POLITECHNIKA WARSZAWSKA

DYSCYPLINA NAUKOWA BIOTECHNOLOGIA DZIEDZINA NAUK ŚCISŁYCH I PRZYRODNICZYCH

Rozprawa doktorska

mgr inż. Patrycja Daria Kowalska

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe mikroorganizmów niepatogennych – charakterystyka oraz wpływ na komórki ludzkie

Promotor dr hab. Jolanta Mierzejewska, prof. uczelni

> **Promotor pomocniczy** dr Małgorzata Milner-Krawczyk

WARSZAWA 2025

Z wielką wdzięcznością dedykuję tę pracę trzem niezwykłym kobietom: **Mamie, Siostrze** oraz **Babci**.

Dziękuję Wam z całego serca za to, że zawsze wierzyłyście we mnie, nawet wtedy, gdy ja wątpiłam. Ta praca jest równie Waszym sukcesem, jak moim.

Przede wszystkim chciałabym wyrazić głęboką wdzięczność moim Promotorkom,

Pani dr hab., prof. uczelni Jolancie Mierzejewskiej

oraz Pani dr Małgorzacie Milner-Krawczyk

za wsparcie i cenne uwagi podczas przygotowywania pracy doktorskiej oraz nieoceniony wpływ na kształtowanie mnie jako naukowca.

Swoje podziękowania pragnę skierować również do **Pani dr inż. Anny Sobiepanek**, bez której wsparcia, przyjaźni i dyskusji naukowych, dawno bym się poddała.

Dziękuję także osobom, z którymi miałam przyjemność współpracować podczas pracy nad rozprawą, a w szczególności: pracownikom Katedry Biotechnologii Środków Leczniczych i Kosmetyków (Wydział Chemiczny Politechniki Warszawskiej), dr hab. Katarzynie Bocian (Zakład Immunologii, Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego), dr inż. Rafałowi Kopiasz (Katedra Chemii i Technologii Polimerów, Wydział Chemiczny Politechniki Warszawskiej / Centre national de la recherche scientifique (CNRS), Université Paris-Saclay we Francji), dr inż. Karolinie Drężek (Katedra Biotechnologii Środków Leczniczych i Kosmetyków, Wydział Chemiczny Politechniki Warszawskiej), dr Ewie Sitkiewicz (Środowiskowe Laboratorium Spektrometrii Mas, Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk), mgr Magdalenie Świadek (Pracownia Mikroskopii Elektronowej, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego Polskiej Akademii Nauk), dr inż. Agacie Goluchowskiej (Pracowni Molekularnych Podstaw Starzenia, Elektronowej, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego Polskiej Akademii Nauk), dr inż. Maciejowi Trzaskowskiemu (Dział Diagnostyki Medycznej, Centrum Zaawansowanych Materiałów i Technologii CEZAMAT Politechniki Warszawskiej), a także mgr inż. Marcie Rogalskiej oraz mgr inż. Aleksandrowi Gryciuk.

Na koniec, pragnę wyrazić swoją wdzięczność mojej **Rodzinie** i **Przyjaciołom**, którzy zawsze byli obok mnie, dodając mi otuchy i radości. Dziękuję Wam za zrozumienie, cierpliwość i wsparcie, które były dla mnie nieocenione przez ostatnie cztery lata.

Wyniki umieszczone w niniejszej pracy zostały uzyskane przy wsparciu finansowym w ramach grantów: OPUS 25 – "Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe drożdży probiotycznych jako nośniki biologicznie aktywnych molekuł przekazywanych do komórek ludzkich w przewodzie pokarmowym." (2024-01-03 - 2027-01-02; Narodowe Centrum Nauki; 2023/49/B/NZ9/03663; kierownik: dr hab., prof. uczelni Jolanta Mierzejewska), **BIOTECHMED-2** Advanced _ "Pecherzyki zewnątrzkomórkowe drożdży probiotycznych jako nośniki biologicznie aktywnych substancji" finansowane w ramach (2021-01-01 2023-03-31; Projekty projektu _ "Inicjatywa Doskonałości - Uczelnia Badawcza"; kierownik: dr hab., prof. uczelni Jolanta Mierzejewska) oraz MINIATURA-5 – "Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe Janthinobacterium lividum jako nośniki wiolaceiny - substancji o udowodnionym działaniu terapeutycznym" (2021-12-15 - 2022-12-14; Narodowe Centrum Nauki; 2021/05/X/NZ1/01372; kierownik: dr Małgorzata Milner-Krawczyk).

STRESZCZENIE

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (ang. *extracellular vesicles*, EVs) wydzielane są przez wszystkie rodzaje żywych komórek w tym także przez mikroorganizmy. Te nanometryczne struktury są bardzo bogate w wiele związków, które mogą wpływać na komórki ssacze, w tym ludzkie. W niniejszej pracy doktorskiej skoncentrowano się na pęcherzykach produkowanych przez drożdże probiotyczne *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* i *Kluyveromyces marxianus* a także bakterie *Janthinobacterium lividum*, które wytwarzają wiolaceinę.

Przetestowano różne metody izolacji EVs z płynnych hodowli mikroorganizmów, spośród których wybrano ultrafiltrację, a także określono wydajność produkcji EVs przez badane mikroorganizmy. Następnie, przeprowadzono porównanie metod analizy wielkości i liczby EVs: NTA (ang. nanoparticle tracking analysis), NTA z barwnikami fluorescencyjnymi oraz DLS (ang. dynamic light scattering) i określono, że najbardziej wiarygodne wyniki uzyskano przy użyciu NTA w świetle białym. Pęcherzyki zobrazowano przy użyciu mikroskopii elektronowej, natomiast wykorzystując mikroskopię fluorescencyjną potwierdzono ich integrację z komórkami wyizolowanymi z jelita człowieka (zarówno prawidłowymi: CCD841 CoN oraz CCD-18Co jak i nowotworowymi: HT-29 oraz HCT116). Na podstawie testu MTT, barwienia fioletem krystalicznym oraz badania poziomu reaktywnych form tlenu (ang. reactive oxygen species, ROS) wykazano, że 24-godzinna inkubacja EVs drożdżowych nie wpływała negatywnie na żadne spośród badanych linii komórkowych. Jednak po wydłużeniu czasu hodowli komórek, po 1-krotnej ekspozycji na pęcherzyki, do 7 dni, zaobserwowano spadek liczebności hodowli komórek nowotworowych oraz wzrost liczebności prawidłowych linii komórkowych. Z wykorzystaniem cytometrii przepływowej oraz qPCR (ang. quantitative polymerase chain reaction) badano także wpływ EVs na potencjał nowotworowy komórek. Sprawdzono również różne metody ładowania związków do pęcherzyków, z których wybrano pasywne ładowanie w obecności związku, minimalizujące stratę pęcherzyków. Potwierdzono przeniesienie ładunku egzogennego do komórek, a także, że ładunek w postaci doksorubicyny pozostaje biologicznie aktywny po załadowaniu do EVs i transporcie do komórek docelowych.

Podczas prowadzonych badań scharakteryzowano 3 szczepy mikroorganizmów jako producentów pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Ponadto w przypadku EVs drożdży probiotycznych wykazano ich pozytywny wpływ na komórki prawidłowe oraz zdolność do

7

hamowania rozwoju komórek nowotworowych. Wskazano także nowe cele badawcze, które w przyszłości mogą dać odpowiedzi na poczynione w pracy doktorskiej obserwacje.

Słowa kluczowe: pęcherzyki zewnątrzkomórkowe, EVs, drożdże probiotyczne, *Saccharomyces boulardii, Kluyveromyces marxianus, Janthinobacterium lividum*, wiolaceina, systemy przenoszenia leków

ABSTRACT

Extracellular vesicles (EVs) are secreted by all living cells, including microorganisms. These nanometric structures contain various compounds that can influence mammalian cells, including those in humans. This doctoral thesis focuses on extracellular vesicles produced by the probiotic yeasts *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* and *Kluyveromyces marxianus*, as well as the bacteria *Janthinobacterium lividum*, which produces violacein.

Multiple methods were tested for isolating EVs from liquid cultures of microorganisms, and ultrafiltration was ultimately chosen. The efficiency of EV production by the tested microorganisms was quantified. A comparison of methods for analyzing the size and number of EVs was conducted, including NTA (Nanoparticle Tracking Analysis), NTA with fluorescent dyes, and DLS (Dynamic Light Scattering). It was determined that the most reliable results were obtained using NTA in white light. Electron microscopy was employed to image the vesicles, and their integration with human intestinal cells - both normal (CCD841 CoN and CCD-18Co) and cancerous (HCT116 and HT-29) - was confirmed using fluorescence microscopy. The MTT test, crystal violet staining, and the measurement of ROS (Reactive Oxygen Species) were used to assess the effects of 24-hour incubation with yeast EVs on the tested cell lines. Results indicated that this incubation did not adversely affect any of the cell lines. However, after extending the incubation period to 7 days, a decrease in the number of cancer cell cultures was observed, alongside an increase in the number of normal cell lines. The impact of EVs on the tumorigenic potential of cells was also examined using flow cytometry and qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction). Various methods for loading compounds into vesicles were evaluated, with passive loading in the presence of the compound selected as the most effective, minimizing vesicle loss. It was confirmed that exogenous cargo could be transferred to cells and that doxorubicin remains biologically active after being loaded into EVs and transported to target cells.

The studies conducted characterized three strains of microorganisms as producers of extracellular vesicles. Notably, the EVs from probiotic yeast demonstrated a positive effect on normal cells and an ability to inhibit the development of cancer cells. The thesis also outlines new research goals that may provide further insights into the observations made throughout this work.

Keywords: extracellular vesicles, EVs, probiotic yeast, *Saccharomyces boulardii*, *Kluyveromyces marxianus*, *Janthinobacterium lividum*, violacein, drug delivery systems

SPIS TREŚCI

1. Cel oraz	z hipoteza badawcza pracy:	15
2. Wstęp		16
2.1. Pęc	herzyki zewnątrzkomórkowe	16
2.1.1.	Podstawowe informacje	16
2.1.2.	Biogeneza pęcherzyków zewnątrzkomórkowych	17
2.1.3.	Mechanizmy pobierania EVs ze środowiska przed komórki	19
2.1.4.	Metody izolacji EVs z próbek biologicznych	22
2.1.5.	Charakterystyka EVs	23
2.1.6.	Natywny ładunek EVs	24
2.1.7.	Możliwości modyfikacji EVs	27
2.2. Pro	biotyki i produkowane przez nie EVs	28
2.2.1.	Warunki probiotyczności mikroorganizmów	28
2.2.2.	EVs mikroorganizmów probiotycznych jako nowe postbiotyki	30
2.3. Bak	terie niepatogenne, produkowane przez nie związki bioaktywne i ich pęcherzy	ki
zew	nątrzkomórkowe	32
2.4. Mo	żliwe praktyczne zastosowania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych	32
3. Materia	3. Materiały i metody	
3.1. Ma	teriały	35
3.1.1.	Materiał biologiczny	35
3.1.2.	Bufory, roztwory i podłoża hodowlane wykorzystywane w pracy:	38
3.1.3.	Startery do qPCR:	48
3.2. Apa	aratura:	49
3.3. Met	3.3. Metody:	
3.3.1.	Hodowle mikroorganizmów:	52
3.3.2.	Hodowle linii komórkowych:	53
3.3.3.	Sterylizacja chemiczna wirówkowych filtrów membranowych	54
3.3.4.	Podstawowa charakterystyka mikroorganizmów:	54
3.3.5.	Mikrobiologiczna produkcja pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (EVs)	55
3.3.6.	Izolacja EVs, pochodzenia mikrobiologicznego:	56
3.3.7.	Inne przetestowane metody izolacji EVs:	58
3.3.8.	Wyliczanie wydajności izolacji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych	61
3.3.9.	Ekstrakcja wiolaceiny z biomasy bakteryjnej	62

- 3.3.13. Cienkowarstwowa chromatografia cieczowa (ang. *Thin Layer Chromatography*, TLC) wiolaceiny zawartej w metanolowym ekstrakcie z biomasy bakteryjnej (Ex-VIO) oraz bakteryjnych pęcherzykach zewnątrzkomórkowych (EVs-VIO). 64

- 3.3.16. Analiza śledzenia nanocząstek NTA 67

- 3.3.19. Obrazowanie EVs z wykorzystaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej... 69

- 3.3.22. Pomiar potencjału elektrokinetycznego błony komórkowej (potencjału zeta, ζ).. 75
- 3.3.23. Test na aktywność metaboliczną komórek (ang. MTT assay)......76

