další molekuly, které se transportují do intraluminálních váčků jsou nukleové kyseliny. Transport RNA, mRNA a miRNA (microRNA) do těchto váčků probíhá díky RNA vazebným proteinům. Například RNA vazebný protein hnRNPA2B1 (heterogeneous nuclear

ribonucleoprotein A2B1) rozeznává GGAG motiv na 3' konci miRNA a transportuje miRNA do intraluminálních váčků (Villarroya-Beltri et al. 2013).

### 2.2.3. Obsah exosomů

Exosomy obsahují proteiny, lipidy a nukleové kyseliny. Jednotlivé exosomy se mezi sebou liší svým obsahem. Obsah exosomů je popsán v několika webových databázích jako je například ExoCarta (<http://exocarta.org/#>) nebo Vesiclepedia (<http://microvesicles.org>).

Exosomy obsahují membránové i cytosolické proteiny. Typické membránové integrální proteiny exosomů jsou tetraspaniny: CD9 (cluster of differentiation), CD63, CD81, CD82, integriny ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) a komplex MHC I a II (major histocompatibility complex) (Segura et al. 2007; Simpson, Jensen, and Lim 2008). Exosomy obsahují také periferní membránové proteiny, jako například lactadherin. Cytosolické proteiny v exosomech jsou například proteiny komplexů ESCRT dráhy: ALIX, vps a TSG 101 (Simpson, Jensen, and Lim 2008). Dále se v exosomech nacházejí proteiny s různou enzymatickou aktivitou například laktát dehydrogenáza, pyruvát kináza a glukóza-6-fosfát izomeráza (Dong-Sic Choi, Dae-Kyum Kim, Yoon-Keun Kim 2011). V exosomech se také nacházejí proteiny tepelného šoku, jako například HSP90 (heat shock protein), HSP70, různé signální proteiny, proteinové transportéry, proteiny podílející se na translaci a transkripci, proteiny cytoskeletu a cytokiny (Dong-Sic Choi, Dae-Kyum Kim, Yoon-Keun Kim 2011; Qu et al. 2019) Exosomy obsahují řadu lipidů. V exosomální membráně se nachází cholesterol, fosfatidylserin, fosfatidylcholin, sfingomyelin a ceramid (Subra et al. 2007). Exosomy obsahují i cytosolické lipidy například prostaglandiny, leukotrieny včetně jejich prekurzoru - kyseliny arachidonové (Zhang et al. 2019).

Kromě lipidů a proteinů obsahují exosomy i nukleové kyseliny. Uvnitř těchto váčků se nachází nekódující microRNA a kódující mRNA (messenger RNA) (Valadi et al. 2007).

### 2.2.4. Funkce exosomů

Většina buněk v našem těle je schopná uvolňovat exosomy. Jsou to například nervové buňky, fibroblasty, adipocyty, imunitní buňky. Funkce exosomů závisí na jejich původu. Exosomy jsou důležité pro mezibuněčnou komunikaci a transportují mezi buňkami různé signální molekuly, proteiny, lipidy a nukleové kyseliny. Exosomy také mohou změnit vlastnosti cílové

buňky. Po fúzi s buňkou na povrchu membrány cílové buňky zůstanou membránové proteiny exosomu. Tyto membránové proteiny mohou být například adheziny, díky kterým buňka získává nové vlastnosti (Pant, Hilton, and Burczynski 2012).

Nukleové kyseliny v exosomech mohou měnit fenotyp cílové buňky. miRNA v cílové buňce může umlčet expresi cílových proteinů, což v buňce inhibuje nebo stimuluje různé signální dráhy (Prada and Meldolesi 2016). Díky schopnosti transportovat nukleové kyseliny mají exosomy důležitou roli v horizontálním přenosu genetické informace (Prada and Meldolesi 2016). Exosomy jsou také schopné regulovat imunitní odpověď. Exosomy z dendritických buněk transportují antigen pomocí MHC komplexu do dalších dendritických buněk a ty pak aktivují T-lymfocyty (Hoen et al. 2015). Další imunitní buňky, které uvolňují exosomy jsou B-lymfocyty. Exosomy B-lymfocytů přímo prezentují antigen T-lymfocytům a aktivují tak imunitní odpověď. Exosomy se tedy chovají jako antigen prezentující buňky (Graca Raposo, Hans W. Nijman, Willem Stoorvogel, Richtje Leijendekker 1996).

Exosomy se také podílejí na odstranění proteinů, které už nejsou pro buňku důležité. Příkladem jsou retikulocyty, které uvolňují exosomy, aby se zbavily transferinových přenašečů na své membráně (Johnstone et al. 1987).

### **2.3. Ektosomy**

Ektosomy jsou váčky o velikosti 100 až 1000nm (Meldolesi 2016), které uvolňuje buňka do extracelulárního prostoru. Narozdíl od exosomů nevznikají z multivezikulárních tělísek, ale pučením přímo z plazmatické membrány.

Pučení ektosomů začíná změnou uspořádání fosfolipidů v plasmatické membráně mateřské buňky. Po změně uspořádání fosfolipidů následuje reorganizace buněčného cytoskeletu v místě pučení váčku (Surman et al. 2017). Změnu uspořádání fosfolipidů zajišťují vápenaté ionty, které se uvolňují z endoplazmatického retikula (Pap et al. 2009; Surman et al. 2017). Vápenaté ionty aktivují scramblázy a inaktivují flipázy a díky tomu se z intracelulární strany membrány přesouvá fosfatidylserin a fosfatidylethanolamin na stranu extracelulární (Pap et al. 2009). Reorganizaci cytoskeletu zajišťují vápenaté ionty, malé Rho GTPázy a protein ARF6 (ADP-ribosylation factor 6). Vápenaté ionty aktivují dvě proteázy calpain a gelsolin (Pap et al. 2009). Tyto dva proteiny způsobí reorganizaci cytoskeletu, což vede k formaci ektosomu na buněčné membráně. Malé RhoGTPázy a protein ARF6 aktivují dráhy, které také vedou k reorganizaci buněčného cytoskeletu a tím se podílejí na pučení ektosomu (Raposo et al. 2009). Transport proteinů do ektosomů probíhá díky ESCRT dráze. Ostatní molekuly se do

ektosomů transportují podobně jako do intraluminálních váčků. Většina molekul v ektosomech a exosomech je stejná, ale existují proteiny, které se vyskytují vždy pouze v jednom váčku (Meldolesi 2016). U Exosomů jsou to například proteiny CD63 a CD61 a u ektosomů například protein TyA a C1a (Cocucci and Meldolesi 2015).

### **3. Extracelulární váčky parazitických prvoků**

Každoročně se na světě nakazí velká část populace parazitickými prvoky. Parazitičtí prvoci jsou původci mnoha závažných onemocnění jako například malárie, spavé nemoci nebo leishmaniózy.

Parazitičtí prvoci díky extracelulárním váčkům komunikují mezi sebou a ovlivňují chování hostitelských buněk (Coakley, Maizels, and Buck 2015). Exosomy tak přispívají k virulenci parazitů. Obsah váčků se liší podle toho, jestli je uvolňují extracelulární nebo intracelulární parazitičtí prvoci. Váčky z extracelulárního parazitického prvoka obsahují pouze jeho vlastní molekuly. Nicméně parazitičtí prvoci se mohou nacházet i v intracelulárním prostoru buňky. Intracelulární parazitičtí prvoci uvolňují váčky, které obsahují jejich vlastní molekuly a také obsahují molekuly z hostitelské buňky. Nejvíce zkoumané kmeny, které využívají extracelulární váčky ke zvyšování své virulence, jsou *Apicomplexa* a *Kinetoplastida* (Fernandez-Becerra et al. 2014). Mimo tyto dvě skupiny se také extracelulární váčky zkoumají u prvoků *Trichomonas vaginalis* a *Giardia intestinalis*.

#### **3.1.Řád *Trichomonadida***

##### **3.1.1. *Trichomonas vaginalis***

*T. vaginalis* je anareobní prvok, který se nachází v urogenitálním traktu hostitele, kde adheruje k buňkám epitelu. K pohybu mu slouží čtyři bičíky a undulující membrána (Benchimol 2004). Tento prvok má přeměněné mitochondrie na tzv. anaerobní hydrogenosom. Hlavní funkcí hydrogenosmu je produkce ATP substrátovou fosforylací a syntéza železosírných center. Metabolická aktivita hydrogenosomu je spojená s produkcí vodíku (Müller et al. 2012, Kusdian and Gould 2014).

*T. vaginalis* se přenáší pohlavním stykem a je původcem onemocnění tzv. trichomonózy. Toto parazitární onemocnění u jedince zvyšuje riziko rakoviny prostaty, nakažení virem HIV a může zapříčinit předčasný porod (McClelland et al. 2007; Stark et al. 2009; Swygard et al.

2004). U mužů trichomonóza probíhá asymptomaticky, zatímco u žen dochází často k zánětu pochvy a močové trubice (Swygard et al. 2004).

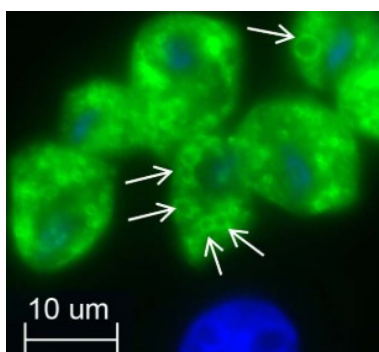
Tento prvok netvoří žádné cysty a mimo svého hostitele brzy hyne. *T. vaginalis* má pouze stádium trofozoita (Schwebke et al. 2004). Při adhezi k hostitelské buňce *T. vaginalis* mění svou morfologii. Z aktivně plovoucí buňky se přeměňuje na amébu, která se rozprostře na buňce epitelu.

