

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra parazitologie**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Parazitologie



Bc. Jana Horáčková

**Role extracelulárních váčků v přenosu dsRNA virů u parazitického prvoka *Trichomonas vaginalis***

The role of extracellular vesicles in transmission of dsRNA viruses in parasitic protist *Trichomonas vaginalis*

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: RNDr. Petr Rada, Ph.D.

Praha, 2022

**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, 1. 8. 2022

.....

**Poděkování:** Na tomto místě bych chtěla především poděkovat svému školiteli RNDr. Petru Radovi, Ph.D. za jeho čas, odborné vedení a za trpělivost při zpracování této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat všem kolegům z naší laboratoře, především Míše Marcinčikové, Mgr. Jitce Kučerové, Mgr. Tamaře Smutné, Ph.D., Dr. Ravi Kumar Narayanasamymu, Ph.D. a prof. RNDr. Janu Tachezemu, Ph.D. za pomoc a cenné rady během mé experimentální práce. Poslední dík patří mým rodičům, kteří mě podporovali po celou dobu studia.

## Abstrakt

*Trichomonas vaginalis* je parazitický prvok, který se nachází v lidském urogenitálním traktu, kde adhezuje k buňkám epitelu. Při infekci uvolňují buňky *T. vaginalis* extracelulární váčky, díky kterým mohou parazité komunikovat mezi sebou a modulovat imunitní odpověď hostitele.

Většina studovaných kmenů *T. vaginalis* obsahuje dsRNA *Trichomonasviru* (TVV). Tento virus patří do rodiny *Totiviridae*, do které patří i další dsRNA viry parazitických protist. TVV se přenáší vertikálně do dceřiných buněk při buněčném dělení a zatím nebyl prokázán horizontální přenos TVV mezi buňkami *T. vaginalis*. Částice TVV byly objeveny uvnitř malých extracelulárních váček, které uvolňují infikované buňky *T. vaginalis* do extracelulárního prostředí. V této diplomové práci bylo prokázáno, že při kokultivaci infikovaných a neinfikovaných trichomonád dochází k přenosu TVV mezi trichomonádami. Touto cestou se však nepodařilo stabilně infikovat trichomonády TVV. Bylo také prokázáno, že extracelulární váčky z infikovaných trichomonád jsou schopné transportovat TVV mezi trichomonádami. Nicméně ani touto cestou se nepodařilo trichomonády stabilně infikovat TVV.

## **Abstract**

*Trichomonas vaginalis* is a parasitic protist found in the human urogenital tract, where it adheres to the epithelial cells. During infection, *T. vaginalis* cells release extracellular vesicles that allow them to communicate with each other and modulate the host immune response. Most studied *T. vaginalis* strains contain dsRNA *Trichomonasviruses* (TVVs). These viruses belong to the *Totiviridae* family, which includes other dsRNA viruses from various parasitic protists. TVV is transmitted vertically to the daughter cells during cell division. Horizontal transfer of TVV between *T. vaginalis* cells has not yet been proven. TVV particles were found inside small extracellular vesicles that release infected *T. vaginalis* into the extracellular space. In this thesis, it was shown that TVV could be transmitted between trichomonads during co-cultivation of infected and uninfected trichomonads. However, stable TVV infection of trichomonads was not observed. It was also proven that extracellular vesicles from infected trichomonads could transmit TVV among other trichomonads. Nevertheless, this way of transmission did not lead to the stable TVV infection of trichomonads either.

1 Úvod.....	1
2 Literární přehled.....	2
2.1 <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	2
2.2 Virulenční faktory parazitického prvoka <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	3
2.3 Extracelulární váčky: Exozomy a mikrovezikly.....	5
2.3.1 Exozomy.....	5
2.3.2 Funkce extracelulárních váček u parazitických prvoků .....	8
2.3.2.1 Extracelulární váčky <i>T. vaginalis</i> .....	9
2.4 <i>Trichomonasvirus</i> .....	11
3 Cíle práce .....	16
4 Materiály a metodika.....	17
4.1 Použité organismy.....	17
4.1.1 <i>Escherichia coli</i> .....	17
4.1.2 <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	17
4.1.3 Lidské aneuploidní imortalizované keratinocyty.....	17
4.2 Použité roztoky a média.....	17
4.3 Použité plasmidy k transfekci trichomonád.....	19
4.4 Použité protilátky.....	19
4.4.1 Primární protilátky.....	19
4.4.2 Sekundární protilátky .....	19
4.5 Transformace bakterií <i>E. coli</i> (TOP10).....	20
4.6 Izolace plasmidů z bakterií .....	20
4.7 Transfekce trichomonád plasmidem .....	20
4.7.1 Elektroporace trichomonád.....	20
4.7.2 Nukleofekce trichomonád.....	21
4.8 Detekce rekombinantních proteinů .....	21
4.8.1 SDS polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE) .....	21
4.8.1.1 Přeblotování proteinů na nitrocelulózovou membránu .....	21
4.8.1.2 Detekce rekombinantních proteinů na nitrocelulózové membráně .....	22
4.8.2 Detekce rekombinantních proteinů v buňkách imunofluorescencí.....	22
4.9 Detekce dsRNA virů v trichomonádách .....	23
4.9.1 Izolace RNA trizolem.....	23
4.9.2 Izolace RNA pomocí High Pure RNA Isolation Kitu .....	24

4.9.3 RT-PCR .....	24
4.9.4 Přepis RNA na cDNA pomocí kitu SuperScript™ III. (Invitrogen) .....	24
4.9.5 Amplifikace příslušných sekvencí cDNA .....	24
4.9.6 Horizontální gelová elektroforéza .....	25
4.9.7 RT-qPCR .....	25
4.10 Izolace extracelulárních váčků z kultury trichomonád .....	26
4.11 Detekce viru v kultuře trichomonád .....	26
4.11.1 Precipitace proteinů kyselinou trichloroctovou .....	27
4.12 Průkaz přítomnosti kapsidového proteinu viru uvnitř extracelulárních váčků .....	27
4.12.1 Precipitace proteinů metanolem/chloroformem .....	27
4.13 Přenos dsRNA virů mezi trichomonádami .....	28
4.13.1 Kokultivace infikovaných a neinfikovaných trichomonád v médiu TYM se sérem ....	28
4.13.1.1 Kokultivace infikovaných a neinfikovaných trichomonád v médiu TYM bez séra .....	28
4.13.2 Kokultivace infikovaných a neinfikovaných trichomonád s HaCaT buňkami .....	28
4.13.3 Koinkubace trichomonád bez virů s extracelulárními váčky z infikovaných trichomonád v médiu TYM se sérem .....	29
4.13.3.1 Inkubace vyléčeného kmene s extracelulárními váčky z infikovaného kmene v médiu TYM bez séra .....	29
5 Výsledky .....	30
5.1 Detekce dsRNA virů v trichomonádách .....	30
5.2 Detekce TVV3 v trichomonádách kmene Tv79-49 .....	32
5.3 Průkaz přítomnosti kapsidového proteinu uvnitř extracelulárních váčků .....	33
5.4 Přenos virů mezi trichomonádami .....	35
5.4.1 Koinkubace buněk Tv79-49c1 <sup>-</sup> G418-PFK s extracelulárními váčky z kmene Tv79-49c1 <sup>+</sup> PAC- BirA v médiu TYM se sérem .....	37
5.4.2 Koinkubace buněk Tv79-49c1 <sup>-</sup> G418-PFK s extracelulárními váčky z kmene Tv79-49c1 <sup>+</sup> PAC-BirA v médiu TYM bez séra .....	40
5.4.3 Kokultivace infikovaných trichomonád Tv79-49c1 <sup>+</sup> PAC-BirA a neinfikovaných trichomonád Tv79-49c1 <sup>-</sup> G418-PFK v médiu TYM se sérem .....	42
5.4.4 Kokultivace infikovaných trichomonád Tv79-49c1 <sup>+</sup> PAC-BirA a neinfikovaných trichomonád Tv79-49c1 <sup>-</sup> G418-PFK v médiu TYM bez séra .....	46
5.4.5 Kokultivace infikovaných trichomonád Tv79-49c1 <sup>+</sup> PAC-BirA a neinfikovaných trichomonád Tv79-49c1 <sup>-</sup> G418-PFK s HaCaT buňkami v médiu GMP .....	48

6 Diskuse .....	50
7 Závěr .....	54
8 Seznam použitých zkratek.....	55
9 Literatura .....	56

# 1 Úvod

*Trichomonas vaginalis* je parazitický extracelulární prvok, který infikuje výhradně lidské hostitele a je původcem onemocnění trichomoniázy. Incidence tohoto onemocnění je přibližně 150 miliónů případů po celém světě (World Health Organization, 2018). Tento parazit se nachází v urogenitálním traktu, přenáší se pohlavním stykem a nemá žádné mezihostitele. Trofozoiti v urogenitálním traktu adherují k buňkám epitelu a rychle se mění na améboidní formu (Lal et al. 2006). Při infekci buňky *T. vaginalis* sekretují různé molekuly, které napomáhají parazitovi k úspěšné infekci a zvyšují tak virulenci parazita (Štáfková et al. 2018). Takové molekuly se označují jako virulenční faktory. Na virulenci *T. vaginalis* se také podílejí extracelulární váčky.

*T. vaginalis* uvolňuje tři různé druhy extracelulárních váček: (i) malé extracelulární váčky o velikosti 50-150 nm – exozomy, dále (ii) velké extracelulární váčky o velikosti 100-1000 nm – mikrovezikly (ektozomy) a (iii) váčky větší než 1000 nm – LVs (large vesicles). Všechny tyto váčky mají schopnost interagovat s ostatními buňkami *T. vaginalis* a také s hostitelskými buňkami (Nievas et al. 2017; Twu et al. 2013). Nejvíce jsou ze všech tří typů váček prozkoumané exozomy. Exozomy vznikají splynutím multivezikulárního tělíska s cytoplazmatickou membránou buňky a tím se uvolní do vnějšího prostředí (Gurung et al. 2021). Exozomy z vysoce adherentních kmenů trichomonád mají schopnost zvyšovat adhezi u méně adherentních kmenů. Exozomy z trichomonád mají také schopnost modulovat imunitní odpověď hostitele (Twu et al. 2013).

Většina klinických izolátů *T. vaginalis* je infikovaná dsRNA viry, které dostaly jméno *Trichomonasvirus* (TVV) (Weber et al. 2003; Wendel et al. 2002). TVV patří do rodiny *Totiviridae*, do které patří i další dsRNA viry prvků, jako je *Giardavirus* či *Leishmania* RNA virus (Barrow et al. 2020). Přítomnost TVV v buňkách *T. vaginalis* má vliv na expresi některých proteinů parazita a pravděpodobně má také vliv na průběh infekce v hostiteli (Fraga et al. 2012; He et al. 2017). TVV se přenáší vertikálně do dceřiných buněk během buněčného dělení (Narayanasamy et al. 2021). Zatím však není jasné, zda dochází k extracelulárnímu přenosu TVV mezi trichomonádami. Ačkoliv bylo prokázáno, že buňky *T. vaginalis* mohou endocytovat izolované viriony, tak touto cestou nedochází ke stabilní infekci trichomonád (Benchimol et al. 2002; Wang and Wang 1986). Rada et al. 2022 prokázali, že infikované trichomonády uvolňují malé extracelulární váčky (exozomy), které obsahují částice TVV. Cílem mé diplomové práce bylo zjistit, zda tyto extracelulární váčky mohou být cestou pro přenos TVV mezi trichomonádami.



## 2 Literární přehled

### 2.1 *Trichomonas vaginalis*

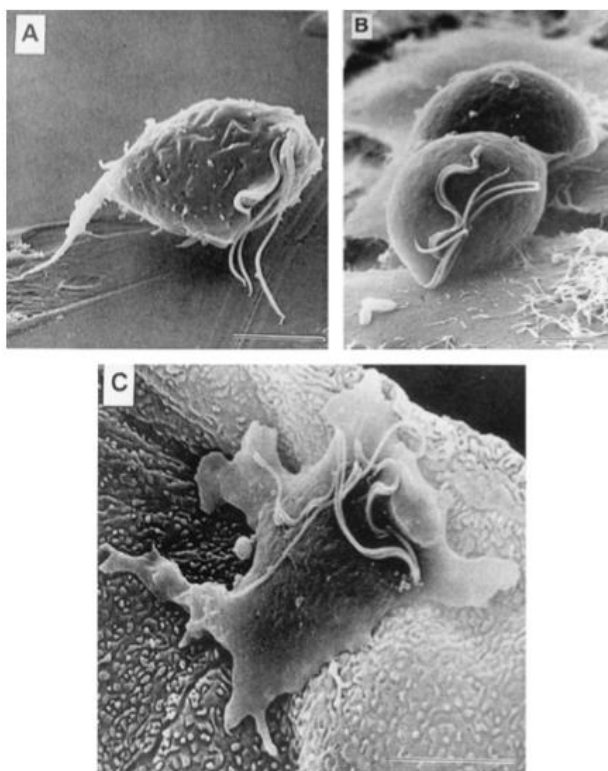
Prvok *Trichomonas vaginalis* byl poprvé popsán v roce 1836 Alfrédem F. Donném. *T. vaginalis* je výhradně lidský patogen a je původcem sexuální přenosného onemocnění – trichomoniázy.

Přibližně u poloviny nakažených žen je infekce *T. vaginalis* asymptomatická (Sutton et al. 2007). Symptomaticky se infekce u žen projevuje výtokem z pochvy a svěděním (Wølner-Hanssen et al. 1989). Trichomoniáza může mít také vliv na průběh těhotenství. U těhotných žen s trichomoniázou může dojít k předčasnému porodu či dokonce potratu (Silver et al. 2014). U mužů bývá infekce *T. vaginalis* asymptomatická (Wølner-Hanssen et al. 1989). S infekcí prvokem *Trichomonas vaginalis* je zvýšené riziko přenosu HIV, zvýšené riziko vzniku karcinomu děložního hrdla a zvýšené riziko vzniku karcinomu prostaty (Masha et al. 2019; Sutcliffe et al. 2012; Yang et al. 2018).

*Trichomonas vaginalis* je mikroareofilní prvok, který má anaerobní formu mitochondrií–hydrogenozomy (Lindmark, Müller, and Shio 1975). Hydrogenozomy jsou organely, které za anaerobních podmínek produkují ATP substrátovou fosforylací. Jméno “hydrogenozomy“ získaly tyto organely díky tomu, že produkují vodík (Cerkasov et al. 1978; Lindmark and Muller 1973).

*T. vaginalis* se nachází pouze u lidí, přenáší se pohlavním stykem a nemá žádné mezihostitele. *T. vaginalis* se nachází v urogenitálním traktu ve stádiu trofozoita. Trofozoiti (obr. 1A) se v urogenitálním traktu pohybují díky čtyřem předním bičíkům a jednomu zpětnému bičíku, který tvoří undulující membránu (Honiberg and King 1964). Trofozoiti adherují k buňkám epitelu a rychle se mění na améboidní formu (obr. 1BC) (Lal et al. 2006). V práci Beri et al. 2020 uvádějí, že trofozoiti se mohou také přeměnit na méně virulentní pseudocysty. *T. vaginalis* má cytolytický efekt na buňky hostitele. Po adhezi parazita dochází k mechanickému poškození buněk epitelu což vede k jejich nekróze. Fragmenty epiteliálních buněk jsou poté fagocytovány trichomonádami (Midlej and Benchimol 2010). Trichomonády jsou schopné také indukovat apoptózu epiteliálních buněk, která je nezávislá na kontaktu parazita s buňkami hostitele (Kummer et al. 2008). Kromě epiteliálních buněk jsou trichomonády schopné fagocytovat i další buňky urogenitálního traktu: např. bakterie, kvasinky, leukocyty, erytrocyty a spermatozoidy (Benchimol et al. 2008; Rendón-Maldonado et al. 1998; Pereira-Neves and Benchimol 2007).

Při infekci *T. vaginalis* je klíčová vrozená imunitní odpověď. Po kontaktu trofozoitů s epiteliálními buňkami dochází k aktivaci prozánětlivé imunitní odpovědi. Dochází k uvolňování cytokinů a chemokinů, zejména IL-8 (interleukin-8), IL-6 a MIP-3 $\alpha$  (macrophage inflammatory protein 3 $\alpha$ ) (Fichorova et al. 2006). IL-8 je důležitý pro chemoatrakci neutrofilů do místa infekce (Shiao Men-Fang et al. 1994). Neutrofilů jsou imunitní buňky, které jsou schopné rychle zabít trichomonády (Gao et al. 2021; Mercer et al. 2018). I přes to, že při infekci *T. vaginalis* převažují mechanismy vrozené imunitní odpovědi, tak dochází také k produkci specifických protilátek proti *T. vaginalis* (Yadav, Gupta, and Malla 2005). Nicméně hladina těchto protilátek klesá po eradikaci infekce. Po infekci *T. vaginalis* tedy není hostitel chráněný před další možnou infekcí parazitem (Anh Ton Nu et al. 2015).



**Obr. 1 Trofozoit *Trichomonas vaginalis*.** (A) Volně plovoucí trofozoit. (B) Adheze trofozoita k vaginálnímu epitelu. Při adhezi se mění volně plovoucí trofozoit na améboidní formu (C) Améboidní forma *T. vaginalis*. Obrázek převzat z práce Nagesha and Rama 1998.

## 2.2 Virulenční faktory parazitického prvka *Trichomonas vaginalis*

Mechanismy a látky, které se podílejí na virulenci parazitů se označují jako virulenční faktory. Klíčový mechanismus pro úspěšnou infekci *T. vaginalis* je (i) cytoadherence a přeměna trofozoitů na améboidní formu, (ii) cytolýza buněk hostitele, (iii) hemolýza, (iv) fagocytóza a (v) únik parazita před imunitní odpovědí hostitele.

V urogenitálním traktu adherují trichomonády k buňkám epitelu. Na adhezi trofozoitů k buňkám se podílí například LPG (lipophosphoglycan), proteiny BspA (bacteroides surface protein A), proteiny Pmp (polymorphic membrane protein) a cysteinové proteázy. LPG je glykokonjugát který se nachází na povrchu parazita *T. vaginalis*. LPG se váže na galektin 1 a 3, které se nachází na povrchu epitelálních buněk (Fichorova et al. 2016; Okumura, Baum, and Johnson 2008). LPG vazbou na galektiny aktivuje prozánětlivou imunitní odpověď v epitelálních buňkách (Fichorova et al. 2006, 2015). Další funkcí LPG je cytolýza buněk hostitele. U mutantů *T. vaginalis* deficientních na LPG, byla prokázána nižší cytotoxická aktivita, než u trichomonád bez fenotypu (Bastida-Corcuera et al. 2005). Na adhezi trofozoitů k buňkám epitelu se dále podílí proteiny BspA (Handrich et al. 2019). Genom *T. vaginalis* kóduje 911 BspA-like proteinů a bylo prokázáno, že 721 těchto paralogů se exprimuje (Gould et al. 2013; Noël et al. 2010). Proteiny BspA byly nalezeny v sekretomu a také na povrchu parazita (de Miguel et al. 2010; Štáfková et al. 2018). Na adhezi parazita k buňkám epitelu se dále podílí proteiny Pmp (Handrich et al. 2019).

Genom *T. vaginalis* kóduje 48 Pmp-like proteinů a tyto proteiny byly nalezeny na povrchu parazita (Hirt et al. 2011; de Miguel et al. 2010).

Dříve bylo mylně uváděno, že na adhezi *T. vaginalis* se podílejí adhezivní proteiny na povrchu parazita, které se specificky vážou na buňky epitelu. Předpokládalo se, že tyto adheziny jsou tzv. moonlighting proteiny, protože se jedná o hydrogenozomální enzymy, které se účastní metabolismu v hydrogenozomech (Engbring and Alderete 1998; Garcia and Alderete 2007; Meza-Cervantez et al. 2011). Nicméně v práci Rada et al. 2019 prokázali, že tyto proteiny jsou lokalizované výhradně v hydrogenozomech a nevstupují do sekreční dráhy. Tyto proteiny tedy nemohou být transportovány sekreční drahou na povrch parazita. Do extracelulárního prostředí se tyto enzymy mohou dostat pomocí autofagozomů anebo se mohou uvolnit z mrtvých buněk (Benchimol 1999). Enzymy z hydrogenozomů jsou hydrofobní a mají schopnost se v extracelulárním prostředí nespécificky vázat na membrány různých buněk (Addis, Rappelli, and Fiori 2000).

Na adhezi trichomonád se dále podílejí cysteinové proteázy. Syntéza a aktivita cysteinových proteáz trichomonád je regulována železem, pH, teplotou a polyaminy (Alvarez-Sánchez et al. 2000, 2008; Arroyo et al. 2015). Konkrétně se na adhezi trichomonád k buňkám epitelu podílí CP30 (cysteine proteinase 30) (Mendoza-Lopez et al. 2000), CP62 (Hernández et al. 2004) a legumain-like cysteinová proteáza (Rendón-Gandarilla et al. 2013). Zdá se, že CP30 je důležitým virulenčním faktorem trichomonád, protože jeho exprese je vyšší u klinických izolátů ze symptomatických pacientek (Yadav et al. 2007). Cysteinové proteázy však mají i další funkce. Podílejí se na cytolýze buněk hostitele, indukují hemolýzu erytrocytů a podílí se na ochraně parazita před imunitní odpovědí hostitele. Na cytolýze se podílí například CP65 a CP39 (Alvarez-Sánchez et al. 2000; Ramón-Luing et al. 2011). Dále se na cytolýze buněk epitelu podílí také metaloproteáza GP63 (glycoprotein 63) (Ma et al. 2011). Na hemolýze erytrocytů se podílí například CP4 (Cárdenas-Guerra et al. 2013). Hemolýza erytrocytů je důležitá pro *T. vaginalis*, protože erytrocyty jsou hlavním zdrojem železa a lipidů pro metabolismus parazita (Lehker et al. 1990). Další funkcí cysteinových proteáz je ochrana parazita před imunitním systémem hostitele. Cysteinové proteázy jsou schopné štěpit protilátky (IgA a IgG) hostitele (Provenzano and Alderete 1995).

Virulenční faktory mohou být sekretovány z trichomonád klasickou sekreční drahou, tj. přes endoplazmatické retikulum a golgiho aparát (Štáfková et al. 2018). Virulenční faktory však mohou být sekretovány z trichomonád i nekonvenčními dráhami, a to pomocí lysozomů nebo pomocí extracelulárních váčků (Nievas et al. 2017; Twu et al. 2013; Zimmann et al. 2022).

### 2.3 Extracelulární váčky: Exozomy a mikrovezikly

Exozomy a mikrovezikly (ektozomy) jsou extracelulární váčky, které uvolňují prokaryotické i eukaryotické buňky do svého okolí (Johnstone et al. 1987; Rivera et al. 2010). Membránu těchto váček tvoří klasická lipidová dvojvrstva a uvnitř váček se nachází proteiny, lipidy a nukleové kyseliny z mateřské buňky (Skotland et al. 2020). Extracelulární váčky transportují svůj obsah mezi buňkami a tím se podílejí na mezibuněčné komunikaci (Frühbeis et al. 2013). Exozomy a mikrovezikly se liší velikostí a biogenezí. Mikrovezikly jsou extracelulární váčky o velikosti 100-1000 nm, které vznikají pučením z cytoplazmatické membrány mateřské buňky. Exozomy jsou malé extracelulární váčky o velikosti 30-150 nm, které se uvolňují z buněk po splynutí multivezikulárního tělíska s cytoplazmatickou membránou buňky (Doyle and Wang 2019).

#### 2.3.1 Exozomy

Dříve se předpokládalo, že exozomy slouží buňkám pouze k odstranění nepotřebných proteinů (Pan and Johnstone 1983). Nicméně později bylo zjištěno, že se tyto váčky podílejí na transportu molekul mezi buňkami a na mezibuněčné komunikaci. Tím se exozomy podílejí na důležitých fyziologických a patofyziologických procesech (Frühbeis et al. 2013; Guo et al. 2020).

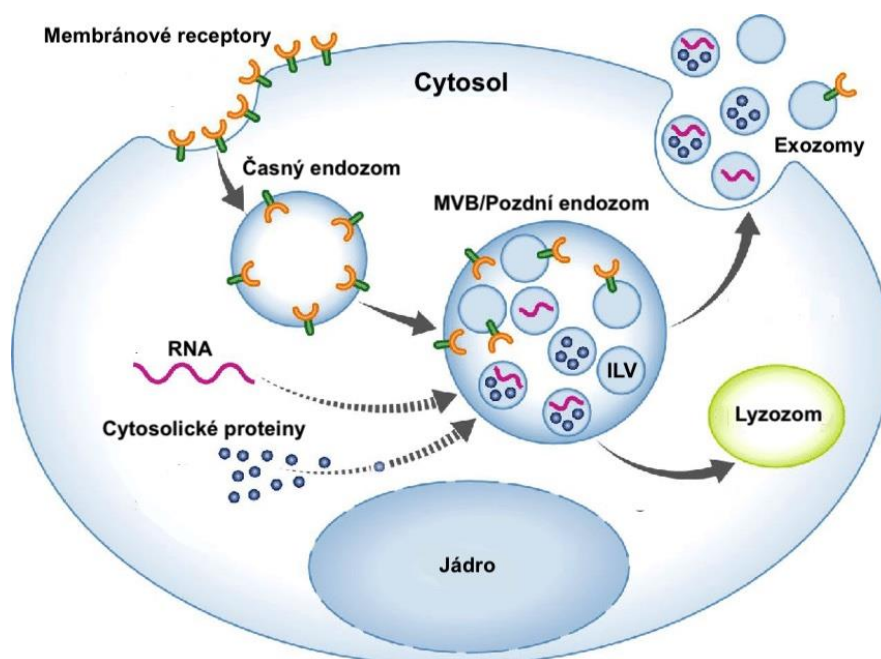
Exozomy se uvolňují z buněk po splynutí multivezikulárního tělíska s cytoplazmatickou membránou (obr. 2) (Gurung et al. 2021). Multivezikulární tělísko neboli pozdní endozom vzniká z časného endozomu. Při přeměně časného endozomu na multivezikulární tělísko dochází k invaginaci endozomální membrány a uvnitř endozomu tak vznikají intraluminální váčky (Huotari and Helenius 2011).

Do vznikajících intraluminálních váček jsou transportovány proteiny, lipidy a nukleové kyseliny. Proteiny jsou transportovány do intraluminálních váček pomocí ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) dráhy. ESCRT dráha je tvořena pěti komplexy: ESCRT 0, I, II, III a ATPázou Vps4 (vacuolar protein sorting 4) (Henne, Buchkovich, and Emr 2011). Podjednotky komplexů ESCRT-0, I a II vážou ubiquitinem značené proteiny (Bache et al. 2003; Katzmann, Babst, and Emr 2001; Teo et al. 2006). Komplex ESCRT-III indukuje invaginaci membrány endozomu a formují se tak intraluminální váčky (Hanson et al. 2008). Komplex ESCRT-III je poté odstraněn z membrány endozomu ATPázou Vps4 (Wollert et al. 2009). Proteiny však mohou být transportovány do intraluminálních váček i nezávisle na ESCRT dráze, a to díky ceramidu. Ceramid je lipid, který vzniká ze sfingomyelinu díky sfingomyelináze a je schopný indukovat invaginaci membrány endozomu (Trajkovic et al. 2008). Dále mohou být proteiny transportovány do intraluminálních váček díky tetraspaninům (Andreu and Yáñez-Mó 2014). V exozomech se nachází také lipidy (Haraszi et al. 2016). Není však jasné, jakým způsobem jsou lipidy transportovány do intraluminálních váček.

V exozomech byla také prokázána přítomnost nukleových kyselin. V exozomech byla detekována kódující mRNA a miRNA (microRNA) (Morris et al. 2020; Yue et al. 2020).

Bylo prokázáno, že miRNA je transportována do intraluminálních váček díky RNA-vazebným proteinům (Shurtleff et al. 2016; Villarroja-Beltri et al. 2013). RNA také může být také transportována do intraluminálních váček pravděpodobně díky komplexu ESCRT-II, protože bylo prokázáno, že tento komplex je schopný vázat RNA (Irion and St Johnston 2007).

Multivezikulární tělísko s intraluminálními váčky je transportováno k cytoplazmatické membráně podél mikrotubulů. Zatím však není jasné, jaké konkrétní molekulární motory se podílejí na transportu multivezikulárního tělíska k cytoplazmatické membráně (Mittelbrunn, Vicente-Manzanares, and Sánchez-Madrid 2015; van Niel, D'Angelo, and Raposo 2018). Posledním krokem biogeneze exozomů je fúze membrány multivezikulárního tělíska s membránou buňky. Jakmile se multivezikulární tělísko spojí s membránou buňky tak dochází k uvolnění intraluminálních váčků do extracelulárního prostoru (Harding, Heuser, and Stahl 1983). Uvolněním intraluminálních váčků do extracelulárního prostoru vzniknou exozomy.