3.3.27.	Ładowanie EVs doksorubicyną (EVs_DOX) oraz oranżem akrydyny (EVs_AO)
	i potwierdzenie przeniesienia ładunku do wnętrza komórek ludzkich
3.3.28.	Inne przetestowane metody wprowadzania do EVs doksorubicyny
3.3.29.	Monitorowanie szybkości wchłaniania EVs-WUT240_AO oraz EVs_NR przez
	komórki eukariotyczne
3.3.30.	Wyznaczenie wydajności ładowania doksorubicyny (DOX) oraz oranżu akrydyny
	(AO) do EVs
3.3.31.	Hodowla długoterminowa (ang. LongTerm assay)
3.3.32.	Hodowla długoterminowa obciążona doksorubicyną (ang. LongTerm-DOX assay)
3.3.33.	Badanie tempa proliferacji komórek (ang. BrdU assay)
3.3.34.	Barwienie komórek oranżem akrydyny oraz jodkiem propidyny (barwienie AO/Pi
3.3.35.	Izolacja mRNA z komórek ludzkich, odwrotna transkrypcja oraz qPCR88
3.3.36.	Zymografia93
3.3.37.	Izolacja białek z komórek eukariotycznych, elektroforeza SDS-PAGE, analiza
	Western blot oraz Slot blot
3.3.38.	Multipleksowa analiza wybranych analitów wykonywana metodą cytometri
	przepływowej (ang. Cytometric Bead Array, CBA)97
3.3.39.	Hodowla długoterminowa ko-kultury komórek prawidłowych oraz
	nowotworowych (ang. Co-culture LongTerm assay) 100
3.3.40.	Barwienie komórek AO, Pi oraz Hoechst 33342 (barwienie AO/Pi/H) 101
3.3.41.	Barwienie tzw. żywe/martwe komórki (barwienie FDA/Pi) 101
4. Wyniki i	dyskusja
4.1. Izola	acja i charakterystyka pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z hodowli drożdży
S. be	pulardii i K. marxianus oraz bakterii J. lividum105
4.1.1.	Wybór metody izolacji EVs 105
4.1.2.	Testowanie warunków przechowywania próbek EVs107
4.1.3.	Wydajność produkcji EVs przez mikroorganizmy 109
4.1.4.	Charakterystyka EVs na podstawie pomiarów NTA oraz DLS 111
4.1.5.	Wpływ fluorescencyjnych barwników lipofilowych na EVs 115
4.1.6.	Ocena morfologii pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z wykorzystaniem
	mikroskopii elektronowej117
4.1.7.	Analiza proteomiczna ładunku mikrobiologicznych EVs 119

4.1.8. Porównanie wiolaceiny z pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (EVs-VIO) or	az		
z biomasy komórek bakteryjnych (Ex-VIO)1	21		
4.2. Wpływ mikrobiologicznych EVs na linie komórkowe z jelita grubego człowieka 125			
4.2.1. Potwierdzenie zdolności EVs do interakcji z komórkami ludzkimi (EVs-NR) 1	25		
4.2.2. Zbadanie wpływu pęcherzyków mikrobiologicznych na ogólną kondycję hodow	vli		
komórkowych1	28		
4.2.3. Indukcja odpowiedzi długotrwałej (ang. LongTerm assay, LTa)1	34		
4.2.4. Długotrwała hodowla mieszana komórek prawidłowych oraz nowotworowych pr	zy		
ekspozycji na EVs drożdżowe, trwającej 168 h (ang. Co-culture LongTerm asso	ıy,		
CcLTa)1	39		
4.2.5. Wpływ pęcherzyków na potencjał nowotworowy komórek HT-29 oraz HCT116			
	44		
4.2.6. Produkcja interleukin indukowana obecnością EVs pochodzer	iia		
mikrobiologicznego1	48		
4.3. EVs jako nośniki leków – egzogenne ładowanie związków do EVs oraz testowanie ie	ch		
jako nośników do stworzenia DDS-EVs (ang. EVs-based drug delivery system) 1	52		
4.3.1. Ładowanie EVs związkiem bioaktywnym:1	52		
4.3.2. Wykorzystanie EVs pochodzenia mikrobiologicznego jako nośników leków 1.	54		
4.3.3. Badanie odpowiedzi długoterminowej komórek na obecność doksorubicy	ny		
(ang <i>LongTermDOX</i> , LTD)1	56		
4.3.4. Monitorowanie tempa interakcji EVs z komórkami przy wykorzystaniu oran	żu		
akrydyny oraz Nile Red1	58		
5. Podsumowanie i perspektywy przyszłych badań1	62		
6. Bibliografia	64		
7. Wykaz skrótów	83		
8. Spis rysunków1	88		
9. Spis tabel 193			
10. Spis załączników			
11. Załączniki	96		

1. Cel oraz hipoteza badawcza pracy:

Hipotezą badawczą niniejszej rozprawy doktorskiej jest brak toksycznego wpływu EVs wytwarzanych przez mikroorganizmy, takie jak drożdże probiotyczne i bakterie niepatogenne, na komórki ludzkie (na przykładzie modelu linii komórek jelitowych człowieka) oraz możliwość ich wykorzystania jako nośników związków biologicznie czynnych do tworzenia DDS-EVs.

W celu weryfikacji bezpieczeństwa pęcherzyków W potencjalnych terapiach przeciwnowotworowych, badania skupiły się na wpływie, jaki EVs wywierają na komórki ludzkie. Oprócz badań na natywnych EVs, przeprowadzono również ich obciążenie egzogenne. Po wyizolowaniu EVs z kultur mikroorganizmów poddano je działaniu różnych czynników, które indukowały przenikanie związków do pęcherzyka lub reorganizację EVs połączoną z zamknięciem związków w ich wnętrzu. Modelowym związkiem wykorzystanym w badaniach _ lek cytostatyczny stosowany obecnie terapiach była doksorubicyna W przeciwnowotworowych.

2. Wstęp

2.1. Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe

2.1.1. Podstawowe informacje

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (ang. *Extracellular Vesicles*, EVs) są małymi, kulistymi strukturami otoczonymi dwuwarstwą lipidową, które w sposób naturalny wydzielane są do otoczenia przez wszystkie rodzaje komórek. Historia ich odkrycia sięga lat 40. XX wieku, kiedy po raz pierwszy zauważono je we krwi¹. Początkowo były one uważane za produkty degradacji komórkowej, jednak już w latach 80. potwierdzono, że nie są to żadne pozostałości komórkowe, lecz egzosomy, które pełnią kluczowe funkcje w komunikacji międzykomórkowej. Wówczas zaczęto rozumieć, że biorą one udział w przekazywaniu sygnałów i materiału genetycznego między komórkami. Przez kolejne dekady badania nad EVs rozwijały się dynamicznie, co doprowadziło do identyfikacji kolejnych typów pęcherzyków, takich jak mikropęcherzyki i ciałka apoptotyczne ^{2–5}. Bezsprzecznie większość wiedzy dotyczącej pęcherzyków zewnątrzkomórkowych pochodzi właśnie z badań nad EVs produkowanymi przez komórki ludzkie. Jednak badania nad analogicznymi strukturami produkowanymi przez mikroorganizmy trwają nieprzerwanie od blisko 50 lat ³.

Obecnie wiadomo, że pęcherzyki zewnątrzkomórkowe stanowią silnie heterogenną grupę nanocząstek zarówno pod względem wielkości, składu jak i transportowanego ładunku. Owa różnorodność ich obciążenia biologicznego jest związana, z faktem, że powstają one poprzez enkapsulację części cytozolu komórkowego w dwuwarstwie lipidowej tworzącej błonę komórkową. EVs pełnią bardzo ważną rolę w interakcjach między komórkami tego samego gatunku (np. przy tworzeniu biofilmu lub transferu genów). Co więcej pęcherzyki pośredniczą także w komunikacji pomiędzy komórkami różnego rodzaju, np. EVs komórek prokariotycznych i odbierające je komórki eukariotyczne (m.in. podczas modulacji odpowiedzi immunologicznej)^{6–8}.

Klasyfikacja pęcherzyków zewnątrzkomórkowych oparta jest nie tylko na ich wielkości, ale także na sposobie ich powstawania. W związku z tym można wyróżnić: egzosomy (małe o średnicy 60 - 80 nm oraz duże w zakresie 90 - 120 nm), mikropęcherzyki ($0,1 - 1 \mu$ m), ciałka apoptotyczne (struktury wydzielane przez komórki ssacze w fazie apoptozy, które mają około $0,05 - 5 \mu$ m średnicy), a w przypadku komórek nowotworowych także onkosomy $(1 - 10 \mu m)^{9,10}$.

Badania nad pęcherzykami zewnątrzkomórkowymi z roku na rok są coraz bardzo szybko postępują, co można zauważyć chociażby korzystając z prostego wyszukiwania w bazie PubMed – <u>https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/</u> (Rys. 1.).



Rysunek 1, Wyniki przeszukiwania bazy artykułów PubMed pod kątem publikacji dotyczących ogólnie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych oraz EVs produkowanych przez konkretny rodzaj komórek: nowotworowych, bakteryjnych lub drożdżowych. Dane dostępne na dzień 26.12.2024.

Intensywny rozwój tego tematu badawczego jest w dużej mierze związany z komórkami ludzkimi i produkowanymi przez nie pęcherzykami, ponieważ ze względu na swój ładunek upatruje się w nich zastosowania jako biomarkerów różnych chorób, w tym nowotworowych ¹¹⁻¹⁶. Pomimo tak szybkiego rozwoju tej gałęzi badawczej wciąż słabo poznane pozostają pęcherzyki mikroorganizmów, w tym drożdży a najsłabiej pęcherzyki drożdży probiotycznych. W 2022 roku opublikowano na ich temat 1 pracę oryginalną ¹⁷, a do tej pory (koniec 2024 roku) jest ich zaledwie 5 ^{17–21}.

2.1.2. Biogeneza pęcherzyków zewnątrzkomórkowych

Obecnie dość dobrze opisane są 4 drogi powstawania głównych typów pęcherzyków, które zostały zilustrowane na poniższym Rys. 2²².



Rysunek 2. Schemat biogenezy pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, opracowany na podstawie^{22–25}.

Pierwszą ze ścieżek jest endosomalna droga biogenezy (ang. *endosomal sorting complex required for transport*, ESCRT-dependent pathway), w wyniku której komórki wytwarzają i uwalniają egzosomy. Początkowo, poprzez endocytozę i dojrzewanie endosomów, wewnątrz komórki powstają ciałka wielopęcherzykowe (ang. *Miltivesicular Bodies*, MVBs). Następie dochodzi do fuzji MVBs z błoną komórkową i następuje uwolnienie egzosomów do przestrzeni międzykomórkowej ^{22,24}.

Mikropęcherzyki powstają natomiast na drodze niezależnej od ESCRT (ang. *ESCRT-independent pathway*). Proces ten przypomina pączkowanie drożdży i polega na utworzeniu się pęcherzyka bezpośrednio z błony komórkowej ^{22,24}.

Kolejną ścieżkę powstawania EVs zaobserwowano u komórek przechodzących proces kontrolowanej śmierci, gdzie pęcherzyki – ciałka apoptotyczne powstają wskutek fragmentacji komórki podczas programowanej śmierci ²².

Istnieje jeszcze jeden typ pęcherzyków – onkosomy, jednak jest on bardzo specyficzny i wydzielany tylko przez komórki nowotworowe. EVs te są wytwarzane w wyniku dynamicznego procesu pączkowania błony komórkowej komórek nowotworowych, co prowadzi do uwolnienia pęcherzyków (100 – 400 nm) do przestrzeni zewnątrzkomórkowej ²⁶. Te pęcherzyki mają znacznie większe rozmiary w porównaniu do egzosomów i mogą przenosić onkoproteiny, RNA oraz inne molekuły biologicznie aktywne, które wspierają rozwój i progresję nowotworu ^{22,24}. Onkosomy odgrywają kluczową rolę w mikrośrodowisku

nowotworowym, gdzie uczestniczą w przekazywaniu sygnałów proonkogennych między komórkami, promując angiogenezę, proliferację oraz migrację komórek rakowych. Dzięki swoim specyficznym właściwościom, onkosomy są obiektem intensywnych badań jako potencjalne biomarkery diagnostyczne oraz cele terapeutyczne w walce z nowotworami ²⁷.

Niedawne badania wykazały istnienie jeszcze jednego typu pęcherzyków wydzielanych przez komórki migrujące (np. komórki układu odpornościowego, nowotwory przerzutowe czy też podocyty), a mianowicie migrasomów o średnicy około 0,5 – 3 μm. Mechanizm ich powstawania nie jest jeszcze w pełni poznany, ale już wiadomo, że jest on związany ze zdolnością komórek do przemieszczania się oraz występowaniem na ich powierzchni cząsteczek, takich jak integryny, tetraspaniny (ang. *tetraspanins*, TSPAN) i cholesterol ^{28,29}. Po odebraniu ze środowiska czynnika stymulującego komórkę, następuje agregacja integryn na spodniej stronie błony komórkowej, powodując silne przyleganie pewnego obszaru komórki do macierzy zewnątrzkomórkowej i jest prawdopodobnie inicjacją powstawania migrasomów ²⁸ (Rys. 3.).



Rysunek 3. Schemat powstawania migrasomów, na podstawie²⁹.