### **Extracelulární váčky *T. vaginalis***

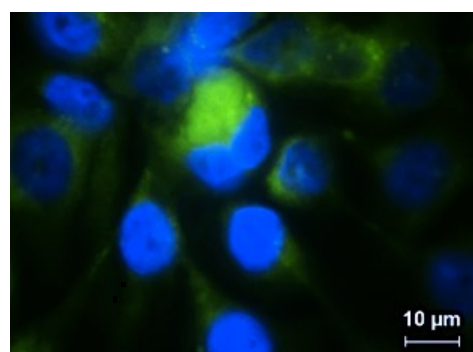
*T. vaginalis* uvolňuje 3 druhy extracelulárních váčků. Jsou to exsomy, ektosomy a LVs (large vesicles) (Nievas et al. 2018; Twu et al. 2013). Tyto váčky splývají s ektocervikálními buňkami v urogenitálním traktu (obr. 3).

Hlavní funkcí exosomů je komunikace mezi parazity a napomáhání adhezi *T. vaginalis* k buňkám epitelu. Exosomy také ovlivňují imunitní odpověď hostitele (Fernandez-Becerra et al. 2014).

Exosomy vylučované *T. vaginalis* obsahují typické exosomální proteiny: ALIX, Rabs, Hsp70 a tetraspaniny. Dále obsahují signální proteiny, enzymy a cytoskeletální proteiny. Exosomy také obsahují proteiny z parazita, které se podílí na jeho patogenitě. Jsou to například membránové proteiny, jako adhezivní protein z rodiny BspA (Tvag\_240680) a metalopeptidáza Tvag\_224980. Dále protein podobný proteáze GP63 (glycoprotein 63) (Tvag\_371800), a cyklofilín (Tvag\_137880), který umožňuje regulaci imunitní odpovědi hostitele (Twu et al. 2013)



3.A



3.B

Obr. 3: Na obrázku 3.A jsou vznikající multivezikulární tělíska uvnitř *T. vaginalis* (označené šipkou). Zelenou barvou je označen protein tetraspanin 1 a modrá barva značí jádra. Na



obrázku 3.B jsou ektocervikální buňky, které mají ve svém intracelulárním prostoru tetraspanin 1 (Twu et al. 2013).

Exosomy *T. vaginalis* ovlivňují imunitní odpověď. Exosomy vylučované tímto prvokem indukují vyšší expresi protizánětlivého cytokinu IL-10 v makrofázích, takže dochází k utlumení zánětu, což napomáhá *T. vaginalis* k přežití uvnitř hostitele (Olmos-Ortiz et al. 2017).

Exosomy také umožňují parazitům lepší adhezi k buňkám epitelu. Bylo zjištěno že exosomy, které vylučují parazité s vysokou adherencí, zvyšují adhezi u parazitů s nižší adherencí a tím se zvyšuje úspěšnost parazitů (Twu et al. 2013).

V blízkosti epitelálních buněk zvyšuje *T. vaginalis* produkci ektosomů. Ektosomy obsahují signální proteiny, proteiny cytoskeletu, enzymy, transportní proteiny a proteiny podílející se na translaci (Nievas et al. 2018). Ektosomy obsahují proteiny ARF (ADP-ribosylation factor) a Rab proteiny, které se podílejí na pučení ektosomu z membrány (Nievas et al. 2018; Raposo et al. 2009). Tyto váčky také obsahují proteiny z parazita například adheziny BspA (Tvag\_240680) a Tvag\_162010 (Nievas et al. 2018).

V nedávné době bylo zjištěno, že *T. vaginalis* také uvolňuje váčky, které jsou větší než 100 nm. Jedná se o LVs, které jsou vylučované *T. vaginalis* do extracelulárního prostoru (Nievas et al. 2018). Zatím není příliš jasná funkce těchto váček.

### **3.2.Kmen *Apicomplexa***

*Apicomplexa* je kmen převážně intracelulárních parazitických prvoků, kteří jsou původci mnoha lidských i zvířecích onemocnění. Mezi prvoky parazitujícími na lidech patří zejména rody *Toxoplasma*, *Plasmodium* a *Cryptosporidium* (Lim and McFadden 2010). Dále pak do kmene *Apicomplexa* patří rody parazitující i na zvířatech jako například *Eimeria*, *Neospora* a *Babesia* (Gubbels and Duraisingh 2012).

Typickým znakem pro prvoky z kmene *Apicomplexa* je přítomnost apikálního komplexu uvnitř buněk. Tento komplex hraje důležitou roli během invaze prvoka do hostitelské buňky. Apikální komplex tvoří složitě uspořádaný cytoskelet a sekreční orgány. Sekreční orgány jsou mikronémy, rhoptrie a denzní granula (Gubbels and Duraisingh 2012). Díky apikálnímu komplexu dochází k vazbě parazita na hostitelskou buňku, invaze do ní a k tvorbě parazitoformní vakuoly (Katris et al. 2014).

Dalším typickým znakem pro tento kmen je apikoplast. Apikoplast je sekundární plastid, který vznikl sekundární endosymbiózou (Lim and McFadden 2010). Tento plastid ztratil schopnost fotosyntézy, ale pro parazita je životně důležitý, protože v něm dochází k zásadním metabolickým dějům (Lim and McFadden 2010). V apikoplastu dochází k biosyntéze mastných kyselin, izoprenoidů, železosírných klastrů a hemu (Ralph et al. 2004).

Typickou strukturou pro kmen *Apicomplexa* jsou také alveoly, které tvoří komplex vnitřních membrán (IMC, inner membrane complex). Tento komplex umožňuje parazitovi pohybovat se po membráně hostitelské buňky.

### **3.2.1. *Toxoplasma gondii***

Tento intracelulární parazit způsobuje onemocnění zvané toxoplazmóza. *T. gondii* se vyskytuje u teplokrevných živočichů včetně lidí (S. A. Elmore et al. 2010). Definitivním hostitelem tohoto parazita je kočkovitá šelma a mezihostitelem může být například člověk. Přibližně třetina lidské populace je infikována tímto parazitem. Toxoplazmóza probíhá většinou bez příznaků. Toto onemocnění je však nebezpečné pro imunodeficientní jedince, u kterých způsobuje postižení centrální nervové soustavy. Pokud se těhotná žena nakazí toxoplazmózou může dojít k poškození plodu (S. A. Elmore et al. 2010). Toxoplazmózou se nakazí jedinec pozřením oocyst například z trusu infikovaného zvířete, pitím infikované vody nebo z tepelně neupraveného masa (Wowk et al. 2017). Toxoplazmóza se také přenáší kongenitálně, tedy z matky na plod (Havelaar, Kemmeren, and Kortbeek 2007).

#### **Životní cyklus *T. gondii***

Kočkovitá šelma pozře tkáňové cysty z masa nebo oocysty z trusu. V tkáňové cystě se nachází tzv. bradyzoiti a v oocystě tzv. sporozoiti. Obě tyto stádia se diferencují na patogenní stádium tzv. tachyzoita. Toto stádium proniká do enterocytů hostitele pomocí apikálního komplexu. V enterocytu se *T.gondii* nachází v parazitotrofní vakuole (Hakimi and Bougdour 2015). Tachyzoit se dělí v intracelulárním prostoru do té doby, než dojde k lýzy buňky. Tachyzoiti jsou uvolněny do extracelulárního prostoru a mohou napadnout další hostitelskou buňku. Uvnitř napadených enterocytů se také tvoří oocysty, které jsou uvolněny do střeva a vychází ven společně s trusem.

U mezihostitele životní cyklus *T. gondii* probíhá poněkud odlišně. Po diferenciaci na tachyzoita, prostupuje toto stádium skrze střevní epitel a proniká do těla. Imunitní odpověď

zabraňuje replikaci tachyzoitů v extracelulárním prostředí. Vliv imunity vede k diferenciaci tachyzoita na bradyzoita (Amigorena et al. 2004; Pope and Lässer 2013). Toto stádium vytváří tkáňové cysty, které se nacházejí hlavně v mozku, svalech a očích, kde parazit zůstává do konce života svého hostitele a jedná se o tzv. chronickou toxoplazmózu (Dlugonska, Gatkowska, and et al. 2016). Pokud dojde k oslabení hostitelského imunitního systému, tkáňové cysty se mohou re-aktivovat a napadat neinfikované buňky.

### **Extracelulární váčky *T. gondii***

Buňky infikované tímto intracelulárním parazitem uvolňují extracelulární váčky podobné exosomům obsahující molekuly, které pocházejí z parazita i z hostitelské buňky. Tyto extracelulární váčky obsahují proteiny CD63, Hsp70, SAG (major surface antigen), MIC (major histocompatibility complex class I chain-related gene), GRA (dense granule protein) a cyklofilín (Dlugonska, Gatkowska, and et al. 2016; Shi et al. 2018). Zatímco proteiny CD63 a Hsp70 jsou typické pro klasické exosomy, tak ostatní zmíněné proteiny jsou typické pro extracelulární váčky vylučované infikovanými buňkami (Shi et al. 2018). Váčky obsahují hostitelskou RNA, ale nebylo prokázáno, že se v těchto váčcích nachází nukleové kyseliny od parazita (Pope and Lässer 2013). Také není příliš jasné, jak tyto váčky vznikají a jak se do nich transportuje jejich obsah.