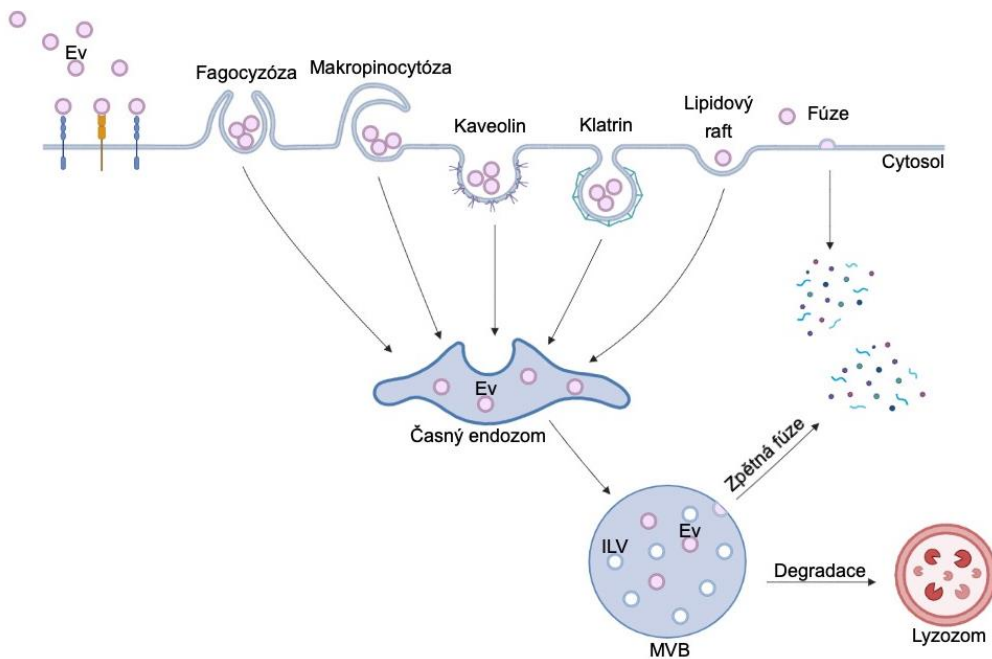


**Obr. 2 Schéma biogeneze exozomů.** Multivezikulární tělísko (MVB)/Pozdní endozom je organela, která obsahuje intraluminální váčky (ILV). Tyto váčky vznikají invaginací membrány endozomu. Do intraluminálních váčků jsou transportovány různé molekuly z cytosolu. Multivezikulární tělísko se poté spojí s plazmatickou membránou a intraluminální váčky se uvolní do extracelulárního prostoru. Uvolněné intraluminální váčky se označují jako exozomy. Multivezikulární tělísko však buňkám také slouží k degradaci nepotřebných molekul. Multivezikulární tělísko se spojí s lyzozomem a dochází tak k degradaci jeho obsahu. Obrázek převzat z práce Vakhshiteh, Atyabi, and Ostad 2019.

Uvnitř uvolněných exozomů se nachází molekuly z mateřské buňky. Na webové databázi ExoCarta (<http://exocarta.org>) jsou popsány proteiny, lipidy a nukleové kyseliny, u kterých bylo prokázáno, že se nacházejí v exozomech. Exozomy obsahují transmembránové a cytosolické proteiny. Transmembránové proteiny exozomů jsou například tetraspaniny (Escola et al. 1998), integriny (Mears et al. 2004) a povrchové receptory (Johnstone et al. 1987; Munich et al. 2012). Cytosolické proteiny exozomů jsou proteiny ESCRT dráhy, proteiny cytoskeletu, proteiny tepelného šoku, enzymy, růstové faktory a cytokiny a jiné (Gurung et al. 2021). Exozomy také obsahují lipidy. V membráně exozomů se nachází ceramid, který se podílí na vzniku intraluminálních váčků (Trajkovic et al. 2008).

V membráně exozomů se dále nachází sfingomyelin, fosfatidylserin a cholesterol (Record et al. 2014). Exozomy mohou také obsahovat biologicky aktivní lipidy například prostaglandiny a leukotrieny (Esser et al. 2010; Subra et al. 2010). Dále bylo prokázáno, že uvnitř exozomů mohou být také nukleové kyseliny. V exozomech můžeme najít nekódující miRNA, mRNA i DNA (Morris et al. 2020; Thakur et al. 2014; Valadi et al. 2007).

Exozomy transportují svůj obsah do cílových buněk. Pomocí svých povrchových proteinů se exozomy vážou na proteiny cílových buněk (Nolte-’t Hoen et al. 2015; Mallegol et al. 2007). Po navázání váčku na cílovou buňku je osud váčku různý (obr. 3). (1) Exozom může zůstat navázaný na plazmatické membráně cílové buňky. Příkladem jsou exozomy obsahující MHC-II komplex (major histocompatibility complex – II), které byly pozorovány na povrchu T-lymfocytů (Buschow et al. 2009) (2) Exozom je po navázání na receptor cílové buňky endocytován. Endocytóza extracelulárních váčků je zprostředkována fagocytózou (Feng et al. 2010), makropinocytózou, klatrinem (Tian et al. 2014), kaveolinem (Nanbo et al. 2013) anebo lipidovými rafty (Svensson et al. 2013). Endocytované váčky se dostávají endocytickou dráhou do časného endozomu (Tian et al. 2010), který se poté přemění na pozdní endozom/multivezikulární tělísko (Huotari and Helenius 2011). Multivezikulární tělísko se spojí s lysozomem a dochází k degradaci endocytovaných exozomů (Huotari and Helenius 2011; Tian et al. 2010). Endocytované váčky mohou uniknout degradaci tím, že se spojí s membránou multivezikulárního tělíska. Obsah váčků se tak uvolní do cytosolu. Tento proces se jmenuje zpětná fúze (Bissig and Gruenberg 2014). (3) Extracelulární váček fúzuje s cílovou buňkou. Membrána extracelulárního váčku se spojí s membránou cílové buňky a obsah váčku je tak uvolněn do cytosolu cílové buňky (Prada and Meldolesi 2016).



**Obr. 3 Osud extracelulárních váčků.** Extracelulární váček se naváže na proteiny na povrchu cílové buňky. Osud navázaného extracelulárního váčku je různý. (I) Extracelulární váček může zůstat navázaný na povrchu buňky. (II) Extracelulární váček může být endocytován cílovou buňkou. Extracelulární váček se tak dostává do časného endozomu, který se mění na multivezikulární tělísko. Multivezikulární tělísko splyne s lyzozomem a dochází tak degradaci jeho obsahu. Extracelulární váčky se mohou vyhnout degradaci v lyzozomu zpětnou fúzí. Zpětná fúze je děj, při němž se membrána extracelulárního váčku spojí s membránou multivezikulárního tělíška a obsah extracelulárního váčku tak uvolní do cytosolu. (III) Extracelulární váček fúzuje s cílovou buňkou. Membrána extracelulárního váčku se spojí s membránou cílové buňky a obsah extracelulárního váčku se tak uvolní do cytosolu. **Ev** – Extracelulární váček, **MVB** – multivezikulární tělísko, **ILV** – intraluminální váček. Obrázek vytvořen pomocí BioRender.com.

### 2.3.2 Funkce extracelulárních váčků u parazitických prvoků

Důležitou úlohu mají extracelulární váčky při infekcích způsobených parazitickými prvky. Díky extracelulárním váčkům mohou parazitičtí prvoci komunikovat mezi sebou, ovlivňovat vlastnosti buněk hostitele a modulovat jeho imunitní systém. Tím se extracelulární váčky podílejí na virulenci parazitů.

Například exozomy z leishmanií inhibují u monocytů produkci IL-8 a TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ) a zároveň zvyšují produkci IL-10 (Silverman et al. 2010). IL-10 je silný protizánětlivý cytokin, který se podílí na imunosupresi při infekci leishmaniemi (Murray et al. 2002). Dalším parazitem, který pomocí extracelulárních váčků moduluje imunitní odpověď hostitele je *Plasmodium falciparum*. Infikované erythrocyty uvolňují mikrovezikly, které mají silné prozánětlivé účinky (Mantel et al. 2013). Lokální prozánětlivá imunitní reakce může být pro parazita přínosná, protože vysoká hladina prozánětlivých cytokinů je spojená s aktivací buněk endotelu a zvýšenou sekvestrací infikovaných erythrocytů (Turner et al. 1994). Extracelulární váčky také mohou chránit parazita před imunitním systémem hostitele. Extracelulární váčky z *Trypanosoma cruzi* vážou C3 konvertázu na povrchu parazita a chrání tak parazita před působením komplementu (Cestari et al. 2012).

Množství vylučovaných exozomů a jejich obsah může být regulován parazitem v závislosti na okolním prostředí. Např. při přenosu leishmanií z vektora do lidského hostitele je parazit vystaven tepelnému šoku. Promastigoti, kteří byli inkubováni při teplotě 37 °C (simulace teploty v lidském těle) uvolňují třikrát více exozomů než promastigoti, kteří byli inkubováni při teplotě 26 °C (simulace teploty ve vektoru). Při neutrálním pH byly exozomy z leishmanií obohaceny o proteiny s kinázovou aktivitou a při nízkém pH byly exozomy obohaceny o proteiny s fosfatázou aktivitou. (Silverman et al. 2010).

Extracelulární váčky umožňují parazitům měnit vlastnosti buněk hostitele. V práci Kim et al. 2016 prokázali, že exozomy z tachyzoitů *Toxoplasma gondii* zpomalují proliferaci potkaních myoblastů a ovlivňují jejich buněčný cyklus. Exozomy z tachyzoitů zastavují buněčný cyklus v S nebo G2/M fázi. Tyto změny však byly pozorovány u potkaních myoblastů pouze přechodně. Dalším příkladem parazita, který mění vlastnosti buněk hostitele díky extracelulárním váčkům je *Giardia intestinalis*. Extracelulární váčky z tohoto parazita obsahují malé RNA, které pravděpodobně mohou modulovat expresi některých proteinů hostitele (Evans-Osses et al. 2017). Extracelulární váčky z cyst *E. histolytica* podporují encystaci trofozoitů, zatímco extracelulární váčky z metabolicky aktivních trofozoitů zabraňují ostatním trofozoitům se encystovat (Sharma et al. 2020). Dalším příkladem parazita, který využívá extracelulární váčky ke komunikaci je *Plasmodium falciparum*. *In vitro* bylo prokázáno, že extracelulární váčky z infikovaných erytrocytů indukují přeměnu merozoitů na gametocyty (Mantel et al. 2013; Regev-rudzki et al. 2013). Přeměna merozoitů na gametocyty je klíčová pro přenos plasmodia do vektora (Alano 2007). V práci Regev-rudzki et al. 2013 dále prokázali, že exozomy z erytrocytů infikovaných *P. falciparum* mohou obsahovat plasmidy, které nesou geny pro rezistenci proti antimalarikům. Tyto plasmidy mohou být díky exozomům rozšířeny v populaci *P. falciparum*.

V naší laboratoři se v současné době zabýváme výzkumem exozomů parazitického prvoka *Trichomonas vaginalis*. Trichomonády využívají, podobně jako ostatní parazitičtí prvoci, extracelulární váčky ke komunikaci a modulaci imunitního systému hostitele. Podrobněji jsou funkce exozomů a další extracelulárních váček *T. vaginalis* popsány v následující kapitole.

### 2.3.2.1 Extracelulární váčky *T. vaginalis*

*T. vaginalis* uvolňuje do svého okolí 3 různé druhy extracelulárních váček: mikrovezikly, LVs (large vesicles) a exosomy. Mikrovezikly obsahují proteiny BspA a metaloproteázy GP63, které se podílejí na virulenci parazita (Nievas et al. 2017). Ukázalo se, že uvolňování mikroveziklů z *T. vaginalis* je stejně jako u savčích mikroveziklů závislé na vápníku (Nievas et al. 2017; Seki et al. 2020). V těchto váčkách byla také zjištěna přítomnost proteinu ARF6 (ADP-ribosilation factor 6), který se podílí biogenezi ektozomů (Muralidharan-Chari et al. 2009; Nievas et al. 2017). Buňky *T. vaginalis* vylučují dále váčky, které jsou větší než mikrovezikly (nad 1000 nm). Tyto váčky se označují jako LVs. Mikrovezikly i LVs z parazita interagují s ostatními trichomonádami a také byla prokázána interakce těchto váček s HeLa buňkami (Nievas et al. 2017). Je tedy pravděpodobné, že díky těmto váčkům mohou parazité komunikovat mezi sebou a ovlivňovat imunitní odpověď hostitelských buněk.



Nejvíce jsou u *T. vaginalis* ze všech tří typů váček prozkoumané exozomy. V práci Twu et al. 2013 zjistili, že buňky *T. vaginalis* uvolňují do extracelulárního prostoru váčky o velikosti 30-150 nm. Prokázali, že tyto váčky vznikají z multivezikulárního tělíska a obsahují proteiny, které jsou specifické pro exozomy (tetraspaniny, Alix, Rab GTPázy, Hsp70 a Tsg101). Na základě těchto výsledků byly tyto váčky označeny jako exozomy. Exozomy z *T. vaginalis* obsahují proteiny, které se podílejí na intracelulárním transportu: SNARE proteiny, Vps (vacuolar protein sorting) proteiny a paralogy Rab proteinů. Exozomy obsahují membránové a volné peptidázy. Membránové peptidázy, které byly nalezeny v exozomech jsou: serinové peptidázy (10 paralogů), dvě cysteinové proteázy závislé na vápníku (calpains) a leishmanolysin-like metalopeptidázy (GP63, 11 paralogů). Volné peptidázy uvnitř exozomů jsou cysteinové proteázy z různých rodin. Například legumainy, calpain-like cysteinové proteázy, ubiquitin-hydrolázy-like cysteinové proteázy a metakaspázy. V exozomech se dále nachází proteiny, které se podílí na přenosu signálu. Jsou to proteinkinázy, proteiny, u kterých se předpokládá, že mají fosfatázou aktivitu a vápník vazebné proteiny. Uvnitř exozomů se také nachází proteiny cytoskeletu, vakuolární proteiny a metabolické enzymy. V exozomech byla prokázána přítomnost proteinu BspA, který se podílí na adhezi trichomonád k buňkám epitelu (Rada et al. 2022; Twu et al. 2013).

Díky exozomům mohou trichomonády ovlivňovat vlastnosti hostitelských buněk a komunikovat mezi sebou. V práci Twu et al. 2013 izolovali exozomy z vysoce adherentního kmene trichomonád. Izolované váčky paralelně koinkubovali s (i) méně adherentním kmenem trichomonád a s (ii) epiteliálními buňkami. U méně adherentního kmene trichomonád došlo po koinkubaci s exozomy ke dvojnásobnému zvýšení adheze k buňkám epitelu. Exozomy z vysoce adherentních kmenů trichomonád tedy zvyšují adhezi u méně adherentních kmenů trichomonád. Preinkubace epiteliálních buněk s exozomy vedla k trojnásobnému zvýšení adheze méně adherentního kmene trichomonád. Exozomy tedy mají schopnost ovlivňovat vlastnosti buněk hostitele, což vede ke zvýšení adheze trichomonád k buňkám epitelu.

Exozomy z trichomonád transportují svůj obsah do buněk hostitele. Extracelulární váčky se vážou 4- $\alpha$  glukotransferázou na heparansulfát, který se nachází na povrchových proteoglykanech buněk hostitele. Extracelulární váčky jsou poté endocytovány buňkami hostitele. Endocytóza extracelulárních váček je zprostředkována lipidovými rafty a je závislá na caveolinu (Rai and Johnson 2019).

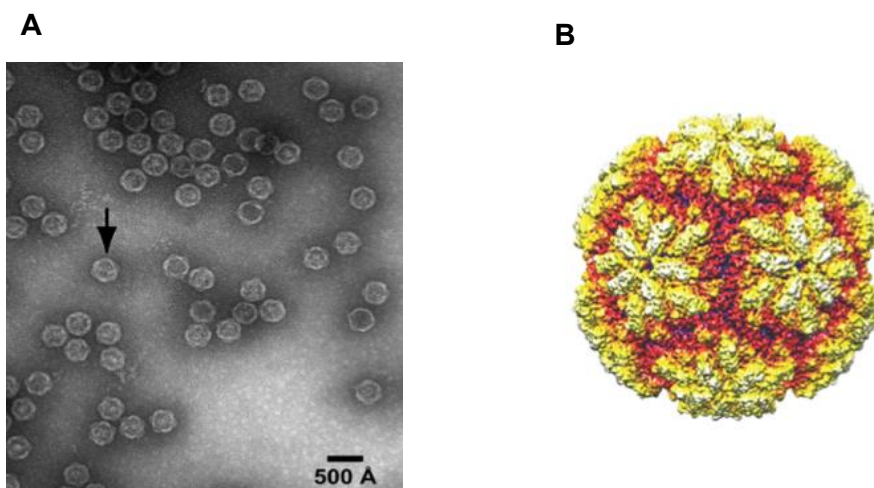
Exozomy ovlivňují imunitní odpověď buněk hostitele na parazita *T. vaginalis*. Exozomy i samotné trichomonády indukují v hostitelských buňkách produkci IL-6 (Twu et al. 2013). Exozomy však výrazně snižují produkci IL-8 (Twu et al. 2013). IL-8 se podílí na chemoatrakci neutrofilů do místa infekce a tento cytokin přetrvává v aktivní formě v místě infekce déle než ostatní chemoatraktanty (Fichorova 2009; Shaio Men-Fang et al. 1994). Snižením produkce IL-8 se tak mohou exozomy podílet na vzniku chronické infekce. Bylo prokázáno, že exozomy také ovlivňují průběh infekce *T. vaginalis in vivo*. Myším byly před inokulací *T. vaginalis* intravaginálně aplikovány exozomy z trichomonád. Takto ošetřené myši obsahovaly po 8 dnech infekce větší množství životaschopných parazitů než myši, které byly infikovány pouze parazitem. U myší, kterým byly aplikovány exozomy, došlo k mírnějšímu zánětu vulvy než u myší, které byly infikovány pouze trichomonádami. Exozomy z *T. vaginalis* tedy snižují zánětlivou reakci hostitele a pravděpodobně také umožňují parazitovi delší přežívání v hostiteli (Olmos-Ortiz et al. 2017).

Imunitní odpověď hostitele na *T. vaginalis* může být také ovlivněna přítomností dsRNA virů v buňkách trichomonád. Jedná se o *Trichomonasviru*, který patří do rodiny *Totiviridae*, stejně jako další dsRNA viry jednobuněčných parazitů.

#### 2.4 *Trichomonasvirus*

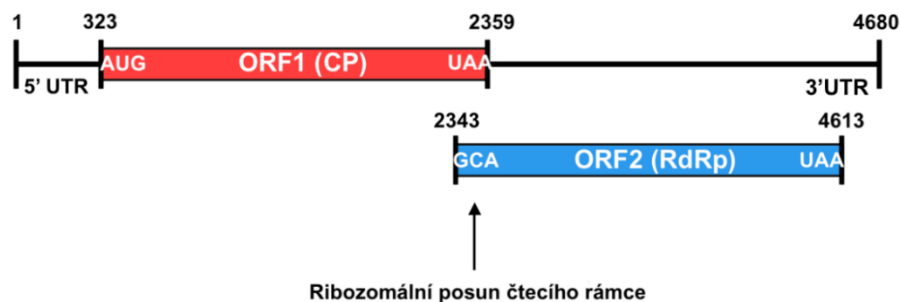
*Trichomonasvirus* (TVV) (obr. 4A) je endosymbiotem parazitického prvoka *T. vaginalis*. Tento virus byl poprvé objeven v buňkách *T. vaginalis* v roce 1986 (Wang and Wang 1986). Později bylo zjištěno, že poměrně velké množství klinických izolátů *T. vaginalis* je infikováno tímto virem. Prevalence TVV u klinických izolátů *T. vaginalis* z Jižní Afriky a Baltimoru byla 75-85 % (Weber et al. 2003; Wendel et al. 2002). V USA a na Kubě se prevalence TVV u klinických izolátů *T. vaginalis* pohybovala okolo 50 % (Fraga et al. 2005; Snipes et al. 2000).

TVV je tvořen ikosahedrální kapsidou (obr. 4B) o průměru 32-45 nm a uvnitř této kapsidy se nachází nesegmentovaný genom dsRNA o velikosti 4,3-5,5 kb (Flegr et al. 1987; Parent et al. 2013; Stevens et al. 2021).



**Obr. 4 (A)** TVV1 zachycený elektronovým mikroskopem. Šipkou je označený TVV. **(B)** Na obrázku je znázorněn 3D obraz TVV1 virionu. Obrázky byly převzaty z práce Parent et al. 2013.

Genom TVV kóduje dva proteiny: kapsidový protein a RNA-dependentní RNA polymerázu. Kapsidový protein tvoří kapsidu viru a RNA-dependentní RNA polymeráza transkribuje a replikuje virovou RNA (Liu, Chu, and Tai 1998). Genom TVV se skládá ze dvou otevřených čtecích rámců, které se částečně překrývají (obr. 5) (Goodman et al. 2011). RNA-dependentní RNA polymeráza je fúzní protein, který je transkribován díky ribozomálnímu posunu čtecího rámce (Liu, Chu, and Tai 1998).



**Obr. 5 Diagram genomu TVV1.** Na obrázku jsou znázorněny překrývající se čtecí rámce genomu TVV1 a první a poslední kodony těchto čtecích rámců. ORF1 (CP) označuje otevřený čtecí rámec kapsidového proteinu a ORF 2 (RdRp) označuje otevřený čtecí rámec RNA-dependentní RNA polymerázy. RNA dependentní RNA polymeráza je díky ribozomálnímu posunu čtecího rámce exprimována jako fúzní protein. UTR označují netranslatované oblasti genomu TVV (Goodman et al. 2011).

TVV byl zařazen do rodiny dsRNA virů *Totiviridae*, do které patří např. *Giardiavirus* a *Leishmania* RNA virus (LRV1) (Barrow et al. 2020). Existují čtyři různé druhy TVV (TVV1, 2, 3 a 4) (Goodman et al. 2011). Tento rok byl analýzou transkriptomu trichomonád identifikován nový druh TVV, který byl pojmenován *Trichomonasvirus* 5 (Manny et al. 2022). Klinické izoláty trichomonád jsou nejčastěji infikované TVV1 a nejméně pak TVV4 (Jehee et al. 2017; Margarita et al. 2019). Jedna buňka *T. vaginalis* může být infikovaná i všemi druhy viru současně (Margarita et al. 2019). V buňce se TVV nachází v cytoplazmě v blízkosti golgiho aparátu anebo v blízkosti cytoplazmatické membrány (Benchimol et al. 2002). Infekce *T. vaginalis* TVV je perzistentní. Infikované buňky však mohou být vyléčeny od TVV 2'-C-metylcytidinem. Tento nukleosidový analog inhibuje syntézu RNA RNA-dependentní RNA polymerázy TVV, která replikuje virovou RNA (Narayanasamy et al. 2021).

TVV se přenáší vertikálně do dceřiných buněk během buněčném dělení (Narayanasamy et al. 2021). Zatím však není jasné, zda dochází k extracelulárnímu přenosu TVV mezi trichomonádami. V práci Benchimol et al. 2002 bylo prokázáno, že buňky *T. vaginalis* mohou endocytovat izolované virové částice, nicméně touto cestou nedochází k infekci trichomonád (Wang and Wang 1986).

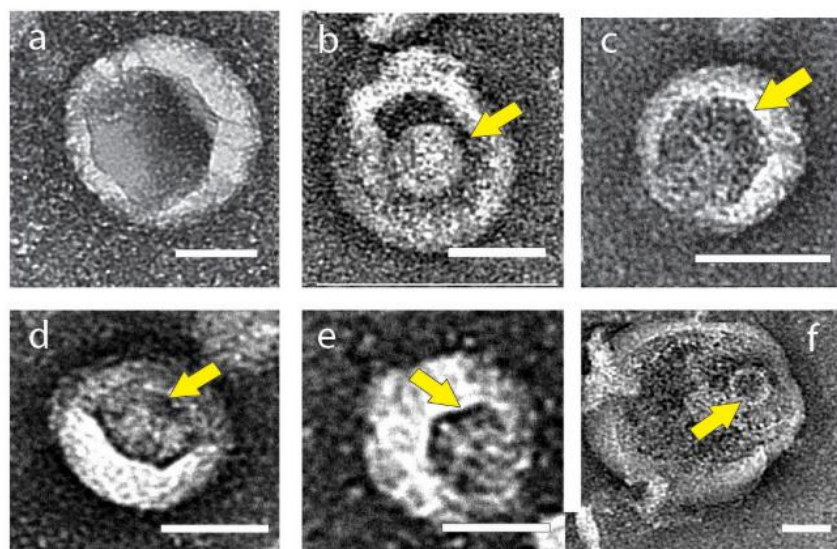
Přítomnost TVV indukuje v buňkách *T. vaginalis* změnu exprese některých proteinů. V práci He et al. 2017 bylo prokázáno, že v infikovaných buňkách dochází ke změně exprese proteinů tepelného šoku, ribozomálních proteinů a některých metabolických enzymů (například alkohol dehydrogenázy, glukóza-6-fosfát izomerázy, malát dehydrogenázy, triózafosfát izomerázy a thioredoxin reduktázy). Přítomnost TVV2 a TVV3 v buňkách *T. vaginalis* indukuje zvýšení exprese imunogenního proteinu P270 na povrchu parazita (Alderete 1999; Khoshnan and Alderete 1994). U infikovaných buněk *T. vaginalis* byla prokázána změna exprese cysteinových proteáz, které jsou důležitým virulencím faktorem parazita (Provenzano, Khoshnan, and Alderete 1997).

V posledních letech se zkoumalo, jestli má přítomnost TVV vliv na průběh infekce *T. vaginalis*. V práci Fraga et al. 2012 uvádějí, že přítomnost TVV ovlivňuje adhezi trichomonád k buňkám epitelu. Klinické izoláty *T. vaginalis* infikované TVV více adherují k buňkám epitelu než ty neinfikované. Úroveň adheze *T. vaginalis* se liší i v závislosti na tom, jakým druhem TVV jsou trichomonády infikovány. Klinické izoláty infikované TVV2 byly více adherentní než klinické izoláty infikované TVV1. Fraga et al. 2012 dále uvádí, že pacientky infikované trichomonádami s TVV1 měli mírné příznaky infekce, zatímco pacientky infikované trichomonádami s TVV2 měli závažnější příznaky infekce. Několik studií však vyvrací souvislost mezi přítomností TVV v trichomonádách a závažnějšími klinickými příznaky (Graves et al. 2019; Malla et al. 2011; Masha et al. 2017). V práci Graves et al. 2019 bylo otestováno celkem 335 klinických izolátů *T. vaginalis* a u 40 % těchto izolátů byla prokázána přítomnost TVV. V této práci však nebyla zjištěna žádná souvislost mezi přítomností TVV a klinickými příznaky.

*In vitro* bylo ověřeno, že přítomnost TVV v buňkách *T. vaginalis* má vliv na imunitní odpověď hostitele. V práci Fichorova et al. 2012 uvádí, že infikované buňky *T. vaginalis* aktivují v epiteliálních buňkách prozánětlivou imunitní odpověď. DsRNA virů je rozeznávána hostitelskými buňkami pomocí endozomálního receptoru TLR3 (toll-like receptor 3). TLR3 aktivuje NF- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B) a indukuje produkci IFN- $\beta$  (Interferon- $\beta$ ) a IL-8. Také dochází k produkci RANTES (regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted), což je chemokin, který se účastní imunitní odpovědi při virových infekcích (Lin et al. 2000; Melchjorsen and Paludan 2003). Prozánětlivá odpověď v hostitelských buňkách byla ještě zesílena po ošetření infikovaných trichomonád metronidazolem. Metronidazol je běžně používané antibiotikum k léčbě trichomoniázy. Stresování a umírající parazité uvolňují TVV, což vede k zesílení zánětlivé reakce (Fichorova et al. 2012).

U Leismanií bylo prokázáno, že dsRNA virus (*Leishmania* RNA virus 1) opouští infikované parazity uvnitř exozomů. LRV1 (*Leishmania* RNA virus 1) je endosymbiotem leishmanií. *In vivo* bylo prokázáno, že exozomy s LRV1 ovlivňují průběh infekce leishmaniemi. U myších infikovaných leishmaniemi indukují exozomy s LRV1 vznik větších lézí než exozomy bez LRV1. Zajímavé je, že samotné virové částice nemají stejný vliv na vznik lézí jako exozomy s LRV1. Dále bylo prokázáno, že exozomy z infikovaných leishmanií transportují LRV1 do neinfikovaných leishmanií. Touto cestou však nedochází ke stabilní infekci a virová RNA vymizí z leishmanií během dvou týdnů (Atayde et al. 2019).

Stejně jako LRV1 i TVV se uvolňuje z infikovaných trichomonád uvnitř exozomů. Částice TVV o velikosti 40 nm byly pozorovány uvnitř exozomů (obr. 6BDEF) a výjimečně se nacházely i mimo váčky (obr. 6C) (Rada et al. 2022).



**Obr. 6. Exozomy z infikovaných buněk *T. vaginalis* zobrazené pomocí elektronového mikroskopu.**

Šipky označují částice TVV a sloupce označují měřítko o velikosti 40 nm. (A) Exozom uvolněný z *T. vaginalis*. (B, D, E) Částice TVV lokalizovaná uvnitř exozomu. (C) Částice TVV, která se nachází mimo exozom. (F) Tři částice TVV lokalizované uvnitř exozomu. Obrázky převzaty z práce Rada et al. 2022.

Přítomnost TVV v trichomonádách má vliv na obsah exozomů. V práci Rada et al. 2022 porovnali proteom exozomů z infikovaných (TVV1, TVV2 a TVV3) a z neinfikovaných trichomonád kmene Tv79-49. Exozomy z trichomonád s TVV obsahovaly 8 unikátních proteinů, které nebyly nalezeny v proteomu exozomů z neinfikovaných trichomonád. Mezi tyto unikátní proteiny patří proteiny TVV, tj. kapsidové proteiny TVV1, TVV2, TVV3 a RNA-dependentní RNA polymeráza TVV1 a dále unikátní proteiny RIC2 (repair of iron centers protein 2), membránový protein TVAG\_109130, protein s vazebnými domény podobnými galaktóze a tři proteiny s neznámou funkcí. V exozomech z infikovaných trichomonád byla také zjištěna vyšší hladina několika proteinů: BspA, TVAG\_004030, dva Rab proteiny, kalcium-dependentní fosfolipid vazebný protein, protein s doménou proteinkinázy, dvě podjednotky vakuolární V-ATPázy a metalopeptidáza M24.