2.1.3. Mechanizmy pobierania EVs ze środowiska przed komórki

EVs transportują między komórkami różne sygnały. Dotychczas zdefiniowano kilka mechanizmów, dzięki którym komórki ssacze pobierają je ze środowiska (Rys. 4.). Uważa się także, że nie odbywa się to na drodze selektywnej ścieżki, lecz ma to charakter mieszany poprzez aktywację różnych sposobów internalizacji pęcherzyków z przestrzeni międzykomórkowej. Określono, że wychwyt EVs może następować między innymi poprzez endocytozę zależną od klatryny lub kaweoliny. Endocytoza zależna od klatryny (ang. *clathrin-mediated endocytosis*, CME) ^{30–32} to proces, który rozpoczyna się od tworzenia wpukleń błony komórkowej wyściełanych białkiem klatryną. Wgłębienia te powstają w miejscach, gdzie

receptory błonowe związały specyficzne ligandy. Dołek pogłębia się, aż do oderwania się od błony komórkowej, w wyniku czego powstaje pęcherzyk pokryty klatryną. Następnie klatryna zostaje usunięta, a pęcherzyk dalej transportowany jest w głąb komórki do wczesnych endosomów, gdzie następuje uwolnienie i sortowanie pobranego materiału. Natomiast endocytoza zależna od kaweoliny (ang. *caveolin-dependent endocytosis*, CDE) ^{30,32,33} rozpoczyna się w miejscach zwanych kaweolami, czyli domenach tratw glikolipidowych w błonie komórkowej, które są bogate w cholesterol, sfingolipidy oraz białko strukturalne – kaweolinę. Pęcherzyk zewnątrzkomórkowy wciągany jest do wnętrza komórki poprzez stopniową deformację błony komórkowej, która postępuje aż do utworzenia się małych pęcherzyków kaweolinowych w błonie plazmatycznej. Następnie są one odrywane i transportowane do wnętrza komórki, gdzie mogą łączyć się z innymi kompartmentami wewnątrzkomórkowymi, takimi jak endosomy lub aparat Golgiego.

EVs mogą dostawać się do wnętrza komórki również poprzez fagocytozę (ang. *phagocytosis*)³⁴⁻³⁶ – mechanizm wykorzystywany przez komórki do wychwytu większych cząstek zewnątrzkomórkowych. Jest on głównie spotykany u makrofagów, neutrofili i niektórych komórkach dendrytycznych, które wykorzystują go do pochłaniania cząstek, takich jak bakterie i fragmenty apoptotyczne. Fagocytoza rozpoczyna się od kontaktu EVs z receptorami na powierzchni komórki. Następnie tworzą się wgłębienia błonowy, które otaczają cząstkę i zamykają ją w pęcherzyku fagocytarnym. W kolejnym kroku łączy się z lizosomem, gdzie zawartość pęcherzyka zewnątrzkomórkowego jest trawiona przez enzymy lizosomalne.

EVs mogą być pobierane przez komórkę także na drodze makropinocytozy (ang. *macropinocytosis*) ${}^{32,36-39}$. Proces ten jest niezależny od receptora, ale uzależniony od aktywności pompy sodowo-protonowej (ang. Na^+/H^+ exchanger) oraz wymagający także obecności cholesterolu do restrukturyzacji cytoszkieletu aktynowego. Makropinocytoza może następować poprzez generowanie wklęsłych falbanek błonowych bądź też wypustek błonowych, które rozciągają się od komórki aż za pęcherzyk, gdzie łączą się ze sobą, zamykając go w tzw. makropinosomie.

Fuzja membrany komórkowej z pęcherzykiem (ang. *plasma membrane fusion*) to kolejny proces, w którym EVs mogą dostarczać swój ładunek biologiczny do komórki poprzez połączenie ich błony z błoną komórkową na drodze internalizacji ^{32,36,40}. Ten bezpośredni kontakt między dwiema dwuwarstwami lipidowymi generuje powstanie trzonu fuzyjnego,

20

który dalej rozszerza się umożliwiając utworzenie poru, w którym mieszają się dwa hydrofobowe rdzenie ⁴¹. Stwierdzono także, że zachodzeniu fuzji sprzyja obniżenie pH środowiska do ok. 6,0⁴⁰.

Zaobserwowano również, że interakcja pęcherzyków z tratwami lipidowymi (ang. *lipid rafts*) może skutkować wychwytem EVs przez komórkę ^{32,36}. Są to małe, dynamiczne obszary błony komórkowej, wzbogacone w cholesterol, sfingolipidy i specyficzne białka zakotwiczone w glikozylofosfatydyloinozytolu (ang. glycosylphosphatidylinositol, GPI) 42 Dzięki składowi lipidowemu, tratwy charakteryzują unikalnemu sie wyższą gestościa i uporządkowaną strukturą w porównaniu z pozostała częścia błony. Ta odmienna organizacja sprawia, że są one miejscem preferencyjnego skupiania się wielu białek sygnałowych i receptorów, co więcej mogą one także wpływać na płynność błony i transport białek. Interakcja pęcherzyków z mikrodomenami lipidowymi może prowadzić do sortowania specyficznych białek oraz do kierowania pęcherzyków w konkretne obszary w komórce. Dynamika tratw, czyli ich zdolność do łączenia się i rozdzielania, umożliwia szybkie reagowanie komórki na zmieniające się warunki środowiska⁴³.



*Rysunek 4. Schemat przedstawiający mechanizmy pobierania EVs ze środowiska wykorzystywane przez komórki ssacze, na podstawie*³⁶.

2.1.4. Metody izolacji EVs z próbek biologicznych

Istnieją różne metody izolacji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, dzięki czemu można dobrać odpowiednią technikę pod posiadaną próbkę, wyposażenie laboratorium lub też badanie, które są planowane. Poniżej omówiono najczęściej wykorzystywane techniki izolacji EVs (Rys. 5.).



Rysunek 5. Podstawowe metody wykorzystywane do izolacji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, na podstawie⁴⁴.

Ultrawirowanie (ang. *ultracentrifugation*, UC) – metoda obecnie uznawana za złoty standard izolacji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Opiera się ona na różnicach w gęstości i rozmiarze EVs oraz innych składników próbki. Wykonanie polega na poddaniu próbki serii wirowań przy rosnących prędkościach, co pozwala na sekwencyjne osadzanie różnych frakcji. W związku z tym możliwe jest usunięcie komórek, ich fragmentów, a także ciałek apoptotycznych. Warto jednak nadmienić, że ultrawirowanie jest czasochłonną metodą wymagającą specjalistycznego sprzętu pozwalającego na wirowanie próbek z prędkością $100000 \times g^{44-46}$.

Wirowanie w gradiencie gęstości (ang. *density gradient centrifugation*, DG) – metoda oparta na utworzeniu w probówce wirówkowej faz o różnej gęstości. Gradient ten może być ciągły lub nieciągły i jest najczęściej tworzony z wykorzystaniem substancji takich jak sacharoza czy jodiksanol. Gradienty przygotowuje się samodzielnie od najwyższej do najniższej gęstości, dobierając fazy, w taki sposób, aby móc oddzielić pożądaną frakcję. Podczas wirowania, cząsteczki migrują w dół gradientu aż osiągną warstwę o gęstości równej własnej gęstości, gdzie się zatrzymują. W ten sposób różne typy cząsteczek zostają rozdzielone w postaci wyraźnych pasm ^{44,47}.

Ultrafiltracja (ang. *ultrafiltration*, UF) – technika polegająca na wykorzystaniu membran o odpowiednio dobranej wielkości porów, najczęściej w zakresie 10 – 100 nm. Po nadaniu na filtr próbki umieszcza się go w wirówce, w której rozdział następuje pod wpływem działającej siły odśrodkowej lub też pod membraną generuje się podciśnienie. Wszystko co jest mniejsze niż średnica użytych porów przechodzi przez membranę, na której zatrzymywane i zatężane są

jedynie większe cząstki, takie jak pęcherzyki. Można także zastosować układ filtrów o różnych średnicach porów, dzięki czemu uzyska się frakcję EVs o konkretnym zakresie wielkości ^{48,49}.

Chromatografia wykluczania na sitach molekularnych (ang. *size-exclusion chromatography*, SEC) – metoda bazująca na kolumnach wypełnionych porowatym żelem, w którym dochodzi do rozdziału mieszaniny pod kątem wielkości cząstek i ich zdolności do przenikania przez jego pory. Cząsteczki większe od porów żelu są wykluczane z porów i przemieszczają się przez kolumnę w przestrzeni międzycząsteczkowej, eluując jako pierwsze. Mniejsze cząsteczki mogą natomiast wnikać do porów żelu, co wydłuża ich czas retencji ^{48,50}.

Precypitacja z wykorzystaniem polimerów (ang. *polimer precipitation*, PP) – metoda bazująca na wytrąceniu pęcherzyków z próbki za pomocą różnych czynników chemicznych takich jak, np. silnie hydrofobowy polimer – polietylenoglikol (ang. *poly-ethylene glycol*, PEG). Zasadniczą wadą tej metody jest możliwa koagulacja białek oraz współwytrącanie innych cząsteczek, które będą zanieczyszczały próbkę ^{48,51}.

Immuno-przechwytywanie (ang. *immunocapture*, IC) – polega na użyciu kulek magnetycznych opłaszczonych przeciwciałami specyficznymi dla markerów powierzchniowych EVs. W wyniku specyficznego wiązania antygen-przeciwciało, EVs zostają związane z kulkami magnetycznymi, co umożliwia ich łatwe oddzielenie od pozostałych składników próbki za pomocą magnesu. Niestety nie jest to metoda uniwersalna, ponieważ większość dostępnych komercyjnie przeciwciał jest dedykowana dla próbek ludzkich bądź mysich. Brakuje przeciwciał dla próbek mikrobiologicznych ^{44,52–54}.

2.1.5. Charakterystyka EVs

Tak różnorodna grupa, jaką stanowią pęcherzyki zewnątrzkomórkowe, wymaga zróżnicowanych i niezwykle precyzyjnych technik detekcji i ogólnej charakterystyki, w tym zbadania rozmiaru oraz oceny powierzchni pęcherzyków. Do badania EVs jedną z najczęściej wykorzystywanych technik jest analiza śledzenia nanocząstek (ang. *Nanoparticle Tracking Analysis*, NTA), która przeprowadzana jest w przepływie i pozwala na pomiar wielkości oraz stężenia EVs w próbkach. Technika ta wykorzystuje światło do śledzenia ruchu cząstek w roztworze, co pozwala na określenie ich rozmiaru na podstawie ruchów Browna ^{54,55}. Równie często wykorzystywane jest także dynamiczne rozpraszanie światła (ang. *Dynamic Light Scattering*, DLS) pozwalające na ocenę wielkości i dystrybucji EVs w roztworze na podstawie

analizy fluktuacji intensywności światła rozproszonego przez pęcherzyki poruszające się w wyniku ruchów Browna, w próbce statycznej ⁵⁶. Wspomniane techniki służą głównie do analizy wielkości i gęstości EVs w próbce, natomiast do oceny ich powierzchni wykorzystywana jest mikroskopia elektronowa (ang. *Electron Microscopy*, EM) ^{54,57}. Pozwala ona na wizualizację pęcherzyków z bardzo wysoką rozdzielczością, przy czym transmisyjna mikroskopia elektronowa (ang. *transmission electron microscopy*, TEM) umożliwia obserwację wewnętrznej struktury EVs, natomiast skaningowa mikroskopia elektronowa (ang. *scanning electron microscopy*, SEM) daje informacje o powierzchni tych nanostruktur ⁵⁷.

Przytoczone powyżej techniki jednak nie wyczerpują możliwości badawczych. Niektórzy naukowcy sprawdzają także potencjał błonowy EVs (potencjał zeta, ang. *Zeta Potential*, ZP) ^{58,59} lub wykorzystują mikrowagę kwarcową (ang. *Quartz Crystal Microbalance with Dissipation monitoring*, QCM-D) ^{60,61}, cytometrię przepływową (ang. *Flow Cytometry*, FC) ⁵⁴ czy też mikroskopię sił atomowych (ang. *Atomic Force Microscopy*, AFM) ^{62–64}.

2.1.6. Natywny ładunek EVs

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe w zależności od typu produkującej je komórki i warunków środowiska, mają bardzo zróżnicowany natywny ładunek (Rys. 6.), który wpływa na ich funkcje i zastosowania ^{65–67}. EVs komórek ludzkich swoimi komponentami odzwierciedlają stan komórki macierzystej ^{11,68,69} a ponadto biorą udział w wielu procesach zarówno fizjologicznych jak i patologicznych, do których można zaliczyć: odpowiedź immunologiczną, procesy zapalne, nowotworzenie, regenerację tkanek oraz progresję chorób neurodegeneracyjnych ^{15,70}. Natomiast pęcherzyki zewnątrzkomórkowe pochodzenia mikrobiologicznego pełnią kluczowe role w:

- interakcjach patogen-gospodarz, czyli procesie patogenezy, w którym EVs przenoszą czynniki wirulencji, takie jak toksyny i enzymy proteolityczne, które pomagają mikroorganizmom w przełamywaniu barier ochronnych gospodarza i wywoływaniu chorób ^{71–75};
- komunikacji, czyli przekazywaniu sygnałów między mikroorganizmami, w tym *quorum sensing*, które pozwalają bakteriom na koordynację zachowań grupowych w odpowiedzi na gęstość populacji, takich jak tworzenie biofilmów czy produkcja substancji przeciwdrobnoustrojowych ^{73–77};

- utrzymaniu homeostazy mikrobiomu i odpowiedzi na stres EVs mogą zawierać białka szoku cieplnego i inne czynniki ochronne, które pomagają im przetrwać w niesprzyjających warunkach środowiska, takich jak wysoka temperatura, obecność antybiotyków czy zmiany pH ^{73–75,78};
- transferze genów EVs mogą przenosić materiał genetyczny między mikroorganizmami, co umożliwia horyzontalny transfer genów i przyczynia się do rozprzestrzeniania się cech takich jak oporność na antybiotyki ⁷⁹.