Extracelulární váčky vylučované infikovanou buňkou ovlivňují imunitní odpověď hostitele. Tyto váčky jsou fagocytovány makrofágy, ve kterých indukují zvýšení exprese cytokinů: interleukin-12, INF- $\gamma$  (interferon  $\gamma$ ) a TNF  $\alpha$  snižují expresi interleukinu-10 (Shi et al. 2018). Společně tyto cytokiny aktivují imunitní reakci typu Th1, která je důležitá k obraně proti intracelulárním parazitům.

V infikovaných buňkách parazit zastavuje proliferaci buňky a ovlivňuje její buněčný cyklus. Parazit zastaví buňku v S fázi buněčného cyklu (Kim et al. 2016). Tyto infikované buňky uvolňují extracelulární váčky, které obsahují specifickou miRNA. Tyto extracelulární váčky uvolní svůj obsah do neinfikovaných buněk, kde dochází také k zastavení buněčného cyklu v S fázi (Kim et al. 2016). Při infekci parazitem tedy přibývá počet buněk, které se nacházejí ve fázi S nebo G2. Tyto změny jsou důležité pro *T. gondii*, protože tento parazit proniká snadněji do buněk, které se nachází v S fázi (Grimwood, Mineo, and Kasper 1996). Během buněčného cyklu se mění fluidita plazmatické membrány. V S fázi buněčného cyklu je mikroviskozita membrány nejnižší (de Laat, van der Saag, and Shinitzky 1977) a *T. gondii* snadněji proniká do hostitelské buňky.

### 3.2.2. Rod *Plasmodium*

Nemoc způsobená prvokem z rodu *Plasmodium* se jmenuje malárie. Jedná se o parazitární onemocnění, které se nejvíce vyskytuje v tropických oblastech a subsaharské Africe. Každoročně se tímto parazitem nakazí 300-500 milionu lidí a z toho 1 milion na tuto nemoc umírá (Barillas-Mury and Kumar 2005). Existuje několik druhů z rodu *Plasmodium*, které jsou přenosné i na člověka. Nejzávažnější je *P. falciparum*, dále člověka může nakazit *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* a *P. knowlesi* (Fernandez-Becerra et al. 2014; Singh et al. 2004).

#### Životní cyklus *Plasmodia*

Tuto nemoc přenáší komár rodu *Anopheles*, který je i definitivním hostitelem *Plasmodia*. Životní cyklus *Plasmodia*: Erythrocyty v periferní krvi hostitele obsahují gametocyty. Po nasátí krve infikovaného hostitele, samčí a samičí gametocyty putují do mesenteronu komára. Zde splývají samčí a samičí gametocyty a vznikají zygoty, ze kterých se stávají ookinety (Barillas-Mury and Kumar 2005). Ookinety procházejí přes stěnu mesenteronu a diferencují na oocysty (Arrighi and Hurd 2002). Oocysty uvolňují tisíce sporozoitů, kteří se díky pozitivní chemotaxi dopravují do slinných žláz komára (Akaki 2005).

Při sání krve samičkou komára *Anopheles* putují sporozoiti ze slinných žláz komára do krevního řečiště hostitele (Silvie et al. 2008). Krevním řečištěm se sporozoiti dostávají do jater (Silvie et al. 2008). Parazit vstupuje do hepatocytů. V hepatocytech se parazit nachází v parazitotrofní vakuole a dochází k přeměně sporozoita na stádium merozoita (Vaughan, Aly, and Kappe 2008). Merozoiti se uvolňují z hepatocytů do krve, kde se pomocí adhezivních proteinů vážou na povrch erythrocytů a díky apikálnímu komplexu pronikají do jejich cytoplasmy (Silvie et al. 2008). Uvnitř erythrocytu se parazit nachází v parazitotrofní vakuole a dochází zde k nepohlavnímu rozmnožování parazita. Erythrocyty infikované prvokem *Plasmodium falciparum* na svém povrchu vystavují parazitární proteiny PfEMP1 (*Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1) (Quadt et al. 2012). Tento protein je kódovaný *var* geny a slouží k adhezi infikovaného erythrocytu ke stěně cévy, aby nedošlo ke zničení infikovaných erythrocytů ve slezině (Pasternak and Dzikowski 2009; Quadt et al. 2012). Merozoiti jsou periodicky uvolňovány z erythrocytů, což má u člověka za následek opakující se horečky. Merozoiti v krevním řečišti infikují další erythrocyty a část merozoitů se v erythrocytech přeměňuje na gametocyty, které nasává komár a cyklus se opakuje.

## **Extracelulární váčky *Plasmodia***

Erythrocyty infikované *Plasmodiem* vylučují extracelulární váčky - ektosomy a exosomy (Regev-rudzki et al. 2013; Sampaio, Cheng, and Eriksson 2017). Tyto extracelulární váčky obsahují molekuly pocházející od *Plasmodia* erythrocytů. Proteiny v extracelulárních váčkách, které pocházejí z erythrocytů jsou stomatin a glykophorin C (Mantel et al. 2013). Tyto váčky také obsahují proteiny *Plasmodia*: SBP1 (skeleton binding protein 1) a RESA (ring-infected erythrocyte surface antigen) (Mantel et al. 2013). Dále obsahují miRNA z hostitelských buněk a nukleové kyseliny z *Plasmodia*, mezi které patří mRNA, nekódující ribozomální RNA, tRNA a plazmidová DNA (Babatunde et al. 2018; Regev-rudzki et al. 2013).

Extracelulární váčky vylučované infikovanými erythrocyty pučí z Maurerových váček (Regev-rudzki et al. 2013). Maurerovy váčky jsou membránové struktury, které se nachází pod membránou erythrocytu. Tuto membránovou strukturu vytváří parazit v cytoplasmě infikovaného erythrocytu. Důležitou funkcí Maurerovo váček je také třídění a sekrece proteinů z parazita na povrch erythrocytu (Mundwiler-Pachlatko and Beck 2013). Na vzniku a funkci extracelulárních váček se také podílí nedávno objevený protein PfPTP2 (Regev-rudzki et al. 2013). Tento protein se nachází na povrchu vylučovaných váček a slouží jako signální molekula pro cílové buňky (Regev-rudzki et al. 2013).

Hlavní funkcí těchto váček je transport signálních molekul mezi parazity a tyto váčky také ovlivňují imunitní systém hostitele.

Díky vylučování extracelulárních váček infikovaným erythrocytem dochází k transportu plazmidové DNA mezi parazity (Regev-rudzki et al. 2013). Plazmidová DNA může nést geny pro rezistenci proti antimalarikům. *Plasmodium* se tak stává více rezistentní vůči používaným léčivům. Plazmidová DNA ve váčkách také umožňuje přeměnu merozoita na samčí nebo samičí gametocyty (Regev-rudzki et al. 2013). Pokud je parazit vystavený nějakému stresu například antimalarikům, tak dochází ke zvýšení produkce extracelulárních váček, které indukují přeměnu merozoita na gametocyty. Erythrocyty, obsahující gametocyty, mohou být nasány komárem a *Plasmodium* tak může uniknout z nepříznivých podmínek do vektora (Regev-rudzki et al. 2013).

Exosomy a ektosomy z infikovaných erythrocytů také ovlivňují imunitní odpověď svého hostitele. Tyto extracelulární váčky indukují zvýšení exprese interleukinů -1 $\beta$ , -6, -10 a -12 (Mantel et al. 2013). Tyto váčky také ovlivňují neutrofile. Neutrofile se díky váčkům z infikovaných erythrocytů pohybují i bez svého atraktantu (Mantel et al. 2013).

Extracelulární váčky také mohou být pohlceny endotelovými buňkami. Tyto váčky transportují miRNA z infikovaných erythrocytů, která umlčuje expresi proteinů ATF2

(activating transcriptional factor 2) a kaveolinu-1 v endotelových buňkách (Mantel et al. 2016). Protein ATF2 se podílí na udržování antiapoptotického signálu v endotelových buňkách a protein kaveolin-1 reguluje expresi proteinů, které se podílejí na bariérové funkci endotelu (Bhoumik, Jones, and Ronai 2015; Mantel et al. 2016; Song, Ge, and Pachter 2007). Během malárie, kvůli umlčení těchto proteinů, dochází k vaskulární dysfunkci. Ačkoliv jsou exosomy a ektosomy vylučované infikovanými erytrocyty velmi důležité pro *Plasmodium*, nejsou ještě přesně známy všechny jejich funkce.

### **3.2.3. *Cryptosporidium parvum***

*Cryptosporidium parvum* je celosvětově rozšířený parazit, který je původce onemocnění tzv. kryptosporidiózy. Jedinec se nakazí pozřením infikovaných oocyst, které se mohou nacházet ve vodě nebo potravě (Herbert L. DuPont et al. 1995). Je to průjmové onemocnění, které u imunokompetentních jedinců odezní po krátké době. U imunodeficientní jedinců se *C. parvum* může šířit do dalších částí těla a napadá epitely pankreatu, žaludku a plic (Leitch and He 2012).