Přítomnost TVV v trichomonádách má vliv na obsah RNA v exozomech. Uvnitř exozomů z infikovaných trichomonád byla prokázána přítomnost kompletní RNA pro RdRp TVV a pro kapsidový protein. Není však jasné, zda tyto váčky obsahují kompletní genom viru, protože se nepodařilo amplifikovat kompletní sekvenci genomu z exozomální RNA. Kromě virové RNA obsahují exozomy z trichomonád s TVV vyšší hladinu specifických tsRNA (tRNA-derived small RNA) než exozomy z neinfikovaných trichomonád. TsRNA jsou fragmenty transferové RNA. Exozomy z infikovaných trichomonád jsou obohaceny o 5' tsRNA-Glu, 5' tsRNA-Gly a tsRNA-Val. Je tedy pravděpodobné, že tsRNA je efektivněji transportována do exozomů při infekci TVV.

Virové částice se uvolňují z trichomonád uvnitř exozomů a mohou být tak exponovány hostitelským buňkám. V práci Rada et al. 2022 porovnali imunitní odpověď HaCaT buněk na exozomy z infikovaných a neinfikovaných trichomonád.

Exozomy z infikovaných trichomonád indukovali v HaCaT buňkách produkci RANTES, což je prozánětlivý chemokin, který je produkován buňkami epitelu v přítomnosti TVV (Fichorova et al. 2012). Dále exozomy z infikovaných trichomonád významně zvýšily v HaCaT buňkách produkci prozánětlivých cytokinů IL-6, IL-8 a IL-1 $\beta$ . Exozomy z infikovaných trichomonád mají tedy schopnost aktivovat prozánětlivou imunitní odpověď (Rada et al. 2022).

### 3 Cíle práce

Cílem mé diplomové práce bylo:

1. Ověřit přítomnost dsRNA virů u vybraných kmenů *T. vaginalis*.
2. Ověřit, zda se *Trichomonavirus* nachází uvnitř extracelulárních váčků z infikovaných buněk *T. vaginalis* kmene Tv79-49.
3. Zjistit, zda se *Trichomonavirus* přenáší mezi buňkami *T. vaginalis* pomocí extracelulárních váčků.

## 4 Materiály a metodika

### 4.1 Použité organismy

#### 4.1.1 *Escherichia coli*

Pro namnožení rekombinantních plasmidů byl použitý kmen *E. coli* TOP10 (Thermo Fisher Scientific). Bakterie byly transformovány tepelným šokem (postup popsán v kapitole 4.5). Po transformaci byly bakterie kultivovány v médiu LB ve 37 °C za stálého třepání (220 rpm). Pro selekci pozitivních klonů bylo do média přidáno příslušné antibiotikum.

#### 4.1.2 *Trichomonas vaginalis*

Pro experimenty byly použité kmeny: TvT1 (Poskytl J. H. Tai, Institute of Biochemical Science, Taipei, Taiwan), Tv17-48 klinický izolát (Kulda 1973), Tv79-49 klinický izolát (Kulda 1973), JH-31A klinický izolát (Hollander 1963). Kmen TvC1 (ATCC 30001) klinický izolát (Jacobs 1956). Kmeny *T. vaginalis* byly kultivované v médiu TYM pH 6,2 ve 37 °C. Pro selekci transformantů bylo do média přidáno příslušné antibiotikum.

#### 4.1.3 Lidské aneuploidní imortalizované keratinocyty

Lidské aneuploidní imortalizované keratinocyty (dále HaCaT buňky) (Boukamp 1988) byly kultivované v médiu RPMI v 5% CO<sub>2</sub> ve 37 °C. Pro společnou kultivaci s trichomonádami bylo použito médium GMP. Buňky byly společně kokultivovány v 5% CO<sub>2</sub> ve 37 °C.

### 4.2 Použité roztoky a média

- **Médium LB** (Bertani 1951): 20 g LB média (Sigma-Aldrich); 500 ml destilované H<sub>2</sub>O; médium vysterilizovat v autoklávu (120 °C, 20 minut).
- **Médium TYM**, pH = 6,2 (Diamond 1957): 900 ml destilované H<sub>2</sub>O; 0,8 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich); 0,8 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich); 0,2 g kyseliny askorbové (Sigma-Aldrich); 1 g L-cysteinu (Sigma-Aldrich); 5 g maltózy (Sigma-Aldrich); 10 g kvasničného autolyzátu (Oxoid); 20 g tryptonu (Oxoid); 22,8 mg citrátu železito-amonného (Sigma-Aldrich); médium vysterilizovat v autoklávu a po vychladnutí přidat 100 ml inaktivovaného koňského séra (56 °C 30 minut) (Gibco™).
- **Médium RPMI**: RPMI 1640 (Gibco™); 10% inaktivované fetální bovinní sérum (Gibco™) (56 °C 30 min.); 20 mM NaHCO<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich); 1000 U/ml Penicillin-Streptomycin.
- **Médium GMP** (Pindak, Gardner, and Pindak 1986): 900 ml MEM (minimum essential medium) (Thermo Fisher Scientific); 100 ml inaktivovaného fetálního bovinního séra; 30 ml 1M HEPES (Gibco™); 20 g glukózy (Sigma-Aldrich); 100 mg kyseliny askorbové; 20 mg kyseliny pantotenové (Sigma-Aldrich); 1000 U/ml Penicillin-Streptomycin.
- **Médium SOC** (Super Optimal broth Catabolite repression), pH = 7: 2 g Tryptonu; 0,5 g kvasničného autolyzátu; 10 mM NaCl (Sigma-Aldrich); 2,5 mM KCl (Sigma-Aldrich); doplnit destilovanou H<sub>2</sub>O na požadovaný objem a vysterilizovat v autoklávu. Po sterilizaci přidat: 20 mM sterilní glukózu; 10 mM MgCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich).



- **Médium Doran, pH = 6,2** (Doran 1959): Roztok A: 9,12 g NaCl; 238 mg KCl; 133 mg CaCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich); 50 ml destilované H<sub>2</sub>O. Roztok B: 9,36 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich); 50 ml destilované H<sub>2</sub>O. Smíchat 25 ml roztoku A a 25 ml roztoku B a 900 ml destilované H<sub>2</sub>O. Následně upravit pH na 6,2 a přidat maltózu o výsledné koncentraci 15 mM.
- **1 x vzorkový pufr:** 50 mM Tris base (Sigma-Aldrich); 10% glycerol; 2% dodecyl-síran sodný (SDS); 5% β-merkaptioetanol; 0,002% bromfenolová modř (Serva).
- **12% rozdělovací gel:** 1,6 ml 30% roztoku akrylamid/bis-akrylamidu (Bio-Rad); 2 ml roztoku C; 0,32 ml destilované H<sub>2</sub>O; 5 μl tetrametyletyldiaminu (Thermo Fisher Scientific); 40 μl amonium persulfátu (100 mg/ml).
- **5% zaostřovací gel:** 0,24 ml 30% roztoku akrylamid/bis-akrylamidu; 0,75 ml roztoku D; 0,47 ml destilované H<sub>2</sub>O; 5 μl tetrametyletyldiaminu; 20 μl amonium persulfátu (100 mg/ml).
- **Roztok C:** 0,2 g SDS; 9,1 g Tris base; 100 ml destilované H<sub>2</sub>O.
- **Roztok D:** 0,2 g SDS; 3 g Tris base; 100 ml destilované H<sub>2</sub>O.
- **SDS-PAGE pufr:** 100 ml 10 x TGS (Tris-glycin-SDS) (Bio-Rad); 900 ml destilované H<sub>2</sub>O.
- **Roztok Coomassie Brilliant Blue:** 250 mg Coomassie Brilliant Blue R-250; 50 ml kyseliny octové; 225 ml metanolu; 225 ml destilované H<sub>2</sub>O.
- **Odbarvovací roztok:** 25% metanol; 10% kyselina octová; destilovaná H<sub>2</sub>O.
- **Blotovací pufr:** 100 ml 10 x TGS; 200 ml metanolu; 700 ml destilované H<sub>2</sub>O.
- **Roztok ponceau:** 0,5% Ponceau S; 1% kyselina octová.
- **PBS, pH = 7,4:** 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich); 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich).
- **Blokovací pufr:** 5% sušené odtučněné mléko (NutriStar); 0,5% Tween® 20 (Sigma-Aldrich); nesterilní PBS.
- **2 x PEM, pH = 6,9:** 20mM PIPES (Sigma-Aldrich); 2mM EGTA (Sigma-Aldrich); 0,2 mM MgSO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich); postupně přidávat 1 M NaOH do vyčerení; destilovanou H<sub>2</sub>O doplnit na požadovaný objem; vysterilizovat v autoklávu.
- **PEMBALG:** 100 ml 1 x PEM; 1% BSA (Sigma-Aldrich); 100mM lysin (Sigma-Aldrich); 0,5% želatina (cold water fish skin gelatin) (Sigma-Aldrich).
- **1 x ST (Sacharóza-Tris) pufr, pH=7,2:** 250 mM sacharóza (Sigma); 10 mM Tris-base; 0,5 mM KCl; destilovaná H<sub>2</sub>O.
- **Inhibitory proteáz:** Leupeptin (Sigma-Aldrich): zásobní roztok o koncentraci 5 mg/ml; Tosyl-L-lysin-chlormetylketon (TLCK) (Sigma-Aldrich): zásobní roztok o koncentraci 25 mg/ml; cOmplete Tablets EDTA-free, EASYpack (Roche): rozpustit jednu tabletu v 50 ml roztoku.
- **Zásobní roztoky antibiotik:** G418 (geneticin) (Sigma-Aldrich) 100 mg/ml; Puromycin (Sigma-Aldrich) 200 mg/ml; Penicillin-Streptomycin (Gibco™) 1000 U/ml; Ampicillin (Sigma-Aldrich) 100 mg/ml.

### 4.3 Použité plasmidy k transfekci trichomonád

- Plasmid pTagVagV5 s vloženým genem pro cytosolický protein biotin ligázu (BirA, WP\_023308552) a genem pro puromycin N-acetyl transferázu (PAC) (Rada et al. 2019). V transformovaných trichomonádách je exprimován protein BirA spolu s V5 tagem na C-konci. Díky V5 tagu je možné detekovat protein BirA v buňkách imunofluorescencí nebo na nitrocelulózové membráně pomocí protilátek. Díky proteinu PAC jsou transformované trichomonády rezistentní na puromycin.
- Plasmid pTagVag2 s vloženým genem pro  $PP_i$  dependentní fosfofruktokinázu (PFK, TVAG\_430830) a genem pro geneticinovou rezistenci (Rada et al. 2015). V transformovaných trichomonádách je protein PFK exprimován spolu s HAHA tagem na C-konci. Díky HAHA tagu je možné detekovat protein PFK v buňkách imunofluorescencí nebo na nitrocelulózové membráně pomocí protilátek.

### 4.4 Použité protilátky

Protilátky byly použité k detekci proteinů v buňce nebo na nitrocelulózové membráně. Primární protilátka se naváže na protein. Poté se přidá sekundární protilátka proti primární protilátce. Sekundární protilátka je konjugovaná s fluoroforem nebo s enzymem. Sekundární protilátky s fluoroforem byly použité pro detekci proteinů v buňkách imunofluorescencí. Sekundární protilátky s enzymem byly použité pro detekci proteinů na nitrocelulózové membráně (imunoblot).

#### 4.4.1 Primární protilátky

- Monoklonální myší protilátka proti HAHA tagu (Exbio) (použité ředění pro imunoblot: 1:400, pro imunofluorescenci: 1:1000).
- Monoklonální králičí protilátka proti V5 tagu (Abcam) (použité ředění pro imunoblot a pro imunofluorescenci: 1:1000).
- Polyklonální králičí protilátka proti kapsidovému proteinu TVV1 (Použité ředění pro imunoblot 1:1000).
- Polyklonální králičí protilátka proti kapsidovému proteinu TVV3 (Použité ředění pro imunoblot 1:1000).

#### 4.4.2 Sekundární protilátky

- Protilátka proti primární myší protilátce konjugovaná s alkalickou fosfatázou (použité pro ředění pro imunoblot: 1:2000).
- Protilátka proti primární myší protilátce konjugovaná s křenovou peroxidázou (použité ředění pro imunoblot: 1:2000).
- Protilátka proti primární králičí protilátce konjugovaná s alkalickou fosfatázou (použité ředění pro imunoblot: 1:2000).
- Protilátka proti primární králičí protilátce konjugovaná s křenovou peroxidázou (použité ředění pro imunoblot: 1:2000).

- Protilátka proti primární myši protilátce Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific) (použité ředění pro imunofluorescenci: 1:1000).

#### **Použité substráty pro zobrazení proteinů na nitrocelulózové membráně**

- Substrát pro alkalickou fosfatázu: Sigma Fast BCIP/NBT (Sigma-Aldrich).
- Substrát pro křenuvou peroxidázu: Western HRP substrate Classico (Merck Millipore).

#### **4.5 Transformace bakterií *E. coli* (TOP10)**

1. Rozmrazit alikvot 150  $\mu$ l *E. coli* (TOP 10).
2. K bakteriím přidat 2  $\mu$ l plasmidu s inserty a inkubovat 20 minut na ledu.
3. Transformovat bakterie tepelným šokem 45 sekund při 42 °C.
4. Poté inkubovat bakterie 3 minuty na ledu.
5. K bakteriím přidat 150  $\mu$ l média SOC a inkubovat 60 minut na třepačce při 37 °C.
6. Do Erlenmeyerovy baňky sterilně nalít 100 ml média LB a přidat 150  $\mu$ l bakterií s plasmidem.
7. Pro selekci transformovaných klonů přidat 100  $\mu$ l ampicilinu.
8. Inkubovat přes noc na třepačce při 37 °C.

#### **4.6 Izolace plasmidů z bakterií**

K izolaci plasmidů z bakterií byl použit kit Wizard® Plus Midipreps DNA Purification System (Promega). Při izolaci plasmidu bylo postupováno dle protokolu od výrobce. Koncentrace vyizolované DNA byla změřena na přístroji NanoDrop™ 2000.

#### **4.7 Transfekce trichomonád plasmidem**

##### **4.7.1 Elektroporace trichomonád**

1. Centrifugovat 250 ml narostlé kultury trichomonád při 4 °C a 1000 x g 10 minut.
2. Pelet zvážit a na 1 g peletu přidat 500  $\mu$ l média TYM.
3. Suspenzi trichomonád resuspendovat pomocí 23G jehly.
4. Do 0,4cm kyvety (Gene Pulser Xcell™) přidat 300  $\mu$ l suspenze buněk a 50  $\mu$ l plasmidu (o koncentraci 0,7-1  $\mu$ g/ $\mu$ l).
5. Elektroporovat na přístroji Gene Pulser (BioRad) při napětí 350 V a časově konstatně 175 ms.
6. Ihned po elektroporaci přenést buňky do 50 ml vytemperovaného média TYM s Penicillin-Streptomycinem.
7. Inkubovat 4 hodiny při 37 °C.
8. Pro selekci transformovaných trichomonád přidat do média příslušné antibiotikum.

#### 4.7.2 Nukleofekce trichomonád

1. Centrifugovat 4 ml narostlé kultury trichomonád při 4 °C a 1000 x g 10 minut.
2. Pelet promýt médiem TYM.
3. Pelet resuspendovat v transfekčním pufru (82 µl Tcell pufru + 18 µl suplementu) z Amaxa™ Human T Cell Line Nucleofector™ kitu (Lonza).
4. Do květy přidat 100 µl suspenze buněk a 10 µg plasmidu.
5. Inkubovat 10 minut na ledu.
6. Nukleofekovat na přístroji Nucleofector™ 2b (program U-33).
7. Po nukleofekci buňky ihned přenést do 10 ml média TYM se sérem, agarem a Penicillin-Streptomycinem.
8. Inkubovat 4 hodiny při 37 °C.
9. Pro selekci transformovaných trichomonád přidat do média příslušné antibiotikum.

#### 4.8 Detekce rekombinantních proteinů

Transfekované trichomonády exprimují rekombinantní proteiny. Rekombinantní proteiny jsou exprimovány spolu s epitopem, na který se vážou specifické protilátky. Díky těmto epitopům lze rekombinantní proteiny detekovat v buňkách imunofluorescencí. Rekombinantní proteiny je možné také detekovat protilátkami na nitrocelulózové membráně.

##### 4.8.1 SDS polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE)

Metoda SDS-PAGE slouží k rozdělení denaturovaných proteinů podle jejich molekulových hmotností v polyakrylamidovém gelu s dodecylsíránem sodným.

1. Vzorky denaturovat 5 minut při 95 °C v 1 x vzorkovém pufru.
2. Připravit 12% rozdělovací gel a 5% zaostřovací gel.
3. Sestavit kazetu pro vertikální elektroforézu Mini-Protean® Tetra cell.
4. Nalít SDS-PAGE pufr do kazety.
5. Nanést vzorky na gel a použít PageRuler™ Plus (Thermo Fisher Scientific) jako standart k určení velikosti proteinů.
6. Po elektroforéze:
  - Zobrazit rozdělené proteiny barvením gelu v roztoku Coomassie Brilliant blue. Po barvení promýt gel odbarvovacím roztokem.
  - Rozdělené proteiny přeblovat na nitrocelulózovou membránu a pomocí specifických protilátek detekovat rekombinantní proteiny na membráně (Imunoblot).

##### 4.8.1.1 Přeblování proteinů na nitrocelulózovou membránu

1. Vystříhnout 0,2µm nitrocelulózovou membránu Amersham™ Protran™ (Cytiva) a dva filtrační papíry o stejné velikosti jako gel.
2. Ponořit membránu s filtračními papíry na 10 minut do blotovacího roztoku.
3. K přeblování proteinů z gelu na nitrocelulózovou membránu použít Trans-Blot®™Turbo™ (Bio-Rad).

4. Do kazety Trans-Blot®™Turbo™ vložit nejprve ion reservoir stack a následně filtrační papír, nitrocelulózovou membránu, rozdělovací gel s proteiny, filtrační papír a opět ion reservoir stack.
5. Blotovat 30 minut při napětí 25 V a při proudu 1.0 A.
6. K ověření přeblotování proteinů promýt membránu roztokem poncenau S.
7. Poncenau S opláchnout z membrány destilovanou vodou.

#### **4.8.1.2 Detekce rekombinantních proteinů na nitrocelulózové membráně**

1. Membránu inkubovat 60 minut v blokovacím pufru.
2. Poté membránu inkubovat 60 minut v blokovacím pufru společně s primární protilátkou.
3. Po inkubaci s primární protilátkou membránu promýt 3 x 15 minut v blokovacím pufru.
4. Membránu inkubovat 60 minut v blokovacím pufru se sekundární protilátkou.
5. Membránu promýt 3 x 15 minut v blokovacím pufru.
6. Membránu promýt 5 minut v nesterilním PBS.
7. Membránu inkubovat s příslušným substrátem. Při použití sekundární protilátky s konjugovanou alkalickou fosfatázou: na membránu nanést předpřipravený substrát pro alkalickou fosfatázu a krátce inkubovat. Při použití sekundární protilátky s konjugovanou křenovou peroxidázou: 1 minutu inkubovat se substrátem pro křenovou peroxidázu a poté vyvolat na přístroji Amersham Imager 600.

#### **4.8.2 Detekce rekombinantních proteinů v buňkách imunofluorescencí**

1. Centrifugovat 10 ml narostlé kultury trichomonád při 25 °C a 1000 x g 10 minut.
2. Buňky fixovat 30 minut při 37 °C v 5 ml PBS spolu s 2% formaldehydem.
3. Centrifugovat buňky při 25 °C a 1000 x g 10 minut.
4. Pelet resuspendovat v 100 µl 1 x PEM.
5. Na očištěné krycí sklíčko přidat 10 µl poly-L-lysinu (Sigma-Aldrich) a rozetřít po povrchu.
6. Sklíčko umístit do 6 jamkové destičky.
7. Na krycí sklíčko nakapat suspenzi buněk a opatrně rozprostřít po celém povrchu sklíčka.
8. Inkubovat 15 minut při 25 °C.
9. Ke sklíčku přidat 1 ml 1 x PEM s 0,1% Tritonem X-100 (Sigma-Aldrich).
10. Inkubovat 20 minut při 25 °C.
11. Promýt 3 x 10 minut v 1 ml 1 x PEM.
12. Do jamky se sklíčkem přidat 1 ml PEMBALGu a inkubovat 60 minut při 25 °C.
13. PEMBALG odsát vývěvou.
14. Do jamky se sklíčkem přidat 0,5 ml PEMBALGu spolu s primární protilátkou a inkubovat 60 minut při 25 °C.
15. Promýt 3 x 10 minut v 1 ml 1 x PEM.
16. Do jamky se sklíčkem přidat 0,5 ml PEMBALGu se sekundární protilátkou a inkubovat bez přístupu světla 60 minut.
17. Promýt 3 x 10 minut v 1 ml 1 x PEM.
18. Na podložní sklíčko kápnout 10 µl montovacího média Vectashield® s DAPI (4,6-Diamidin-2-fenylyndol dihydrochlorid).

19. Na podložní sklíčko položit krycí sklíčko s buňkami a zafixovat lakem na nehty.
20. K analýze preparátu použít fluorescenční mikroskop Nikon N-SIM.

#### **4.9 Detekce dsRNA virů v trichomonádách**

Z trichomonád byla vyizolovaná totální RNA, která byla vyhodnocena metodou RT-PCR anebo metodou RT-qPCR.

##### **4.9.1 Izolace RNA trizolem**

1. 5 ml narostlé kultury trichomonád ( $1,5 \times 10^6$  buněk/ml) centrifugovat při 25 °C a 1000 x g 10 minut.
2. K peletu přidat 1 ml trizolu (Sigma).
3. Inkubovat 5 minut při 25 °C.
4. K 1 ml trizolu přidat 200 µl chloroformu.
5. Promíchat v ruce (nevortexovat).
6. Inkubovat 3 minuty při 25 °C.
7. Centrifugovat při 4°C a 13 000 RPM 10 minut.
8. Po centrifugaci se směs rozdělí na 3 fáze: Na spodní růžovou fázi s proteiny, na mezifázi s DNA a horní bezbarvou fázi s RNA. Bezbarvou fázi odpipetovat do nové zkumavky (bez narušení ostatních fází).
9. K vodné fázi přidat 500 µl isopropanolu.
10. Inkubovat 10 minut při 25 °C.
11. Centrifugovat při 4 °C a 13 000 RPM 10 minut.
12. Odsát supernatant bez narušení peletu.
13. K peletu přidat 1 ml 70% etanolu.
14. Centrifugovat při 4°C a 8000 RPM 5 minut.
15. Odsát co nejvíce etanolu.
16. Dát pelet vysušit na termobloček při 55 °C.
17. Pelet nechat rozpustit v ddH<sub>2</sub>O 5 minut při 55 °C.
18. Změřit koncentraci RNA na přístroji NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific).

Získaná RNA je po izolaci kontaminovaná genomovou DNA. Před dalším použitím je nutné nejprve odstranit DNA následujícím postupem:

##### **K 1 µg RNA přidat:**

1. 1 µl DNázy
2. 1 µl reakčního pufru
3. Doplnit ddH<sub>2</sub>O na objem 10 µl
4. Reakci inkubovat 30 minut při 37 °C.
5. K zastavení reakce přidat 1 µl EDTA a inkubovat 10 minut při 65 °C.

#### 4.9.2 Izolace RNA pomocí High Pure RNA Isolation Kitu

K izolaci RNA byl také použit kit od firmy Roche. Při izolaci RNA bylo postupováno dle protokolu od výrobce. Získanou RNA lze ihned použít, protože součástí kitu je enzym DNáza, který očistí RNA od genomové DNA.

#### 4.9.3 RT-PCR

Získaná RNA byla vyhodnocena metodou RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction). Metoda RT-PCR zahrnuje dva kroky. Nejprve je RNA přepsána reverzní transkriptázou na komplementární DNA (cDNA). Poté jsou příslušné sekvence cDNA amplifikovány metodou PCR.

#### 4.9.4 Přepis RNA na cDNA pomocí kitu SuperScript™ III. (Invitrogen)

1. K 11 µl vzorku přidat 1 µl 10mM dNTP a 1 µl 50µM oligo (dT) primer.
2. Inkubovat při 5 minut při 65 °C.
3. Poté reakci inkubovat 1 minutu na ledu.
4. Přidat k reakci:
5. 4 µl 5 x FS pufru
6. 1 µl 0,1M DL-dithiotreitolu
7. 0,5 µl RNázy OUT™
8. 0,5 µl 20 mM MgCl<sub>2</sub>
9. 1 µl reverzní transkriptázy
10. Inkubovat 60 minut při 42 °C a poté 15 minut při 70 °C.

#### 4.9.5 Amplifikace příslušných sekvencí cDNA

Příslušné sekvence cDNA byly amplifikované metodou PCR. Na cDNA se naváží specifické primery podle kterých DNA polymeráza syntetizuje výslednou sekvenci.

1. Složení reakce:
  - 12,5 µl Master mix emerald
  - 0,5 µl reverse primer
  - 0,5 µl forward primer
  - 1 µl cDNA
  - 10,5 µl ddH<sub>2</sub>O
2. Použité primery (tab. 1) a zvolený program na cykleru:

	Primer	Sekvence primeru 5' → 3'
TVV1	TVV1 RdRp Forw.	ATTAGCGGTGTTGTGATGCA
	TVV1 RdRp Rev.	CTATCTTGCCATCCTGACTC
TVV2	TVV2 RdRp Forw.	GCTTGAGCACTGCTCGCG
	TVV2 RdRp Rev.	TCTCTTTTGGCATCGCTT
TVV3	TVV3 RdRp Forw.	AAATTAATCAACACCCTCC
	TVV3 RdRp Rev.	CAGATCACTTTGTGTGTC
TVV4	TVV4 RdRp Forw.	ATGCCAGTTGCTTCCG
	TVV4 RdRp Rev.	TTCCCAATAGTTATCAG

Cyklus	Počet opakování	Teplota	Čas
1	1	95 °C	5 min.
2	20	95 °C	30 sek.
		60 °C	30 sek.
3	15	72 °C	80 sek.
		95 °C	30 sek.
		40 °C	30 sek.

Tab.1: Primery použité pro detekci TVV1-4 (Goodman et al. 2011).

#### 4.9.6 Horizontální gelová elektroforéza

Amplifikované sekvence cDNA byly analyzované na 1% agarózovém gelu.

1. Napipetovat vzorek na 1% agarózový gel s přidaným barvivem SYBR<sup>TM</sup>Safe (Thermo Fisher Scientific).
2. Jako standard použít GeneRuler<sup>TM</sup> (Biogen).
3. Gel vyhodnotit pomocí UV transiluminátoru.

#### 4.9.7 RT-qPCR

Metoda RT-qPCR (real time quantitative polymerase chain reaction) umožňuje sledovat množství amplifikovaného produktu během jednotlivých cyklů reakce. Součástí reakce je reverzní transkriptáza, která přepíše RNA na komplementární DNA (cDNA). Poté na příslušné sekvence cDNA nasedají specifické primery a dochází k tvorbě dsDNA úseků. Na dsDNA se váže fluorescenční látka a množství amplifikovaného produktu se měří pomocí fluorescence.

1. K přípravě reakce použít kit KAPA<sup>TM</sup> SYBR® FAST One-Step Universal (Sigma-Aldrich):
  - 2 µl SYBR green
  - 5 µl ddH<sub>2</sub>O
  - 0,2 µl reverzní transkriptáza
  - 0,4 µl forward primer
  - 0,4 µl reverse primer
  - 100 ng RNA
2. Použité primery (tab. 2) a zvolený program na přístroji Rotor-Gene RG-3000A<sup>TM</sup> (Corbett Research/Qiagen GmbH):

	Primer	Sekvence primeru 5'→3'
Biotin ligáza	BirA qForw.	TGATCGTATCGGAGAGCTTAAA
	BirA qRev.	CGCCAGAACATCGACAAATATAA
Puromycin N-acetyl transferáza	Puro qForw.	GTCACCGAGCTGCAAGAA
	Puro qRev.	CCGATCTCGGCGAACAC
DNA topo izomeráza II.	DNA Topo II qForw.	ATCGGTGTCGGTTGGTCAAG
	DNA Topo II qRev.	TGGCTGTTTGACACCGTCTTT
TVV1	Tv79-49V1 RdRp qForw.	GACTCACATTTCGATCCGACAA
	Tv79-49V1 RdRp qRev.	AGCGTTCTTCCAAATGGTACT
TVV2	Tv79-49V2 RdRp qForw.	TTCACGTGCAATATGTCGCAATGAT
	Tv79-49V2 RdRp qRev.	TCTCTTTTGGCATCGCTTGAAGTT
TVV3	Tv79-49V3 RdRp qForw.	ACACTTCGCCAAGTATAGTTCACG
	Tv79-49V3 RdRp qRev.	AATGTACCTAGTCTTACCGTGTCC

Tab. 2 Primery použité k detekci TVV1-3.



Cyklus	Počet opakování	Teplota	Čas
1	1	42 °C	10 min.
2	1	95 °C	3 min.
		95°C	5 sek.
3	40	60 °C	30 sek.
		72 °C	20 sek.

Analýza křivek tání byla provedena podle výchozího nastavení přístroje Rotor-Gene RG-3000A.

3. K určení relativní genové exprese vzorku použit jako referenční gen *DNATopII* (DNA topoizomeráza II, TVAG\_03880) (dos Santos et al. 2015).