Rysunek 6. Schemat przedstawiający zróżnicowanie natywnego ładunku biologicznego pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w zależności od produkujących je komórek mikroorganizmów, na podstawie ⁸⁰.

Do jednej z najliczniejszych grup składników EVs należy zaliczyć białka ^{80–82}. W przypadku pęcherzyków ssaczych należy wśród nich wymienić enzymy, białka powierzchniowe i strukturalne, regulatory sygnałowe oraz tetraspaniny (zwłaszcza CD9, CD63, CD81), które uczestniczą w procesach adhezji i fuzji międzykomórkowej, a także białka szoku cieplnego (ang. *heat shock proteins*, HSP), które pełnią funkcje ochronne ^{83,84}. Z kolei do białek obecnych w EVs mikrobiologicznych należy zaliczyć enzymy hydrolityczne, toksyny, białka adhezyjne, białka sygnalizacyjne, a także białka związane z odpornością na antybiotyki ^{85–88}. Badanie składu białkowego EVs przeprowadzane jest bardzo często z wykorzystaniem spektrometrii mas (ang. *Mass Spectrometry*, MS), sprzężonej z różnymi metodami rozdziału mieszaniny białek w próbce. Dużą popularnością podczas badania proteomu cieszy się chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas (ang. *Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*, LC-MS/MS), pozwalająca na rozdzielanie mieszanin molekularnych, ich

identyfikację oraz kwantyfikację ^{89,90}. Oprócz niej wykorzystuje się również jonizację laserową wspomaganą matrycą połączoną z analizą czasu przelotu (ang. *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry*, MALDI-TOF MS) ^{91,92}, spektrometrię mas sprzężoną z jonizacją elektrosprejową (ang. *Electrospray Ionization Mass Spectrometry*, ESI-MS) ^{93,94} oraz elektroforezę kapilarną w połączeniu ze spektrometrią mas (ang. *Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry*, CE-MS) ^{95,96}. Metody te w połączeniu z przeszukiwaniem baz peptydów pozwalają na identyfikację i ilościową analizę białek wchodzących w skład EVs ⁵⁷. W przypadku próbek ludzkich podczas poszukiwania konkretnych białek markerowych często stosuje się także Western blotting⁵⁶.

Bardzo dużo informacji o pęcherzykach zewnątrzkomórkowych dostarczają też badania ich transkryptomu ^{97,98}. Badanie kwasów nukleinowych ⁸¹ transportowanych w EVs jest sposobem na poznanie ich funkcji biologicznych ^{54,97}. W przypadku materiału pochodzenia ludzkiego możemy znaleźć w nich różne formy RNA (mRNA, miRNA, tRNA i rRNA), które mogą modulować ekspresję genów w komórkach docelowych, wpływając na ich funkcjonowanie i metabolizm ⁹⁹. Z kolei pęcherzyki mikrobiologiczne mogą zawierać DNA, np. plazmidy, zawierające m.in. geny oporności na antybiotyki, co ma kluczowe znaczenie dla adaptacji i ewolucji mikroorganizmów ⁷⁵.

Kolejną bardzo liczną grupą związków wykrywanych w EVs są lipidy ^{80–82,100}. W przypadku pęcherzyków z materiału ludzkiego są to głównie fosfolipidy, cholesterol i sfingolipidy, które tworzą strukturalną bazę błonową pęcherzyków i są kluczowe dla ich integralności strukturalnej oraz funkcjonalnej ^{101,102}. Natomiast w przypadku EVs produkowanych przez, np. bakterie Gram-ujemne wykrywane są lipopolisacharydy (ang. *lipopolysaccharide*, LPS) oraz fosfatydyloetanoloaminy, które są charakterystyczne dla zewnętrznej błony komórkowej tych drobnoustrojów ⁷⁵.

Natywny ładunek pęcherzyków nie jest ograniczony do wymienionych 3 grup związków. Oprócz nich EVs mogą one zawierać barwniki ^{80–82}, polisacharydy ^{80,82}, czynniki wzrostu ¹⁰⁰, toksyny ¹⁰³, trudno rozpuszczalne metabolity bioaktywne metabolity takie jak wiolaceina ^{104,105} a także cząsteczki sygnałowe, które wpływają na funkcjonowanie komórek docelowych ⁸⁰. W ich badaniu bardzo przydatna może okazać się spektroskopia Ramanowska, która umożliwia analizę chemiczną EVs na poziomie pojedynczej cząstki ¹⁰⁶.

2.1.7. Możliwości modyfikacji EVs

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe mają duży potencjał by stać się narzędziami m.in. w dostarczaniu leków, terapii genowej oraz diagnostyce. Ma to związek z ich naturalnymi zdolnościami do przenoszenia ładunków biologicznych. Wprowadzanie dodatkowego, zaplanowanego ładunku do EVs pozwala na zwiększenie ich funkcjonalności oraz dostosowanie do specyficznych zastosowań medycznych ^{107,108}. Można to osiągnąć korzystając z kilku typów metod, do których należą metody fizyczne, chemiczne i biologiczne.

Do pierwszej grupy zaliczana jest m.in. inkubacja pęcherzyków w obecności ładunku. Jest to najprostsza technika, która bazuje na pasywnym wchłanianiu przez pęcherzyki ładunku ze środowiska, w którym zostały umieszczone. Efektywność tej metody jest zależna od właściwości fizykochemicznych ładunku oraz samych EVs¹⁰⁹. Bardziej inwazyjną techniką jest elektroporacja wykorzystująca krótkotrwałe impulsy elektryczne w celu utworzenia w błonie porów, przez które ładunek dostaje się do wnętrza pęcherzyka. Metodę tą wykorzystuje się do wprowadzania m.in. RNA, DNA i białek. Jednak należy mieć na uwadze, że parametry elektroporacji, takie jak napięcie i czas trwania impulsu, wymagają optymalizacji, aby zminimalizować uszkodzenia błony EVs¹⁰⁹. Kolejną metodą fizyczną jest sonikacja, podczas której błona EVs podlega destabilizacji wskutek działania fal ultradźwiękowych. Ułatwia to wprowadzenie np. cząstek hydrofobowych, które trudno załadować do EVs innymi technikami. Sonikację wykorzystuje się także, aby przeprowadzić fuzję pęcherzyków z nanocząstkami, w wyniku której powstają hybrydowe systemy dostarczania leków ^{110,111}.

W przypadku metod chemicznych takich jak pegylacja wykorzystywane są polimery takie jak glikol polietylenowy (PEG). Jego cząsteczki są przyłączane do powierzchni EVs, co nie tylko zwiększa stabilność ich struktury, wydłuża czas półtrwania w krwiobiegu, ale także zmniejsza ich immunogenność, co jest istotne w kontekście terapii ^{112,113}. Natomiast koniugacja EVs z ligandami bazuje na chemicznym przyłączeniu cząsteczek, które specyficznie wiążą się z receptorami na powierzchni EVs. Powoduje to zwiększenie efektywności dostarczania ładunku do komórek docelowych, np. koniugacja przeciwciał monoklonalnych, które wiążą się z określonymi receptorami na komórkach nowotworowych ^{114,115}. Szerokie zastosowanie mają także chemiczne modyfikacje lipidów. Poprzez wprowadzenie do błony pęcherzyków zewnątrzkomórkowych specyficznych lipidów, można wpływać na stabilność, fuzję z komórkami docelowymi oraz właściwości farmakokinetyczne EVs, np. wprowadzenie

lipidów kationowych może zwiększyć efektywność dostarczania RNA do komórek docelowych ^{116,117}.

Wykorzystując narzędzia biologii molekularnej można zmienić komórki produkujące EVs tak, aby dochodziło u nich do ekspresji białek fuzyjnych. Utworzone w ten sposób chimery białkowe wbudowywane są w błonę EVs. Co więcej białka te mogą zawierać fragmenty m.in. odpowiedzialne za rozpoznawanie specyficznych receptorów na powierzchni komórek docelowych, przez co zwiększona zostaje efektywność dostarczania ładunku terapeutycznego¹¹⁸. Poprzez genetyczne modyfikacje komórek produkujących EVs można również przeprowadzać biogenezę kontrolowaną. Polega ona na manipulacji szlakami biogenezy pęcherzyków i wykorzystywana jest, aby nie tylko zwiększyć wydajność ich produkcji, ale również kontrolować ich ładunek ^{119,120}.

2.2. Probiotyki i produkowane przez nie EVs

2.2.1. Warunki probiotyczności mikroorganizmów

Probiotykami nazywa się żywe mikroorganizmy, które przynoszą korzyści zdrowotne dla gospodarza. Wspierają one różnorodne funkcje fizjologiczne oraz chronią przed wieloma chorobami. Aby mikroorganizm został uznany za probiotyczny, musi spełniać określone kryteria¹²¹ wymienione poniżej.

- Bezpieczeństwo mikroorganizmy probiotyczne muszą być bezpieczne dla ludzi i nie mogą wywoływać chorób ani produkować toksyn. Większość probiotyków to bakterie kwasu mlekowego, takie jak *Lactobacillus* sp. i *Bifidobacterium* sp., które są naturalnie obecne w ludzkim przewodzie pokarmowym i wykazują niską patogenność ¹²².
- 2. Stabilność w produkcie, podczas przechowywania, a także po spożyciu przez człowieka. Oznacza to, że mikroorganizmy muszą przetrwać procesy technologiczne, takie jak suszenie, liofilizacja, a także przechowywanie w różnych warunkach temperatury i wilgotności. Ponadto muszą dotrzeć do jelita żywe, czyli muszą być odporne na działanie kwasu żołądkowego, soli żółciowych oraz enzymów trawiennych ¹²³.
- 3. Przyleganie do komórek nabłonka jelitowego muszą produkować odpowiednie białka adhezyjne, które umożliwiają im przyczepianie się do komórek jelitowych. Cecha ta

pozwala probiotykom na kolonizację jelit i konkurencję z patogenami o niszę i składniki odżywcze ¹²³.

- Aktywność przeciwdrobnoustrojowa wobec patogenów produkcja różnorodnych substancji przeciwdrobnoustrojowych, takich jak kwas mlekowy, bakteriocyny czy nadtlenek wodoru które hamują wzrost patogenów takich jak bakterie chorobotwórcze, wirusy i grzyby ^{124,125}.
- 5. Korzyści zdrowotne dla gospodarza potwierdzone i udokumentowane w badaniach klinicznych, takie jak:
 - wspieranie procesów trawienia i wchłaniania składników odżywczych w przewodzie pokarmowym oraz dostarczanie witaminy K, witamin z grupy B i kwasu foliowego;
 - modulację układu odpornościowego poprzez indukcję zwiększonej produkcji przeciwciał, cytokin przeciwzapalnych i stymulowanie aktywności komórek NK (ang. *natural killer cells*), pomagając w walce z infekcjami i zmniejszając ryzyko rozwoju chorób autoimmunologicznych i alergii;
 - łagodzenie objawów chorób przewlekłych poprzez wpływanie na metabolizm glukozy i lipidów oraz na zmniejszenie stanu zapalnego, co może przynosić korzyści osobom cierpiącym na cukrzycę, otyłość, choroby sercowonaczyniowe i choroby neurodegeneracyjne.

Probiotyki są w głównie kojarzone z bakteriami z typu *Firmicutes*, a konkretniej z gatunkami z rodzajów *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. Należy jednak pamiętać, że do probiotyków klasyfikowane są również inne mikroorganizmy, m.in. bakterie z rodzajów *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Bacillus* a także *Escherichia coli* oraz drożdże *Saccharomyces*¹²⁶.

Przykładem mikroorganizmu zaliczanego do tej ostatniej grupy jest *Saccharomyces cerevisiae var boulardii* ¹²⁷. Najlepiej poznany i przebadany jest szczep CNCM I-745, który został wyizolowany w 1923 roku ze skórek owoców tropikalnych przez francuskiego mikrobiologa, Henriego Boularda ^{128,129}. Obecnie jest on komercyjnie dostępnym probiotykiem produkowanym przez Biocodex Laboratories (<u>https://www.biocodex.pl/pl/biocodex-na-swiecie/nasze-dziedzictwo/</u>; dostęp: 01.01.2025). Szczep ten wykazuje się dużą skutecznością w zapobieganiu i leczeniu biegunek wywołanych przez antybiotyki, a także infekcje bakteryjne (*Clostridioides dificille*) oraz wirusowe ^{130,131}. *S. boulardii* wspiera kondycję jelit człowieka nie

tylko poprzez utrzymanie równowagi mikroflory jelitowej i ochronę przed patogenami ^{132–134}, ale także poprzez poprawę wchłaniania składników odżywczych takich jak witaminy ^{135–137}.