#### **Životní cyklus *C. parvum***

Po pozření infikované vody nebo potravy, ve které se nacházejí oocysty *C. parvum* putují oocysty do tenkého střeva hostitele. V tenkém střevě oocysty uvolní sporozoity. Sporozoit neproniká do cytoplasmu hostitelské buňky jako výše zmínění parazité, ale nasedne na enterocyt a indukuje vychlípení jeho membrány. Sporozoit je obalený plazmatickou membránou enterocytu a nachází se v parazitotrofní vakuole. Sporozoit se diferencuje na stádium trofozoita. Trofozoit se nepohlavně dělí a vzniká merozoit, který uniká z parazitotrofní vakuoly a napadá další buňky. Uvnitř hostitele dochází i k pohlavnímu rozmnožování parazita. Merozoiti se diferencují na samičí makrogamont nebo samčí mikrogamont. Z mikrogamontu se uvolňují mikrogamety, které oplodní makrogamont a vzniká zygota. Z této zygoty pak vzniká tenkostěnná oocysta, která se excystuje v hostiteli nebo vzniká tlustostěnná oocysta, která odchází z hostitele a *C. parvum* se může dostat do nového hostitele (Leitch and He 2012).

### **Exosomy vylučované *C. parvum***

Infikované buňky epitelu tenkého střeva uvolňují exosomy, které ovlivňují chování okolních hostitelských buněk. Exosomy uvolňované infikovanými epiteliálními buňkami indukují imunitní odpověď hostitele. Tyto exosomy totiž obsahují oproti buňkám neinfikovaným vyšší hladinu ICAM-1 a HMGB1 (high mobility group box 1) (Wang et al. 2019). Exosomy splývají s imunitními buňkami, ve kterých se protein HMGB1 váže na jaderný faktor kappa B, který aktivuje (Wang et al. 2019). Hlavní funkcí jaderného faktoru kappa B je exprese cytokinů v imunitních buňkách (Luan et al. 2010). Exosomy uvolňované infikovanými buňkami indukují imunitní odpověď.

### **3.3. Třída *Kinetoplastida***

*Kinetoplastida* je třída bičíkatých prvoků, kteří jsou původci závažných nemocí (Donelson, Gardner, and El-Sayed 2002). Mezi kinetoplastida patří například rody *Trypanosoma* a *Leishmania*, které parazitují na lidech i zvířatech.

U většiny prvoků z třídy *Kinetoplastida* je přítomen kinetoplast. Kinetoplast se nachází uvnitř mitochondrií a tvoří ho cirkulární DNA (Lukes et al. 2002). Tato DNA se skládá z minikroužků a maxikroužků. Maxikroužky obsahují geny pro klasické proteiny mitochondrií, zejména subjednotky dýchacího řetězce. Transkribovaná mRNA z maxikroužků musí být nejprve editovaná, aby mohla být přeložena do proteinů. Minikroužky kódují gRNA (guide RNA), která je důležitá pro editaci mRNA z maxikroužků (Lukes et al. 2002).

Další typickou organelou jsou glykosomy. Tyto organely jsou specifickým typem peroxisomů a probíhá v nich část glykolýzy (Rodrigues et al. 2014).

#### **3.3.1. *Trypanosoma brucei***

Tento parazit je původcem tzv. spavé nemoci. *Trypanosoma brucei* se také označuje jako africká trypanosoma, protože se endemicky vyskytuje na území Afriky. Přenašeč parazita mezi hostiteli je moucha rodu *Glossina* (Rodrigues et al. 2014). Dva poddruhy *T. brucei*, které způsobují onemocnění u lidí jsou *T. brucei gambiense* a *T. brucei rhodesiense* (Rodrigues et al. 2014).

Při sání krve infikovaného hostitele se tzv. krevního trypomastigoti dostávají do mesenteronu mouchy rodu *Glossina*. V mesenteronu mouchy se krevní trypomastigoti diferencují na

procyklické trypomastigoty. Po diferenciaci se procykliční trypomastigoti dělí a následně unikají z mesentoronu a míří ke slinným žlázám. Ve slinných žlázách se diferencují na epimastigoty, kteří se znovu množí, a nakonec se diferencují na metacyklické trypomastigoty. Při sání krve vektorem putují metacykliční trypomastigoti ze slinných žláz do krevního řečiště. V krvi se metacyklický trypomastigot diferencuje na stádium krevního trypomastigota, který proniká do celého těla (Rodrigues et al. 2014).

Tento parazit se vyskytuje pouze v extracelulárním prostředí, takže je neustále vystaven imunitnímu systému hostitele. Na svém povrchu mají trypomastigoti VSG (variable surface glycoproteins) molekuly. Imunitní systém vždy vytvoří protilátky proti specifickým VSG molekulám. Trypomastigot dokáže měnit své VSG molekuly, které vytvořené protilátky už nerozeznají a imunitní systém musí znovu vytvořit protilátky proti novým VSG molekulám. Trypomastigot mění své VSG molekuly a tím uniká před imunitním systémem hostitele (Pinger, Chowdhury, and Papavasiliou 2017).

### **Exosomy a ektosomy *T. brucei***

*T. brucei* vylučuje extracelulární váčky exosomy a ektosomy. Ektosomy vznikají z membránových nanotrubiček. Tyto nanotrubičky pučí z bičíkaté membrány a rozpadem těchto nanotrubiček vznikají ektosomy (Shaked et al. 2017).

Tyto extracelulární váčky vylučované *T. brucei* obsahují proteiny SRA (serum-resistance associated protein), caflagin, metakaspázu 4, glykosylfosfatidyinotisol fosfolipázu C a VSG (Szempruch et al. 2016). Dále tyto extracelulární váčky obsahují HSP70, enzymy glycerol kinázu, aldolázu a adenylátcyklázu (Szempruch et al. 2016).

Ektosomy a exosomy vylučované *T. brucei* ovlivňují imunitní systém hostitele a transportují virulenci faktory mezi parazity.

Extracelulární váčky transportují adenylátcyklázu do imunitních buněk. To způsobuje zvýšení hladiny cAMP (cyclic adenosine monophosphate), což má za následek snížení produkce cytokinu TNF $\alpha$  (Salmon et al. 2012; Shaked et al. 2017). *T. brucei* tak ovlivňuje imunitní systém hostitele ve svůj prospěch.

Po fúzi exosomu z parazita s erytrocytem na povrchu erytrocytu zůstávají molekuly z parazita, díky kterým dochází ke změně uspořádání lipidů a membrána erytrocytu je rigidnější. Takto pozměněné erytrocyty s molekulami z trypanosom jsou přednostně fagocytovány makrofágy, což se u nemocného člověka projevuje anémií (Stijlemans et al. 2015; Szempruch et al. 2016). V nedávné době bylo experimentálně zjištěno, že exosomy



mohou transportovat protein SRA mezi poddruhy *T.brucei* (Szempruch et al. 2016). Protein SRA je virulenční faktor, který zabraňuje TLF (trypanosome lytic factor) v lytické degradaci trypanosom (Greef and Hamers 1994). Lipoprotein TLF je součástí vrozené imunity. Tento protein se aktivuje v lysozomech kde vytváří póry, což vede k smrti trypanosom (Molina-portela et al. 2005).

### **3.3.2. *Trypanosoma cruzi***

Prvok *T. cruzi* je původcem onemocnění tzv. Chagasovy choroby. Dříve se toto onemocnění vyskytovalo endemicky v latinské Americe, ale nyní se tento parazit stává hrozbou i v needemických oblastech např. Evropy a Severní Ameriky (Wyllie and Ramirez 2017). Parazit je přenášen plošticemi z rodů *Rhodnius*, *Triatoma* a *Panstrongylus* (J. Pérez-Molina 2018). Chagasova choroba má akutní a chronickou fázi. Akutní fáze se projevuje horečkou a zánětem v místě vstupu parazita. Pokud není chagasova choroba léčena může dojít k chronické fázi. Po několika letech chronické fáze u jedince může nastat kardiomyopatie a objevuje se megakolon a megaesophagus (Barrett et al. 2003).

#### **Životní cyklus *T. cruzi***

Během sání infikované krve plošticí, se do jejího mesenteronu dostávají trypomastigoti a amastigoti v hostitelských buňkách. V mesenteronu ploštice se trypomastigoti diferencují na stádium epimastigota. Epimastigoti se následně dělí a v rektu ploštice se diferencují na metacyklické trypomastigoty. Během sání krve hostitele ploštice kálí na kůži a v jejích výkalech se nacházejí metacykličtí trypomastigoti (Rodrigues et al. 2014). Toto stádium proniká do hostitele oděrkou nebo skrze sliznice. Trypomastigot proniká do cytoplasmu hostitelských buněk a diferencuje se na stadium tzv. amastigota (J. Pérez-Molina 2018). Amastigoti se množí v intracelulárním prostoru infikované buňky a následně se opět diferencují na stádium trypomastigota. Trypomastigoti opouští infikovanou buňku a mohou napadnout další hostitelské buňky (Souza et al. 2010).

#### **Ektosomy a exosomy *T. cruzi***

Trypomastigotia infikované hostitelské buňky vylučují v krevním řečišti ektosomy a exosomy (Bayer-santos et al. 2012). Tyto extracelulární váčky vylučuje i neinfekční stádium epimastigota (Bayer-santos et al. 2012).