• **určení relativní hladiny genové exprese (R) vzorku** (Livak and Schmittgen 2001):

$$\Delta Ct = Ct_{\text{vzorek}} - Ct_{\text{referenční gen}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{vzorek}} - \Delta Ct_{\text{kontrola}}$$

$$R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

4. Výsledná data analyzovat v programu GraphPad Prism 7.

#### 4.10 Izolace extracelulárních váčků z kultury trichomonád

1. Kulturu trichomonád ( $1,5 \times 10^9$  buněk) v logaritmické fázi růstu centrifugovat při 25 °C a 2000 x g 20 minut na centrifuze Avanti® J-26 XPI (Beckman).
2. Pelet buněk 2 x promýt v TYMu bez séra.
3. Pelet buněk resuspendovat v původním objemu TYMu bez séra, aby výsledná koncentrace buněk byla  $1,5 \times 10^6$  buněk/ml.
4. Buňky inkubovat 2,5 hodiny ve 37 °C.
5. Centrifugovat při 25 °C a 2000 x g 20 minut.
6. Supernatant I přefiltrovat přes filtr s póry o velikosti 0,22 µm.
7. Kondenzovat supernatant I tangenciální filtrací pomocí přístroje VivaFlow 200 (Sartorius).
8. Kondenzovaný supernatant I centrifugovat při 4 °C a 100 000 x g 60 minut na centrifuze Optima XPN-90 (Beckman). Pelet II je obohacen o extracelulární váčky a supernatant II obsahuje molekuly sekretované trichomonádami.

#### 4.11 Detekce viru v kultuře trichomonád

1. Kulturu trichomonád (2 x  $1,5 \times 10^9$  buněk) v logaritmické fázi růstu centrifugovat při 25 °C a 2000 x g 20 minut.
2. Pelet  $1,5 \times 10^9$  buněk 2 x promýt v TYMu bez séra a druhý pelet  $1,5 \times 10^9$  buněk promýt v médiu Doran.
3. Pelety resuspendovat v příslušném médiu, aby výsledná koncentrace v obou médiích byla  $1,5 \times 10^6$  buněk/ml.
4. Buňky paralelně inkubovat 2,5 hodiny v TYMu bez séra a Doranu při 37°C.
5. Centrifugovat při 25 °C a 2000 x g 20 minut.
6. Supernatanty I přefiltrovat přes filtr s póry o velikosti 0,22 µm.
7. Kondenzovat supernatanty I tangenciální filtrací pomocí přístroje VivaFlow 200 (Sartorius).

8. Ke kondenzovaným supernatantům I přidat inhibitory proteáz: leupeptin a TLCK o výsledné koncentraci 2 $\mu$ l/ml.
9. Centrifugovat při 4 °C a 100 000 x g 60 minut na centrifuze Optima XPN-90 (Beckman). Pelet II je obohacen o extracelulární a supernatant II obsahuje molekuly sekretované trichomonádami
10. Proteiny z peletu II rozdělit na SDS-PAGE a přeblotovat na nitrocelulózovou membránu. Pomocí protilátek detekovat na membráně kapsidový protein TVV.
11. Proteiny v supernatantech II vysrážet kyselinou trichloroctovou (postup popsán v kapitole 4.11.1). Proteiny rozdělit na SDS-PAGE a přeblotovat na nitrocelulózovou membránu. Pomocí protilátek detekovat na membráně kapsidový protein TVV.

#### **4.11.1 Precipitace proteinů kyselinou trichloroctovou**

1. Inkubovat vzorek s kyselinou trichloroctovou (Sigma-Aldrich) v poměru 4:1 10 minut na ledu.
2. Centrifugovat při 4 °C a 14 000 RPM 5 minut.
3. Pelet promýt 3 x ve vychlazeném acetonu.
4. Pelet promýt v PBS.
5. Pelet vysušit na termobločku při 37 °C.

#### **4.12 Průkaz přítomnosti kapsidového proteinu viru uvnitř extracelulárních váčků**

1. Vyizolovat extracelulární váčky (postup popsán v kapitole 4.10).
2. Pelet obohacený o extracelulární váčky resuspendovat v 2,4 ml 1 x ST médiu.
3. Suspenzi extracelulárních váčků rozdělit do 4 zkumavek po 600  $\mu$ l. Paralelně inkubovat tyto 4 vzorky 10 minut za následujících podmínek:
  - Vzorek I. (kontrola) inkubovat při 4 °C.
  - Vzorek II. (kontrola) inkubovat při 37 °C.
  - Vzorek III. inkubovat při 37 °C s trypsinem o výsledné koncentraci 5  $\mu$ g/ml.
  - Vzorek IV. inkubovat při 37 °C s trypsinem o výsledné koncentraci 5  $\mu$ g/ml a 0,5% Tritonem X-100.
4. Po inkubaci vysrážet proteiny ze vzorků I.-III. metanolem/chloroformem (postup popsán v kapitole 4.12.1). Ke vzorku IV. přidat inhibitor proteáz a centrifugovat při 4 °C a 100 000 x g 30 minut na centrifuze Optima™ MAX-XP (Beckman). Po stočení vysrážet proteiny ze vzorku IV. metanolem/chloroformem.
5. Vysrážené proteiny ze vzorků rozdělit na SDS-PAGE a přeblotovat na nitrocelulózovou membránu. Pomocí protilátek detekovat na membráně kapsidový protein viru.

#### **4.12.1 Precipitace proteinů metanolem/chloroformem**

1. Ke vzorku přidat metanol a chloroform v poměru 4:4:1 a zvortexovat.
2. Centrifugovat při 4 °C a 14 000 x g 1 minutu.
3. Po stočení se vytvoří 3 fáze – horní vodnou fázi odsát a k ostatním fázím přidat metanol (stejně množství metanolu jako v prvním kroku) a zvortexovat.
4. Centrifugovat při 4 °C a 20 000 x g 5 minut.
5. Odstranit co nejvíce supernatantu a pelet vysušit na termobločku při 37 °C.

6. Vysušený pelet resuspendovat v 80°C 1 x vzorkovém pufru.

#### **4.13 Přenos dsRNA virů mezi trichomonádami**

Cílem následujících experimentů bylo zjistit, zda je možný přenos dsRNA virů mezi trichomonádami. Trichomonády bez virů byly inkubovány společně s infikovanými trichomonádami a také byly inkubovány pouze s extracelulárními váčky z infikovaných trichomonád. Jako donor virů byl vybrán infikovaný kmen, ze kterého byly vytvořené klony. Tyto klony byly transfekované plasmidem s vloženým genem pro puromycinovou rezistenci. Jako akceptor viru byl vybrán izogenní kmen, který po vyléčení 2'-C-methyl-cytidynem neobsahoval žádné viry (Narayanasamy et al. 2021). Z toho kmene byly vytvořeny klony, které byly transfekované plasmidem s vloženým genem pro geneticinovou rezistenci.

##### **4.13.1 Kokultivace infikovaných a neinfikovaných trichomonád v médiu TYM se sérem**

1. Podle generační doby nasadit obě linie do 10 ml média TYM, aby po 24 hodinách bylo v kultuře  $6,25 \times 10^5$  buněk/ml od každé linie.
2. Společně kultivovat obě linie 5 pasáží. Každých 24 hodin vyizolovat z kultury RNA pomocí High Pure RNA Isolation kitu a přenést 1 milion buněk z kultury do nového média TYM. Po 5. pasáži přidat antibiotikum geneticin (100 mg/ml).
3. Inkubovat s geneticinem až do 40. pasáže a průběžně izolovat RNA z kultury pomocí High Pure RNA Isolation kitu.
4. Po 40. pasáži vyhodnotit vyizolovanou RNA metodou RT-qPCR.

##### **4.13.1.1 Kokultivace infikovaných a neinfikovaných trichomonád v médiu TYM bez séra**

1. Nasadit stejné množství buněk do 2 ml TYMu bez séra. Buňky společně inkubovat 4 hodiny ve 37 °C.
2. Po 4 hodinách přidat 7 ml TYMu bez séra, 1 ml inaktivovaného koňského séra a geneticin.
3. Inkubovat s geneticinem až do 40. pasáže a průběžně izolovat RNA z kultury pomocí High Pure RNA Isolation kitu.
4. Po 40. pasáži vyhodnotit vyizolovanou RNA metodou RT-qPCR.

##### **4.13.2 Kokultivace infikovaných a neinfikovaných trichomonád s HaCaT buňkami**

1. Do sterilní 12 jamkové destičky rozplnit do 5 jamek GMP médium po 1 ml.
2. Do tří jamek přidat 200 000 HaCaT buněk a obě linie trichomonád, aby celkový počet trichomonád v jedné jamce byl  $10^5$  buněk. Do čtvrté jamky přidat pouze 200 000 HaCaT buněk a do páté jamky přidat obě linie trichomonád, aby celkový počet buněk v jamce byl  $10^5$ .
3. Inkubovat společně všechny buňky 72 hodin v 5% CO<sub>2</sub> při 37 °C.
4. Po 72 hodinách přeočkovat trichomonády do média TYM s agarem a geneticinem (100 mg/ml).
5. Trichomonády inkubovat 30. pasáží v médiu s geneticinem a každých 24 hodin z kultury vyizolovat RNA.
6. Po 30. pasáži vyhodnotit vyizolovanou RNA metodou RT-qPCR.

#### **4.13.3 Koinkubace trichomonád bez virů s extracelulárními váčky z infikovaných trichomonád v médiu TYM se sérem**

1. Vyizolovat extracelulární váčky z  $7,5 \times 10^8$  infikovaných buněk (postup popsán v kapitole 4.10).
2. K milionu vyléčených buněk přidat ekvivalentní množství extracelulárních váček, které odpovídá počtu extracelulárních váček, uvolněných z  $15 \times 10^6$  buněk. Ze zbytku extracelulárních váček vyizolovat RNA trizolem (postup popsán v kapitole 4.9.1).
3. Buňky s extracelulárními váčky společně koinkubovat v 10 ml média TYM s penicilin-streptomycinem ve  $37^\circ\text{C}$  5 pasáží. Každých 24 hodin vyizolovat z kultury RNA pomocí High Pure RNA Isolation kitu a přenést 1 milion buněk z kultury do nového média TYM se sérem.
4. Vyizolovanou RNA vyhodnotit metodou RT-qPCR.

#### **4.13.3.1 Inkubace vyléčeného kmene s extracelulárními váčky z infikovaného kmene v médiu TYM bez séra**

1. K milionu vyléčených buněk přidat ekvivalentní množství extracelulárních váček, které odpovídá počtu extracelulárních váček, uvolněných z  $15 \times 10^6$  buněk.
2. Buňky s extracelulárními váčky inkubovat 4 hodiny ve 2 ml TYMu bez séra ve  $37^\circ\text{C}$ .
3. Po 4 hodinách přidat 7 ml TYMu bez séra, 1 ml koňského séra a penicilin-streptomycin.
4. Buňky s extracelulárními váčky inkubovat v 10 ml média TYM s penicilin-streptomycinem ve  $37^\circ\text{C}$  5 dní. Každých 24 hodin vyizolovat z buněk RNA pomocí High Pure RNA Isolation kitu a přenést 1 milion buněk z kultury do nového média TYM se sérem.
5. Vyizolovanou RNA vyhodnotit metodou RT-qPCR.

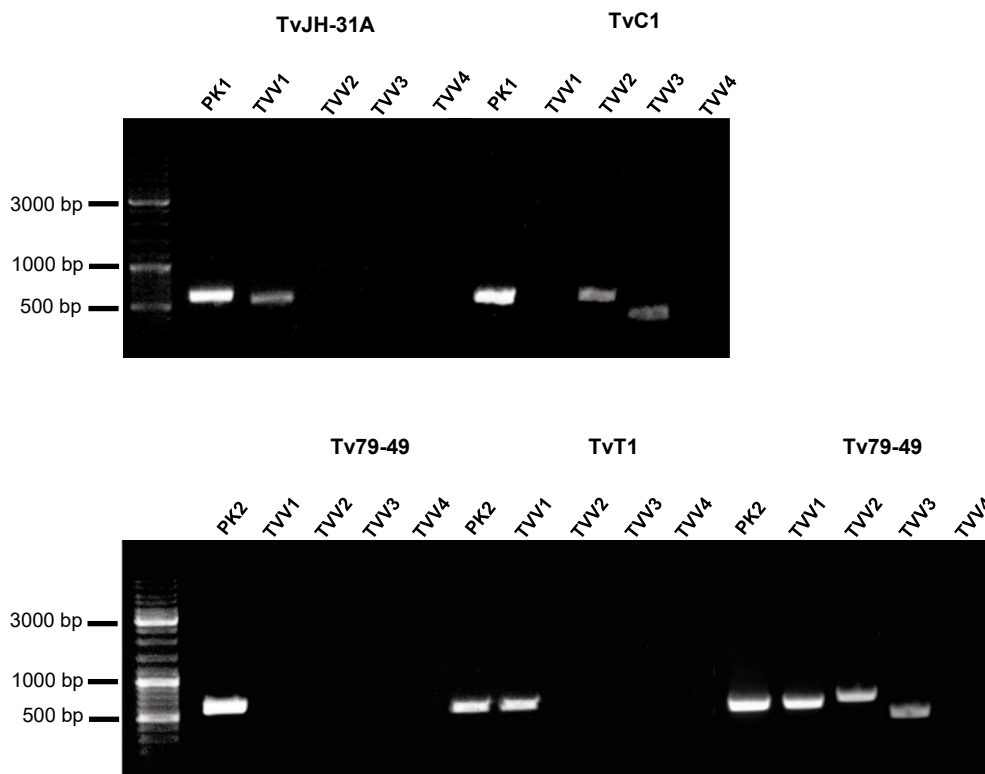
## 5 Výsledky

### 5.1 Detekce dsRNA virů v trichomonádách

Prvním krokem experimentální práce bylo zjistit, zda jsou vybrané kmeny trichomonád (TvJH-31A, TvC1, Tv17-48, TvT1, Tv79-49) infikovány dsRNA viry. Všechny vybrané kmeny trichomonád byly otestovány metodou RT-PCR na přítomnost dsRNA virů (*Trichomonasvirus* - TVV1, TVV2, TVV3, TVV4). Pro detekci TVV v trichomonádách byly použité specifické primery, které amplifikují příslušné úseky cDNA daného viru (tab. 3). Velikost amplifikovaných úseků cDNA je uvedena v tabulce (tab. 3). Amplifikované sekvence cDNA byly analyzovány na horizontální gelové elektroforéze. Metoda RT-PCR prokázala v kmeni TvJH-31A přítomnost TVV1 (obr. 7). V kmeni TvC1 prokázala přítomnost TVV2 a TVV3 (obr. 7). V kmeni Tv17-48 neprokázala žádný TVV (obr. 7). V kmeni TvT1 prokázala přítomnost TVV1 (obr. 7). V kmeni Tv79-49 prokázala přítomnost TVV1, TVV2 a TVV3 (obr. 7). Přehled všech virů, které byly detekovány ve vybraných kmenech trichomonád je v tabulce 4 (tab. 4).

	Použité primery	Sekvence primeru 5'→3'	Velikost (bp)
TVV1	TVV1 RdRp Forw.	ATTAGCGGTGTTTGTGATGCA	569
	TVV1 RdRp Rev.	CTATCTTGCCATCCTGACTC	
TVV2	TVV2 RdRp Forw.	GCTTGAGCACTGCTCGCG	625
	TVV2 RdRp Rev.	TCTCTTTGGCATCGCTT	
TVV3	TVV3 RdRp Forw.	AAATTAATCAACACCCTCC	437
	TVV3 RdRp Rev.	CAGATCACTTTGTGTGTC	
TVV4	TVV4 RdRp Forw.	ATGCCAGTTGCTTTCGG	514
	TVV4 RdRp Rev.	TTCCCAATAGTTATCAG	

Tab. 3 Velikost amplifikovaných sekvencí cDNA příslušnými primery.



**Obr. 7 Detekce TVV ve vybraných kmenech trichomonád (TvJH-31A, TvC1, Tv17-48, TvT1, Tv79-49)**

**(PK1)** Pozitivní kontrola 1: Amplifikovaný úsek virové cDNA z kmene Tv10-02. K amplifikaci virové cDNA byly použité primery pro TVV2 (tab. 3). **(PK2)** Pozitivní kontrola 2: Amplifikovaný úsek virové cDNA z kmene TvJH-31A. K amplifikaci virové cDNA byly použité primery pro TVV1 (tab. 3) **(TVV1)** K amplifikaci virové cDNA byly použité primery pro TVV1 **(TVV2)** K amplifikaci virové cDNA byly použité primery pro TVV2 (tab. 3) **(TVV3)** K amplifikaci virové cDNA byly použité primery pro TVV3 (tab. 3) **(TVV4)** K amplifikaci virové cDNA byly použité primery pro TVV4 (tab. 3).

	TvJH-31A	TvC1	Tv17-48	TvT1	Tv79-49
TVV1	+	-	-	+	+
TVV2	-	+	-	-	+
TVV3	-	+	-	-	+
TVV4	-	-	-	-	-

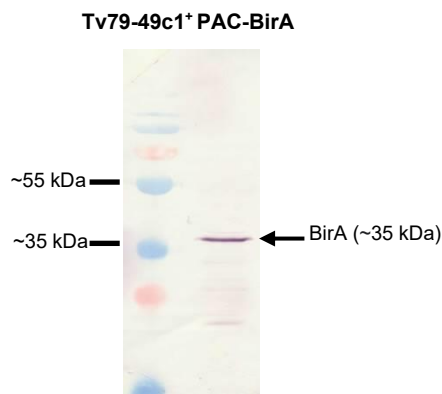
**Tab. 4 Přehled všech virů, které byly detekovány ve vybraných kmenech trichomonád metodou RT-PCR.**

**(+)** Příslušný virus, byl detekován v daném kmeni. **(-)** Příslušný virus nebyl detekován v daném kmeni.

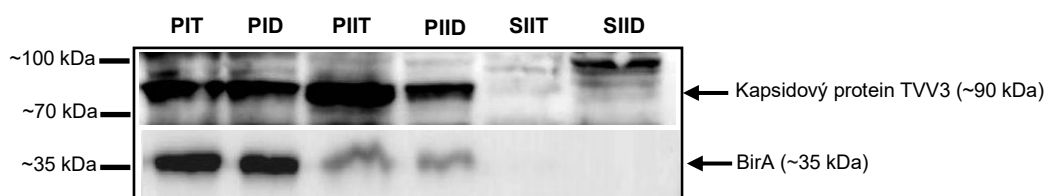
## 5.2 Detekce TVV3 v trichomonádách kmene Tv79-49

Cílem experimentu bylo zjistit, kde se v trichomonádách nachází TVV3. Imunoblotem bylo ověřeno, zda se TVV3 nachází v trichomonádách, extracelulárních váčkách nebo v médiu, ve kterém byly trichomonády inkubovány. Pro experiment byl vybrán kmen Tv79-49, u kterého byla prokázána přítomnost TVV1, TVV2 a TVV3 (tab. 4). Z tohoto kmene byl vytvořen klon 1 (dále jako Tv79-49c1<sup>+</sup>). Aby bylo možné ověřit, zda během experimentu nedocházelo k rozpadu buněk, byly trichomonády Tv79-49c1 transformovány plasmidem pTagVag s vloženým genem pro cytosolický protein biotin ligázu (BirA, WP\_02330855) a genem pro puromycin N-acetyltransferázu (PAC) (Rada et al. 2019) (dále jako Tv79-49c1<sup>+</sup> PAC-BirA). Transformované trichomonády exprimovaly v cytosolu rekombinantní protein BirA, který má na C-konci V5 tag. Díky V5 tagu bylo možné detekovat rekombinantní protein BirA imunoblotem (obr. 8). Pokud by během experimentu docházelo k rozpadu buněk, tak by se cytosolický protein BirA nacházel v médiu, ve kterém byly trichomonády inkubované. Transformované trichomonády byly paralelně inkubovány 2,5 hodiny v Doranu a v TYMu bez séra. V průběhu 2,5 hodin docházelo k sekreci proteinů a uvolňování extracelulárních váček z trichomonád do média. V průběhu inkubace byl mikroskopicky ověřován stav trichomonád. Po inkubaci byly trichomonády z Doranu i z TYMu bez séra izolovány centrifugací. Pelety obsahovaly sedimentované buňky trichomonád (pelet I) a supernatanty obsahovaly extracelulární váčky a sekretované proteiny (supernatant I). Supernatanty I byly zahuštěny pomocí tangenciální filtrace (Vivaflow) a poté byly centrifugovány. Pelety obsahovaly extracelulární váčky (pelet II) a supernatanty obsahovaly proteiny sekretované z trichomonád (supernatant II). Ze supernatantů II byly proteiny vysráženy kyselinou trichloroctovou. Proteiny z peletů I, II a supernatantů II byly analyzovány imunoblotem. Pomocí imunoblotové analýzy byl v peletech I detekován signál pro protein BirA (obr. 12). V peletech II, které obsahovaly extracelulární váčky, byl detekován velmi slabý signál pro BirA a v supernatantech II nebyl detekován signál pro BirA (obr. 9). Imunoblotem byl v peletech I a II detekován signál pro kapsidový protein TVV3 (obr. 9). Imunoblot neprokázal přítomnost kapsidového proteinu TVV3 v supernatantech II (obr. 9).

Získané výsledky ukázaly, že virus se uvolňuje z infikovaných trichomonád pomocí extracelulárních váček. Vzhledem k tomu, že kapsidový protein TVV3 nebyl detekován v supernatantech II, tak lze předpokládat, že z infikovaných trichomonád není uvolňován samotný virus. Během experimentu nedocházelo k rozpadu trichomonád, protože cytosolický protein BirA nebyl detekován v supernatantech II. Nicméně cytosolický protein BirA byl detekován v peletech II, což jsou pelety obohacené o extracelulární váčky.



**Obr. 8 Ověření exprese rekombinantního proteinu BirA v transformovaných buňkách Tv79-49c1<sup>+</sup> PAC-BirA pomocí imunoblotu.** Rekombinantní protein BirA (~35 kDa) byl detekován primární králičí protilátkou proti V5 tagu a sekundární protilátkou konjugovanou s alkalickou fosfatázou.



**Obr. 9 Detekce kapsidového proteinu viru TVV3 a rekombinantního proteinu BirA v jednotlivých frakcích pomocí imunoblotu.** Kapsidový protein TVV3 (~90 kDa) byl detekován primární králičí protilátkou proti kapsidovému proteinu TVV3 a sekundární protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidázou. Cytosolický protein BirA (~35 kDa) byl detekován primární králičí protilátkou proti V5 tagu a sekundární protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidázou. **(PIT)** Pelet I z TYMu bez séra **(PID)** Pelet I z Doranu **(PIIT)** Pelet II z TYMu bez séra **(PIID)** Pelet II z Doranu **(SIIT)** Supernatant II z TYMu bez séra. **(SIID)** Supernatant II z Doranu.

### 5.3 Průkaz přítomnosti kapsidového proteinu uvnitř extracelulárních váčků

V předchozím experimentu bylo prokázáno, že TVV se uvolňuje z infikovaných trichomonád pomocí extracelulárních váčků. Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, zda je TVV1 a TVV3 lokalizovaný uvnitř těchto extracelulárních váčků.

Pro tento experiment byl vybrán transformovaný klon Tv79-49c1<sup>+</sup> PAC-BirA. Stejným postupem jako v předchozím experimentu byl z kultury trichomonád izolován pelet I, pelet II a supernatant II. Ze supernatantu II byly proteiny vysráženy metanolem/chloroformem. Proteiny z peletu I a supernatantu II byly analyzované imunoblotem. Cytosolický protein BirA byl detekován v peletu I, ale nebyl detekován v supernatantu II (obr. 10). Nedošlo tedy k rozpadu trichomonád při izolaci extracelulárních váčků.

Pelet II, který obsahuje extracelulární váčky, byl ošetřen trypsinem. Proteáza trypsin byla použita k degradaci volných proteinů a k degradaci proteinů ve vnější membráně extracelulárních váčků. Proteiny, které byly lokalizované uvnitř extracelulárních váčků byly chráněny před trypsinem membránou váčku. Po ošetření trypsinem, byl pomocí imunoblotu v peletu II detekován kapsidový protein TVV1 a TVV3 (obr. 11). Kapsidové proteiny virů nebyly degradovány trypsinem a nachází se tedy uvnitř extracelulárních váčků.

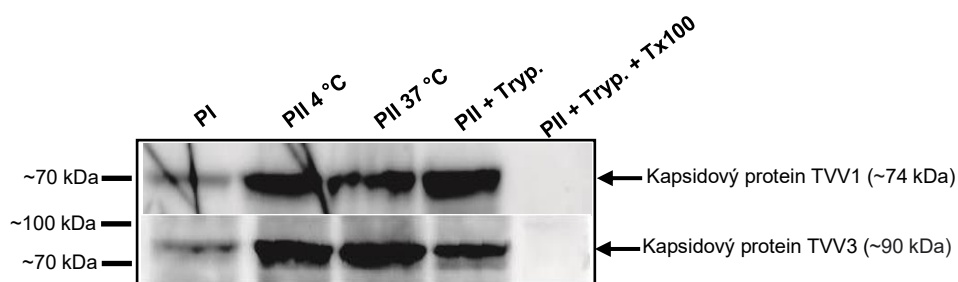


Signál pro kapsidový protein TVV1 a TVV3 nebyl detekován v peletu II (obr. 11), který byl ošetřený trypsinem a tritonem. Triton byl použit k solubilizaci cytoplazmatické membrány extracelulárních váčků. Proteiny uvnitř extracelulárních váčků tak nebyly dále chráněny cytoplazmatickou membránou váčku a byly degradovány trypsinem. Kapsidový protein TVV1 a TVV3 byl degradován trypsinem, protože již nebyl chráněn cytoplazmatickou membránou extracelulárních váčků.

Získané výsledky prokázaly, že kapsidový protein TVV1 a TVV3 se nachází uvnitř extracelulárních váčků, které jsou uvolňované z infikovaných trichomonád. Přítomností kapsidového proteinu TVV1 a TVV3 uvnitř těchto váčků bylo prokázáno, že tyto viry jsou uvolňovány z infikovaných trichomonád uvnitř extracelulárních váčků.



**Obr. 10 Detekce cytosolického proteinu BirA v peletu I a supernatantu II pomocí imunoblotu.** Cytosolický protein BirA (~35 kDa) byl detekován primární králičí protilátkou proti V5 tagu a sekundární protilátkou s konjugovanou alkalickou fosfatázou. **(PI)** Pelet I. **(SII)** Supernatant II.

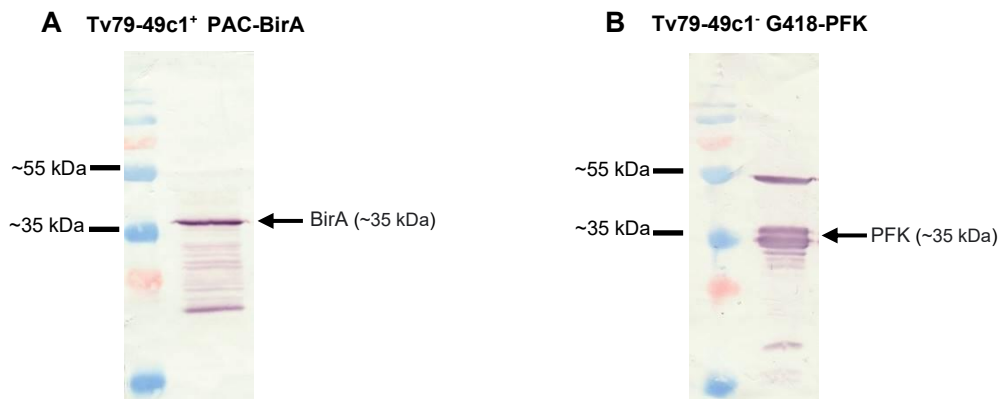


**Obr. 11 Detekce kapsidového proteinu TVV1 a TVV3 v extracelulárních váčcích.** Kapsidový protein viru TVV1 (~74 kDa) byl detekován primární králičí protilátkou proti kapsidovému proteinu viru TVV1 a sekundární protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidázou. Kapsidový protein viru TVV3 (~90 kDa) byl detekován primární králičí protilátkou proti kapsidovému proteinu viru TVV3 a sekundární protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidázou. **(PI)** Pelet I. **(PII 4 °C)** Pelet II inkubovaný při 4 °C. **(PII 37 °C)** Pelet II inkubovaný při 37 °C. **(PII Tryp.)** Pelet II inkubovaný s trypsinem. **(PII Tryp+Tx100)** Pelet II inkubovaný s trypsinem a tritonem.

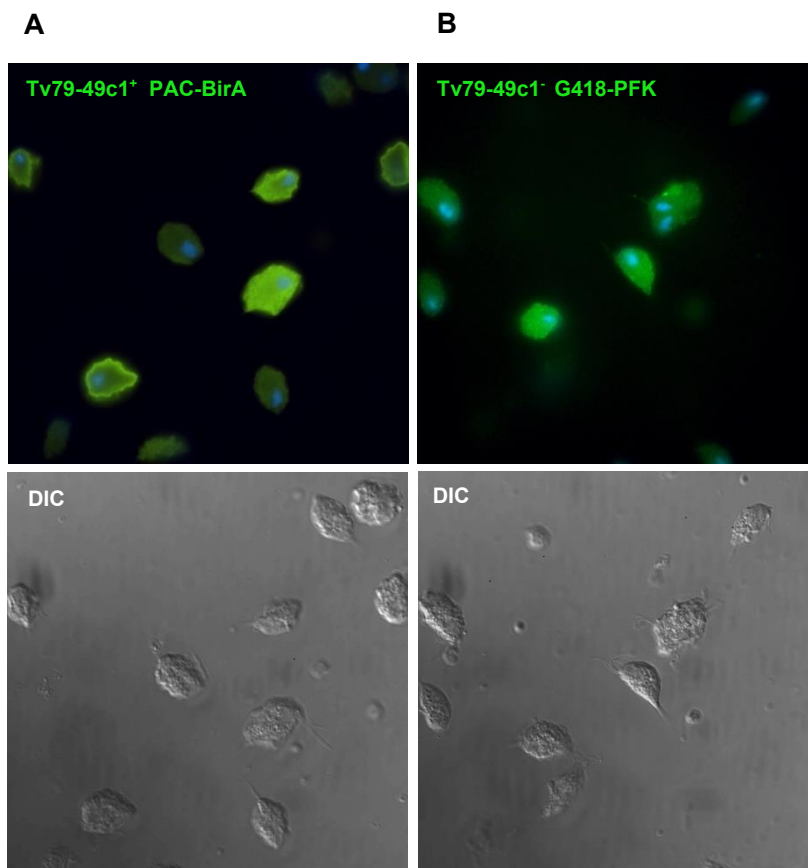
#### 5.4 Přenos virů mezi trichomonádami

V předchozích experimentech bylo prokázáno, že se TVV uvolňuje z infikovaných trichomonád uvnitř extracelulárních váčků. Cílem následujících experimentů bylo tedy zjistit, zda je možný horizontální přenos TVV pomocí těchto váčků. (i) Nejdříve bylo otestováno, zdali se mohou přenést viry z izolovaných váčků do trichomonád. (ii) Dále bylo ověřeno, jestli se mohou přenášet viry mezi buňkami přirozenější cestou. Pro tyto účely se společně kokultivovaly infikované a neinfikované trichomonády v médiu TYM. (iii) Nakonec bylo ověřeno, zda se na přenosu TVV mohou podílet lidské epitelální buňky HaCaT. Infikované a neinfikované trichomonády byly proto kultivovány s HaCat buňkami. (iv) Dále nás zajímalo, jestli má přítomnost koňského séra v médiu vliv na přenos TVV mezi trichomonádami. Koňské sérum totiž obsahuje exosomy a další mikrovesikly, které by mohly narušit přenos virů mezi buňkami trichomonád.