Innym gatunkiem drożdży, który przyciąga uwagę badaczy ze względu na jego potencjalne właściwości probiotyczne jest *Kluyveromyces marxianus*. Jest to gatunek izolowany z produktów mlecznych, głównie kefirów ^{138,139} Wykazuje on zdolność do przylegania do komórek jelitowych, co jest kluczowe dla działania probiotycznego. Co więcej zaobserwowano, że potrafi wspierać układ odpornościowy i zmniejszać stan zapalny. Wykazano bowiem jego zdolność do modulacji odpowiedzi immunologicznej poprzez regulację produkcji cytokin prozapalnych, w tym zmniejszenia ich poziomu po indukcji bakteryjnymi lipopolisacharydami (ang. *lipopolysaccharides*, LPS). Korzystny wpływ tych drożdży wykazano także w badaniach nad mikroflorą jelitową, poprzez zwiększenie koncentracji bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* oraz ilości krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (takich jak octan i propionan) wpływają one na jej skład i funkcjonowanie ¹⁴⁰. *K. marxianus* produkuje również substancje hamujące wzrost bakterii chorobotwórczych (m.in. *Candida albicans czy Listeria monocytogenes*), chroniąc w ten sposób jelita przed infekcjami ^{141,142}.

2.2.2. EVs mikroorganizmów probiotycznych jako nowe postbiotyki

Drożdże probiotyczne, odgrywają kluczową rolę we wspieraniu zdrowia ludzkiego. Podobnie ma to miejsce w przypadku wydzielanych przez nie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, które mają unikalny skład i przyczyniają się do właściwości probiotycznych produkujących je drożdży. Potencjalnie mogą więc zapewniać podobne korzyści jak żywe probiotyki i znaleźć zastosowanie w różnych obszarach, w tym w przemyśle spożywczym i biomedycynie. Na podstawie wyników badań prowadzonych nad EVs produkowanymi przez bakterie probiotyczne można uznać, że wpasowują się one w definicję "postbiotyku" ^{143,144}. Międzynarodowe Stowarzyszenie Naukowe Probiotyków i Prebiotyków (ang. *International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics*, ISAPP) wydało bowiem definicję, według której postbiotykiem jest preparat nieożywionych mikroorganizmów i/lub ich składników, które przynoszą korzyści zdrowotne gospodarzowi ^{145,146}.

Badania nad EVs produkowanymi przez drożdże probiotyczne nie są jeszcze tak popularne jak w przypadku bakterii. Dla tych ostatnich można przytoczyć wiele przykładów, w tym niedawne badania nad *Lactobacillus acidophilus* ATCC 53544. Wykazano w nich, że bakterie mogą

dostarczać bakteriocyny za pośrednictwem pęcherzyków zewnątrzkomórkowych i w ten sposób zabijać inne bakterie ^{147,148}. Może to okazać się bardzo obiecującą alternatywą dla stosowania antybiotyków, zwłaszcza podczas leczenia chorób zakaźnych wywoływanych przez bakterie oporne na antybiotyki ^{149,150}.

Na przykładzie produkowanych przez *Lacticaseibacillus rhamnosus GG* (dawniej *Lactobacillus rhamnosus GG*) pęcherzyków zaobserwowano, że zwiększają one proliferację i migrację komórek śródbłonka (HUVEC) oraz keratynocytów (HaCaT). Wykazano także ich pozytywny wpływ *in vitro*, gdzie poprzez zwiększenie proliferacji komórek i angiogenezę wywołały przyspieszoną reepitelializację naskórka, tworzenie tkanki ziarninowej oraz odkładanie się białek macierzy zewnątrzkomórkowej, prowadząc w ten sposób do zamknięcia rany ^{151,152}. Natomiast pęcherzyki z *Lactobacillus druckerii* nie tylko przyspieszają gojenie się zapobiegają tworzeniu się blizn ¹⁵³.

Pęcherzyki z *Latilactobacillus sakei* (dawniej *Lactobacillus sakei*) indukują komórki dendrytyczne z kępki Peyera (produkujące prozapalną interleukinę 6, IL-6) do produkcji także IgA. Ponadto pęcherzyki z *Lactobacillus plantarum* JCM8341, zaindukowały komórki Raw264 do produkcji prozapalnych interleukin (IL-1 β oraz IL-6), oraz przeciw-zapalnych (IL-10, IF- γ oraz IL-12), które biorą udział w różnicowaniu pierwotnych pomocniczych limfocytów T typu 3 (Th3) do pomocniczych limfocytów T typu 1 (Th1)¹⁵².

Innym przykładem wpływu EVs pochodzenia probiotycznego jest zastosowanie pęcherzyków z *L. plantarum*, których dodatek zapobiega urazom na skutek niedokrwienia mózgu. Redukcja apoptozy neuronów została potwierdzona in vitro a także in vivo w organizmie myszy, gdzie zaobserwowano również, że EVs pokonały nie tylko cały organizm (od miejsca podania, czyli żyłę ogonową aż do mózgu) ale także barierę krew-mózg¹⁵⁴.

Na podstawie przytoczonych przykładów można zakładać, że badania nad pęcherzykami zewnątrzkomórkowymi produkowanymi przez drożdże probiotyczne również będą wykazywały bardzo różnorodny i pozytywny wpływ na organizm. Ich unikalne właściwości, nadają im ogromny potencjał do wykorzystania w różnych dziedzinach, w tym także w biomedycynie.

2.3.Bakterie niepatogenne, produkowane przez nie związki bioaktywne i ich pęcherzyki zewnątrzkomórkowe

Niezwykle interesującym zagadnieniem w kontekście pęcherzyków zewnątrzkomórkowych jest wykorzystanie mikroorganizmów niepatogennych dla człowieka i produkujących tym samym różne wiązki aktywne. Takim przykładem jest *Janthinobacterium lividum* – Gram-ujemna bakteria z rodziny *Oxalobacteraceae* ¹⁵⁵. Te bakterie można znaleźć w różnorodnych środowiskach naturalnych, takich jak gleba, słodka woda ^{156,157}, a także na powierzchniach roślin oraz u organizmów zwierząt wodnych, takich jak salamandry ^{158,159}.

J. lividum wyróżnia się spośród wielu mikroorganizmów swoją zdolnością do produkcji wiolaceiny – intensywnego fioletowego pigmentu, który wykazuje silne właściwości przeciwdrobnoustrojowe (zarówno przeciwko wielu bakteriom Gram-dodatnim jak i Gram-ujemnym), przeciwgrzybicze i przeciwwirusowe ^{160–163}. Ponadto badania naukowe sugerują, że wiolaceina może mieć właściwości przeciwnowotworowe, co czyni ją obiecującym kandydatem do dalszych badań w dziedzinie onkologii ^{105,164–166}. Ze względu na swoje wszechstronne właściwości biologiczne wiolaceina jest bardzo obiecującym narzędziem do różnych zastosowań medycznych i przemysłowych, jako barwnik lub dodatek do włókien ^{162,167–169}.

J. lividum ogólnie uznaje się za bakterię niepatogenną i nie jest ona związana z żadnymi znanymi chorobami u ludzi. Jednak w historii odnotowano kilka przypadków występowania tych bakterii u hospitalizowanych chorych ^{170,171}. Ze względu na powszechne występowanie *J. lividum* w środowisku, prawdopodobieństwo, że człowiek nie spożyje tych bakterii z wodą lub pożywieniem jest znikome. Sprawia to, że ryzyko zakażenia i postępujących powikłań chorobowych można jednak uznać za niewielkie. Wspomniane przypadki stanowią zaledwie 2 doniesienia literaturowe dotyczące chorób, w których zidentyfikowano *J. lividum* w przeciągu przeszło 30 lat. Jednakże, aby jeszcze bardziej zminimalizować ewentualne ryzyko powikłań, można zastosować nie całe mikroorganizmy, a produkowane przez nie pęcherzyki zewnątrzkomórkowe, które zawierają wiolaceinę ^{104,105,169,172}.

2.4. Możliwe praktyczne zastosowania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe są obecnie bardzo intensywnie badane i mają potencjał komercyjny, ale nie są jeszcze szeroko wykorzystywane w praktyce klinicznej. Istnieje jednak wiele badań i klinicznych prób, które wykazały ich potencjalne zastosowania w terapii

i diagnostyce. Na przykład, EVs są badane jako nośniki leków, biomarkery diagnostyczne oraz narzędzia terapeutyczne w regeneracyjnej medycynie ^{14,173,174}. Wartościowe zastosowania EVs zarówno w przemyśle biotechnologicznym jak i diagnostyce już są zauważalne, ale pełna komercjalizacja nie jest jeszcze możliwa zarówno ze względu na wciąż rozwijającą się technologię ich wytwarzania jak i brak regulacji prawnych w ich zakresie ¹⁷⁵.

Jednak diagnostyka nie jest jedynym obszarem, nad którym pracują zespoły z całego świata. Potencjał zastosowań EVs jest ogromny. Ze względu na ich zdolność do transportowania różnych substancji, EVs są badane jako potencjalne nośniki leków oraz jako składniki nowych szczepionek ^{176–178}. Ponadto, dokładne poznanie mechanizmów działania EVs może przyczynić się do opracowania nowych strategii zwalczania infekcji bakteryjnych, w tym wykorzystania jako nośników różnych terapeutyków ¹⁶. Zastosowanie to ma związek z ich strukturą, która jest bardzo podobna do liposomów, czyli syntetycznych struktur lipidowych obecnie wykorzystywanych w systemach dostarczania leków (ang. *Drug Delivery Systems*, DDS) ³. Co więcej trwają prace, aby móc wykorzystywać pęcherzyki w walce z chorobami nowotworowymi. Ma to poniekąd przypominać stosowaną obecnie (także w Polsce) terapię chimerycznymi komórkami CAR-T, jednak potencjalnie może mieć szersze zastosowanie, w tym także do guzów litych ¹⁷⁹.

Ze względu na bardzo duży potencjał aplikacyjny samych mikroorganizmów probiotycznych także i struktury przez nie produkowane powinny mieć możliwość wykorzystania. Wykazano bowiem, że EVs z *L. plantarum* działają jako mediatory odpowiedzi immunologicznej oraz mają działanie przeciwzapalne ¹⁸⁰.

Należy jednak pamiętać, że stosowanie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (EVs) wiąże się z kilkoma wyzwaniami i ograniczeniami, które muszą być rozwiązane przed ich szeroką komercjalizacją ¹⁸¹ (<u>https://wwwfdagov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/regulation-human-cells-tissues-and-cellular-and-tissue-based-products-hctps-small-entity-compliance;</u> dostęp: 26.12.2024).

Izolacja EVs jest skomplikowana ze względu na ich mały rozmiar i różnorodność struktury. Niestety, brak standardowych metod izolacji sprawia, że uzyskiwane wyniki mogą być zróżnicowane i trudne do reprodukcji/odtworzenia, a wytworzone/końcowe produkty mogą się od siebie znacząco różnić ¹⁸². Co więcej, nie wydano jeszcze jednolitych standardów i regulacji prawnych dotyczących nie tylko samej izolacji, ale również analizy i stosowania EVs.

W związku z tym ich szerokie zastosowanie w praktyce klinicznej, jest w tym momencie nie tylko utrudnione, lecz wręcz niemożliwe ¹⁸³.

W przypadku różnych terapii bezpieczeństwo potencjalnego produktu jest kluczowe. W związku z tym, trzeba mieć więc na uwadze, że EVs mogą zawierać substancje potencjalnie niebezpieczne dla zdrowia, takie jak wirusy lub geny, które mogą wywoływać u pacjentów odpowiedzi immunologiczne (<u>https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/safety-</u> <u>availability-biologics/public-safety-notification-exosome-products</u>; dostęp: 01.01.2025). Niemniej istnieje także ryzyko, że same EVs mogą wywoływać niepożądane reakcje immunologiczne i tym samym trudne do przewidzenia skutki uboczne ¹⁸⁴.

Pod samym kątem produkcyjnym, w przemyśle farmaceutycznym istnieje wiele regulacji i wymagań, które podniosą koszty wytwarzania samych pęcherzyków. Natomiast produkcja EVs obciążonych konkretnym ładunkiem obecnie jest już czasochłonna i kosztowna, co może ograniczać ich dostępność i zastosowanie w praktyce klinicznej. Rozwój bardziej efektywnych i tanich metod produkcji i modyfikacji pęcherzyków jest więc kluczowa dla ich szerokiego wykorzystania ¹⁸⁵.

Kolejnym niezwykle istotnym aspektem jest skuteczność terapeutyczna EVs. Obecnie jest ona jeszcze w trakcie badań, jednak przed ich komercjalizacją niezbędne jest potwierdzenie i udokumentowanie nie tylko skuteczności ich zastosowania, ale również bezpieczeństwa w różnych aplikacjach medycznych ¹⁸⁶. Same dostarczenie EVs w konkretne miejsce ich działania może być trudne w organizmie, zwłaszcza w przypadku głębokich tkanek lub układów narządowych. W związku z tym trzeba mieć na uwadze, że wykorzystanie EVs w praktyce klinicznej prawdopodobnie będzie wymagało zaawansowanych strategii terapeutycznych ^{187,188}.

3. Materiały i metody

3.1. Materiały

3.1.1. Materiał biologiczny

a) mikroorganizmy

Saccharomyces boulardii (obecnie Saccharomyces cerevisiae var. boulardii) CNCM I-745 drożdże probiotyczne ożywione z liofilizatu mikroorganizmów komercyjnie dostępnego w sprzedaży jako lek probiotyczny pod nazwą ENTEROL firmy BICODEX. W niniejszej pracy szczep ten nazywany jest w wersji skróconej jako "Sb".

Komórki tego gatunku przyjmują kształt kulisto-elipsoidalny o średniej wielkości $5,15\pm0,79 \mu m$ w trakcie wzrostu w pożywce pełnej YPD w temp. $37^{\circ}C$ i produkują niewielkie ilości ciałek lipidowych (Rys. 7.).