Ektosomy umožňují parazitovi uniknout imunitnímu systému a napomáhají mu proniknout do intracelulárního prostoru buňky. Ektosomy vylučované parazitem obsahují proteiny parazita. Příkladem takových proteinů je FCaBP (flagellar calcium binding protein), glykoprotein 82, proteáza cruzipain a MASP (mucin-associated surface protein) (Ouaissi et al. 1992; Ribeiro et al. 2018; Trocoli Torrecilhas et al. 2009). Váčky vylučované *T.cruzi* obsahují i nukleové kyseliny: rRNA, tRNA, sRNA (Bayer-Santos et al. 2014).

Ektosomy z parazita v krevním řečišti fúzí s makrofágy a T-lymfocyty a uvolňují do nich svůj obsah (Trocoli Torrecilhas et al. 2009). V těchto imunitních buňkách dojde ke zvýšení exprese IL-4 a IL-10. Tyto interleukiny jsou součástí imunitní reakce typu Th2. Aktivací této imunitní odpovědi se inhibuje imunitní reakce typu Th1. V T-lymfocytech a makrofázích dochází k inhibici exprese cytokinu TNF a snížení produkce oxidu dusnatého (Trocoli Torrecilhas et al. 2009) a díky tomu je intracelulární stádium amastigota chráněno před imunitním systémem. K virulenci parazita také přispívají ektosomy z hostitelských buněk. Tyto ektosomy se váží na C3 konvertázu, která je na povrchu trypanomastigota a zabraňují komplementu ve zničení parazita (Cestari et al. 2012). Pro životní cyklus parazita je také důležitá invaze do hostitelských buněk. Ektosomy z infikovaných buněk napomáhají *T. cruzi* proniknout do hostitelské buňky. Tyto ektosomy obsahují membránový cytokin TGF- $\beta$ , který spouští specifickou signální dráhu v hostitelských buňkách, která pravděpodobně pomáhá parazitovi v invazi do buněk (Cestari et al. 2012).

### 3.3.3. Rod *Leishmania*

Tento prvok je původcem onemocnění tzv. leishmanióza. Parazit je přenášen flebotomy rodů *Phlebotomus* a *Lutzomyia* (Fernandez-Becerra et al. 2014). Leishmaniózu způsobuje několik druhů rodu *Leishmania* a toto onemocnění má několik forem. Nejzávažnější je forma viscerální. Během viscerální formy parazit napadá např. slezinu a játra a dochází k otoku a dysfunkci těchto orgánů (Rodrigues et al. 2014).

Další je forma mukokutánní. Při této formě parazit způsobuje slizniční léze v nose, ústech a dutině hrdla. Poslední je forma kožní, kdy parazit poškozuje kůži (Rodrigues et al. 2014).

#### **Životní cyklus prvoků rodu *Leishmania***

Během sání krve nasaje flebotomus infikované makrofágy se stádiem amastigotů. Amastigoti se v zaživacím ústrojí přemění na stádium promastigota, který se intenzivně dělí. Leishmanie

u flebotoma narušují stomodeální valvu a tvoří zátku, která zabraňuje přenašeči další příjem potravy (Bates et al. 1999). Flebotomus je hladový a saje na více hostitelích, což napomáhá parazitovi se dál šířit. Během sání krve flebotomem se do kůže hostitele dostávají promastigoti. Neutrofilů, makrofágů a dendritické buňky fagocytují promastigoty (Bates 2018). Parazit se uvnitř těchto buněk nachází ve fagolysosomu. Uvnitř fagolysosomu se promastigoti diferencují na stádium amastigota (Murray et al. 2005). Amastigot se dělí v hostitelské buňce, která následně lyzuje a amastigoti se uvolňují do extracelulárního prostředí a mohou napadat další hostitelské buňky (Rodrigues et al. 2014).

### **Exosomy a ektosomy rodu *Leishmania***

Parazitický prvek rodu *Leishmania* uvolňuje ektosomy i exosomy (Silverman, Clos, de'Oliveira, et al. 2010; Silverman and Reiner 2012). Polovina proteinů v těchto exosomech se shoduje s proteiny, které se nacházejí i v savčích exosomech (Silverman, Clos, de'Oliveira, et al. 2010). Exosomy vylučované leishmaniemi také obsahují proteiny z parazita jako proteáza GP63, enlogační faktor 1- $\alpha$ , tryparedoxin-peroxidáza, 14-3-3 like protein, HSP10 a HSP70 (Silverman, Clos, de'Oliveira, et al. 2010; Silverman and Reiner 2012).

Počet vylučovaných váčků a jejich obsah závisí na okolním pH a teplotě (Fernandez-Becerra et al. 2014). Uvnitř mesenteronu komára je nízké pH a teplota okolo 26 °C. V lidské krvi je pH neutrální a teplota se pohybuje okolo 37 °C. Pokud se leishmanie nachází v krevním řečišti člověka, tak vylučuje více exosomů, které obsahují vyšší koncentraci virulenních faktorů (Silverman, Clos, de'Oliveira, et al. 2010).

Promastigoti a amastigotivylučují exosomy a ektosomy do extracelulárního prostředí. Tyto váčky splývají s makrofágy a uvolňují do nich svůj náklad. Metaloproteáza GP63 a enlogační faktor 1- $\alpha$  aktivuje tyrosinové fosfatázy (Silverman and Reiner 2011). Tyto fosfatázy inhibují dráhu aktivovanou cytokinem INF  $\gamma$ , která vede k expresi cytokinu TNF $\alpha$  a produkci kyslíkových radikálů a oxidu dusnatého. Zároveň se aktivuje exprese protizánětlivého IL-10. Exosomy a ektosomy uvolňované *leishmanií* inhibují mikrobicidní funkce makrofágů a zabraňují makrofágům zničit parazita (Silverman, Clos, Horakova, et al. 2010; Silverman and Reiner 2011).

Během životního cyklu, který se odehrává v komárovi parazit také uvolňuje exosomy (Atayde et al. 2015). Během sání krve jsou tyto váčky dopravovány z mesenteronu do místa sání. Bylo zjištěno, že tyto váčky se podílejí na rozvoji kožních lézí v místě sání flebotoma (Atayde et al. 2015).

## 4. Závěr

V této práci jsou shrnuty dosavadní poznatky o exosomech a zaměřuji se zde zejména na význam těchto váčků v kontextu s parazitismem. Parazitičtí prvoci a infikované hostitelské buňky vylučují exosomy a ektosomy. Tyto váčky dokážou měnit chování hostitelských buněk a imunitní odpověď ve prospěch parazita. Zkoumání těchto extracelulárních váčků parazitů a infikovaných buněk je důležité pro podrobnějšímu pochopení průběhu parazitárních infekcí. Lepší pochopení strategií, které používají parazité při invazi do hostitele, může zajistit do budoucna efektivnější léčbu onemocnění jako například malárie nebo spavé nemoci.

Také je důležité se do budoucna zabývat extracelulárními váčky jako takovými, protože se podílí na mnoha důležitých fyziologických a patofyziologických procesech v těle. Exosomy a ektosomy odráží stav své mateřské buňky a díky tomu je možné včas diagnostikovat patologické změny buněk. Lze tedy neinvazivně diagnostikovat některá onemocnění v raném stádiu. V budoucnu bych se ráda nadále věnovala studiu exosomů parazitických prvků. Chtěla bych se zaměřit na obsah exosomů, které vylučuje prvek *T. vaginalis* infikovaný dsRNA virem z rodiny *Totiviridae*.

## 5. Použitá literatura

- Airola, M. V. a Hannun, Y. A.** (2013) Sphingolipid metabolism and neutral sphingomyelinases. *Handbook of Experimental Pharmacology* **215**, 57–76.  
<http://link.springer.com/10.1007/978-3-7091-1368-4>.
- Akaki, M. a Dvorak, J. A.** (2005) A chemotactic response facilitates mosquito salivary gland infection by malaria sporozoites. *Journal of Experimental Biology* **208**, 3211–3218.
- Akers, J. C., Gonda, D., Kim, R., Carter, B. S. a Chen, C.C.** (2013) Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *Journal of Neuro-Oncology* **113**, 1–11.
- Adel, M. A. Y a Teis, D.** (2011). assembly and disassembly of the ESCRT-III membrane scission complex. *FEBS Letters* **585**, 3191–3196.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2011.09.001>.
- Amigorena, S., Dimier-Possion, I., Bout, D., Aline, F. a Roingeard, P.** (2004) *Toxoplasma gondii* antigen-pulsed-dendritic cell-derived exosomes induce a protective immune response against *T. gondii* infection. *Infection and Immunity* **72**, 4127–4137.
- Anand, S., Samuel, M., Kumar, S. a Mathivanan, S.** (2019) Ticket to a bubble ride: cargo sorting into exosomes and extracellular vesicles. *BBA-Proteins and Proteomics*  
<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.02.005>.
- Arrighi, R. B.G. a Hurd, H.** (2002) The role of *Plasmodium berghei* ookinete proteins in binding to basal lamina components and transformation into oocysts. *International Journal for Parasitology* **32**, 91–98.
- Atayde, V. D., Aslan, H., Townsend, S., Hassani, K., Kamhawi, S. a Olivier, M.** (2015) Exosome secretion by the parasitic protozoan *Leishmania* within the sand fly midgut. *Cell Reports* **13**, 957–967. <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2015.09.058>.
- Babatunde, K. A., Mbagwu, S., Hernández-Castañeda, M. A., Adapa, S. R., Walch, M., Filgueira, L., Falquet, L., Jiang, R. H. Y., Ghiran, I. a Mantel, P.** Malaria infected red blood cells release small regulatory RNAs through extracellular vesicles. *Scientific Reports* **8**, 1–15.
- Babst, M., Katzmann, D. J., Snyder, W. B., Wendland, B. a Erm, S. C.** (2002) Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body. *Developmental Cell* **3**, 283–289.
- Babst, M.** (2011) MVB Vesicle formation: ESCRT-dependent, ESCRT-independent and everything in between. *Current Opinion in Cell Biology* **23**, 452–457.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2011.04.008>.
- Barillas-Mury, C. a Kumar, S.** (2005) *Plasmodium*-mosquito interactions: a tale of dangerous liaisons. *Cellular Microbiology* **7**, 1539–1545.