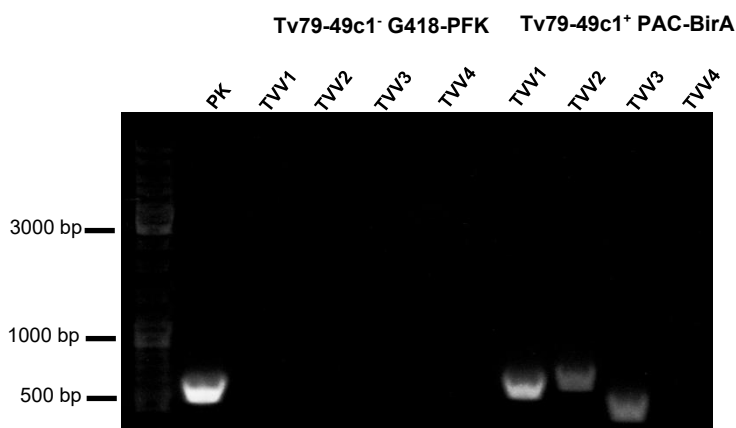
Jako donor TVV byl vybrán klon kmene Tv79-49, který obsahuje viry TVV1, TVV2 a TVV3 (Tv79-49c1<sup>+</sup>). Jako akceptor TVV byl vybrán klon z kmene Tv79-49c1<sup>+</sup>, který byl vyléčený od virů 2'-C-methyl-cytidinem (Tv79-49c1<sup>-</sup>) (Narayanasamy et al. 2021). Aby bylo možné odlišit donor a akceptor virů během kokultivace, byl donor virů Tv79-49c1<sup>+</sup> transformovaný plasmidem s vloženým genem pro expresi proteinu biotin ligázy (BirA) a s genem pro rezistenci na puromycin (protein puromycin N-acetyltransferáza, PAC) (Tv79-49c1<sup>+</sup> PAC-BirA). Vyléčený akceptor virů byl transformován plasmidem s vloženým genem pro expresi proteinu PP<sub>i</sub> dependentní fosfofruktokinázy (PFK, TVAG\_430830) a genem pro rezistenci na geneticin (protein neomycin fosfotransferáza) (Rada et al. 2015) (Tv79-49c1<sup>-</sup> G418-PFK). Expresie rekombinantní proteinů BirA a PFK v transformovaných trichomonádách byla ověřena imunoblotem (obr. 12AB). Míra exprese rekombinantních proteinů BirA a PFK byla v transformovaných trichomonádách ověřena imunofluorescencí. Fluorescenční mikroskopií bylo ověřeno, že většina buněk v kultuře Tv79-49c1<sup>+</sup> PAC-BirA exprimuje protein BirA (obr. 13A) a většina buněk v kultuře Tv79-49c1<sup>-</sup> G418-PFK exprimuje protein PFK (obr. 13B). Izogenní kmeny byly poté otestovány metodou RT-PCR na přítomnost TVV1, TVV2, TVV3 a TVV4. Metodou RT-PCR bylo prokázáno, že transformovaný kmen Tv79-49c1<sup>+</sup> PAC-BirA obsahuje TVV1, TVV2 a TVV3 a transformovaný kmen Tv79-49c1<sup>-</sup> G418-PFK žádné TVV neobsahuje (obr. 14).



**Obr. 12 Ověření exprese rekombinantního proteinu BirA a PFK v transformovaných trichomonádách pomocí imunoblotu. (A)** Rekombinantní protein BirA (~35 kDa) byl detekován primární králičí protilátkou proti V5 tagu a sekundární protilátkou konjugovanou s alkalickou fosfatázou. **(B)** Rekombinantní protein PFK (~35 kDa) byl detekován primární myší protilátkou proti HAAA tagu a sekundární protilátkou konjugovanou s alkalickou fosfatázou.



**Obr. 13 Ověření exprese rekombinantních proteinů v transformovaných trichomonádách imunofluorescencí. (A)** Rekombinantní protein BirA byl detekován v trichomonádách primární myší protilátkou proti V5 tagu a sekundární protilátkou Alexa 488 (zelená barva). **(B)** Rekombinantní protein PFK byl detekován v trichomonádách primární myší protilátkou proti HAAA tagu a sekundární protilátkou Alexa 488 (zelená barva). Jádra trichomonád jsou značena DAPI (modrá barva). DIC – diferenciální interferenční kontrast.



**Obr. 14 Detekce TVV v izogenních kmenech Tv79-49c1<sup>-</sup> G418-PFK a Tv79-49c1<sup>+</sup> PAC-BirA metodou RT-PCR. (PK)**  
 Pozitivní kontrola: Amplifikovaný úsek virové cDNA z kmene TvJH-31A. K amplifikaci virové cDNA byly použité primery pro TVV1 (tab. 3). **(TVV1)** K amplifikaci virové cDNA byly použité primery pro TVV1 (tab. 3). **(TVV2)** K amplifikaci virové cDNA byly použité primery pro TVV2 (tab. 3). **(TVV3)** K amplifikaci virové cDNA byly použité primery pro TVV3 (tab. 3). **(TVV4)** K amplifikaci virové cDNA byly použité primery pro TVV4 (tab. 3).

#### 5.4.1 Koinkubace buněk Tv79-49c1<sup>-</sup> G418-PFK s extracelulárními váčky z kmene Tv79-49c1<sup>+</sup> PAC- BirA v médiu TYM se sérem

V předchozích experimentech bylo prokázáno, že se TVV uvolňují z infikovaných trichomonád uvnitř extracelulárních váčků. V práci Twu et al. 2013 bylo prokázáno, že trichomonády uvolňují exosomy, které interagují s ostatními trichomonádami. Zajímalo nás tedy, zda se TVV může horizontálně přenášet mezi trichomonádami pomocí extracelulárních váčků. Pro ověření této hypotézy byly extracelulární váčky s TVV z infikovaného kmene Tv79-49c1<sup>+</sup> PAC-BirA koinkubovány s akceptorovými buňkami trichomonád Tv79-49c1<sup>-</sup> G418-PFK, které žádné TVV neobsahují. Přítomnost či absence TVV v trichomonádách a extracelulárních váčkách byla prokázána metodou RT-qPCR a to použitím specifických primerů (tab. 5), které amplifikují příslušné sekvence cDNA RdRp (RNA depondentní RNA polymeráza TVV1, 2 a 3). V extracelulárních váčkách z kmene Tv79-49c1<sup>+</sup> PAC-BirA byla prokázána přítomnost TVV1, 2 a 3, zatímco u kmene Tv79-49c1<sup>-</sup> G418-PFK přítomnost virů prokázána nebyla (obr. 15ABC).

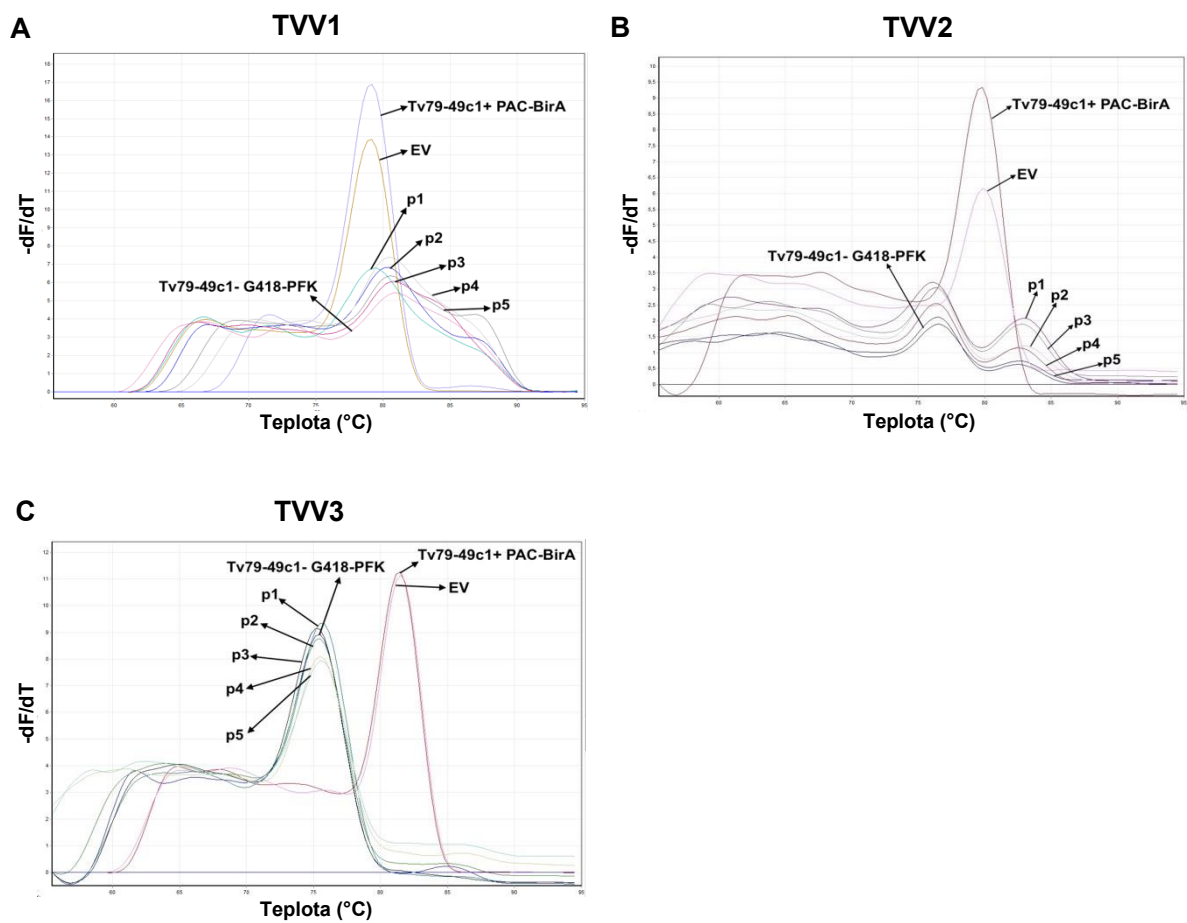
Extracelulární váčky s viry byly koinkubovány s akceptorovými buňkami v médiu TYM s geneticinem po dobu 24 hodin. Po 24 hodinách koinkubace byly akceptorové buňky přeneseny do nového média TYM s geneticinem a byly dále kultivované do 5. pasáže (každých 24 hodin byly trichomonády přeneseny do nového média TYM s geneticinem). Aby bylo možné zjistit, v jakých pasážích byl přítomný TVV1, TVV2 a TVV3, byla z kultury každých 24 hodin (tj. každou pasáž) izolovaná RNA, ve které byla metodou RT-qPCR prokázána přítomnost či absence RNA RdRp TVV1, TVV2 a TVV3. Analýza křivek tání amplikonů RdRp prokázala, že TVV2 a TVV3 nebyly přítomné v kultuře již po 24 hodinách koinkubace (tj. v 1. pasáži) (obr. 15BC). TVV1 byl detekován v kultuře po 24 hodinách koinkubace (tj. v 1. pasáži), nicméně po 48 hodinách koinkubace (tj. v 2. pasáži) již nebyl TVV1 v kultuře přítomný (obr. 15A). Dále nás zajímalo, jak se změnila hladina TVV1 po 24 hodinách koinkubace (tj. v 1. pasáži) trichomonád s extracelulárními váčky.

Analýzou výsledků RT-qPCR byla stanovena relativní genová exprese RdRp TVV1 v 1. pasáži koinkubace. Tato analýza prokázala, že relativní genová exprese RdRp TVV1 byla v 1. pasáži koinkubace přibližně 2000x nižší, než v trichomonádách Tv79-49c1<sup>+</sup> PAC-BirA, ze kterých byly extracelulární váčky izolovány (obr. 16). Relativní genová exprese RdRp TVV1 byla stanovena pouze v 1. pasáži, protože v následujících pasážích již nebyla prokázána přítomnost RNA RdRp TVV1 (obr. 15A).

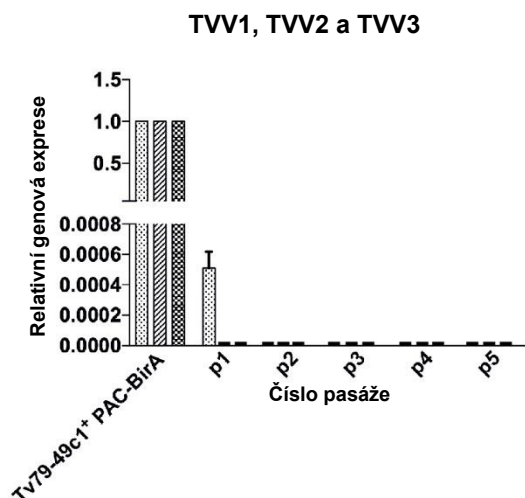
Získané výsledky prokázaly, že RNA RdRp TVV2 a TVV3 vymizela z kultury trichomonád již po 24 hodinách (tj. v 1. pasáži) koinkubace akceptorových buněk Tv79-49c1<sup>-</sup> G418-PFK s extracelulárními váčky z infikovaného kmene Tv79-49c1<sup>+</sup> PAC-BirA (obr. 15BC). Dále bylo prokázáno, že v 1. pasáži po 24 hodinách koinkubace došlo k významnému poklesu relativní genové exprese RdRp TVV1 a že v 2. pasáži po 48 hodinách koinkubace již nebyla RNA RdRp TVV1 v kultuře trichomonád vůbec detekována (obr. 15A). Získané výsledky tedy prokázaly, že za těchto podmínek nedošlo k přenosu TVV do akceptorových buněk Tv79-49c1<sup>-</sup> G418-PFK.

	Primer	Sekvence primeru 5'→3'	Velikost (bp)
DNA topo izomeráza II.	DNA Topo II qForw.	ATCGGTGTCGGTTGGTCAAG	171
	DNA Topo II qRev.	TGGCTGTTTGACACCGTCTTT	
TVV1	Tv79-49V1 RdRp qForw.	GACTCACATTCGATCCGACAA	132
	Tv79-49V1 RdRp qRev.	AGCGTTCTTCCAAATGGTACT	
TVV2	Tv79-49V2 RdRp qForw.	TTCACGTGCAATATGTCGCAATGAT	153
	Tv79-49V2 RdRp qRev.	TCTCTTTTGGCATCGCTTGAAGTT	
TVV3	Tv79-49V3 RdRp qForw.	ACACTTCGCCAAGTATAGTTACCG	130
	Tv79-49V3 RdRp qRev.	AATGTACCTAGTCTTACCGTGTCC	

**Tab. 5 Primery použité k amplifikaci příslušných sekvencí cDNA.**



**Obr. 15** Křivky tání amplikonů RdRp TVV1, TVV2 a TVV3. Jako pozitivní kontrola byla použita totální RNA z buněk Tv79-49c1<sup>+</sup> PAC-BirA. Jako negativní kontrola byla použita totální RNA z buněk Tv79-49c1<sup>-</sup> G418-PFK. **(A)** Příslušné sekvence cDNA byly amplifikovány pomocí primerů pro RdRp TVV1 (tab. 5). **(B)** Příslušné sekvence cDNA byly amplifikovány pomocí primerů pro RdRp TVV2 (tab. 5). **(C)** Příslušné sekvence cDNA byly amplifikovány pomocí primerů pro RdRp TVV3 (tab. 5). **(EV)** Kontrola přítomnosti TVV1, TVV2 a TVV3 v extracelulárních váčcích. Pomocí specifických primerů byla v extracelulárních váčcích detekována přítomnost RdRp TVV1, TVV2 a TVV3 (tab. 5). **(p1-p5)** Číslo pasáže, ve které byl metodou RT-qPCR detekován TVV1, TVV2 a TVV3.



**Obr. 16** Relativní genová exprese RdRp TVV1,TVV2 a TVV3 v jednotlivých pasážích. Ke stanovení relativní genové exprese RdRp v kultuře byl použit referenční gen *DNATop11* a jako pozitivní kontrola byla použita totální RNA z buněk Tv79-49c1<sup>+</sup> PAC-BirA.

#### 5.4.2 Koinkubace buněk Tv79-49c1<sup>-</sup> G418-PFK s extracelulárními váčky z kmene Tv79-49c1<sup>+</sup> PAC-BirA v médiu TYM bez séra

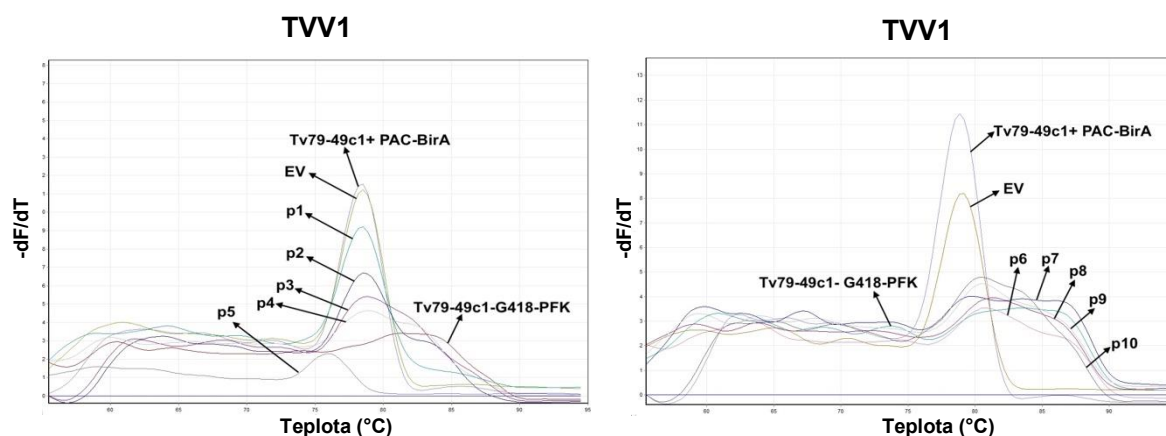
Cílem experimentu bylo zjistit, zda má přidané koňské sérum v médiu TYM vliv na přenos TVV pomocí extracelulárních váčků. V předchozím experimentu byly akceptorové buňky Tv79-49c1<sup>-</sup> G418-PFK (bez virů) koinkubovány s extracelulárními váčky z kmene Tv79-49c1<sup>+</sup> PAC-BirA (které viry obsahují) v médiu TYM s geneticinem a s koňským sérem. Koňské sérum však obsahuje exosomy a další mikrovesikly, které by mohly narušit přenos virů pomocí extracelulárních váčků mezi buňkami trichomonád. Aby bylo možné ověřit, zda má přidané koňské sérum vliv na přenos TVV pomocí extracelulárních váčků, byly trichomonády Tv79-49c1<sup>-</sup> G418-PFK koinkubovány s extracelulární váčky z kmene Tv79-49c1<sup>+</sup> PAC-BirA v médiu TYM bez koňského séra.

V extracelulárních váčkách z kmene Tv79-49c1<sup>+</sup> PAC-BirA byla metodou RT-qPCR prokázána přítomnost TVV1 (obr. 17), zatímco u kmene Tv79-49c1<sup>-</sup> G418-PFK přítomnost TVV1 prokázána nebyla (obr. 17). Trichomonády Tv79-49c1<sup>-</sup> G418-PFK byly koinkubovány s extracelulární váčky z kmene Tv79-49c1<sup>+</sup> PAC-BirA v médiu TYM bez séra a bez geneticinu po dobu 4 hodin. V průběhu 4 hodin byl mikroskopicky kontrolován stav buněk. Po 4 hodinách koinkubace bylo přidáno koňské sérum a trichomonády byly dále koinkubovány s extracelulárními váčky v médiu TYM se sérem a geneticinem po dobu 24 hodin. Po 24 hodinách byly trichomonády přeneseny do nového média TYM s geneticinem a byly dále kultivovány do 10. pasáže (každých 24 hodin byly trichomonády přeneseny do nového média TYM s geneticinem). Aby bylo možné zjistit, v jakých pasážích byl přítomný TVV1, byla každých 24 hodin z kultury izolována RNA (tj. každou pasáž), ve které byla metodou RT-qPCR prokázána přítomnost či absence RNA RdRp TVV1.

Analýza křivek tání ampliconů RdRp prokázala, že TVV1 byl detekován v kultuře trichomonád do 5. pasáže. Dále nás zajímalo, jak se měnila hladina TVV1 během prvních 5 pasáží koinkubace trichomonád s extracelulárními váčky. Analýzou výsledků RT-qPCR byla stanovena relativní genová exprese RdRp TVV1 v 1. až 5. pasáži koinkubace. Tato analýza prokázala, že relativní genová exprese RdRp TVV1 byla v 1. pasáži koinkubace přibližně 500x nižší než v trichomonádách Tv79-49c1<sup>+</sup> PAC-BirA, ze kterých byly extracelulární váčky s viry izolovány (obr. 18). Relativní genová exprese RdRp TVV1 klesala v každé následující pasáži koinkubace a v 6. pasáži již nebyl TVV1 v kultuře trichomonád vůbec detekován (obr. 17).

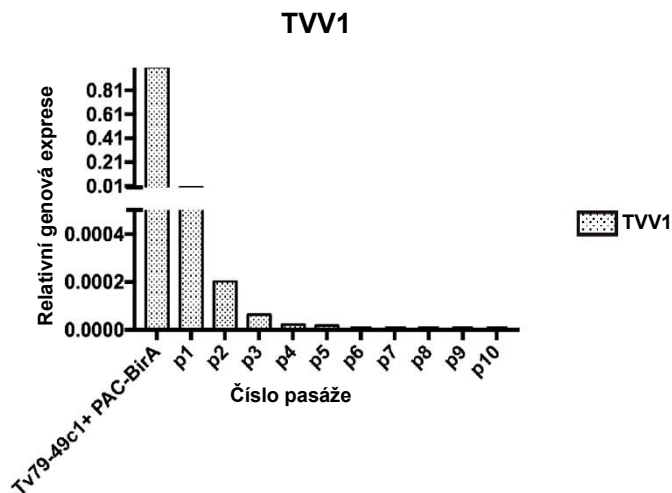
Získané výsledky ukázaly, že došlo k přenosu TVV1 pomocí extracelulárních váček do akceptorových buněk trichomonád. Infekce trichomonád ale nebyla stabilní, protože hladina TVV1 klesala v kultuře trichomonád s každou pasáží.

V předchozím experimentu, kdy byly akceptorové buňky trichomonád koinkubovány s extracelulárními váčky s viry v médiu TYM se sérem, klesala relativní genová exprese RdRp TVV1 v kultuře trichomonád mnohem rychleji než při koinkubaci akceptorových buněk trichomonád s extracelulárními váčky s viry v médiu TYM bez séra. Lze tedy předpokládat, že přítomnost koňského séra v médiu TYM má vliv na přenos TVV do buněk trichomonád pomocí extracelulárních váček.



**Obr. 17** Křivky tání ampliconů RdRp TVV1. Jako pozitivní kontrola byla použita totální RNA z buněk Tv79-49c1<sup>+</sup> PAC-BirA. Jako negativní kontrola byla použita totální RNA z buněk Tv79-49c1<sup>-</sup> G418-PFK. Příslušné sekvence cDNA byly amplifikovány pomocí primerů pro RdRp TVV1 (tab. 5). (EV) Kontrola přítomnosti TVV1 v extracelulárních váčcích. Pomocí specifických primerů (tab.5) byla v extracelulárních váčcích detekována přítomnost RdRp TVV1. (p1-p5) Číslo pasáže, ve které byl metodou RT-qPCR detekován TVV1.





**Obr. 18 Relativní genová exprese TVV1 jednotlivých pasáží.** K určení relativní genové exprese byl použit referenční gen *DNA TopII* a pozitivní kontrola byla použita totální RNA z buněk Tv79-49c1<sup>+</sup> PAC-BirA.

#### 5.4.3 Kokultivace infikovaných trichomonád Tv79-49c1<sup>+</sup> PAC-BirA a neinfikovaných trichomonád Tv79-49c1<sup>-</sup> G418-PFK v médiu TYM se sérem

Cílem experimentu bylo zjistit, zda se TVV přenáší mezi trichomonádami přirozenější cestou, tj. při společné kultivaci (kokultivaci) infikovaných a neinfikovaných trichomonád v médiu TYM se sérem. Jako donor TVV byl vybrán infikovaný kmen Tv79-49c1<sup>+</sup> PAC-BirA a jako akceptor TVV byl vybrán izogoní kmen Tv79-49c1<sup>-</sup> G418-PFK, který viry neobsahuje. V donorovém kmeni Tv79-49c1<sup>+</sup> PAC-BirA byla metodou RT-qPCR prokázána přítomnost TVV1, TVV2 a TVV3, zatímco u akceptorového kmene Tv79-49c1<sup>-</sup> G418-PFK přítomnost TVV prokázána nebyla (obr. 21ACD). Kmen Tv79-49c1<sup>+</sup> PAC-BirA epizomálně exprimuje protein BirA a je rezistentní na puromycin. Kmen Tv79-49c1<sup>-</sup> G418-PFK epizomálně exprimuje protein PFK a je rezistentní na geneticin. Oba kmeny trichomonád byly nejprve společně kokultivovány v médiu TYM bez antibiotik. Díky tomu, že oba kmeny trichomonád epizomálně exprimují rozdílné proteiny, bylo možné imunoblotem ověřit přítomnost obou kmenů v kultuře během kokultivace. Aby bylo možné zjistit, zda během kokultivace došlo k přenosu TVV do akceptorových buněk Tv79-49c1<sup>-</sup> G418-PFK, byl z kultury eliminován infikovaný kmen Tv79-49c1<sup>+</sup> PAC-BirA (ke kultuře trichomonád byl přidán geneticin, na který je rezistentní pouze akceptor virů Tv79-49c1<sup>-</sup> G418-PFK). Eliminace donorového kmene Tv79-49c1<sup>+</sup> PAC-BirA byla ověřena imunoblotem a metodou RT-qPCR. Po přidání geneticinu byla z kultury pravidelně izolována totální RNA, ve které byla specifickými primery (tab. 6) prokázána přítomnost či absence transkriptů genu *BirA* a genu *PAC*. Gen *BirA* a *PAC* je transkribován v infikovaných trichomonádách Tv79-49c1<sup>+</sup> PAC-BirA. V trichomonádách Tv79-49c1<sup>-</sup> G418-PFK nejsou tyto geny přítomné a nemohou být tedy transkribovány. Eliminace donorového kmene byla tedy potvrzena absencí proteinu BirA (imunoblot) a absencí transkriptů genu *BirA* a *PAC* (RT-qPCR). Během experimentu byla metodou RT-qPCR sledována přítomnost a hladina TVV1, TVV2 a TVV3 v kultuře trichomonád.

Díky tomu bylo možné zjistit, zda došlo k přenosu TVV do akceptorových buněk Tv79-49c1<sup>-</sup> G418-PFK a zda případná infekce trichomonád byla stabilní.

Oba kmeny byly nejprve společně kokultivovány 5 pasáží v médiu TYM bez antibiotik (každých 24 hodin byly trichomonády přeneseny do nového média TYM bez antibiotik). Imunoblotem bylo prokázáno, že v každé pasáži byl exprimován protein PFK i BirA (obr. 19). Oba kmeny byly tedy přítomné v kultuře po celou dobu kokultivace. Po 5. pasáži byl ke kultuře přidán geneticin, aby byl eliminován donor virů, tj. kmen Tv79-49c1<sup>+</sup> PAC-BirA. Trichomonády byly dále kultivované do 40. pasáže v médiu TYM s geneticinem (každých 24 hodin byly trichomonády přeneseny do nového média TYM s geneticinem). Imunoblotem bylo ve vybraných pasážích (tj. v pasáži 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 a 30) ověřeno, zda po přidání geneticinu již nebyly v kultuře žádné trichomonády, které exprimují protein BirA (tj. infikované trichomonády Tv79-49c1<sup>+</sup> PAC-BirA). Imunoblot prokázal, že protein BirA byl v kultuře trichomonád exprimován do 7. pasáže a v dalších pasážích již nebyl detekován (obr. 19). Nicméně imunoblot není dostatečně citlivá metoda, aby potvrdila, že v kultuře již nejsou žádné trichomonády, které exprimují protein BirA. Proto byla zvolena velmi citlivá metoda RT-qPCR, kterou bylo ve vybraných pasážích (tj. v pasáži 5, 7, 10, 15, 20, 25 a 30) ověřeno, že po přidání geneticinu vymizely z kultury trichomonády, které transkribují gen *BirA* a gen *PAC* (tj. trichomonády Tv79-49c1<sup>+</sup> PAC-BirA). Analýza křivek tání ampliconů *BirA* prokázala, že transkripty genu *BirA* byly v kultuře detekovány do 7. pasáže. V následujících pasážích (tj. v pasáži 8, 9, 10, 15, 20, 25 a 30) již přítomnost transkriptů genu *BirA* prokázána nebyla, což odpovídá výsledkům imunoblotu (obr. 20A). Analýza křivek tání ampliconů *PAC* prokázala, že transkripty genu *PAC* byly detekovány v kultuře pouze před přidáním geneticinu (tj. do 5. pasáže) (obr. 20B). Dále bylo ověřeno, jak se změnila hladina transkriptů genu *BirA* v kultuře trichomonád po přidání geneticinu. Analýzou výsledků RT-qPCR byla stanovena v kultuře trichomonád relativní genová exprese genu *BirA* před a po přidání geneticinu (tj. v 5. a 7. pasáži). Tato analýza prokázala, že v 7. pasáži byla relativní genová exprese genu *BirA* přibližně 700x nižší, než v kultuře trichomonád před přidáním geneticinu (tj. v 5. pasáži) (obr. 22A). V následujících pasážích již nebyly transkripty genu *BirA* detekovány (obr. 20A). Relativní genová exprese genu *PAC* byla stanovena pouze v 5. pasáži (obr. 22A), protože v následujících pasážích již přítomnost transkriptů genu *PAC* nebyla prokázána (obr. 20B). Výsledky RT-qPCR a imunoblotu prokázaly, že došlo k eliminaci donorového kmene Tv79-49c1<sup>+</sup> PAC-BirA po 7. pasáži kokultivace.