Rysunek 7. Zdjęcie mikroskopowe preparatu drożdży S. boulardii CNCM I-745, po wybarwieniu ciałek lipidowych (ang. lipid droplets) z wykorzystaniem barwnika Oil Red O (badania własne). Skala 10 µm.

Kluyveromyces marxianus WUT240

drożdże wyizolowane w 2017 roku z próbki mleka klaczy z Kirgistanu, wchodzące w skład kolekcji Katedry Biotechnologii Środków Leczniczych i Kosmetyków, Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej – Warsaw University of Technology Yeast Culture Collection

(<u>https://wutyeastcollection.pw.edu.pl/strain/WUT240</u>). W niniejszej pracy powołując się na ten szczep wykorzystywany jest skrót "WUT240".

Komórki mają kształt elipsoidalny o średniej długości $5,35\pm0,64 \ \mu\text{m}$ oraz szerokości $3,39\pm0,56 \ \mu\text{m}$. Ponadto, w czasie hodowli w pożywce pełnej YPD przy 37° C,



Rysunek 8. Zdjęcie mikroskopowe preparatu drożdży K. marxianus WUT240, po wybarwieniu ciałek lipidowych (ang. lipid droplets) z wykorzystaniem barwnika Oil Red O (badania własne). Skala 10 µm.

charakteryzują się dość wysoką produkcją ciałek lipidowych (Rys. 8.).

Janthinobacterium lividum KP16

bakterie wyizolowałam w 2016 r. z próbki wody zaczerpniętej ze studni głębinowej w Nadarzynie koło Warszawy, Polska. Szczep został zdeponowany w 2024 r. w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (ang. The Polish Collection of Microorganisms, PCM) przy Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu, Polska. Pełna nazwa szczepu zgodna ze zgłoszeniem rejestracyjnym w PCM Janthinobacterium lividum PCM 3520. to W przeprowadzonych badaniach przywoływano ten szczep poprzez formę skróconą "VIO".

Gram-ujemne pałeczki, które w hodowli w ½ LB przy 20°C, mają średnie wymiary: 2,45±0,43 μm długości na 0,53±0,07 μm szerokości (Rys. 9.).



Rysunek 9. Zdjęcie mikroskopowe preparatu bakterii J. lividum PCM 3520, po barwieniu metodą Grama (badania własne). Skala 10 µm.

b) linie komórkowe

НТ-29 (АТСС: НТВ-38 тм)

linia nowotworowych komórek adherentnych o morfologii nabłonkowej (Rys. 10.), wyizolowana z pierwotnego guza pobranego od pacjentki cierpiącej na gruczolakoraka jelita grubego.

Warunki hodowli: 37°C, 5% CO₂ medium McCoy's 5A z 10% FBS i 1% antybiotyków (100 U/mL penicyliny oraz 0,1 mg/mL streptomycyny).



Rysunek 10. Zdjęcie mikroskopowe hodowli komórek HT-29 (badania własne). Skala 100 µm.
НСТ116 (АТСС: ССL-247 ™)

linia nowotworowych komórek adherentnych raka nabłonkowego (Rys. 11.), wyizolowana z próbki pobranej od pacjenta cierpiącego na raka jelita grubego.

Warunki hodowli: 37°C, 5% CO₂ medium McCoy's 5A z 10% FBS i 1% antybiotyków (100 U/mL penicyliny oraz 0,1 mg/mL streptomycyny).

ССD841 CoN (АТСС: CRL-1790 тм)

linia prawidłowych komórek adherentnych o morfologii nabłonkowej (Rys. 12.), wyizolowane z prawidłowej tkanki ludzkiego jelita grubego pobranej od płodu płci żeńskiej w 21. tygodniu ciąży.

Warunki hodowli: 37°C, 5% CO₂ medium MEM z 10% FBS, 1% L-glutaminą (2 mM) i 1% antybiotyków (100 U/mL penicyliny oraz 0,1 mg/mL streptomycyny).

ССD-18Co (ATCC: CRL-1459 тм)

linia prawidłowych komórek adherentnych o morfologii fibroblastów (Rys. 13.), wyizolowana z prawidłowej tkanki jelita grubego pobranej od 2,5-miesięcznej dziewczynki.

Warunki hodowli: 37°C, 5% CO₂ w medium MEM z 10% FBS, 1% L-glutaminą (2 mM) i 1% antybiotyków (100 U/mL penicyliny oraz 0,1 mg/mL streptomycyny).



Rysunek 11. Zdjęcie mikroskopowe hodowli komórek HCT116 (badania własne). Skala 100 µm.



Rysunek 12. Zdjęcie mikroskopowe hodowli komórek CCD841 CoN (badania własne). Skala 100 μm.



Rysunek 13. Zdjęcie mikroskopowe hodowli komórek CCD-18Co (badania własne). Skala 100 μm.

Linie komórek jelitowych zakupione zostały z ATCC (ang. *American Type Culture Collection*), którego dystrybucją na terenie Polski zajmuje się firma LGC, ze środków pozyskanych przez dr hab. Jolantę Mierzejewską, prof. uczelni w ramach grantu BIOTECHMED-2 Advanced.

LUVA (Immortalized Human Mast Cells)

komórki tuczne (mastocyty) o mieszanych właściwościach wzrostu (zarówno zawiesinowe jak i adherentne) (Rys. 14.), uzyskane spontanicznie z nietransformowanych komórek macierzystych układu krwiotwórczego CD34⁺, które hodowano z czynnikiem wzrostu komórek macierzystych oraz interleukinami.



Warunki hodowli: 37°C, 5% CO₂ w medium IMDM z 10% FBS i 1% antybiotyków (100 U/mL penicyliny oraz 0,1 mg/mL streptomycyny).

Rysunek 14. Zdjęcie mikroskopowe hodowli komórek LUVA (badania własne). Skala 100 µm.

Badania na tej linii mogły zostać przeprowadzone i zamieszczone w niniejszej pracy dzięki życzliwości Pani dr inż. Anny Sobiepanek z Katedry Biotechnologii Środków Leczniczych i Kosmetyków, Wydziału Chemicznego, Politechniki Warszawskiej.

3.1.2. Bufory, roztwory i podłoża hodowlane wykorzystywane w pracy:

W poniższej Tabeli 1. Zestawiono składy oraz podstawowe informacje o buforach i mediach wykorzystywanych w pracy.

roztwór	skład / przygotowanie	końcowe stężenie				
EDTA	93,05 g kwasu wersenowego					
pH 8,0	(ang. ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA; E6511,					
	Sigma Aldrich)					
	400 mL wody Mili-Q					
	Wykorzystując 1 M zasadę sodową (NaOH; PA-03-9101-X,					
	POL-AURA) doprowadzono pH roztworu do wartości 8,0.					
	Następnie dopełniono roztwór wodą Mili-Q do 500 mL					
	i poddane sterylizacji za pomocą autoklawu (121°C,					
	20 min). Roztwór przechowywano w RT.					
½ LB	1,25 g podłoża LB Broth (Miller; BioShop), w tym:					
	0,25 g ekstrakt drożdżowy	[0,25%]				
	0,5 g trypton	[0,5%]				
	0,5 g NaCl	[0,5%]				
	100 mL wody Mili-Q					

Tabela 1. Skład i warunki przechowywania buforów, roztworów oraz podłóż hodowlanych wykorzystywanych w metodach badawczych.

¹ / ₂ LB _{agar}	1,25 g podłoża LB Broth (Miller; BioShop), w tym:					
	0,25 g ekstrakt drożdżowy	[0,25%]				
	0,5 g trypton	[0,5%]				
	0,5 g NaCl	[0,5%]				
	2 g agaru mikrobiologicznego (AB03, Biomaxima)	[2%]				
	100 mL wody Mili-Q					
10x bufor do	15,14 g zasady Tris (TRS001.1, BioShop)	[0,25 M]				
elektroforezy	72,00 g glicyny (GLN001.1, BioShop)	[1,92 M]				
i transferu	500 mL wody Mili-Q					
	Przv użyciu 1 M zadady sodowei (NaOH: PA-03-9101-X.					
	POL-AURA) doprowadzono pH buforu do wartości 8,3.					
	Stężony roztwór przygotowywano wcześniej i trzymano					
	w temperaturze pokojowej (ang. room temperature, RT).					
1x PBS	komercyjny bufor 1x PBS (392-0442, VWR)					
50x bufor do	242 g zasady Tris (TRS001.1, BioShop)	[2 M]				
elektroforezy RNA	57,1 mL bezwodnego kwasu octowego (693870115,	[1 M]				
(JUX TAE)	cz.d.a., POCH S.A.)	[50 mM]				
	100 mL 0,5 M EDTA pH 8,0					
	1000 mL wody DEPC					
	Roztwór przechowywano w RT. Przed wykonaniem					
	elektroforezy, bufor rozcieńczano w wodzie DEPC:					
	10 mL 50x TAE (Tris-octan-EDTA)					
	490 mL wody DEPC					
	Końcowe stężenie komponentów w buforze 1xTAE: 40 mM					
	Tris, 20 mM kwas octowy, 1 mM EDTA.	F 40/ 7				
5x bufor nieredukujący do	0,4 g dodecylosiarczanu sodu (ang. <i>sodium dodecyl sulfate</i> , SDS; SDS001.1, BioShop)	[4%]				
elektroforezy	2,5 mg błękitu bromofenolowego (BRO777, EPRO)	[0,01%]				
(zymografia)	2,00 mL 100% glicerolu (114433204, CHEMPUR)	[20%]				
	1,25 mL 1 M Tris-HCl, pH 6,8 (E0270, EURx)	[125 mM]				
	6,75 mL wody Mili-Q					
	Przygotowany bufor podzielono na porcje po 0,5 mL					
	i przechowywano w -20°C.	FO (T]				
AO/P1	0,4 μL 5 mg/mL oranżu akrydyny	$[2 \ \mu g/mL]$				
	2,0 μL 1 mg/mL jodku propidyny	[2 µg/mL]				
	997,6 μL DPBS					
	Mieszaninę barwników przygotowywano tuż przed użyciem					
	i trzymano w ciemności.					
APS	1 g nadsiarczanu amonu (ang. <i>ammonium persulfate</i> , APS;	[10%]				
	A3678, Sigma Aldrich)					
	10 mL wody Mili-Q					

	Rozpuszczono 1 g APS w 10 mL wody Mili-Q i intensywnie mieszano na worteksie. Następnie przygotowany roztwór					
	podzielono po 200 μL do probówek 1,5-mL typu Eppendorf i przechowywano w -20°C.					
błękit trypanu	40 mg błękitu trypanu (T0887, Sigma Aldrich) 10 mL wody Mili-Q					
	Po rozpuszczeniu roztwór filtrowano przez filtr PES o porach 0,2 μm i przechowywano w RT.					
BSA	10 mg surowiczej albuminy bydlęcej (ang. <i>bovine serum albumin</i> , BSA; ALB001.100, BioShop) 1 mL DPBS	[10 mg/mL]				
	Albuminę rozpuszczono w DPBS poprzez delikatne pipetowanie góra-dół, aby nie spienić roztworu. Roztwór przechowywano w -20°C.					
	Rozcieńczenia robocze roztworu do krzywej standardowej (oznaczanie stężenia białek w próbkach) przygotowywano tuż przed użyciem poprzez odpowiednie rozcieńczenie w buforze RIPA.					
bufor do elektroforezy	100 mL 10x buforu do elektroforezy i transferu	[250 mM Tris, 192 mM glicyna]				
	10 mL 10% SDS 890 mL wody Mili-Q	[0,1%]				
bufor do inkubacji	2,50 mL Tritonu X-100 (TRX506.500, BioShop)	[1%]				
i aktywacji	12,50 mL 1 M Tris-HCl, pH 7,5 (E0272, EURx)	[50 mM]				
elektroforezie	$625 \ \mu\text{L} 2 \ \text{M} \ \text{CaCl}_2$	$\begin{bmatrix} 5 & \mathbf{IIIVI} \end{bmatrix}$				
w zymografii	234.37 mL wody Mili-O					
bufor do transferu	Bujor przygotowywano tuz przed uzyciem. 100 mL 10x buforu do elektroforezy i transferu	[250 mM				
białek z żelu	100 mL 10x bulord do clekuororezy i transferd	Tris, 192				
poliakrylamidowego		mM				
na membranę	200 mL alkoholu metylowego (621990110, cz.d.a., POCH S.A.)	glicyna] [20%]				
	700 mL wody Mili-Q					
bufor płuczący do	6,25 mL 100% Tritonu X-100 (TRX506.500, BioShop)	[2,5%]				
zymografii	12,50 mL 1 M Tris-HCl, pH 7,5 (E0272, EURx)	[50 mM]				
	$625 \ \mu L \ 2 \ M \ CaCl_2$	[5 mM]				
	230,62 mL wody Mili-Q	[լ առոլ]				
	Bufor przygotowywano tuż przed użyciem.					
bufor RIPA	0,6 mg chlorku sodu (S9625, Sigma Aldrich)	[0,006%]				
	1,8 mg ortowanadianu sodu (567540, Sigma Aldrich)	[0,018%]				