- Barrett, M. P., Burchmore, R. J. S., Stich, A., Lazzari, J. O., Frasch, C., Cazzulo, J. J. a Krishna, S.** (2003) The trypanosomiasis. *Biology cell Journal* **362**, 1469–1480.
- Bates, P. A.** (2018) Revising *Leishmania*'s life cycle. *Nature Microbiology* **3**, 529–530.  
<http://dx.doi.org/10.1038/s41564-018-0154-2>.
- Bates, P. A., Stierhof, Y., Jacobson, R. L., Rogers, M. E., Schlein, Y., Handman, E. a Ilg, T.** (1999) Filamentous proteophosphoglycan secreted by *Leishmania* promastigotes forms gel-like three-dimensional networks that obstruct the digestive tract of infected sandfly vectors. *Journal of Cell Biology* **78**, 675–689.
- Bayer-santos, E., Aguilar-Bonavides, C., Rodrigues, S. P., Cordero, E. M., Marques, A. F, Varela-Ramirez, A., Choi, H., Yoshida, N., da Silveira, J. F. a Almeida, I. C.** (2012) Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* secretome: haracterization of two populations of extracellular vesicles and soluble proteins. *Journal of proteome* **12**, 1–43.
- Bayer-Santos, E., Lima, F. M., Ruiz, J. C., Almeida I. C. a da Silveira J. F.** (2014) Characterization of the small RNA content of *Trypanosoma cruzi* extracellular vesicles. *Molecular and Biochemical Parasitology* **193**, 71–74.
- Benchimol, M.** (2004) Trichomonads under Microscopy. *Microscopy and Microanalysis* **10**, 528–550.
- Bhounik, A., Jones, N. a Ronai Z.** (2015) Transcriptional switch by activating transcription factor 2 derived peptide sensitizes melanoma cells to apoptosis and inhibits their tumorigenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* **101**, 4222–4227.
- Caruso, S. a Ivan K.H. Poon, I. K. H.** (2018) Apoptotic cell-derived extracellular vesicles: more than just debris. *Frontiers in Immunology* **9**, 1-9.
- Cestari, I., Ansa-Addo, E., Deolindo, P., Inal, J. M. a Ramirez M. I.** (2012) *Trypanosoma cruzi* immune evasion mediated by host cell-derived microvesicles. *The Journal of Immunology* **188**, 1942–1952.
- Chu, T., Sun, J., Saksena, S. a and Emr, S. D.** (2006) New component of ESCRT-I regulates endosomal sorting complex assembly. *Journal of Cell Biology* **175**, 815–823.
- Coakley, G., Maizels, R. M. a Buck, A. H.** (2015) Exosomes and other extracellular vesicles: the new communicators in parasite infections. *Trends in Parasitology* **31**, 477–489.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2015.06.009>.
- Cocucci, E. a Meldolesi, J.** (2015) Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends in Cell Biology* **25**, 364–372.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2015.01.004>.
- De Greef, C. a Hamers, R.** (1994) The serum resistance-associated (SRA) gene of *Trypanosoma brucei rhodesiense* encodes a variant surface glycoprotein-like protein. *Molecular and Biochemical Parasitology* **68**, 277–284.

- Długonska, H. a Gatkowska, J.** (2016) Exosomes in the context of *Toxoplasma gondii* -host communication. *Annals of Parasitology* **62**, 169–174.
- Donelson, J. E., Gardner, M. J. a El-Sayed, N. M.** (2002) More surprises from *Kinetoplastida*. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A* **96**, 2579-2581.
- DuPont, H. L., Chappell, C. L., Sterling, Ch. R., Okhuysen, P. C, Rose, J. B. a Jakubowski, W.** (1995) The Infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *Clinical microbiology reviews* **332**, 855–859.
- Dreyer, F. a Baur, A.** (2016) Biogenesis and functions of exosomes and extracellular vesicles. *Methods in Molecular Biology* **1448**, 201-216.
- Elmore, S. A., Jones, J. L., Conrad, P. A., Patton, S., Lindsay, D. S., Dubey, J. P.** (2010) *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. *Trends in Parasitology* **26**, 190–196. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2010.01.009>
- Elmore, S.** (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology* **35**, 495–516.
- Erwig, L. P. a Henson, P. M.** (2008) Clearance of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death and Differentiation* **15**, 243–250.
- Fadok, V. A., Voelker D. R., Campbell, P. A., Cohen, J. J., Bratton, D. L. a Henson, P.M.** (1992) Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *Journal of immunology* **148**, 2207–2216.
- Fernandez-Becerra, C., Marcila, A., Martin-Jaular, L., Trelis, M., Menezes-Neto, A., Osuna, A., Bernal, D., Almeida, I. C. a del Portillo, H. A.** (2014) Extracellular vesicles in parasitic diseases. *Journal of Extracellular Vesicles* **3**, 1–15.
- Friedl, P., Vischer, P. a Freyberg, M. A.** (2002) The role of glycosylation in protein antigenic properties. *Cellular and Molecular Life Sciences* **59**, 1347–1357.
- Grimwood, J., Mineo J. R., a Kasper L. H.** (1996) Attachment of *Toxoplasma gondii* to host cells is host cell cycle dependent. *Infection and Immunity* **64**, 4099–4104.
- Gubbels, M. a Duraisingh M. T.** (2012) Evolution of apicomplexan secretory organelles. *International Journal for Parasitology* **42**, 1071–1081.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.09.009>.
- Hakimi, M. a Bougdour, A.** 2015. *Toxoplasma*'s ways of manipulating the host transcriptome via secreted effectors. *Current Opinion in Microbiology* **26**, 24–31.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2015.04.003>.
- Haraszti, R. A., Didiot, M. a Sapp, E.** (2016) High-resolution proteomic and lipidomic analysis of exosomes and microvesicles from different cell sources. *Journal of Extracellular Vesicles* **5**, 1-14.
- Hassani, K. a Olivier, M.** (2013) Immunomodulatory impact of *Leishmania*-induced macrophage exosomes: a comparative proteomic and functional analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **7**, 1–17.

- Havelaar, A. H., Kemmeren, J. M. a Kortbeek L. M.** (2007) Disease burden of congenital toxoplasmosis. *Clinical Infectious Diseases* **44**, 1467–1474.
- Henne, W. M., Buchkovich, N. J. a Emr S. D.** (2011) The ESCRT Pathway. *Developmental Cell* **21**, 77–91.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2011.05.015>.
- Hoehn, N. M. N, Budchow, S. I., Anderton, S. M., Stroorvogel, W. a Wauben, M. H.** (2015) Brief report activated T cells recruit exosomes secreted by dendritic cells via LFA-1. **113**, 1977–1982.
- Choi, D., Kim, D., Kim, Y. a Gho, Y. S.** (2011) Proteomics of extracellular vesicles: exosomes and ectosomes. *Mass Spectrometry Reviews* **34**, 474-490.
- Johnstone, R. M., Hammond, M. A. H. R., Orr, L. a Turbide, C.** (1987) Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *Journal of Biological Chemistry* **262**, 9412–9420
- Katris, N. J., van Dooren G. G., McMilan, P. J., Hanssen, E., Tilley, L. a Waller, R. F.** (2014) The apical complex provides a regulated gateway for secretion of invasion factors in *Toxoplasma*. *PLoS pathogens* **10**, 1-16.
- Katzmann, D. J., Babst, M. a Emr, S. D.** (2001) Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* **106**, 145–55.
- Kelly, E. E., Horgan, C. P., Goud, B. a McCaffrey, M. W.** (2012) The Rab family of proteins: 25 Years On. *Biochemical Society Transactions* **40**, 1337–1347.
- Kim, M. J., Jung, B., Cho, J., Song, H., Pyo, K., Lee, J. M., Kim, M. a Chai, J.** (2016) Exosomes secreted by *Toxoplasma gondii*-infected L6 cells: Their effects on host cell proliferation and cell cycle changes. *Korean Journal of Parasitology* **54**, 147–154.
- Kusdian, G. a Gould, S. B.** (2014) The biology of *Trichomonas vaginalis* in the light of urogenital tract infection. *Molecular and Biochemical Parasitology* **198**, 92–99.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2015.01.004>.
- de Laat, S. W., van der Saag, P. T. a Shinitzky, M.** (1977) Microviscosity modulation during the cell cycle of neuroblastoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* **74**, 4458–4461.
- Leitch, G., J. a He, Q.** (2012) Cryptosporidiosis-an overview. *Journal of Biomedical Research* **25**, 1–16. [http://dx.doi.org/10.1016/S1674-8301\(11\)60001-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1674-8301(11)60001-8).
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S. a Wang X.** (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**, 479–489.
- Lim, L. a McFadden, G. I.** (2010) The evolution, metabolism and functions of the apicoplast. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **365**, 749–763.