Cílem experimentu bylo zjistit, zda se TVV přenesl z trichomonád Tv79-49c1<sup>+</sup> PAC-BirA do trichomonád Tv79-49c1<sup>-</sup> G418-PFK. Metodou RT-qPCR (analýza křivek tání ampliconů RdRp) byla ověřena přítomnost či absence RdRp TVV1 ve vybraných pasážích (tj. v pasáži 5, 7, 10, 15, 20, 25, 30, 35 a 40). RT-qPCR prokázala, že TVV1 byl v kultuře trichomonád detekován až do 30. pasáže (obr. 21A). V následujících pasážích (tj. v pasáži 35. a 40.) již přítomnost TVV1 nebyla prokázána (obr. 21B). Dále nás zajímalo, jak se měnila hladina TVV1 v kultuře trichomonád během experimentu. Proto byla stanovena analýzou výsledků RT-qPCR relativní genová exprese RdRp TVV1 ve vybraných pasážích (tj. v pasáži 5, 7, 10, 15, 20, 25, 30, 35 a 40). Tato analýza prokázala, že po 5. pasáži kokultivace (tj. po přidání geneticinu ke kultuře) klesala relativní genová exprese RdRp TVV1 v kultuře trichomonád s každou následující pasáží (obr. 22B). V pasáži 35. a 40. již nebyl TVV1 vůbec detekován (obr. 21B).

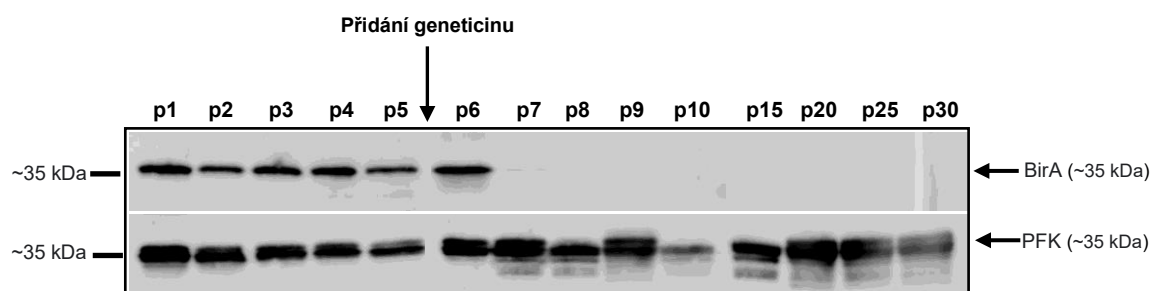
Vzhledem k tomu, že v 35. a 40. pasáži nebyla přítomnost TVV1 prokázána, nebylo nutné v těchto pasážích ověřovat přítomnost transkriptů genu *BirA* a genu *PAC*.

Dále bylo ověřeno, zda došlo k přenosu TVV2 a TVV3 z trichomonád Tv79-49c1<sup>+</sup> PAC-BirA do trichomonád Tv79-49c1<sup>-</sup> G418-PFK. Metodou RT-qPCR (analýza křivek tání ampliconů RdRp) byla ve vybraných pasážích (tj. v pasáži 5, 10 a 40) ověřena přítomnost či absence RdRp TVV2 a TVV3. RT-qPCR prokázala, že TVV2 a TVV3 byl v kultuře přítomný pouze do 5. pasáže (tj. před přidáním geneticinu) (obr. 21CD). Relativní genová exprese RdRp TVV2 a TVV3 byla určena pouze v 5. pasáži, protože v následujících pasážích již přítomnost TVV2 a TVV3 prokázána nebyla (obr. 22B).

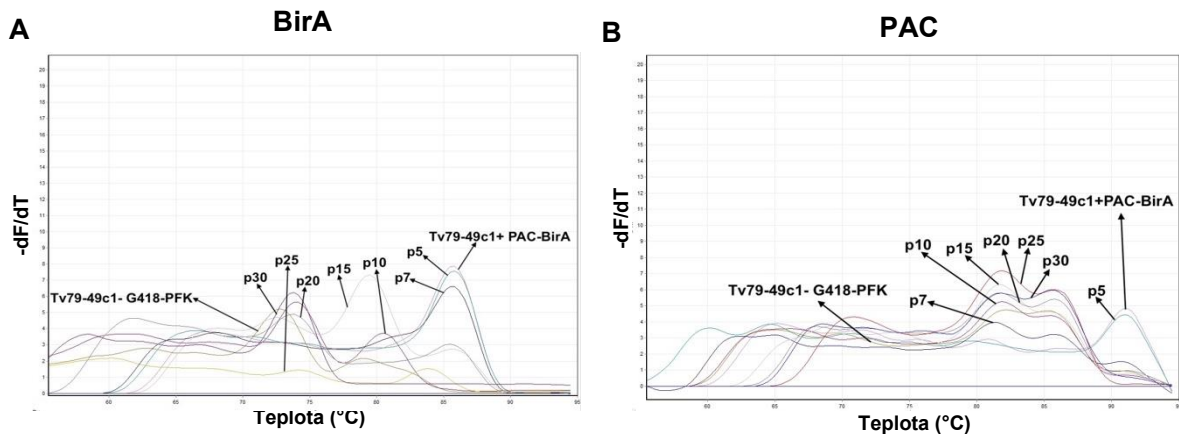
Získané výsledky prokázaly, že po přidání geneticinu byl z kultury trichomonád eliminován donor virů, tj. kmen Tv79-49c1<sup>+</sup> PAC-BirA. Po eliminaci donorového kmene byla v kultuře trichomonád stále přítomná RdRp TVV1. Došlo tedy k přenosu TVV1 z trichomonád Tv79-49c1<sup>+</sup> PAC-BirA do trichomonád Tv79-49c1<sup>-</sup> G418-PFK. Infekce trichomonád Tv79-49c1<sup>-</sup> G418-PFK však nebyla stabilní, protože relativní genová exprese RdRp TVV1 klesala s každou pasáží až virus vymizel úplně. TVV2 a TVV3 se nepřenesešly vůbec, protože RdRp TVV2 a TVV3 nebyla po přidání geneticinu v kultuře detekována. TVV2 a TVV3 byl tedy eliminován z kultury společně s kmenem Tv79-49c1<sup>+</sup> PAC-BirA.

	Primer	Sekvence primeru 5'→3'
Biotin ligáza (BirA)	BirA qForw.	TGATCGTATCGGAGAGCTTAAA
	BirA qRev.	CGCCAGAACATCGACAAATATAA
Paromycin N-acetyl Transferáza (PAC)	Puro qForw.	GTCACCGAGCTGCAAGAA
	Puro qRev.	CCGATCTCGGCGAACAC

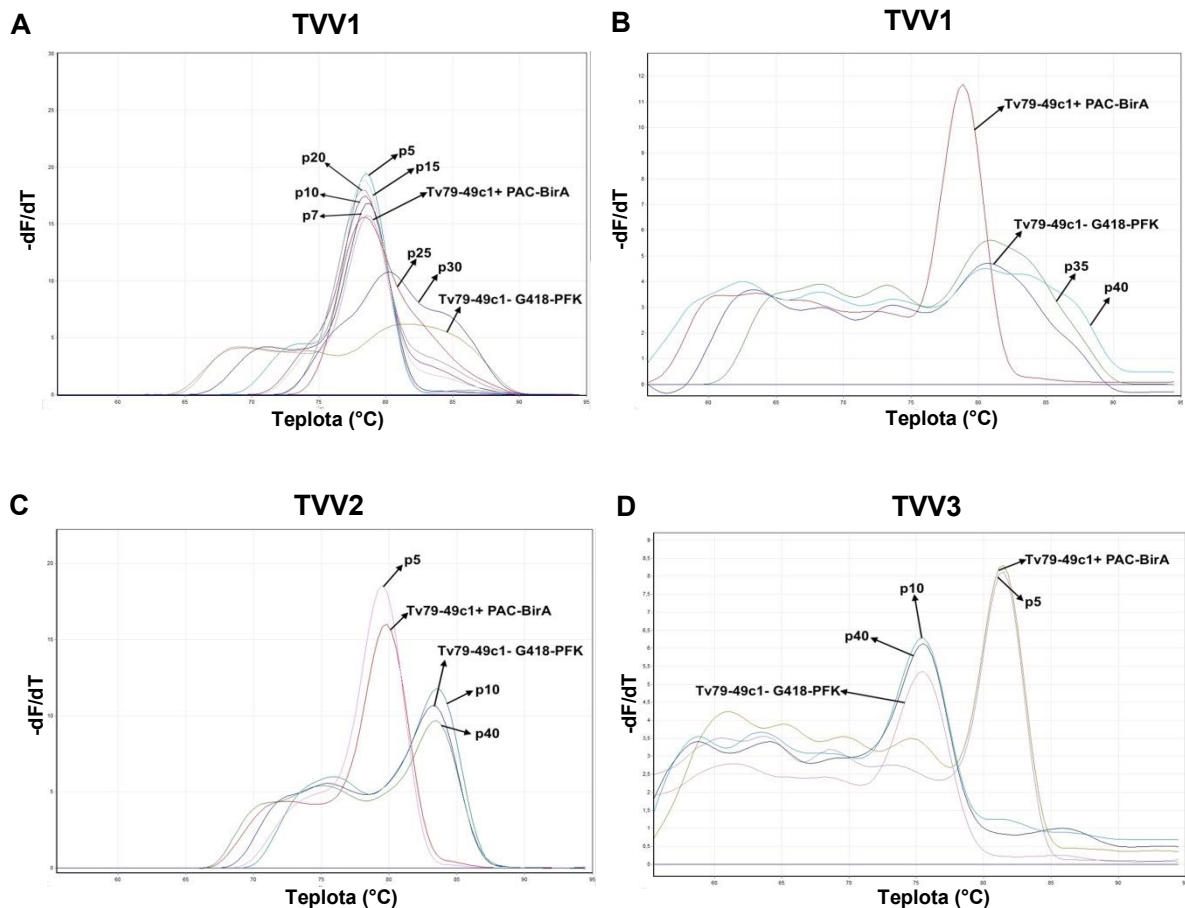
Tab. 6 Primery použité pro detekci transkriptů genu *BirA* a *PAC*.



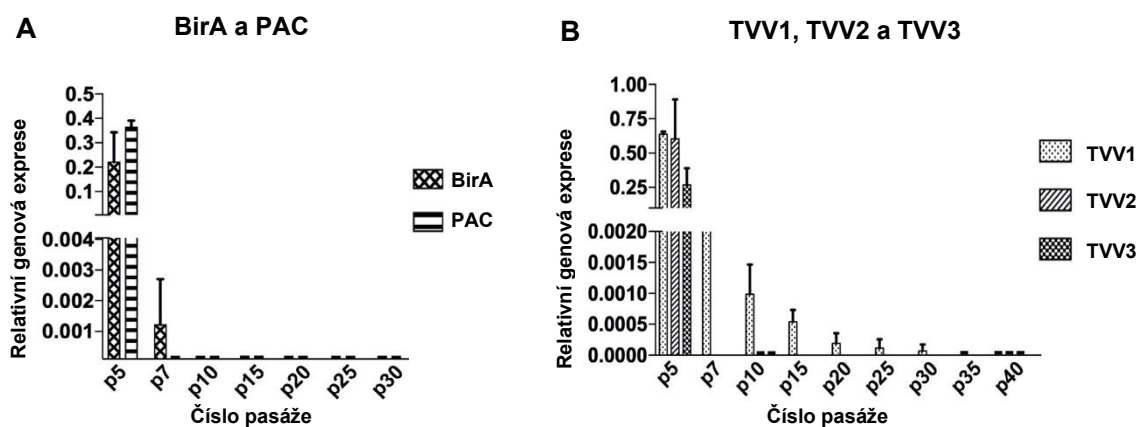
Obr. 19 Detekce rekombinantních proteinů BirA a PFK ve vybraných pasážích pomocí imunoblotu. Rekombinantní protein BirA (~35 kDa) byl detekován primární myší protilátkou proti V5 tagu a sekundární protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidázou. Rekombinantní protein PFK (~35 kDa) byl detekován primární králičí protilátkou proti HAHA tagu a sekundární protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidázou. (p1 – p30) Číslo pasáže, ve které byl detekován rekombinantní protein BirA a PFK imunoblotem.



**Obr. 20** Křivky tání amplifikovaných úseků transkriptů genu *BirA* a *PAC*. Jako pozitivní kontrola byla použita totální RNA z buněk Tv79-49c1<sup>+</sup> PAC-BirA. Jako negativní kontrola byla použita totální RNA z buněk Tv79-49c1<sup>-</sup> G418-PFK. **(A)** Příslušné sekvence cDNA byly amplifikovány pomocí primerů pro BirA (tab. 6) **(B)** Příslušné sekvence cDNA byly amplifikovány pomocí primerů pro PAC (tab. 6). **(p5-p30)** Číslo pasáže, ve které byly metodou RT-qPCR detekovány transkripty genu *BirA* a *PAC*.



**Obr. 21** Křivky tání amplikonů RdRp **TVV1**, **TVV2** a **TVV3**. Jako pozitivní kontrola byla použita totální RNA z buněk Tv79-49c1<sup>+</sup> PAC-BirA. Jako negativní kontrola byla použita totální RNA z buněk Tv79-49c1<sup>-</sup> G418-PFK. **(A)** Příslušné sekvence cDNA byly amplifikovány pomocí primerů pro TVV1 (tab.5). **(B)** Příslušné sekvence cDNA byly amplifikovány pomocí primerů pro TVV1 (tab.5). **(C)** Příslušné sekvence cDNA byly amplifikovány pomocí primerů pro TVV2 (tab.5). **(D)** Příslušné sekvence cDNA byly amplifikovány pomocí primerů, které nasedají na specifické sekvence cDNA TVV3 (tab.5). **(p5-p40)** Číslo pasáže, ve které byl metodou RT-qPCR detekován TVV1, TVV2 a TVV3.



Obr. 22 Relativní genová exprese genu *BirA*, *PAC* a RdRp TVV1, RdRp TVV2 a RdRp TVV3 ve vybraných pasážích. K určení relativní genové exprese byl použit referenční gen *DNATopII* a jako pozitivní kontrola byla použita totální RNA z buněk Tv79-49c1<sup>+</sup> PAC-BirA. (A) Relativní genová exprese genu *BirA* a *PAC* ve vybraných pasážích. (B) Relativní genová exprese RdRp TVV1, TVV2 a TVV3 ve vybraných pasážích.

#### 5.4.4 Kokultivace infikovaných trichomonád Tv79-49c1<sup>+</sup> PAC-BirA a neinfikovaných trichomonád Tv79-49c1<sup>-</sup> G418-PFK v médiu TYM bez séra

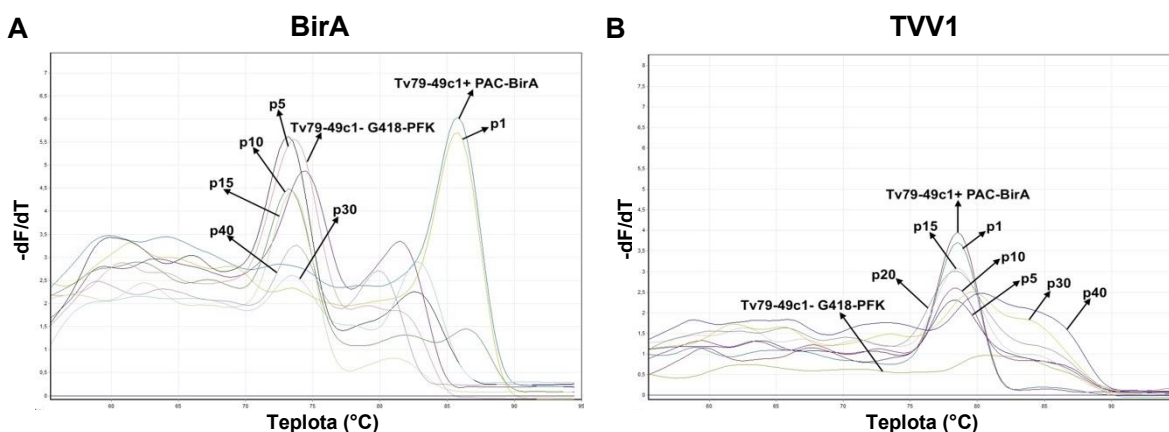
Cílem experimentu bylo zjistit, zda má koňské sérum vliv na přenos TVV mezi trichomonádami při kokultivaci infikovaných a neinfikovaných trichomonád. V předchozím experimentu byly akceptorové buňky Tv79-49c1<sup>-</sup> G418-PFK kokultivovány s donorem virů Tv79-49c1<sup>+</sup> PAC-BirA v médiu TYM s koňským sérem. Koňské sérum však obsahuje exosomy a další mikrovesikly, které by mohly narušit přenos virů pomocí extracelulárních váčků mezi buňkami trichomonád. Aby bylo možné ověřit, zda má koňské sérum v médiu TYM vliv na přenos TVV, byl donorový kmen Tv79-49c1<sup>+</sup> PAC-BirA kokultivován s akceptorovým kmenem Tv79-49c1<sup>-</sup> G418-PFK v médiu TYM bez přidaného koňského séra.

Metodou RT-qPCR (analýza křivek tání amplikonů RdRp) byla prokázána přítomnost TVV1 v donorovém kmeni Tv79-49c1<sup>+</sup> PAC-BirA, zatímco u kmene Tv79-49c1<sup>-</sup> G418-PFK přítomnost TVV1 prokázána nebyla (obr. 23B).

Oba kmene byly kokultivovány 4 hodiny v médiu TYM bez séra a bez geneticinu. V průběhu 4 hodin byl mikroskopicky kontrolován stav buněk. Po 4 hodinách bylo přidáno koňské sérum a geneticin, který eliminoval donor TVV1 Tv79-49c1<sup>+</sup> PAC-BirA. Trichomonády byly poté kultivovány 40 pasáží v médiu TYM se sérem a s geneticinem (každých 24 hodiny byly trichomonády přeneseny do nového média TYM s koňským sérem a s geneticinem). Metodou RT-qPCR bylo ve vybraných pasážích (tj. v pasáži 1, 5, 10, 15, 20, 30 a 40) ověřeno, že po přidání geneticinu vymizely z kultury trichomonády, které transkribují gen *BirA* (tj. trichomonády Tv79-49c1<sup>+</sup> PAC-BirA). Analýza křivek tání amplikonů *BirA* prokázala, že transkripty genu *BirA* byly v kultuře detekovány pouze v 1. pasáži (obr. 23A). V následujících pasážích (tj. v pasáži 8, 9, 10, 15, 20, 25 a 30) již nebyla přítomnost transkriptů genu *BirA* prokázána (obr. 23A). Relativní genová exprese genu *BirA* byla stanovena pouze v první pasáži, protože v následujících pasážích již přítomnost transkriptů genu *BirA* nebyla prokázána (obr. 24A).

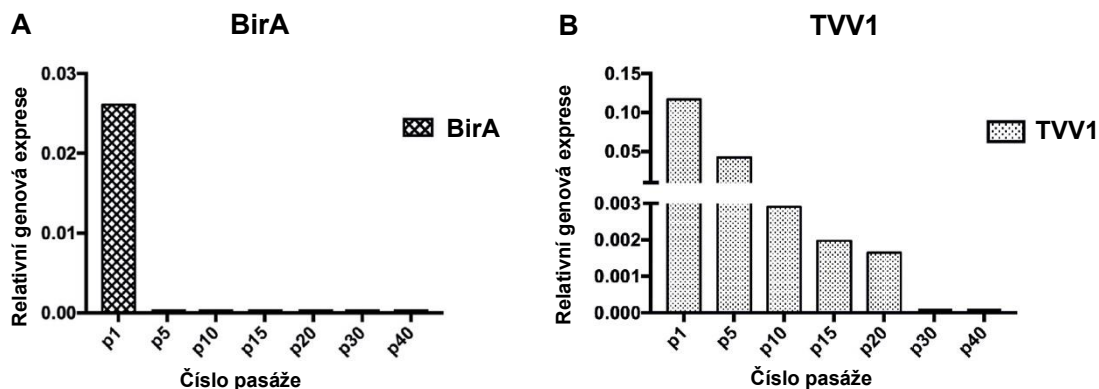
Cílem experimentu bylo zjistit, zda se TVV1 přenesl z trichomonád Tv79-49c1<sup>+</sup> PAC-BirA do trichomonád Tv79-49c1<sup>-</sup> G418-PFK. Metodou RT-qPCR (analýza křivek tání ampliconů RdRp) byla ověřena přítomnost či absence RdRp TVV1 ve vybraných pasážích (tj. v pasáži 1, 5, 10, 15, 20, 30 a 40). Tato analýza prokázala, že TVV1 byl v kultuře přítomný až do 20. pasáže (obr. 23B). Ve 30. a 40. pasáži již nebyl TVV1 detekován (obr. 23B). Dále nás zajímalo, jak se měnila hladina TVV1 v kultuře trichomonád během experimentu. Proto byla stanovena analýzou výsledků RT-qPCR relativní genová exprese RdRp TVV1 ve vybraných pasážích (tj. v pasáži 1, 5, 10, 15, 20, 30 a 40). Tato analýza prokázala, že po vymizení transkriptů genu *BirA* z kultury trichomonád, došlo k poklesu relativní genové exprese RdRp TVV1 v každé následující pasáži (obr. 24B).

Získané výsledky prokázaly, že po přidání geneticinu byl z kultury trichomonád eliminován donor virů, tj. kmen Tv79-49c1<sup>+</sup> PAC-BirA. Po eliminaci donorového kmene byla v kultuře trichomonád stále přítomná RdRp TVV1. Došlo tedy k přenosu TVV1 z trichomonád Tv79-49c1<sup>+</sup> PAC-BirA do trichomonád Tv79-49c1<sup>-</sup> G418-PFK. Infekce trichomonád Tv79-49c1<sup>-</sup> G418-PFK však nebyla stabilní, protože relativní genová exprese RdRp TVV1 klesala s každou pasáží až virus vymizel úplně. Dále bylo prokázáno, že koňské sérum má vliv na přenos TVV do buněk trichomonád. Při kokultivaci infikovaných a neinfikovaných trichomonád v médiu TYM se sérem byla v 10. pasáži (tj. 5 pasáží od přidání geneticinu) relativní genová exprese RdRp TVV1 přibližně 1000x nižší než v trichomonádách Tv79-49c1<sup>+</sup> PAC-BirA. Při kokultivaci infikovaných a neinfikovaných trichomonád v médiu TYM bez séra, byla v 5. pasáži (tj. 5 pasáží od přidání geneticinu) relativní genová exprese RdRp TVV1 přibližně 25x nižší než v trichomonádách Tv79-49c1<sup>+</sup> PAC-BirA. Při obou experimentech byl TVV1 detekován do 20. pasáže od přidání geneticinu.



**Obr. 23** Křivky tání ampliconů transkriptů genu *BirA* a *PAC*. Jako pozitivní kontrola byla použita totální RNA z buněk Tv79-49c1<sup>+</sup> PAC-BirA. Jako negativní kontrola byla použita totální RNA z buněk Tv79-49c1<sup>-</sup> G418-PFK. **(A)** Příslušné sekvence cDNA byly amplifikovány pomocí primerů pro *BirA* (tab. 6) **(B)** Příslušné sekvence cDNA byly amplifikovány pomocí primerů pro TVV1 (tab. 5). **(p5-p40)** Číslo pasáže, ve které byly metodou RT-qPCR detekovány transkripty genu *BirA* a RNA RdRp TVV1.





**Obr. 24 Relativní genová exprese genu *BirA* a RdRp TVV1 ve vybraných pasážích.** K určení relativní genové exprese byl použit referenční gen *DNATop11* a pozitivní kontrola byla použita totální RNA z buněk Tv79-49c1<sup>+</sup> BirA. **(A)** Relativní genová exprese genu *BirA* ve vybraných pasážích. **(B)** Relativní genová exprese RdRp TVV1 ve vybraných pasážích.

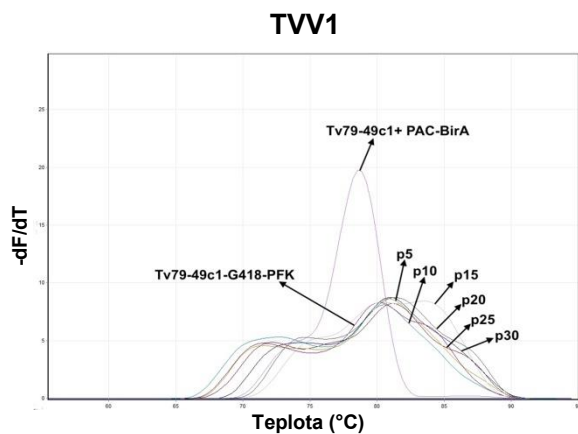
#### 5.4.5 Kokultivace infikovaných trichomonád Tv79-49c1<sup>+</sup> PAC-BirA a neinfikovaných trichomonád Tv79-49c1<sup>-</sup> G418-PFK s HaCaT buňkami v médiu GMP

Cílem experimentu bylo zjistit, zda se na přenosu TVV mezi trichomonádami mohou podílet lidské epiteliální buňky. Pro tento experiment byly jako epiteliální buňky zvoleny HaCaT buňky. HaCaT buňky jsou spontánně immortalizované lidské keratinocyty a mimo organoidů jsou tak vhodným modelem vaginálního epitelu *in vitro*.

V práci Twu et al. 2013 bylo prokázáno, že exosomy z trichomonád mohou transportovat svůj obsah do buněk epitelu. Je tedy možné, že se do epiteliálních buněk může uvolnit i TVV, který je s největší pravděpodobností uvnitř extracelulárních váčků. Při infekci trichomonádami dochází k cytolyze buněk vaginálního epitelu. Fragmenty epiteliálních buněk jsou poté fagocytovány trichomonádami (Midlej and Benchimol 2010). Pokud je tedy TVV z extracelulárních váčků do epiteliálních buněk, může být TVV fagocytován trichomonádami spolu s fragmenty epiteliálních buněk. Pro ověření této hypotézy byly epiteliální HaCaT buňky kokultivovány s infikovanými a neinfikovanými trichomonádami v médiu GMP. Donor TVV1 byl infikovaný kmen Tv79-49c1<sup>+</sup> PAC-BirA s rezistencí na puromycin a akceptor TVV1 byl kmen Tv79-49c1<sup>-</sup> G418-PFK (bez virů) s rezistencí na geneticin. Metodou RT-qPCR (analýza křivek tání amplikonů RdRp) byla prokázána přítomnost TVV1 v donorovém kmeni Tv79-49c1<sup>+</sup> PAC-BirA, zatímco u kmene Tv79-49c1<sup>-</sup> G418-PFK přítomnost TVV1 prokázána nebyla (obr. 25).

Oba kmeny trichomonád byly společně kultivované s HaCaT buňkami v médiu GMP v 5% CO<sub>2</sub> po dobu 72 hodin. Po 72 hodinách kokultivace byly trichomonády přeneseny do média TYM s agarem, koňským sérem a geneticinem, který eliminoval donor TVV1 Tv79-49c1<sup>+</sup> PAC-BirA. Trichomonády byly dále kultivovány do 30. pasáže v médiu TYM bez agaru s geneticinem (každých 24 hodin byly trichomonády přeneseny do nového média TYM s geneticinem). Cílem experimentu bylo zjistit, zda došlo k přenosu TVV1 do trichomonád Tv79-49c1<sup>-</sup> G418-PFK. Metodou RT-qPCR (analýza křivek tání amplikonů RdRp) bylo prokázáno, že RdRp TVV1 nebyla v žádné z vybraných pasážích (tj v pasáži 5, 10, 15, 20, 25 a 30) detekována (obr. 25).

Získané výsledky tedy prokázaly, že během kokultivace infikovaných trichomonád Tv79-49c1<sup>+</sup> PAC-BirA a neinfikovaných trichomonád Tv79-49c1<sup>-</sup> G418-PFK (bez virů) s buňkami HaCaT nedošlo k přenosu TVV1 do buněk Tv79-49c1<sup>-</sup> G418-PFK. V přítomnosti trichomonád došlo k destrukci HaCat buněk a nebylo tak možné ověřit, zda během kokultivace s trichomonádami došlo k přenosu TVV1 do HaCat buněk.



**Obr. 25 Křivky tání amplikonů RdRp TVV1.** Jako pozitivní kontrola byla použita totální RNA z buněk Tv79-49c1<sup>+</sup> PAC-BirA. Jako negativní kontrola byla použita totální RNA z buněk Tv79-49c1<sup>-</sup> G418-PFK. Příslušné sekvence cDNA byly amplifikovány pomocí primerů pro TVV1 (tab. 5). (p5-p30) Číslo pasáže, ve které byl metodou RT-qPCR detekována RNA RdRp TVV1.