	25,0 mg deoksycholanu sodu (ang. desoxycholic acid	[0,25%]			
	sodium salt, DOC; 264101, Sigma Aldrich)				
	0,5 mL 1 M Tris-HCl pH 7,6 (ROCKMB-003, VWR)				
	0,1 mL Nonidetu P-40 (NP-40; 56741, Sigma Aldrich)				
	20 µL 0,5 M EDTA pH 8,0				
	9,38 mL wody Mili-Q				
	Tuż przed użyciem do buforu dodawano inhibitory proteaz				
	(SigmaFAST Protease Inhibitor Coctail Tablet, EDTA free;				
	S8830, Sigma Aldrich), do końcowego stężenia 1%.				
chlorek cynku	13,6 mg ZnCl ₂ (208086, Sigma Aldrich)	[0,1 M]			
	1 mL wody Mili-Q				
	Przygotowany roztwór podzielono na 0,2-mL porcje				
	i zamrożono w -20°C.				
chlorek wapnia	333 mg CaCl ₂ (C1016, Sigma Aldrich)	[2M]			
-	1,5 mL wody Mili-Q				
	Przygotowywany zawsze tuż przed użyciem				
dcFDA	609.11 mg dcFDA (ang. 2'.7'-dichlorofluorescin	[25 mM]			
	<i>diacetate</i> ; 287810, Sigma Aldrich)				
	50 mL DMSO (363550117, POCH S.A.)				
	Roztwor podzielono na mniejsze porcje i przechowywano w -20°C.				
	Tuż przed użyciem roztwór rozcieńczano do 10 µM				
	w odpowiednim czystym medium hodowlanym.				
DiO	1 mg nadchloranu 3,3'-dioktadecyloksakarbocyjaniny	[1,13 M]			
	(ang. 3,3'-dioctadecyloxacarbocyanine perchlorate, DiO;				
	MERCK)				
	1 mL DMSO (363550117, POCH S.A.)				
	Roztwór przechowywano w 4°C.				
DOC	15 mg deoksycholanu sodu (ang. desoxycholic acid sodium	[0,15%]			
	salt, DOC; 264101, Sigma Aldrich)				
	10 mL wody Mili-Q				
	Po przygotowaniu roztwór, w probówce szczelnie owinietej				
	parafilmem, przechowywano w 4°C.				
doksorubicyna	5 mg chlorowodorku doksorubicyny (ang. <i>doxorubicin</i> ,	[4 mg/mL]			
	DOX; PA-03-4969-A, POL-AURA)				
	1,25 mL sterylnej wody Mili-Q				
	6 mg chlorowodorku doksorubicyny (PA-03-4969-A,	[2 mg/mL]			
	POL-AURA)				
	3 mL sterylnej wody Mili-Q				
	Roztwory doksorubicyny podzielono na ok. 0,4-mL porcje				
	i przechowywano w ciemnych 1,5-mL probówkach, w 4°C.				
1xDPBS	10 mL 10x DPBS (sól fizjologiczna buforowana				
	fosforanem Dulbecco, 392-0440, VWR)				
	90 mL sterylnej wody Mili-Q				

DPBST	100 mL 10x DPBS (392-0440, VWR)					
	1 mL Tweenu 20 (655204, MERCK)	[0,1%]				
	900 mL wody Mili-Q					
DTT	23,2 mg ditiotreitolu (ang. <i>dithiothreitol</i> , DTT; 2010,					
	A&A Biotechnology)					
	1,5 mL wody Mili-Q					
	Post vín internet miss miss ma 20 ml mohímot terre					
	Roziwor iniensywnie mieszano w 2,0-mL probowce typu Enpendorf a nastepnie podzielono na porcie					
	i przechowywano w -20°C.					
dwuoctan	5 mg dwuoctanu fluoresceiny (ang. fluorescein diacetate,	[5 mg/mL]				
fluoresceiny	FDA; F7378, Sigma Aldrich)					
	1 mL acetonu (102480411, POCH S.A.)					
	Roztwór przechowywano w -20°C.					
FDA/Pi	2,4 µL 5 mg/mL dwuoctanu fluoresceiny	[8 µg/mL]				
	4,5 μL 1 mg/mL jodku propidyny	[3 µg/mL]				
	1493,1 μL DPBS					
	Mieszanine barwników przygotowywano tuż przed użyciem					
	i trzymano w ciemności.					
fiolet krystaliczny	0,25 g fioletu krystalicznego (ang. crystal violet, CV;	[0,05%]				
	C0775, Sigma Aldrich)					
	5 mL alkoholu metylowego (621990110, cz.d.a.;					
	POCH S.A.)					
	495 mL wody Mili-Q					
	Po roznuszczeniu fioletu, roztwór przefiltrowano przez					
	membrane PES o porach 0,45 µm i przechowywano w RT.					
fiolet krystaliczny do	komercyiny roztwór fioletu krystalicznego do barwienia					
barwienia Grama	met. Grama (20201304, KOLCHEM)					
COL	Roztwor przechowywano w R1.	[150] VI				
GSH	46,09 mg glutationu (ang. <i>glutathion</i> , GSH; G6013, Sigma	[150 mM]				
	Aldrich) 1 mL wody Mili O					
	T IIIL wody WIII-Q					
	Roztwór przechowywano w 4°C przez okres do 3 tygodni.					
	Roztwór rozcieńczano do 5 mM tuż przed użyciem					
	w odpowiednim pełnym medium hodowlanym.					
Hoechst33342	komercyjny roztwór Hoechst33342 (H3570, Invitrogen)					
	Roztwór przechowywano w 4°C. a tuż przed użyciem					
	rozcieńczano go DPBS do stężenia 0,5 μg/mL.					
IMDM ⁺	89 mL IMDM (L0190-500, Biowest)	[89%]				
	10 mL FBS (10270-106, Gibco)	[10%]				
	1 mL roztworu penicyliny-streptomycyny (P4333-100ML,	[1%]				
	Sigma Aldrich)					

jodek propidyny	1 mg jodku propidyny (PPI777, EPRO)				
	1 mL wody Mili-Q				
	Roztwór przechowywano w 4°C.				
McCoy's 5A ⁺	89 mL McCov's 5A (L0210-500, Biowest)				
	10 mL FBS (10270-106, Gibco)	[10%]			
	1 mL roztworu penicyliny-streptomycyny (P4333-100ML,	[1%]			
	Sigma Aldrich)				
MEM ⁺	88 mL MEM (L0430-500, Biowest)	[88%]			
	10 mL FBS (10270-106, Gibco)	[10%]			
	1 mL roztworu penicyliny-streptomycyny (P4333-100ML,	[1%]			
	Sigma Aldrich)	54.04.7			
	1 mL roztworu L-glutaminy (25030-081, Gibco)	[1%]			
mieszanina do	5 mL acetonu (111024800, CHEMPUR)				
rozdziału TLC	5 mL chloroformu (112344305, CHEMPUR)				
	50 μL 25% amoniaku (111349637, CHEMPUR)				
	Aceton, chloroform i amoniak zmieszano ze soba				
	w stosunku 1: 1: 0,01. Mieszaninę przechowywano				
	w ciemnej, szczelnie zamkniętej i zabezpieczonej				
	parafilmem butelce.	/			
MTT	5 mg bromku 3-(4,5-dimetylo-2-tiazolilo)-2,5-difenylo- 2H-tetrazoliowego (ang. (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazolium bromide). MTT: 158990050. Sigma				
	Aldrich)				
	1 mL DPBS				
nadtlenek wodoru	30 mL 30% nadtlenku wodoru (118851934, CHEMPUR)	[3%]			
	270 mL wody Mili-O				
	Dokiaanie wymieszano zawartosc buteiki, roztworu				
	kwasów nukleinowych (maksymalnie 3-krotnie) gotowy				
	roztwór przechowywano w 4°C.				
Nile Red	2,5 mg Nile Red (7726, Carl Roth GmbH + Co. KG)	[2,5			
	1 mL acetonu (102480411, POCH S.A.)	mg/mL]			
	Podezas hamujania nozojehozono stażony hamunik				
	Pouczus barwieniu rozcienczono sięzony barwnik 26-krotnie poprzez zmieszanie so z barwiona próbka FVs				
	$(100 \ \mu L \ probki \ EVs + 4 \ \mu L \ 2.5 \ mg/mL \ Nile \ Red).$				
NP-40	0,1 mL Nonidetu P-40 (NP-40; 56741, Sigma Aldrich)	[10%]			
	0,9 mL wody Mili-Q				
Oil Red O	10 mg Oil Red O (O0625, Sigma Aldrich)	[1%]			
	10 mL alkoholu izopropylowego (751500111, cz.d.a.;				
	POCH S.A.)				
	Tuż przed użyciem alkoholowy roztwór Oil Red O mieszano				
	z wodą Mili-Q w stosunku 3:2 i przefiltrowano przez				
	membrane $PES 0,2 \mu m$.				

oranż akrydyny	5 mg oranżu akrydyny (ang. <i>acridine orange</i> , AO; A6014, Sigma Aldrich) 1 mJ. wody Mili-O					
	Roztwór przechowywano w 4°C					
naraformaldehvd	10 a paraformaldahudu (8,18715, Siama Aldrich)					
paratormatucityu	10 g paratornadenydu (8.16713, Sigina Aldrich)	[10/0]				
	Roztwór przygotowywano w 60°C mieszając go na mieszadle magnetycznym przez 30 min. Następnie porcjowano go i przechowywano w 4°C. Tuż przed użyciem rozcieńczano roztwór przy użyciu DPBS do uzyskania końcowego steżenia paraformaldehvdu 3.7%.					
PEG6000	10 g glikolu polietylenowy 6000 (ang. polyethylene glycol	[20%]				
	with an average molecular weight of 6000, PEG6000;					
	81260, Sigma Aldrich)					
	50 mL DPBS					
	Po całkowitym rozpuszczeniu PEG6000 w DPBS, roztwór					
	przefiltrowano przez membranę PES 0,2 μm					
DIIII (5	<i>i przechowywano w 4°C.</i>	[1] NO				
РКН67	(MINI67, Sigma Aldrich)					
	Komercyiny roztwór przechowywano w 4°C					
płyn Lugola (jodyna)	a) roztwór wodny jodu; synonim: Płyn Lugola (1 g płynu					
	zawiera: jod – 10 mg, jodek potasu – 20 mg)					
	(EAN: 5909990011698, Wytwórnia Euceryny Laboratorium Farmaceutyczne "COEL")					
	Roztwór przechowywano w RT.					
rozdzielający żel	1,145 mL wody Mili-Q					
poliakrylamidowy	1,250 mL 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 (CHMP15TRIS8.8,	[375 mM]				
do SDS-PAGE	VWR)					
	2,500 mL 30% Akrylamid/Bis-akrylamid (37,5:1)	[15%]				
	(ACR010.300, BioSnop)	[0.1%]				
	0.050 mL 10% SDS	[0,1%]				
	0.005 mL N N N' N'-tetrametyloetylenodiamina (ang	[0,1%]				
	<i>N.N.N'.N'-tetramethylethylenediamine</i> , TEMED: T9281.	[0,0170]				
	Sigma Aldrich)					
zagęszczający żel	1,405 mL wody Mili-Q					
poliakrylamidowy	0,625 mL 0,5 M Tris-HCl pH 6,8 (AB355082, Linegal	[125 mM]				
do SDS-PAGE	Chemicals)					
	0,417 mL 30% Akrylamid/Bis-akrylamid (37,5:1) (ACR010.500, BioShop)	[3%]				
	0,025 mL 10% SDS	[0,1%]				
	0,025 mL 10% APS	[0,1%]				
	0,003 mL TEMED (T9281, Sigma Aldrich)	[0,01%]				

	Podano ilości odoznaników wystarozają na wylanie 1 żelu	
	rodane llosci odczynników wystarczają na wytanie i zelu o gwybaści 0 1 cm w litówym 725 75.0% objętości	
	0 grudosci $0,1$ cm, w kiorym $72,5 - 75,0\%$ 00jęlosci $(4.25 - 4.40 \text{ mL})$ stanowi żel voz dzielający	
	(4,25 – 4,40 mL) stanowi zei rozuzielający. Zmontowano układ do uplawania żeli poliakmiamidownych	
	Zmoniowano układ do wylewania zeli poliakrylamidowych. Tuż pyzad wylaniem żeli zmieszano jeh składujki (opyćez	
	ADS and TEMED) i delikataje vyvnicazane popuzor	
	APS oraz TEMED) i delikalnie wymieszano poprzez	
	Vagtoppie dodano APS oraz TEMED i w top sam sposóh	
	Nasiępnie dodano APS oraz TEMED i w ien sam sposoo	
	wymieszano składniki. Między oczyszczone i odłuszczone	
	szkietka wytano zel rozazietający, nasiępnie delikalnie	
	i powoli halano na niego ok. 0,3-cm warsiwę alkonolu	
	izopropylowego. Pozoslawiono ukiaa na ok. 50 min w K1, aby żal spolimanyzował Nastapnia zlano alkohol	
	uby zei sponneryzował. Nasiępnie ziano alkonol	
	i osuszono brzegi szkierek ręcznikiem pupierowym. Przygotowano żel zageszczający w ten sam sposób co żel	
	1 rzygołowano zel zugęszczujący, w len sum sposob co zel	
	wczesniej i wytuno uo nu już spolineryżowany zel rozdzielający. W układzie umieszczono także senarator	
	tworzący studzienki żely Ilkład ponownie pozostawiono	
	w RT na ok 30 min. Po spolimeryzowaniu żel można było	
	wykorzystać od razu do rozdziału elektroforetycznego	
	higher lub zawingć w recznik papierowy zwilżony woda	
	Mili-O i przechowywać w woreczky strunowym w 4°C	
	przez maksymalnie 2 dni.	
rozdzielajacy żel	0.728 mL wody Mili-O	
poliakrylamidowy	1 250 mL 1 5 M Tris-HCl pH 8 8 (CHMP15TRIS8 8	[375 mM]
do zymografii	VWR)	[0,0]
	1,667 mL 30% Akrylamid/Bis-akrylamid (37,5:1)	[10%]
	(ACR010.500, BioShop)	
	1,250 mL 4 mg/mL żelatyny	[1 mg/mL]
	0,050 mL 10% SDS	[0,1%]
	0,050 mL 10% APS	[0,1%]
	0,005 mL TEMED (T9281, Sigma Aldrich)	[0,01%]
zageszczający żel	1,489 mL wody Mili-Q	
poliakrylamidowy	0.625 mL 0.5 M Tris-HCl pH 6.8 (AB355082, Linegal	[125 mM]
do zymografii	Chemicals)	. ,
	0.333 mL 30% Akrylamid/Bis-akrylamid (37.5:1)	[4%]
	(ACR010.500, BioShop)	
	0.025 mL 10% SDS	[0,1%]
	0.025 mL 10% APS	[0.1%]
	0.002 mL TEMED (T0221 Sigma Aldrich)	[0,01%]
	0,003 IIIL TEIVIED (19201, SIgilia Aluficii)	[0,01/0]
	Podane ilości odczynników wystarczają na wylanie 1 żelu	
	o grubości 1 mm, w którym 72,5 – 75,0% objętości	
	(4,25 – 4,40 mL) stanowi żel rozdzielający.	