- Locksley, R. M., Killeen, N. a Lenardo, M. J.** (2004) The TNF and TNF receptor superfamilies. *Cell* **104**, 487–501.
- Luan, Z., Zhang, H., Yang, P., Ma, X., Zhang, Ch. a Cuo, R.** (2010) HMGB1 activates nuclear factor- $\kappa$ B signaling by RAGE and increases the production of TNF- $\alpha$  in human umbilical vein endothelial cells. *Immunobiology* **215**, 956–962.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2009.11.001>.
- Luhtala, N. a Odorizzi, G.** (2004) Bro1 coordinates deubiquitination in the multivesicular body pathway by recruiting Doa4 to endosomes. *Journal of Cell Biology* **166**, 717–729.
- Lukeš, J., Guilbride, D. L., Votýpka, J., Benne, R. a Englund, P. T.** (2002) Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable structure. *Eukaryotic cell* **1**, 495–502.
- Mantel, P., Hoag, A. N., Goldowitz, I., Potashnikova, D., Hamza, B., Vorobjev, I., Ghiran, I., Toner, M., Irimia, D., Ivanov, A. R., Barteneva, N. a Marti, M.** (2013) Malaria-infected erythrocyte-derived microvesicles mediate cellular communication within the parasite population and with the host immune system. *Cell Host and Microbe* **13**, 521–534.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2013.04.009>.
- Mantel, P., Hjelmqvist, D., Walch, M., Kharoubi-Hess, S., Nilsson, S., Ravel, D., Ribeiro, M., Gruring, Ch., Ma, S., Padmanabhan, P., Trachtenberg, A., Ankarlev, J., Brancucci, N. M., Huttenhower, C., Duraisingh, M. T., Ghiran, I., Kuo, W. P., Filgueira, L., Martinelli, R. a Marti, M.** (2016) Infected erythrocyte-derived extracellular vesicles alter vascular function via regulatory Ago2-miRNA complexes in malaria. *Nature Communications* **7**, 1–15.
- McClelland, R. S., Sangaré, L., Hassan, W. M., Lavreys, L., Mandaliya, K., Kiarie, J., Ndinya-Achola, J., Jaoko, W. a Baeten, J. M.** (2007) Infection with *Trichomonas vaginalis* increases the risk of HIV-1 acquisition. *The Journal of Infectious Diseases* **195**, 698–702.
- Meldolesi, J.** (2016) Ectosomes and exosomes—two extracellular vesicles that differ only in some details. *Biochemistry & Molecular Biology Journal* **2**, 1–4.
- Mevorach, D., Mascarenhas, J. O., Gershov, G. a Elkon, K. B.** (1998) Complement-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages. *Journal of Experimental Medicine* **188**, 2313–2320.
- Molina-portela, M., P., Lugli, E., B., Recio-pinto, E. a Raper, J.** (2005) Trypanosome lytic factor a subclass of high-density lipoprotein forms cation-selective pores in membranes. *Molecular and Biochemical Parasitology* **144**, 218–226.
- Müller, M., Mentel, M., van Hellemond, J. J., Henze, K., Woehle, Ch., Gould, S. B., van der Giezen, Y. M., Tielens, A. G. M. a Martin, W. F.** (2012) Biochemistry a evolution of anaerobic energy metabolism in eukaryotes. **76**, 444–495.
- Mundwiler-Pachlatko, E. a Beck, H.** (2013) Maurer’s clefts, the enigma of *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* **110**, 19987–19994.

- Murray, H. W., Berman, J. B., Davies, C. R. a Saravia, N. G.** (2005) Advances in leishmaniasis. *Lancet* **366**, 1561–1577
- Nievas, Y. R., Coceres, V. M., Midlej, V., de Souza, W., Benchimol, M., Pereira-Neves, A., Vashisht, A. A., Wohlschlegel, J. A., Johnson, P. J. a de Miguel, N.** (2018) Membrane-shed vesicles from the parasite *Trichomonas vaginalis*: characterization and their association with cell interaction. *Cellular and Molecular Life Sciences* **75**, 2211–2226.
- Olmos-Ortiz, L. M., Barajas-Mendiola, M., Barrios-Rodiles, M., Cestellano, L. E., Arias-Negrete, S., Avila, E. E. a Cuéllar-Mata, P.** (2017) *Trichomonas vaginalis* exosome-like vesicles modify the cytokine profile and reduce inflammation in parasite-infected mice. *Parasite Immunology* **39**.
- Ouaissi, A., Aguirre, T., Plumas-Marty, B., Piras, M., Schoneck, R., Gras-Masse, H., Taibi, A., Loyes, M., Tartar, A., Capron, A., Piras, R.** (1992) Cloning and sequencing of a 24-kDa *Trypanosoma cruzi* specific antigen released in association with membrane vesicles and defined by a monoclonal antibody. *Biology of the Cell* **75**, 11–17.
- Pant, S., Hilton, H. a Burczynski E. M.** (2012) The multifaceted exosome: biogenesis, role in normal and aberrant cellular function, and frontiers for pharmacological and biomarker opportunities. *Biochemical Pharmacology* **83**, 1484–1494.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2011.12.037>.
- Pap, E., Pállinger, E., Pásztói, M., a Falus, A.** (2009) Highlights of a new type of intercellular communication: microvesicle-based information transfer. *Inflammation Research* **58**, 1–8.
- Pasternak, N. D. a Dzikowski. R.** (2009) PfEMP1: An antigen that plays a key role in the pathogenicity and immune evasion of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **41**, 463–1466.
- Pérez-Molina, J. A., Molina, I.** (2018) Chagas disease. *Lancet* **391**, 82–94.
- Pinger, J., Chowdhury, S. a Papavasiliou, F. N.** (2017) Variant surface glycoprotein density defines an immune evasion threshold for african trypanosomes undergoing antigenic variation. *Nature Communications* **8**, 1-9.  
<http://dx.doi.org/10.1038/s41467-017-00959-w>.
- Piper, R. C. a Katzmann, D. K.** (2007) Biogenesis and function of multivesicular bodies. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **23**, 519–547.
- Podbilewicz, B.** (2014) Virus and cell fusion mechanisms. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **30**, 111–139.
- Pope, S. M. a Lässer, C.** (2013) *Toxoplasma gondii* infection of fibroblasts causes the production of exosome-like vesicles containing a unique array of mRNA and miRNA transcripts compared to serum starvation. *Journal of Extracellular Vesicles* **2**, 1–8.
- Prada, I. a Meldolesi, J.** (2016) Binding and fusion of extracellular vesicles to the plasma membrane of their cell targets. *International Journal of Molecular Sciences* **17**, 1–8.

- Qu, Y., Franchi, L., Nunez, G. a Dubyak, G. R.** (2019) Nonclassical IL-1 $\beta$  secretion stimulated by P2X7 receptors is dependent on inflammasome activation and correlated with exosome release in murine macrophages. *Journal of Immunology* **179**, 1913–1925.
- Quadt, K. A., Barfod, L., Andersen, D., Brunn, J., Gyan, B., Hassenkam, T., Ofori, M. F. a Hviid, L.** (2012) The density of knobs on *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes depends on developmental age and varies among isolates. *PLoS One* **7**, 1–8.
- Raiborg, C., Bremnes, B., Mehlum, A., Gillooly, D. J., D'Arrigo, A., Stang, E. a Stenmark, H.** (2001) FYVE and coiled-coil domains determine the specific localisation of Hrs to early endosomes. *Journal of Cell Science* **114**, 2255–2263.
- Ralph, S. A., van Dooren, G. G., Waller, R. F., Crawford, M. J., Fraunholz, M. J., Foth, B. J., Tonkin, Ch. J., Roos, D. S. a McFadden, G. I.** (2004) Metabolic maps and functions of the *Plasmodium falciparum* apicoplast. *Nature Reviews Microbiology* **2**, 203–216.
- Raposo, G., Nijman, H. W., Stoorvogel, W., Leijendekker, R., Hardingfl, C., V., Melief, C. J. M. a Geuze, H. J.** (1996) B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *The Journal of Experimental Medicine* **183**, 1161-1172.
- Raposo, G., Muralidharan-Chari, V., Clancy, J., Plou, C., Romao, M., Chavrier, P. a D'Souza-Schorey** (2009) ARF6-Regulated shedding of tumor cell-derived plasma membrane microvesicles. *Current Biology* **19**, 1875–1885. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2009.09.059>.
- Regev-rudzki, N., Wilson, D. W., Carvalho, T. G., Sisquella, X., Coleman, B. M., Rug, M., Bursac, D., Angrisano, F., Gee, M., Hill, A. F., Baum, J. a Cowman, A. F.** (2013) Resource cell-cell communication between malaria-infected red blood cells via exosome-like vesicles. *Cell* **153**, 1–14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.029>.
- Ribeiro, K. S., Vasconcellos C. I., Soares R. P., Mendes, M. T., Ellis, C. C., Aguilera-Flores, M., de Almeida, I. C., Schenkman, S., Iwai, L. K. a Torrecilhas, A. C.** (2018) Proteomic analysis reveals different composition of extracellular vesicles released by two *Trypanosoma cruzi* strains associated with their distinct interaction with host cells. *Journal of Extracellular Vesicles* **7**, 1-14. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1463779>.
- Rodrigues, J. C. F., Godinho J. L. P. a de Souza W.** (2014) Biology of human pathogenic trypanosomatids: Epidemiology, lifecycle and ultrastructure. *Subcellular Biochemistry* **74**, 1-41
- Salmon, D., Vanwalleghem, G., Morias, Y., Denoed, J., Krumbholz, C., Lhómmé, F., Bachmaier, S., Kador, M., Gossman, J., Dias, F. B. S., De Muylder, G., Uzureau, P., Magez, S., Moser, M., De Baetselier, P., Van Den Abbele, J., Beschin, A., Boshart, M., a Pays, E.** (2012) Adenylate cyclases of *Trypanosoma brucei* inhibit the innate immune response of the host. *Science* **463**, 1–5.
- Sampaio, N. G., Cheng L. a Eriksson E. M.** (2017) The role of extracellular vesicles in malaria biology and pathogenesis. *Malaria Journal* **16**, 1–11.