## 6 Diskuse

Většina studovaných kmenů *Trichomonas vaginalis* je infikováno dsRNA viry, tzv. trichomonasviru (TVV). Tyto viry byly zařazeny do rodiny *Totiviridae*, do které patří i další dsRNA viry parazitických protist (*Giardiavirus* a *Leishmania RNA virus*) (Barrow et al. 2020). Genom TVV kóduje kapsidový protein a RNA-dependentní RNA polymerázu. TVV se přenáší vertikálně během buněčného dělení z mateřské buňky na dceřinou (Liu, Chu, and Tai 1998; Narayanasamy et al. 2021). Zatím nebyl prokázán horizontální přenos TVV, a ačkoliv jsou trichomonády schopné endocytovat izolovaný TVV (Benchimol et al. 2002), tak touto cestou nedochází k infekci buněk (Wang and Wang 1986).

Částice TVV jsou uvolňovány z infikovaných trichomonád uvnitř malých extracelulárních váčků – exozomů (Rada et al. 2022). Díky těmto váčkům mohou trichomonády komunikovat mezi sebou a modulovat imunitní odpověď hostitele (Twu et al. 2013). Cílem této diplomové práce bylo zjistit, zda se TVV může přenášet mezi buňkami trichomonád pomocí těchto extracelulárních váčků.

Prvním úkolem mé diplomové práce bylo otestovat vybrané kmene trichomonád na přítomnost TVV. Buňky *T. vaginalis* mohou být infikované čtyřmi různými druhy TVV (TVV1, TVV2, TVV3 a TVV4) (Goodman et al. 2011). Trichomonády mohou být infikovány jedním či více druhy TVV najednou. Nejčastěji se u trichomonád vyskytuje TVV1 a nejméně pak TVV4 (Jehee et al. 2017; Margarita et al. 2019). Celkem bylo v této práci otestováno pět vybraných kmenů *T. vaginalis*: Tv79-49, TvC1, TvJH-31A, TvT1 a Tv17-48. Metodou RT-PCR byla ve vybraných kmenech prokázána přítomnost či absence RNA-dependentní RNA polymerázy (RdRp) TVV1-4. Touto metodou bylo prokázáno, že kmen Tv79-49 je infikován TVV1, TVV2 a TVV3. TvC1 je infikován TVV2 a TVV3. Kmeny TvJH-31A a TvT1 jsou infikovány pouze TVV1 a kmen Tv17-48 žádné TVV neobsahuje. Získané výsledky byly porovnány s prací Hampl et al. 2001. Hampl et al. 2001 prokázali přítomnost TVV u kmenů Tv79-49 a TvC1 a u kmene Tv17-48 přítomnost TVV neprokázali, což odpovídá výsledkům této diplomové práce. Neprokázali však přítomnost TVV u kmene TvJH-31A, zatímco v této diplomové práci byl v buňkách kmene TvJH-31A detekován TVV1. Rozporné výsledky mohly být způsobeny rozdílnými metodami, které byly použity pro detekci TVV v trichomonádách. V práci Hampl et al. 2001 izolovali z trichomonád nukleové kyseliny, které byly rozděleny podle velikosti pomocí elektroforézy v 1% agarózovém gelu. Přítomnost TVV byla prokázána specifickým bandem, který odpovídal velikosti genomu viru. Zatímco v této diplomové práci byla k detekci TVV v trichomonádách použita velmi citlivá metoda RT-PCR.

Viry z rodiny *Totiviridae*, které infikují parazitické prvoky využívají různé strategie k opuštění hostitelské buňky. Buňky *Giardia intestinalis* infikované *Giardiavirem* uvolňují samotné viriony do kultivačního média, aniž by došlo k narušení buněk parazita (Wang and Wang 1986). U giardií zatím nebyla prokázána jiná cesta, kterou by mohl *Giardiavirus* opustit infikované buňky. *Leishmania RNA virus 1* (LRV1) infikuje parazitické prvoky rod *Leishmania*. V práci Atayde et al. 2019 prokázali, že LRV1 se uvolňuje z infikovaných parazitů uvnitř exozomů. LRV1 byl také detekován mimo exozomy. Je tedy možné, že infikované leishmanie uvolňují do okolí samotné částice LRV1. Tento rok bylo prokázáno, že stejně jako LRV1 se také TVV uvolňuje z infikovaných trichomonád uvnitř exozomů (Rada et al. 2022).

Tomu odpovídají výsledky této diplomové práce. Kapsidový protein TVV3 byl detekován ve frakci extracelulárních váčků. Kapsidový protein TVV3 nebyl detekován v médiu, ve kterém byly trichomonády inkubovány.

V práci Rada et al. 2022 detekovali TVV i mimo extracelulární váčky. Virus se však mohl nespecificky uvolnit z umírajících a stresovaných trichomonád během izolace extracelulárních váčků. Nelze však vyloučit, že infikované trichomonády mohou vylučovat samotné částice TVV do svého okolí.

Již dříve bylo prokázáno, že některé viry mohou infikovat další buňky hostitele pomocí extracelulárních váčků. Uvnitř extracelulárních váčků z infikovaných buněk se může nacházet replikačně kompetentní virová RNA či dokonce celé viriony. Díky exozomům se mezi buňkami hostitele může šířit například virus hepatitidy C. Buňky infikované tímto virem vylučují exozomy, které obsahují virovou RNA a jsou tak schopné infikovat další buňky hostitele virem hepatitidy C (Longatti, Boyd, and Chisari 2015). Dalším příkladem viru, který k přenosu využívá extracelulární váčky je virus reprodukčního a respiračního syndromu prasat (PRRSV). Z buněk infikovaných tímto virem jsou vylučovány exozomy, které obsahují virovou RNA a tyto váčky tak mohou infikovat naivní buňky tímto virem (Wang et al. 2018). Buňky infikované viry mohou vylučovat pomocí extracelulárních váčků i viriony. Exozomy s viriony vylučují například buňky infikované lidským polyomavirem 2. Viriony se nachází uvnitř exozomů anebo jsou připojené na vnější straně membrány váčku. Bylo prokázáno, že tyto exozomy jsou schopné infikovat další buňky lidským polyomavirem 2 (Morris-Love et. al. 2019).

Zajímalo nás tedy, zda se i *Trichomonasvirus* může přenášet mezi trichomonádami pomocí extracelulárních váčků. Pro ověření této hypotézy byly společně kokultivované neinfikované trichomonády s infikovanými, tj. s donorem extracelulárních váčků s TVV. Jako donor extracelulárních váčků s TVV byl vybrán kmen trichomonád, který je infikován TVV1, TVV2 a TVV3. Aby se zvýšila pravděpodobnost přenosu TVV, tak jako akceptor virů byl vybrán izogenní kmen, který byl vyléčený od virů 2'-C-methyl-cytidinem (Narayanasamy et al. 2021). Aby bylo možné odlišit izogenní kmene během kokultivace, tak infikované trichomonády byly transformovány plasmidem s vloženým genem pro expresi biotin ligázy (*BirA*) a s genem pro rezistenci na puromycin (*PAC*). Trichomonády bez virů byly transformované plasmidem s vloženým genem pro expresi fosfofruktokinázy (*PFK*) a genem pro rezistenci na geneticin (*G418*). Uvnitř extracelulárních váčků z infikovaných trichomonád byl detekován kapsidový protein TVV1 a TVV3. Ve váčcích byla také prokázána přítomnost RNA RNA-dependenční RNA polymerázy (*RdRp*) TVV1, TVV2 a TVV3. Tím bylo prokázáno, že se uvnitř extracelulárních váčků z infikovaných trichomonád nachází TVV1-3. Přítomnost kapsidových proteinů a RNA *RdRp* TVV v extracelulárních váčcích z infikovaných trichomonád byla také prokázána v práci Rada et al. 2022. Infikované a neinfikované trichomonády byly nejprve společně kokultivovány v médiu se sérem a poté byl přidán geneticin, aby byl eliminován infikovaný kmen trichomonád. Po přidání geneticinu vymizely z kultury trichomonád transkripty genu *PAC* a *BirA*. Spolu s transkripty *BirA* a *PAC* vymizel z kultury trichomonád i TVV2 a TVV3. Vymizení transkriptů *BirA* a *PAC* spolu s TVV2 a TVV3 z kultury trichomonád prokazuje, že skutečně došlo k eliminaci infikovaného kmene trichomonád.

TVV1 byl v kultuře trichomonád detekován 20 dní po přidání geneticinu. Došlo tedy k přenosu TVV1 do akceptorového kmene trichomonád. Infekce trichomonád však nebyla stabilní, protože hladina TVV1 postupně klesala s každým dnem až došlo k úplnému vymizení viru. Podobné výsledky byly pozorovány při kokultivaci leishmanií infikovaných LRV1 a neinfikovaných leishmanií. Po odstranění leishmanií s viry byl detekován LRV1 v buňkách leishmanií, které byly původně bez virů. Stejně jako v případě TVV1 docházelo během experimentu k poklesu hladiny LRV1 a během dvou týdnů virus z kultury leishmanií vymizel úplně (Atayde et al. 2019).

Jak již bylo zmíněno, tak kokultivace infikovaných a neinfikovaných trichomonád probíhala v médiu se sérem. Zvířecí séra jsou běžně používána v laboratořích ke kultivaci organismů *in vitro*. Sérum však obsahuje extracelulární váčky, které mohou zabránit přenosu TVV (Aswad, Jalabert, and Rome 2016). Proto bylo ověřeno, zda má přítomnost séra v médiu vliv na přenos TVV1 mezi trichomonádami. Infikované a neinfikované trichomonády byly nejprve kokultivovány v médiu bez séra a poté bylo do média přidáno sérum a geneticin, který eliminoval infikovaný kmen z kultury trichomonád. TVV1 byl detekován v kultuře trichomonád 20 dní od přidání geneticinu, což odpovídá experimentu, kdy byly infikované a neinfikované trichomonády kokultivovány v médiu se sérem. Hladina TVV1 však byla při kokultivaci trichomonád v médiu bez séra významně vyšší než při kokultivaci v médiu se sérem. Infekce trichomonád TVV1 ani v tomto případě však nebyla stabilní.

Aby bylo možné zjistit, zda je přenos TVV skutečně zprostředkovan extracelulárními váčky, tak byly extracelulární váčky z infikovaných trichomonád přidány k neinfikovaným trichomonádám. Trichomonády byly koinkubovány s extracelulárními váčky po dobu 5 dní. Již po 24 hodinách koinkubace nebyl v kultuře trichomonád detekován TVV2 ani TVV3. TVV1 vymizel z kultury trichomonád druhý den experimentu. Je možné, že došlo k přenosu TVV1 do akceptorových buněk, ale přenesené množství TVV1 bylo velmi nízké. Přenosu TVV také mohlo zabránit sérum, které bylo přidáno do kultivačního média. Pro ověření této hypotézy byly neinfikované trichomonády koinkubovány s extracelulárními váčky v médiu bez séra. Poté bylo do média přidáno sérum. TVV1 byl detekován v kultuře trichomonád až do 5. dne experimentu. Extracelulární váčky tedy přenesly TVV1 do trichomonád. Infekce trichomonád však nebyla stabilní, protože hladina TVV1 postupně klesala a 5. den již nebyl TVV1 v kultuře trichomonád detekován.

Extracelulární váčky tedy mohou přenášet TVV1 mezi buňkami trichomonád. Nedochozí však ke stabilní infekci buněk *T. vaginalis*. Podobné výsledky byly také pozorovány v případě LRV1. Extracelulární váčky z infikovaných leishmanií obsahují LRV1 a jsou schopné infikovat další leishmanie. Bylo prokázáno, že touto cestou nedochází ke stabilní infekci leishmanií a virus vymizí z leishmanií během dvou týdnů (Atayde et al. 2019). Neschopnost extracelulárních váček stabilně infikovat trichomonády TVV by mohla být způsobena tím, že se uvnitř váček může nacházet nekompletní nebo degradovaný genom viru. V této diplomové práci se podařilo metodou RT-qPCR detekovat v extracelulárních váčkách úsek RNA RdRp o délce 132 nukleotidů. Genom nativního viru obsahuje RNA RdRp o přibližné délce 2270 nukleotidů. V práci Rada et al. 2022 detekovali uvnitř extracelulárních váček fragmenty genomu TVV, což by mohlo znamenat, že extracelulární váčky skutečně obsahují degradovaný genom TVV.

Z extracelulárních váčků se však podařila amplifikovat velká část virového genomu (o velikosti 2000 bp). Nelze tedy vyloučit, že extracelulární váčky obsahují kompletní genom TVV (Rada et al. 2022).

Ve výše zmíněných experimentech extracelulární váčky přenesly pouze TVV1, zatímco TVV2 a TVV3 se nepřenesly vůbec. To může být způsobeno tím, že extracelulární váčky obsahují vyšší hladinu TVV1 oproti TVV2 a TVV3. Tomu odpovídají i výsledky práce Narayanasamy et al. 2021, kde bylo prokázáno, že TVV1 má nejvyšší virovou zátěž v infikovaných trichomonádách oproti TVV2 a TVV3.

Již dříve se Wang and Wang 1986 pokoušeli infikovat trichomonády TVV. Trichomonády bez virů koikubovali s purifikovanými částicemi TVV. Po inkubaci trichomonád s purifikovanými viry se však nepodařilo detekovat virovou dsRNA v trichomonádách. Zdá se tedy, že extracelulární váčky jsou důležité pro transport TVV do dalších trichomonád.

Na rozdíl od TVV, izolovaný *Giardiavirus* je schopný stabilně infikovat buňky *Giardia intestinalis*. *Giardiavirus* je více termorezistentní a jeho schopný transkripce při vyšším pH než *Trichomonasvirus* (Janssen et al. 2015). *Giardiavirus* je tedy v extracelulárním prostředí stabilnější a díky tomu je pravděpodobně schopný stabilně infikovat další buňky *G. intestinalis*.

Posledním experimentem této diplomové práce bylo ověřit, zda se na přenosu TVV mohou podílet buňky epitelu. Již dříve bylo prokázáno, že extracelulární váčky mohou transportovat svůj obsah do lidských epitelálních buněk (Twu et al. 2013). Je tedy možné, že se do buněk epitelu může dostat z extracelulárních váčků i TVV. Při infekci trichomonádami dochází k cytolýze buněk epitelu a fragmenty těchto buněk jsou fagocytovány trichomonádami (Midlej and Benchimol 2010). Pokud je tedy TVV uvolněn z extracelulárních váčků do epitelálních buněk, může být TVV fagocytován trichomonádami spolu s fragmenty epitelálních buněk. Pro ověření této hypotézy byly infikované a neinfikované trichomonády kokultivovány společně s HaCaT buňkami (spontánně immortalizované lidské keratinocyty). Během této kokultivace však nedošlo k přenosu TVV do neinfikovaných trichomonád. V přítomnosti trichomonád došlo k destrukci HaCaT buněk a nebylo tak možné ověřit, zda během kokultivace došlo k přenosu TVV do buněk epitelu.

## 7 Závěr

Hlavním cílem této diplomové práce bylo zjistit, zda se extracelulární váčky mohou podílet na přenosu *Trichomonasvirů* mezi buňkami *T. vaginalis*.

Jako donor virů byl vybrán kmen *T. vaginalis*, který je infikovaný TVV1, TVV2 a TVV3. V extracelulárních váčkách z tohoto kmene byl detekován kapsidový protein TVV1 a TVV3 a také RNA RNA-dependentní RNA polymerázy TVV1, TVV2 a TVV3. Tím bylo prokázáno, že extracelulární váčky z infikovaných trichomonád obsahují TVV. Jako akceptor virů byl vybrán izogenní kmen, který byl vyléčený od virů. Při společné kokultivaci akceptoru a donoru virů došlo k přenosu TVV1 do buněk trichomonád. TVV2 a TVV3 se nepřenesl vůbec. Aby bylo možné zjistit, zda je přenos TVV skutečně zprostředkován extracelulárními váčky, tak byly extracelulární váčky s TVV přidány k neinfikovaným trichomonádám. Během koinkubace neinfikovaných trichomonád s extracelulárními váčky došlo k přenosu TVV1. Nedošlo však k přenosu TVV2 a TVV3. Infekce trichomonád ani v tomto případě nebyla stabilní a došlo k vymizení TVV1 z trichomonád.

Výsledky této diplomové práce tedy prokázaly, že extracelulární váčky mohou přenášet TVV1 mezi buňkami *T. vaginalis*. Touto cestou však nedochází ke stabilní infekci trichomonád. Není tedy zatím jasné, zda a jak může TVV infikovat další buňky *T. vaginalis*.

## 8 Seznam použitých zkratek

Alix	<u>AL</u> G-2- <u>i</u> nteractiong protein <u>X</u>
ARF6	<u>A</u> DP- <u>r</u> ibosylation factor <u>6</u>
BspA	<u>b</u> acteroides <u>s</u> urface protein <u>A</u>
CP	<u>c</u> ysteine protease
dsRNA	<u>d</u> ouble- <u>s</u> tranded <u>R</u> NA
ESCRT	<u>e</u> ndosomal <u>s</u> orting <u>c</u> omplex <u>r</u> equired for <u>t</u> ransport
GP63	<u>g</u> lycoprotein <u>63</u>
Hsp	<u>h</u> eat <u>s</u> hock protein
IFN- $\beta$	<u>I</u> nter <u>f</u> er <u>o</u> n- $\beta$
IgA	<u>i</u> munoglobulin <u>A</u>
IL	<u>i</u> nter <u>l</u> eukin
ILV	<u>i</u> nter <u>l</u> uminal <u>v</u> esicles
LPG	<u>l</u> ypophosphoglycan
LRV1	<u>L</u> eishmania <u>R</u> NA <u>v</u> irus <u>1</u>
LVs	<u>l</u> arge <u>v</u> esicles
MHC-II	<u>m</u> ajor <u>h</u> istocompatibility <u>c</u> omplex- <u>I</u> I
MIP3- $\alpha$	<u>m</u> acophage <u>i</u> nflammatory protein <u>3</u> $\alpha$
miRNA	<u>m</u> icro <u>R</u> NA
mRNA	<u>m</u> essenger <u>R</u> NA
MVB	<u>m</u> ulti <u>v</u> esicular <u>b</u> ody
NF- $\kappa$ B	<u>n</u> uclear <u>f</u> actor <u><math>\kappa</math></u> <u>B</u>
ORF	<u>o</u> pen <u>r</u> eading <u>f</u> rame
PFP	<u>p</u> ore <u>f</u> orming proteins
Pmp	<u>p</u> olymorphic <u>m</u> embrane protein
RANTES	<u>r</u> egulated upon <u>a</u> ctivation, <u>n</u> ormal <u>T</u> -cell <u>e</u> xpressed and <u>s</u> ecreted
RdRp	<u>R</u> NA- <u>d</u> eependent <u>R</u> NA polymerase
SNARE	<u>s</u> nap <u>r</u> eceptor
TLR-3	<u>t</u> oll- <u>l</u> ike <u>r</u> eceptor <u>3</u>
TNF- $\alpha$	<u>t</u> umor <u>n</u> ecrosis <u>f</u> actor $\alpha$
Tsg101	<u>t</u> umor <u>s</u> usceptibility gene <u>101</u>
tsRNA	<u>t</u> RNA-derived <u>s</u> mall <u>R</u> NA
TVV	<i>Trichomonasvirus</i>
UTR	<u>u</u> ntranslated <u>r</u> egion
Vps	<u>v</u> acuolar protein <u>s</u> orting

## 9 Literatura

- Addis, M. F., Rappelli, P., Fiori, P. L. (2000). Host and tissue specificity of *Trichomonas vaginalis* is not mediated by its known adhesion proteins. *Infect. Immun.* 66, 4358-4360.
- Alano, P. (2007). *Plasmodium falciparum* gametocytes: still many secrets of a hidden life. *Mol. Microbiol.* 66, 291–302.
- Alderete, J. F. (1999). Iron modulates phenotypic variation and phosphorylation of P270 in double-stranded RNA virus-infected *Trichomonas vaginalis*. *Infect. Immun.* 67, 4298-4302.
- Alvarez-Sánchez, M. E., Avila-González, L., Becerril-García, C., Fattel-Facenda L. V., Ortega-López, J., Arroyo, R. (2000). A novel cystein proteinase (CP65) of *Trichomonas vaginalis* involved in cytotoxicity. *Microb. Pathog.* 28, 193–202.
- Alvarez-Sánchez, M. E., Carvajal-Gamez, B. I., Solano-González, E., Martínez-Benitez, M., Gracia, A. F., Alderete, J. F., Arroyo, R. (2008). Polyamine depletion down-regulates expression of the *Trichomonas vaginalis* cytotoxic CP65, a 65-kDa cysteine proteinase involved in cellular damage. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 2442–2451.
- Andreu, Z., Yáñez-Mó, M. (2014). Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. *Front. Immunol.* 5, 1–13.
- Anh Ton Nu, P., Rappelli P., Dessí, D., Nguyen, V. Q. H., Fiori, P. L. (2015). Kinetics of circulating antibody response to *Trichomonas vaginalis*: clinical and diagnostic implications. *Sex. Transm. Infect.* 0, 1–3.
- Arroyo, R., Gárdenas-Guerra, R. E., Figueria-Angulo, E. E., Puente-Rivera, J., Zamudio-Prieto, O., Ortega-López, J. (2015). *Trichomonas vaginalis* cysteine proteinases: Iron response in gene expression and proteolytic activity. *BioMed Res. Int.* 2015, 946787.
- Aswad, H., Jalabert A., Rome, S. (2016). Depleting extracellular vesicles from fetal bovine serum alters proliferation and differentiation of skeletal muscle cells *in vitro*. *BMC Biotechnol.* 16, 32.
- Atayde, V. D., da Silva Lira Filho, A., Chaparro, V., Zimmermann, A., Martel, C., Jaramillo, M., Olivier, M. (2019) Exploitation of the *Leishmania* exosomal pathway by *Leishmania* RNA virus 1. *Nat. Microbiol.* 4, 714–723.
- Bache, K. G., Raiborg, C., Mehlum, A., Stenmark, H. (2003) STAM and Hrs Are subunits of a multivalent ubiquitin-binding complex on early endosomes. *J. Biol. Chem.* 278, 12513–12521.

- Barrow, P., Dujardin, J. C., Fasel, N., Greenwood A. D., Osterrieder, K., Lomonosoff, G., Fiori, P. L., Atterbury, R., Rossi, M., Lalle, M. (2020). Viruses of protozoan parasites and viral therapy: Is the time now right? *Viol. J.* 17, 142.
- Bastida-Corcuera, F. D., Okumura, Ch. Y., Colocoussi, A., Johnson, P. J. (2005). *Trichomonas vaginalis* lipophosphoglycan mutants have reduced adherence and cytotoxicity to human ectocervical cells. *Eukaryot. Cell* 4, 1951–1958.
- Benchimol, M. (1999). Hydrogenosome autophagy: An ultrastructural and cytochemical study. *Biol. Cell* 91, 165–174.
- Benchimol, M., de Andrade Rosa, I., da Silva Fontes, R., Burla Dias, Â. J. (2008). *Trichomonas* adhere and phagocytose sperm cells: adhesion seems to be a prominent stage during interaction. *J. Parasitol. Res.* 102, 597–604.
- Benchimol, M., Monteiro, S. P., Cahng T. H., Alderete, J. F. (2002) Virus in *Trichomonas* – an ultrastructural study. *Parasitol. Int.* 51,293–98.
- Beri, D., Yadav, P., Devi, H. R. N., Narayana, C., Gadara, D., Tatu, U. (2020). Demonstration and characterization of cyst-like structures in the life cycle of *Trichomonas vaginalis*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 9, 1–15.
- Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. bacteriol.* 62, 293–300.
- Bissig, Ch., Gruenberg, J. (2014). ALIX and the multivesicular endosome: ALIX in Wonderland. *Trends Cell Biol.* 24, 19–25.
- Boukamp, P., Petrussevska, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., Fusenig, N. E. (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.* 106, 761–771.
- Buschow, S. I., Nolte-’t Hoen E. N. M., van Niel, G., Pols, M. S., ten Broeke, T., Lauwen, M., Ossendorp, F., Melief, J. M., Raposo, G., Wubbolts, R., Wauben, M. H. M., Stoorvogel, W. (2009). MHC II in dendritic cells is targeted to lysosomes or T cell-induced exosomes via distinct multivesicular body pathways. *Traffic.* 10, 1528–1542.
- Cárdenas-Guerra, R. E., Arroyo, R., Rosa de Andrade I., Benchimol, M., Ortega-López, J. (2013). The iron-induced cysteine proteinase TvCP4 plays a key role in *Trichomonas vaginalis* haemolysis. *Microbes Infect.* 15, 958–968.
- Cerkasov, J., Cerkasovova, A., Kulda, J., Vilhelmova D. (1978). Respiration of hydrogenosomes of *Trichomonas foetus*. I. ADP-dependent oxidation of malate and pyruvate. *J. Biol. Chem.* 253, 1207–1214.



- Cestari, I., Ansa-Addo, E., Deolindo, P., Inal, J. M., Ramirez, M. I. (2012). *Trypanosoma cruzi* immune evasion mediated by host cell-derived microvesicles. *J. Immunol.* 188, 1942–1952.
- Diamond, L. S. (1957). The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. *J. Parasitol.* 43,488.
- Doran, D. J. (1959). Studies on trichomonads. III. inhibitors, acid production, and substrate utilization by 4 strains of *Tritrichomonas foetus*. *J. Parasitol.* 6, 177–182.
- Doyle, L. M., Wang, M. Z. (2019). Overview of extracellular vesicles, their origin, composition, purpose, and methods for exosome isolation and analysis. *Cells* 8:727.
- Engbring, J. A., Alderete, J. F. (1998). Three genes encode distinct AP33 proteins involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. *Mol. Microbiol.* 28, 305–313.
- Escola, J. M., Kleijmeer, M. J., Stoorvogel, W., Griffith, J. M. (1998). Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 273, 20121–20127.
- Esser, J., Gehrmann, U., D’Alexandri, F. L., Hidalgo-Estévez, A. M., Wheelock, C. E., Scheynius, A., Gbrielsson, S., Radmark, O. (2010). Exosomes from human macrophages and dendritic cells contain enzymes for leukotriene biosynthesis and promote granulocyte migration. *J. Allergy Clin. Immunol.* 126, 1032-1040.
- Evans-Osses, I., Mojoli, A., Monguió-Tortajada, M., Marcilla, A., Aran, V., Amorim, M., Inal, J., Borràs, F. E., Ramirez, M. I. (2017). Microvesicles released from *Giardia intestinalis* disturb host-pathogen response *in vitro*. *Eur. J. Cell Biol.* 96, 131–142.
- Feng, D., Zhao, W., Xe, Y., Bai, X., Liu, R., Chang, L., Zhou, Q., Sui, S. (2010). Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis. *Traffic* 11, 675–687.
- Fichorova, R. N., Trifonova, R. T., Gilbert, R. O., Costello, E. C., Hayes, G. R., Lucas, J. J., Singh, B. N. (2006). *Trichomonas vaginalis* lipophosphoglycan triggers a selective upregulation of cytokines by human female reproductive tract epithelial cells. *Infect. Immun.* 74, 5773–5779.
- Fichorova, R. N. (2009). Impact of *T. vaginalis* infection on innate immune responses and reproductive outcome. *J. Reprod. Immunol.* 83, 185–189.
- Fichorova, R. N., Lee, Y., Yamamoto, H. S., Takagi, Y., Hayes, G. R., Goodman, R. P., Cephalotrea, X., Buck, O. R., Murray, R., Kula, T., Beach, D. H., Singh, B. N., Nibert, M. L. (2012). Endobiont viruses sensed by the human host – beyond conventional antiparasitic therapy. *PLoS One* 7:e48418.

- Fichorova, R. N., Yamamoto, H. S., Fashemi, T., Foley, E., Ryan, S., Beatty, N., Dawood, H., Hayes G. R., St-Pierre, G., Sato, S., Singh, B. (2016). *Trichomonas vaginalis* lipophosphoglycan exploits binding to galectin-1 and -3 to modulate epithelial immunity. *J. Biol. Chem.* 291, 998–1013.
- Flegr, J., Cerkasov, J., Kulda, J., Tachezy, J., Stokrová, J. (1987). The dsRNA of *Trichomonas vaginalis* is associated with virus-like particles and does Not correlate with metornidazole resistance. *Folia Microbiol.* 32, 345-348.
- Fraga, J., Rojas, L., Sarioego, I., Fernández-Calienes, A., Nuñez, F. A. (2012). Species typing of cuban *Trichomonas vaginalis* virus by RT-PCR, and association of TVV-2 with high parasite adhesion levels and high pathogenicity in patients. *Arch. Virol.* 157, 1789–1795.
- Fraga, J., Rojas, L., Sarioego, I., and Fernández-Calienes, A. (2005). Double-stranded RNA viral infection in cuban *Trichomonas vaginalis* isolates. *Braz. J. Infect. Dis.* 9, 521-524.
- Frühbeis, C., Fröhlich, D., Kuo, W. P., Amphornrat, J., Thilemann, S., Saab, A. S., Kirchhoff, F., Möbius, W., Goebbels, S., Nave, K., Schneider, A., Simons, M., Klugmann, M., Trotter, J., Krämer-Albers, E. (2013). Neurotransmitter-triggered transfer of exosomes mediates oligodendrocyte-neuron communication. *PLoS Biol.* 11:e1001604.
- Gao, Y., Li, X., Zhang, N., Zhao, P., Li, S., Tai, L., Li, X., Li, L., Li, J., Zhang, X., Sun, M., Cao, L., Gong, O. (2021). *Trichomonas vaginalis* induces extracellular trap release in mouse neutrophils *in vitro*. *Acta biochim. Biophys. Sin.* 53, 1736–1738.
- Garcia, A. F., Alderete, J. F. (2007). Characterization of the *Trichomonas vaginalis* surface-associated AP65 and binding domain interacting with trichomonads and host cells. *BMC Microbiol.* 7:116.
- Goodman, R. P., Freret, T. S., Kula, T., Geller, A. M., Talkington, M. W. T., Tang-Fernandez, V., Suci, O., Demidenko, A. A., Ghabrial, S. A., Beach, D. H., Singh, B. N., Fichorova, R. N., Nibert, M. L. (2011). Clinical isolates of *Trichomonas vaginalis* concurrently infected by strains of up to four *Trichomonasvirus* species (family *Totiviridae*). *J. Virol.* 85, 4258–4270.
- Gould, S. B., Woehle, Ch., Kusdian, G., Landan, G., Tachezy, J., Zimorski, V., Martin, W. F. (2013). Deep sequencing of *Trichomonas vaginalis* during the early infection of vaginal epithelial cells and amoeboid transition. *Int. J. Parasitol.* 43, 707–719.
- Graves, K. J., Ghosh, A. P., Schmidt, N., Augustini, P., Secor W. E., Schwebke, J. R., Martin, D. H., Kissinger, P. J., Muzny, Ch. A. (2019). *Trichomonas vaginalis* virus among women with trichomoniasis and associations with demographics, clinical outcomes, and metronidazole resistance. *Clin. Infect. Dis.* 69, 2170–2176.
- Guo, Min et al. 2020. “Microglial Exosomes Facilitate A-Synuclein Transmission in Parkinson’s Disease.” *Brain* 143(5): 1476–97.