- Schwebke, J. R. a Burgess, D.** (2004) Trichomoniasis. *Clinical Microbiology Reviews* **17**, 794–803.
- Segura, E., Guérin, C., Hogg, N., Amigorena, S. a Théry, C.** (2007) CD8<sup>+</sup> dendritic cells use LFA-1 to capture MHC-peptide complexes from exosomes in vivo. *The Journal of Immunology* **179**, 1489–1496.
- Shaked, H., Eliaz, D., Kannan, S., Arvatz, G., Tkacz, I. D., Binder, L., Ben-Asher, H. W., Okalang, U., Chikne, V., Cohen-Chalamish, S. a Michaeli, S.** (2017) Exosome secretion affects social motility in *Trypanosoma brucei*. *PLOS Pathogens* **13**, 1-38.
- Shi, Y., Li, Y., Xiu, F., Wang, J., Cong, H., He, S., Wang, X., Li, X. a Zhou, H.** (2018.) Characterization of exosomes derived from *Toxoplasma gondii* and their functions in modulating immune responses. *International Journal of Nanomedicine* **13**, 467–477.
- Silverman, J. M., Clos, J., Horakova, E., Wang, A. Y., Wiesgigl, M., Kelly, I., Lynn, M. A., McMaster, W. R., Foster, L. J., Levings, M. K. a Reiner, N. E.** (2010) Leishmania exosomes modulate innate and adaptive immune responses through effects on monocytes and dendritic cells. *The Journal of Immunology* **158**, 5011–5022.
- Silverman, J. M. a Reiner, N. E.** (2011) Exosomes and other microvesicles in infection biology: organelles with unanticipated phenotypes. *Cellular Microbiology* **13**, 1–9.
- Silverman, J. M. a Reiner, N. E.** (2012) *Leishmania* exosomes deliver preemptive strikes to create an environment permissive for early infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **1**, 1–8.
- Silvie, O., Mota, M. M., Matuschewski, K. a Prudêncio, M.** (2008) Interactions of the malaria parasite and its mammalian host. *Current Opinion in Microbiology* **11**, 352–359.
- Simpson, R. J., Jensen, S. S. a Lim, J. W. E.** (2008) Proteomic profiling of exosomes: current perspectives. *Proteomics* **8**, 4083–4099.
- Singh, B., Sung, L. K., Matusop, A., Radhakrishnan, A., Shamsul S. S. G., Cox-Singh, J., Thomas, A. a Cornway, D. J.** (2004) A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet* **363**, 1017–1024.
- Song, L., Ge, S. a Pachter, J** (2007) Caveolin-1 regulates expression of junction-associated proteins in brain microvascular endothelial cells. *Blood* **109**, 1515–1523.
- de Souza, W., de Carvalho, T. M. U. a Barrias, E. S.** (2010) Review on *Trypanosoma cruzi*: host cell interaction. *International Journal of Cell Biology* **2010**, 1–18.
- Stark, J. R., Judson, G., Alderete, J. F., Mundodi, V., Kucknoor, A. S., Giovannucci, E. L., Platz, E. A., Sutcliffe, S., Fall, K., Kurth, T., Stampfer, M. J. a Mucci, L. A.** (2009) Prospective study of *Trichomonas vaginalis* infection and prostate cancer incidence and mortality: physicians' health study. *Journal of the National Cancer Institute* **101**, 1406–1411.
- Stijlemans, B., Cnops, J., Naniima, P., Vaast, A., Bockstal, V., De Baetselier, P. a Magez, S.** (2015) Development of a pHrodo-based assay for the assessment of *in vitro* and *in vivo* erythrophagocytosis during experimental trypanosomosis. *PLoS neglected tropical diseases* **9**, 1–22.

- Subra, C., Laulagnier, K., Perret, B. a Record, M.** (2007) Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies. *Biochimie* **89**, 205–212.
- Surman, M., Stępień, E., Hoja-Lukowicz, D. a Przybyło, P.** (2017) Deciphering the role of ectosomes in cancer development and progression: focus on the proteome. *Clinical and Experimental Metastasis* **34**, 273–289.
- Swygard, H., Seña, A. C., Hobbs, M. M. a Cohen, M. S.** (2004) Trichomoniasis: clinical manifestations, diagnosis and management. *Sexually Transmitted Infections* **80**, 91–95.
- Szempruch, A. J., Sykes, S., Kieft, R., Almeida, I. C., Hajduk, S. L. a Harrington, J. M.** (2016) Extracellular vesicles from *Trypanosoma brucei* mediate virulence factor transfer and cause host anemia. *Cell* **164**, 246–257.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.11.051>.
- Taylor, R. C., Cullen, S. P. a Martin, J. M.** (2008) Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **9**, 231–241.
- Trajkovic, K., Hsu, Ch., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Schwille, P., Brügger, B. a Simons, M.** (2008) Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* **319**, 1–15.
- Trapani, J. A. a Smyth, M. J.** (2002) Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nature Reviews Immunology* **2**, 735–747
- Torrecilhas, A. C. T., Tonelli, R. R., Pavanelli, W. R., da Silva, J. S., Schumacher, R. I., de Souza W., Silva, N. C., Abrahamsohn, I. A., Colli, W. a Alves M. J. M.** (2009) *Trypanosoma cruzi*: Parasite shed vesicles increase heart parasitism and generate an intense inflammatory response. *Microbes and Infection* **11**, 29–39.
- Twu, O., de Miguel, N., Lustig, G., Stevens, G. C., Vashisht, A. A., Wohlschlegel, J. A. a Johnson, P. J.** (2013) *Trichomonas vaginalis* exosomes deliver cargo to host cells and mediate host:parasite interactions. *PLoS Pathogens* **9**, 1-14.
- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J. a Lötvall, J. O.** (2007) Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature cell biology* **9**, 654–659.
- Vaughan, A. M., Aly, A. S. I. a Kappe, S. H. I.** (2008) Malaria parasite pre-erythrocytic stage infection: gliding and hiding. *Cell Host and Microbe* **4**, 209–218.
- Verweij, F. J., van Eindhoven, M. A. J., Hopmans, E. S., Vendring, T., Wurdinger, T., Cahir-McFarland, E., Kieff, E., Geerts, D., van der Kant, R., Neeffjes, J., Middeldorp, J. M. a Pegtel D. M.** (2011) LMP1 association with CD63 in endosomes and secretion via exosomes limits constitutive NF-κB Activation. *EMBO Journal* **30**, 2115–2129.  
<http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2011.123>.
- Villarroya-Beltri, C., Gutiérrez-Vázquez, C., Sánchez-Cabo, F., Pérez-Hernández, D., Vázquez, J., Martín-Cofreces, N., Martínez-Herrera, D. J., Pscual-Montano, A., Mittelbrunn, M. a Sánchez-**

- Madrid, F.** (2013) Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nature Communications* **4**, 1–10.
- Wang, Y., Shen, Y., Liu, H., Yin, J., Zhang, X., Gong, A., Chen, X., Chen, S., Mathy, N. W., Cao, J. a Chen, X.** (2019) Induction of inflammatory responses in splenocytes by exosomes released from intestinal epithelial cells following *Cryptosporidium parvum* infection. *Infection and Immunity* **87**, 1-26.
- Wei, Y., Wang, D., Jin, F., Bian, Z., Li, L., Liang, H., Li, M., Shi, L., Pan, Ch., Zhu, D., Chen, X., Hu, G., Liu, Y., Zhang, C. a Zen, K.** (2017) Pyruvate kinase type M2 promotes tumour cell exosome release via phosphorylating synaptosome-associated protein 23. *Nature Communications* **8**, 1–12.  
<http://dx.doi.org/10.1038/ncomms14041>.
- Wollert, T., a Hurley, J. H.** (2010) Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature* **464**, 864–869.  
<http://dx.doi.org/10.1038/nature08849>.
- Wowk, P. F., Zardo, M. L., Miot, H. T., Goldenberg, S., Carvalho, P. C. a Mörking, P. A.** (2017) Proteomic profiling of extracellular vesicles secreted from *Toxoplasma gondii*. *Proteomics* **17**, 15–16.
- Wyllie, M. P. a Ramirez, M. I.** (2017) Microvesicles released during the interaction between *Trypanosoma cruzi* TcI and TcII strains and host blood cells inhibit complement system and increase the infectivity of metacyclic forms of host cells in a strain-independent process. *Pathogens and Disease* **75**.
- Zhang, Y., Liu, Y., Liu, H. a Tang, W. H.** (2019) Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell & Bioscience* **9**, 1–18.  
<https://doi.org/10.1186/s13578-019-0282-2>.