- Gurung, S., Perocheau, D., Touramanidou, L., Baruteau, J. (2021). The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling. *Cell Commun. Signal* 19:47.
- Hampl, V., Vaňáčová, Š., Kulda, J., Flegr, J. (2001). Concordance between genetic relatedness and phenotypic similarities of *Trichomonas vaginalis* strains. *BMC Evol. Biol.* 1:11.
- Handrich, M. R., Garg, S. G., Sommerville, E. W., Hirt, R. P., Gould, S. B. (2019). Characterization of the BspA and Pmp protein family of trichomonads. *Parasit. Vectors* 12:406.
- Hanson, P. I., Roth, R., Lin, Y., Heuser, J. E. (2008). Plasma membrane deformation by circular arrays of ESCRT-III protein filaments. *J. Cell Biol.* 180, 389–402.
- Haraszti, R. A., Didiot, M., Sapp, E., Leszyk, J., Shaffer, S. A., Rockwell, H. E., Gao, F., Narain, N. R., DiFiglia, M., Kiebish, M. A., Aronin, N., Khvorova, A. (2016). High-resolution proteomic and lipidomic analysis of exosomes and microvesicles from different cell sources. *J. Extracell. Vesicles* 5:32570
- Harding, C., Heuser, J., Stahl, P. (1983). Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J. cell biol.* 97, 329–339.
- He, D., Pengtao, G., Ju, Y., Jianhua, L., He, L., Guocai, Z., Xichen, Z. (2017). Differential protein expressions in virus-infected and uninfected *Trichomonas vaginalis*. *Korean J. Parasitol.* 55, 121–128.
- Henne, W. M., Buchkovich, N. J., Emr, S. D. (2011). The ESCRT Pathway. *Dev. Cell* 21,77–91.
- Hernández, H., Sariago, I., Garber, G., Delgado, R., López, O., Sarracent, J. (2004). Monoclonal antibodies against a 62 KDa proteinase of *Trichomonas vaginalis* decrease parasite cytoadherence to epithelial cells and confer protection in mice. *Parasite Immunol.* 26, 119-125.
- Hirt, R. P., de Miguel, N., Nakjang, S., Dessi, D., Liu, Y., Diaz, N., Rappelli, P., Acosta-Serrano, A., Fiori, P. L., Mottram, J. C. (2011). *Trichomonas vaginalis* pathobiology new insights from the genome sequence. *Adv. Parasitol.* 77, 87-140.
- Honiberg, B. M., King, V. M. (1964). Structure of *Trichomonas vaginalis* Donné. *J. parasitol.* 50, 345–364.
- Huotari, J., Helenius, A. (2011). Endosome maturation. *EMBO J.* 30, 3481–3500.
- Irion, U., St Johnston, D. (2007). Bicoid RNA localization requires specific binding of an endosomal sorting complex. *Nature* 445, 554–558.

- Janssen, M. E. W., Takagi, Y., Parent, K. N., Cardone, G., Nibert, M. L., Baker, T. S. (2015). Three-dimensional structure of a protozoal double-stranded RNA virus that infects the enteric pathogen *Giardia lamblia*. *J. Virol.* 89, 1182–1194.
- Jehee, I., van der Veer, Ch., Himschoot, M., Hermans, M., Bruisten, S. (2017). Direct detection of *Trichomonas vaginalis* virus in *Trichomonas vaginalis* positive clinical samples from the Netherlands. *J. Virol. Methods* 250, 1–5.
- Johnstone, R. M., Adam, M., Hammond, J. R., Orr, L., Turbide, C. (1987). Vesicle formation during reticulocyte maturation. association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J. Biol. Chem.* 262, 9412–9420.
- Katzmann, D. J., Babst, M., 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, 145–155.
- Khoshnan, A., Alderete, J. F. (1994). *Trichomonas vaginalis* with a double-stranded RNA virus has upregulated levels of phenotypically variable immunogen mRNA. *J. Virol.* 68, 4035–4038.
- Kim, M. J., Jung, B., Cho, J., Song, H., Pyo, K., Lee, J. M., Kim, M., Chai, J. (2016). Exosomes secreted by *Toxoplasma gondii*-infected L6 cells: Their effects on host cell proliferation and cell cycle changes. *Korean J. Parasitol.* 54, 147–154.
- Kummer, S., Hayes, G. R., Gilbert, R. O., Beach, D. H., Lucas, J. J., Singh, B. N. (2008). Induction of human host cell apoptosis by *Trichomonas vaginalis* cysteine proteases is modulated by parasite exposure to iron.” *Microb. Pathog.* 44, 197–203.
- Lal, K., Noel, Ch. J., Field, M. C., Goulding, D., Hirt, R. P. (2006). Dramatic reorganisation of trichomonas endomembranes during amoebal transformation: a possible role for G-Proteins. *Mol. Biochem. Parasitol.* 148, 99–102.
- Lehker, M. W., Chang, T. H., Dailey, D. C., Alderete, J. F. (1990). Specific erythrocyte binding is an additional nutrient acquisition for *Trichomonas vaginalis*. *J. Exp. Med.* 171, 2165-2170.
- Lin, Y. L., Liu, C. C., Chuang, J. I., Lei, H. Y., Yeh, T. M., Lin, Y. S., Huang, Y. H., Liu, H. S. (2000). Involvement of oxidative stress, NF-IL-6, and RANTES expression in Dengue-2-virus-infected human liver cells. *Virology* 276, 114–26.
- Lindmark, D. G., Muller, M. (1973). Hydrogenosome, a cytoplasmic organelle of the anaerobic flagellate *Tritrichomonas foetus*, and its role in pyruvate metabolism. *J. Biol. Chem.* 248, 7724–7728.
- Lindmark, D. G., Müller, M., Shio, H. (1975). Hydrogenosomes in *Trichomonas vaginalis*. *J. Parasitol.* 61, 552-554

- Liu, H. W., Chu, Y. D., Tai, J. H. (1998). Characterization of *Trichomonas vaginalis* virus proteins in the pathogenic protozoan *T. vaginalis*. *Arch. Virol.* 143, 963–970.
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* 25,402–408.
- Longatti, A., Boyd, B., Chisari, F. V. (2015). Virion-independent transfer of replication-competent hepatitis C virus RNA between permissive cells. *J. Virol.* 89, 2956–2961.
- Ma, L., Meng, Q., Cheng, W., Sung, Y., Tang, P., Hu, S., Yu, J. (2011). Involvement of the GP63 protease in infection of *Trichomonas vaginalis*. *Parasitol. Res.* 109, 71–79.
- Malla, N., Kaul, P., Sehgal, R., Gupta, I. (2011). The Presence of dsRNA virus in *Trichomonas vaginalis* isolates from symptomatic and asymptomatic indian women and its correlation with *in vitro* metronidazole sensitivity. *Indian J. Med. Microbiol.* 29, 152–57.
- Mallegol, J., Van Niel, G., Lebreton, C., Lepelletier Y., Candalh, C., Dugave, Ch., Heath, J. K., Raposo, G., Cerf-Bensussan, N., Heyman, M. (2007). T84-intestinal epithelial exosomes bear MHC class II/peptide complexes potentiating antigen presentation by dendritic cells. *Gastroenterology* 132, 1866–1876.
- Manny, A. R., Hetzel, C. A., Mizani, A., Nibert, M. L. (2022). Discovery of a novel species of *Trichomonasvirus* in the human parasite *Trichomonas vaginalis* using transcriptome mining. *Viruses* 14:548.
- Mantel, P. Y., Hoang, A. N., Goldowitz, I., Potashnikova, D., Hamza, B., Vorobjev, I., Ghiran, I., Toner, M., Irimia, D., Ivanov, A. R., Barteneva, N., Marti, M. (2013). Malaria-infected erythrocyte-derived microvesicles mediate cellular communication within the parasite population and with the host immune system. *Cell Host Microbe* 13, 521–534.
- Margarita, V., Marongiu, A., Diaz, N., Dessì, D., Fiori, P. L., Rappelli, P. (2019). Prevalence of double-stranded RNA virus in *Trichomonas vaginalis* isolated in Italy and association with the symbiont *Mycoplasma hominis*.” *Parasitol. Res.* 118, 3565–3570.
- Masha, S. Ch., Cools, P., Crucitti, T., Sandres, E. J., Vaneechoutte, M. (2017). Molecular typing of *Trichomonas vaginalis* isolates by actin gene sequence analysis and carriage of *T. vaginalis* viruses. *Parasit. Vectors* 10:537.
- Masha, S. Ch., Cools, P., Sandres, E. J., Vaneechoutte, M., Crucitti, T. (2019). *Trichomonas vaginalis* and HIV infection acquisition: a systematic review and meta-analysis. *Sex. Transm. Infect.* 95, 36–42.
- Mears, R., Craven, R. A., Hanrahan, S., Totty, N., Upton, C., Young, S. L., Patel, P., Selby, P. J., Banks, R. E. (2004). Proteomic analysis of melanoma-derived exosomes by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 4, 4019–4031.

- Melchjorsen, J., Paludan, S. R. (2003). Induction of RANTES/CCL5 by herpes simplex virus is regulated by nuclear factor kB and interferon regulatory factor 3. *J. Gen. Virol.* 84, 2491–95.
- Mendoza-Lopez, M. R., Becerril-Garcia, C., Fattel-Facenda, L. V., Avila-Gonzalez, L., Ruíz-Tachiquín, M. E., Ortega-Lopez, J., Arroyo, R. (2000). CP30, a cysteine proteinase involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. *Infect. Immun.* 68, 4907–4912.
- Mercer, F., Ng, S. H., Brown, T. M., Boatman, G., Johnson, P. J. (2018). Neutrophils kill the parasite *Trichomonas vaginalis* using trogocytosis. *PLoS Biol.* 16:e2003885.
- Meza-Cervantez, P., González-Robles, A., Cárdenas-Guerra, R. E., Ortega-López, J., Saavedra, E., Pineda, E., Arroyo, R. (2011). Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase (PFO) is a surface-associated cell-binding protein in *Trichomonas vaginalis* and is involved in trichomonal adherence to host cells. *Microbiology* 157, 3469–3482.
- Midlej, V., Benchimol, M. (2010). *Trichomonas vaginalis* kills and eats – evidence for phagocytic activity as a cytopathic effect. *Parasitology* 137, 65–76.
- de Miguel, N., Lustig, G., Twu, O., Chattopadhyay, A., Wohlschlegel, J. A., Johnson, P. J. (2010). Proteome analysis of the surface of *Trichomonas vaginalis* reveals novel proteins and strain-dependent differential expression. *Mol. Cell. Proteomics* 9, 1554–1566.
- Mittelbrunn, M., Vicente-Manzanares, M., Sánchez-Madrid, F. (2015). Organizing polarized delivery of exosomes at synapses. *Traffic* 16, 327–337.
- Morris, D. R., Bounds, S. E., Liu, H., Ding, W., Chen, Y., Liu, Y., Cai, J. (2020). Exosomal miRNA transfer between retinal microglia and RPE. *Int. J. Mol. Sci.* 21:3541.
- Morris-Love J., Gee G. V., O’Hara B. A., Assetta B., Atkinson A. L., Dugan A. S., Haley S. A., Atwood W. J. (2019). JC Polyomavirus uses extracellular vesicles to infect target cells. 10:e00379-19.
- Munich, S., Sobo-Vujanovic, A., Buchser, W. J., Beer-Stolz, D., Vujanovic, N. L. (2012). Dendritic cell exosomes directly kill tumor cells and activate natural killer cells via TNF superfamily ligands. *OncoImmunology* 1, 1074–1083.
- Muralidharan-Chari, V., Clancy, J., Plou, C., Romao, M., Chavrier, P., Raposo, G., D’Souza-Schorey, C. (2009). ARF6-regulated shedding of tumor cell-derived plasma membrane microvesicles. *Curr. Biol.* 19, 1875–1885.
- Murray, H. W., Lu, Ch. M., Mauze, S., Freeman, S., Moreira, A. L., Kaplan, G., Coffman, R. L. (2002). Interleukin-10 (IL-10) in experimental visceral leishmaniasis and IL-10 receptor blockade as immunotherapy. *Infect. Immun.* 70, 6284–6293.
- Nagesha, C. N., Rama N. K. (1998). Clinical and microbiological aspects of vaginitis. *Indian j. med. Sci.* 52, 526–532.

- Nanbo, A., Kawanishi, E., Yoshida, R., Yoshiyama, H. (2013). Exosomes derived from Epstein-Barr virus-infected cells are internalized via caveola-dependent endocytosis and promote phenotypic modulation in target cells. *J. Virol.* 87, 10334–10347.
- Narayanasamy, R. K., Rada, P., Zdrha, A., van Ranst, M., Neyts, J., Tachezy, J. (2021). Cytidine nucleoside analog is an effective antiviral drug against *Trichomonasvirus*. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 55, 191-198.
- van Niel, G., D'Angelo, G., Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 213–228.
- 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., de Miguel, N. (2017). Membrane-shed vesicles from the parasite *Trichomonas vaginalis*: characterization and their association with cell interaction. *Cell. Mol. Life Sci.* 75, 2211–2226.
- Noël, Ch. J., Diaz, N., Sicheritz-Ponten, T., Safarikova, L., Tachezy, J., Tang, P., Fiori, P. L., Hirt, R. P. (2010). *Trichomonas vaginalis* vast BspA-like gene family: evidence for functional diversity from structural organisation and transcriptomics. *BMC Genomics* 11:99
- Nolte-’t Hoen, E. N., Buschow, S. I., Anderton, S. M., Stoorvogel, W., Wauben, M. H. M. (2009). Activated T cells recruit exosomes secreted by dendritic cells via LFA-1. *Blood* 113, 1977–1982.
- Okumura, Ch. Y. M., Baum, L. G., Johnson, P. J. (2008). Galectin-1 on cervical epithelial cells is a receptor for the sexually transmitted human parasite *Trichomonas vaginalis*. *Cell Microbiol.* 10, 2078–2090.
- Olmos-Ortiz, L. M., Barajas-Mendiola, M. A., Barrios-Rodiles, M., Cestellano, L. E., Arias-Negrete, S., Avila, E. E., Cuéllar-Mata, P. (2017). *Trichomonas vaginalis* exosome-like vesicles modify the cytokine profile and reduce inflammation in parasite-infected mice. *Parasite Immunol.* 39:e12426.
- Pan, B. T., Johnstone, R. M. (1983). Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes *in vitro*: selective externalization of the receptor. *Cell* 33, 967–978.
- Parent, K. N., Cardone, Y. T. G., Olson, N. H., Ericsson, M., Yang, M., Lee, Y., Asara, J. M., Fichorova, R. N., Baker, T. S., Nibert, M. L. (2013). Structure of a protozoan virus from the human genitourinary parasite *Trichomonas vaginalis*. *mBio.* 4:e00056-13.
- Pereira-Neves, A., Benchimol, M. (2007). Phagocytosis by *Trichomonas vaginalis*: new insights. *Biol. Cell* 99, 87–101.
- Pindak, F. F., Gardner, W. A., de Pindak, M. M. (1986). Growth and cytopathogenicity of *Trichomonas vaginalis* in tissue cultures. *J. Clin. Microbiol.* 23, 672–678.

- Prada, I., Meldolesi, J. (2016). Binding and fusion of extracellular vesicles to the plasma membrane of their cell targets. *Int. J. Mol. Sci.* 17:1296.
- Provenzano, D., Alderete, J. F. (1995). Analysis of human immunoglobulin-degrading cysteine proteinases of *Trichomonas vaginalis*. *Infect. Immun.* 63, 3388–3395.
- Provenzano, D., Khoshnan, A., Alderete, J. F. (1997). Involvement of dsRNA virus in the protein composition and growth kinetics of host *Trichomonas vaginalis*. *Arch. Virol.* 142, 939–952.
- Rada, P., Makki, A. R., Zimorski, V., Garg, S., Hampl, V., Hrdý, I., Gould, S. B., Tachezy, J. (2015). N-Terminal presequence-independent import of phosphofructokinase into hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis*. *Eukaryot. Cell* 14, 264–275.
- Rada, P., Hrdý, I., Zdrha, A., Narayanasamy, R. K., Smutná, T., Horáčková, J., Harant, K., Beneš, V., Ong, S. C., Tsai, C. Y., Luo, H. W., Chiu, C. H., Tang, P., Tachezy, J. (2022). Double-stranded RNA viruses are released from *Trichomonas vaginalis* inside small extracellular vesicles and modulate the exosomal cargo. *Front. Microbiol.* 4; 13:893692.
- Rada, P., Kellerová, P., Verner, Z., Tachezy, J. (2019). Investigation of the secretory pathway in *Trichomonas vaginalis* argues against a moonlighting function of hydrogenosomal enzymes. *J. Eukaryot. Microbiol.* 66, 899–910.
- Rai, A. K., Johnson, P. J. (2019). *Trichomonas vaginalis* extracellular vesicles are internalized by host cells using proteoglycans and caveolin-dependent endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 116, 21354–21360.
- Ramón-Luing, L. A., Rendón-Gandarilla, F. J., Puente-Rivera, J., Ávila-González, L., Arroyo, R. (2011). Identification and characterization of the immunogenic cytotoxic TvCP39 proteinase gene of *Trichomonas vaginalis*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43, 1500–1511.
- Record, M., Carayon, K., Poirot, M., Silvente-Poirot, S. (2014). Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiological processes. *Biochim. Biophys. Acta* 1841, 108–20.
- 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., Cowman, A. F. (2013). Resource cell-cell communication between malaria-infected red blood cells via exosome-like vesicles. *Cell.* 153, 1120-1130.
- Rendón-Gandarilla, F. J., Ramón-Luing, L. D. L. A., Ortega-López, J., Rosa de Anderade, I., Benchimol, M., Arroyo, R. (2013). The TvLEGU-1, a legumain-like cysteine proteinase, plays a key role in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. *BioMed Res. Int.* 2013:561979.



- Rendón-Maldonado, J. G., Espinosa-Cantellano, M., González-Robles, A., Martínez-Palomo, A. (1998). *Trichomonas vaginalis*: *In vitro* Phagocytosis of lactobacilli, vaginal epithelial cells, leukocytes, and erythrocytes. *Exp. Parasitol.* 89, 241-250.
- Rivera, J., Cordero, R. J. B., Nakouzi, A. S., Frases, S., Nicola, A., Casadevall, A. (2010). *Bacillus anthracis* produces membrane-derived vesicles containing biologically active toxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 19002-19007.
- dos Santos, O., de Vargas Rigo, G., Fasson, A. P., Macedo, A. J., Tasca, T. (2015) Optimal reference genes for gene expression normalization in *Trichomonas vaginalis*. *PLoS one* 10:e0138331.
- Seki, M., Arashiki, N., Takakuwa, Y., Nitta, K., Nakamura, F. (2020). Reduction in flippase activity contributes to surface presentation of phosphatidylserine in human senescent erythrocytes. *J. Cell. Mol. Med.* 24, 13991–14000.
- Shao M. F., Lin P. R., Liu J. Y., Tang K. D. (1994). Monocyte-derived interleukin-8 involved in the recruitment of neutrophils induced by *Trichomonas vaginalis* infection. *J. Infect. Dis.* 170, 1638–1640.
- Sharma, M., Morgado, P., Zhang, H., Ehrenkauf, G., Manna, D., Singh, U. (2020). Characterization of extracellular vesicles from *Entamoeba histolytica* identifies roles in intercellular communication that regulates parasite growth and development. *Infect. Immun.* 88:e00349-20.
- Shurtleff, M. J., Temoche-Diaz, M. M., Karfilis, K. V., Ri, S., Schekman, R. (2016). Y-box protein 1 is required to sort microRNAs into exosomes in cells and in a cell-free reaction. *ELife* 5:e19276.
- Silver, B. J., Guy, R. J., Kaldor, J. M., Jamil, M. S., Rumbold, A. R. (2014). *Trichomonas vaginalis* as a cause of perinatal morbidity: a systematic review and meta-analysis. *Sex. Trans. Dis.* 41, 369–376.
- Silverman, J. M., Clos, J., de'Oliveira, C. C., Shirvani, O., Fang, Y., Wang, Ch., Foster, L. J., Reiner, N. E. (2010). An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from *Leishmania* and communication with macrophages. *J. Cell Sci.* 123, 842–852.
- 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., Reiner, N. E. (2010). *Leishmania* exosomes modulate innate and adaptive immune responses through effects on monocytes and dendritic cells. *J. Immunol.* 158, 5011–5022.
- Skotland, T., Sagini, K., Sandvig, K. Llorente, A. (2020). An emerging focus on lipids in extracellular vesicles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 159, 308–321.

- Snipes, L. J., Gamard, P. M., Narcisi, E. M., Beard, C. B., Lehmann, T., Secor, W. E. (2000). Molecular epidemiology of metronidazole resistance in a population of *Trichomonas vaginalis* clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* 38, 3004–3009.
- Štáfková, J., Rada, P., Meloni, D., Žárský, V., Smutná, T., Zimmann, N., Harant, K., Pompach, P., Hrdý, I., Tachezy, J. (2018). Dynamic secretome of *Trichomonas vaginalis*: case study of  $\beta$ -amylases. *Mol. Cell. Proteomics* 17, 304–320.
- Stevens, A., Muratore, K., Cui, Y., Johnson, P. J., Zhou, Z. H. (2021). Atomic structure of the *Trichomonas vaginalis* double-stranded RNA virus 2. *mBio* 12:e02924-20.
- Subra, C., Grand, D., Laulagnier, K., Stella, A., Lambeau, G., Paillasse, M., De Medina, P., Monsarrat, B., Perret, B., Silvente-Poirot, S., Poirot, M., Record, M. (2010). Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins. *J. Lipid Res.* 51, 2105–2120.
- Sutcliffe, S., Neace, C., Magnuson, N. S., Reeves, R., Alderete, J. F. (2012) Trichomonosis, a common curable STI, and prostate carcinogenesis—a proposed molecular mechanism.” *PLoS Pathog.* 8:e1002801.
- Sutton, M., Sternberg, M., Koumans, E. H., McQuillan, G., Berman, S., Markowitz, L. (2007). The prevalence of *Trichomonas vaginalis* infection among reproductive-age women in the united states, 2001-2004. *Clin. Infect. Dis.* 45, 1319–1326.
- Svensson, K. J., Christianson, H. C., Wittrup, A., Bourseau-Guilmain, E., Lindqvist, E., Svensson, L. M., Mörgelin, M., Belting, M. (2013). Exosome uptake depends on ERK1/2-heat shock protein 27 signaling and lipid raft-mediated endocytosis negatively regulated by caveolin-1. *J. Biol. Chem.* 288, 17713–17724.
- Teo, H., Gill, D. J., Sun, J., Perisic, O., Veprintsev, D. B., Vallis, Y., Emr, S. D., Williams, R. L. (2006). ESCRT-I core and ESCRT-II GLUE domain structures reveal role for GLUE in linking to ESCRT-I and membranes. *Cell* 125, 99–111.
- Thakur, B. K., Zhang, H., Becker, A., Matei, I., Huang, Y., Costa-Silva, B., Zheng, Y., Hosino, A., Brazier, H., Xiang, J., Williams, C., Rodriguez-Barrueco, R., Silva, J. M., Zhang, W., Hearn, S., Elemento, O., Paknejad, N., Manova-Todorova, K., Welte, K., Bromberg, J., Peinado, H., Lyden, D. (2014). Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. *Cell Res.* 24, 766–769.
- Tian, T., Wang, Y., Wang, H., Zhu, Z., Xiao, Z. (2010). Visualizing of the cellular uptake and intracellular trafficking of exosomes by live-cell microscopy. *J. Cell. Biochem.* 111, 488–496.
- Tian, T., Zhu, Y. L., Zhou, Y. Y., Liang, G. F., Wang, Y. Y., Hu, F. H., Xiao, Z. D. (2014). Exosome uptake through clathrin-mediated endocytosis and macropinocytosis and mediating miR-21 delivery. *J. Biol. Chem.* 289, 22258–22267.

- Trajkovic, K., Hsu, Ch., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Schwille, P., Brügger, B., Simons, M. (2008). Supporting online material for: ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* 319, 1244–1247.
- Turner, G. D., Morrison, H., Jones, M., Davis, T. M., Looareesuwan, S., Buley, I. D., Gatter, K. C., Newbold, C. I., Pukritayakamee, S., Nagachinta, B., White, N. J., Berendt, A. R. (1994). An immunohistochemical study of the pathology of fatal malaria: evidence for widespread endothelial activation and a potential role for intercellular adhesion molecule-1 in cerebral sequestration. *Am. J. Pathol.* 145, 1057–1069.
- Twu, O, de Miguel, N., Lustig, G., Stevens, G. C., Vashisht, A. A., Wohlschegel, J. A., Johnson, P. J. (2013). *Trichomonas vaginalis* exosomes deliver cargo to host cells and mediate host:parasite interactions. *PLoS Pathog.* 9:e1003482.
- Vakhshiteh, F., Atyabi, F., Ostad, S. N. (2019). Mesenchymal stem cell exosomes: A two-edged sword in cancer therapy. *Int. J. Nanomedicine* 14, 2847–2859.
- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J., Lötvall, J. O. (2007). Exosome-mediated Transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. cell biol.* 9, 654–659.
- Villarroya-Beltri, C., Gutiérrez-Vázquez, C., Sánchez-Cabo, F., Pérez-Hernández, D., Vázquez, J., Martín-Cofreces, N., Martínez-Herrera, D. J., Pascual-Montano, A., Mittelbrunn, M., Sánchez-Madrid, F. (2013). Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat. Commun.* 4:2980.
- Wang, A. L., Wang, C. C. (1986). The double-stranded RNA in *Trichomonas vaginalis* may originate from virus-like particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 7956–7960.
- Wang, A. L., Wang, C. C. (1986). Discovery of a specific double-stranded RNA virus in *Giardia lamblia*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 21, 269–276.
- Wang, T., Fang, L., Zhao, F., Wang, D., Xiao, S. (2018). Exosomes mediate intercellular transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Virol.* 92:e01734-17.
- Weber, B., Mapeka, T. M., Maahlo, M. A., Hoosen, A. A. (2003). Double stranded RNA virus in South African *Trichomonas vaginalis* isolates. *J. Clin. Pathol.* 56, 542–543.
- Wendel, K. A., Rompalo, A. M., Erbeling, E. J., Chang, T. H., Alderete, J. F. (2002). Double-stranded RNA viral infection of *Trichomonas vaginalis* infecting patients attending a sexually transmitted diseases clinic. *J. Infect. Dis.* 186, 558–561.
- Wollert, T., Wunder, C., Lippincott-Schwartz, J., Hurley, J. H. (2009). Membrane scission by the ESCRT-III complex. *Nature* 458, 172–177.

- Wølner-Hanssen, P., Krieger, J. N., Stevens, C. E., Kiviat, N. B., Koutsky, L., Critchlow, C., DeRouen, T., Hillier, S., Holmes, K. K. (1989). Clinical manifestations of vaginal trichomoniasis. *JAMA*. 261, 571–576.
- World Health Organization (WHO) (2018). *Report on Global Sexually Transmitted Infection Surveillance*. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241565691>.
- Yadav, M., Gupta, I., Malla, N. (2005). Kinetics of immunoglobulin G, M, A and IgG subclass responses in experimental intravaginal trichomoniasis: prominence of IgG1 response. *Parasite Immunol.* 27, 461-467.
- Yadav, M., Dubey, M. L., Gupta, I., Bhatti, G., Malla, N. (2007). Cysteine proteinase 30 in clinical isolates of *T. vaginalis* from symptomatic and asymptomatic infected women. *Exp. Parasitol.* 116, 399–406.
- Yang, S., Zhao, W., Wang, H., Wang, Y., Li, J., Wu, X. (2018). *Trichomonas vaginalis* infection-associated risk of cervical cancer: A meta-analysis. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 228, 166–173.
- Yue, Y., Huang, S., Wu, Z., Wang, K., Li, H., Hou, J., Huang, X., Luo, L., Liu, Q., Wu, Z. (2020). Characterization of mRNA profiles of exosomes from diverse forms of M2 macrophages. *BioMed Res. Int.* 2020:1585306.
- Zimmann, N., Rada, P., Žárský, V., Smutná, T., Záhonová, K., Dacks, J., Harant, K., Hrdý, I., Tachezy, J. (2022). Proteomic analysis of *Trichomonas vaginalis* phagolysosome, lysosomal targeting, and unconventional secretion of cysteine peptidases. *Mol. Cell. Proteomics* 21:100174.