	Zmontowano układ do wylewania żeli poliakrylamidowych.	
	Tuż przed wylaniem żeli zmieszano ich składniki (oprócz	
	APS oraz TEMED) i delikatnie wymieszano poprzez	
	odwracanie probówki (bez spieniania zawartości).	
	Następnie dodano APS oraz TEMED i w ten sam sposób	
	wymieszano składniki. Między oczyszczonymi	
	i odtłuszczonymi płytkami szklanymi umieszczono warstwę	
	żelu rozdzielającego, a na nią powoli nalano ok. 5-mm	
	warstwę alkoholu izopropylowego. Pozostawiono układ na	
	ok. 30 min w RT, aby żel spolimeryzował. Następnie	
	usunięto alkohol i osuszono brzegi płytek szklanych	
	ręcznikiem papierowym. Przygotowano mieszaninę żelu	
	zagęszczającego, w ten sam sposób co wcześniej	
	i umieszczono ją na już spolimeryzowanym żelu	
	rozdzielającym. W warstwie zagęszczającej umieszczono	
	także grzebień tworzący studzienki w żelu. Układ ponownie	
	pozostawiono w RT na ok. 30 min. Po spolimeryzowaniu,	
	żel można było wykorzystać od razu do rozdziału	
	elektroforetycznego białek lub odpowiednio zabezpieczony	
	przed utrata wilgoci, przechować w 4°C przez	
	maksymalnie 2 dni.	50 10/1
roztwór barwiący do	0,1 g błękitu brylantowego Coomassie R-250	[0,1%]
membrany po	(CBB250.100, BioShop)	F 400 ()
transferze	40 mL alkoholu metylowego (621990110, cz.d.a.,	[40%]
	POCH S.A.)	F10/ J
	1 mL kwasu octowego (568760114, cz.d.a., POCH S.A.)	[1%]
	59 mL wody Mili-Q	
roztwór barwiący do	0,5 g błękitu brylantowego Coomassie R-250	[0,5%]
zymografii	(CBB250.100, BioShop)	E 400/ J
	40 mL alkoholu metylowego (621990110, cz.d.a., POCH S.A.)	[40%]
	10 mL kwasu octowego (568760114, cz.d.a., POCH S.A.)	[10%]
	50 mL wody Mili-O	
roztwór barwiacy do	0.25 g błekitu brylantowego Coomassie R-250	[0.25%]
żeli	(CBB250.100, BioShop)	[-, -,]
poliakrylamidowych	40 mL alkoholu metylowego (621990110, cz.d.a.,	[40%]
po elektroforezie	POCH S.A.)	
	10 mL kwasu octowego (568760114, cz.d.a., POCH S.A.)	[10%]
	50 mL wody Mili-Q	
roztwór	200 mL alkoholu metylowego (621990110, cz.d.a.,	[40%]
odbarwiający do	POCH S.A.)	
zymografii	50 mL kwasu octowego (568760114, cz.d.a., POCH S.A.)	[10%]
	250 mL wody Mili-Q	
roztwór	225 mL alkoholu metylowego (621990110, cz.d.a.,	[45%]
odbarwiający do żeli		-
	POCH S.A.)	
poliakrylamidowych	POCH S.A.) 50 mL kwasu octowego (568760114, cz.d.a., POCH S.A.)	[10%]

roztwór żelatyny	6,0 mg żelatyny (EAN: 5900552000365, Gellwe) 1,5 mL wody Mili-Q			
	Roztwór przygotowano tuż przed użyciem, poprzez podgrzewanie żelatyny w mikrofali. Co ok. 5 sek mieszano zawartością probówki, aż do momentu całkowitego rozpuszczenia żelatyny. Nie dopuszczono do zagotowania próbki.			
sacharoza	1,37 g sacharozy (A3935, AppliChem GmbH) 10 mL wody Mili-Q	[400 mM]		
	Po rozpuszczeniu roztwór przefiltrowano przez membranę PES o porach 0,2 μm i przechowywano w 4°C.			
safranina	komercyjny roztwór Safraniny O – roztwór do mikroskopii (30201308, KOLCHEM)			
	Roztwór przechowywano w RT.			
SDS	10 g dodecylosiarczanu sodu (ang. <i>sodium dodecyl sulfate</i> , SDS; SDS001.1, BioShop) 100 mL wody Mili-Q	[10%]		
	Rozpuszczono 10 g SDS w 70 – 80 mL wody Mili-Q, podgrzano roztwór do 70°C i mieszano do całkowitego rozpuszczenia SDS. Następnie dopełniono roztwór wodą Mili-Q do końcowej objętości 100 mL. Przygotowany roztwór przechowywano w RT.			
t-BHP	25 μL 70% wodoronadtlenku tert-butylu (ang. <i>tert-Butyl hydroperoxide</i> , t-BHP; 458139, Sigma Aldrich)	[50 mM]		
	Roztwór przechowywano w 4°C przez okres do 3 tygodni. Rozcieńczenie robocze roztworu (100 μM) przygotowywano tuż przed użyciem poprzez rozcieńczenie w odpowiednim pełnym medium hodowlanym.			
TCA	5g kwasu trichlorooctowego (ang. <i>trichloroacetic acid</i> , TCA; PA-03-7416-K, POL-AURA) 5 mL wody Mili-Q	[100%]		
	23 mL 100% TCA (PA-03-7416-K, POL-AURA) 27 mL wody Mili-Q	[46%]		
	Roztwory przechowywano w 4°C w szczelnie zamkniętej i zabezpieczonej parafilmem 50-mL probówce.			
woda DEPC	0,5 mL pirowęglanu dietylu (ang. <i>diethylpyrocarbonate</i> , DEPC; DEP001.50, BioShop) 500 mL wody Mili-Q	[0,1%]		
	Dokładnie wymieszano zawartość butelki i 2-krotnie poddano wodę sterylizacji za pomocą autoklawu (121°C, 20 min).			

YPD	1 g ekstraktu drożdżowego (PB06, Biomaxima)			
	2 g peptonu bakteriologicznego (PB01, Biomaxima)	[2%]		
	2 g D-glukozy (GLU501.1, BioShop)	[2%]		
	100 mL wody Mili-Q			
YPDagar	1 g ekstraktu drożdżowego (PB06, Biomaxima)	[1%]		
	2 g peptonu bakteriologicznego (PB01, Biomaxima)	[2%]		
	2 g D-glukozy (GLU501.1, BioShop)	[2%]		
	2 g agaru mikrobiologicznego (AB03, Biomaxima)	[2%]		
	100 mL wody Mili-Q			
żel agarozowy do	0,2 g agarozy (BIO STANDARD, PRONA)	[1%]		
elektroforetycznego	19,6 mL wody DEPC			
rozdziału RNA	0,4 mL 50x TAE			
	Do 50-mL probówki wirówkowej typu Falcon, odważono agarozę i wlano 20 mL świeżo przygotowanego buforu 1xTAE. Żel podgrzewano w mikrofali aż do momentu całkowitego rozpuszczenia agarozy. Po przestudzeniu roztworu do ok. 60°C dodano 1 µL 10 mg/mL bromku etydyny (ang. Ethidium Bromide, EtBr; ETB444.1, BioShop) i delikatnie wymieszano. Następnie wylano roztwór na uprzednio wymoczone w 3% roztworze H ₂ O ₂ i osuszone saneczki, a w roztworze umieszczono tzw. grzebień tworzący dołki. Po zastygnięciu agarozy, grzebień został usunięty i zalewano żel świeżo przygotowanym buforem 1xTAE.			

3.1.3. Startery do qPCR:

W Tabeli 2. zestawiono sekwencje oraz dane dotyczące starterów wykorzystywanych podczas qPCR. Większość par starterów została wybrana z bazy PrimerBank (<u>https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/index.html</u>; dostęp: 01.01.2025) zgodnie z poniższymi kryteriami:

- długość sekwencji starterów: 18 30 nukleotydów,
- temperatura topnienia starterów: 60 64°C oraz różnica w temperaturze topnienia w obrębie pary starterów < 2°C,
- zawartość par GC w sekwencji: 35 65% oraz brak regionów składające się z 4⁺ następujących po sobie reszt G,
- wielkość produktu (amplikonu): 70 150 nukleotydów.

Tabela 2. Zestawienie informacji dotyczących starterów wykorzystywanych w trakcie badań, w przypadku, gdy para starterów została wybrana z bazy PrimerBank w nawiasie, pod nazwą celu molekularnego, wpisano numer indentyfikacyjny z bazy.

cel molekularny	starter	sekwencja (5' → 3')	GC [%]	T _m [°C]	amplikon [nt]
	Fw	AGGGCTGCTTTTAACTCTGGT	47,6	62,7	206
GAPDH	Rv	CCCCACTTGATTTTGGAGGGA	52,4	63,1	200
MMP-2	Fw	TACAGGATCATTGGCTACACACC	47,8	61,7	00
(ID: 189217851c1)	Rv	GGTCACATCGCTCCAGACT	57,9	61,1	90
MMP-9	Fw	TGTACCGCTATGGTTACACTCG	50,0	61,5	07
(ID: 74272286c1)	Rv	GGCAGGGACAGTTGCTTCT	57,9	61,9	97
TIMP1 (ID: 73858576c1)	Fw	CTTCTGCAATTCCGACCTCGT	52,4	62,4	70
	Rv	ACGCTGGTATAAGGTGGTCTG	52,4	61,3	79
TIMP2 (ID: 73858577c2)	Fw	GCTGCGAGTGCAAGATCAC	57,9	61,5	100
	Rv	TGGTGCCCGTTGATGTTCTTC	52,4	62,9	109
TIMP3 (ID: 75905820c1)	Fw	CATGTGCAGTACATCCATACGG	50,0	60,8	100
	Rv	CATCATAGACGCGACCTGTCA	52,4	61,6	100

^ Fw – od ang. *Forward primer*

^^ Rv – od ang. Reverse primer

3.2. Aparatura:

Aparat do wizualizacji żeli i	G:BOX Chemi XT4 (Syngene) wraz z oprogramowaniem		
membran	GenSys, wersja 1.4.3.0		
Cieplarka stacjonarna	Heratherm IMC18l, Thermo Scientific		
Cytometr przepływowy	FACSVerse, BD z oprogramowaniem BD FACSuite,		
(Zakład Immunologii, Wydział Biologii	wersja 1.2.; wraz z komputerem z oprogramowaniem		
Uniwersytetu Warszawskiego)	FCAP Array wersja 3		
Czytnik płytek wielodołkowych	Synergy H4 Hybrid plate reader (BioTek Instruments)		
	z oprogramowaniem Gen5, wersja 3.09.		
DLS	ZETASIZER Nano series, Nano - ZS wraz		
	z oprogramowaniem Zetasizer Software, wersja 7.12.		
Inkubator do hodowli linii	HF90 Heal Force		
komórkowych z podłączeniem			
CO ₂			

Inkubator mikrobiologiczny z	SI-600R, Lab Companion		
wytrząsaniem			
Inkubator stacjonarny	BD53, BINDER		
Kołyska laboratoryjna	Rocker-Shaker MR-12, bioSan		
Komora laminarna	Mars 1200, Scanlaf		
Lodówko-zamrażalka	CANDY		
Mikroskop fluorescencyjny	Nikon Eclipse Ni z kamerą oraz oprogramowaniem NIS		
	Elements Basic Research, wersja 5.30.04		
Mikroskop odwrócony	OLYMPUS CKX41 z kamerą OLYMPUS S.C.50 oraz		
	oprogramowaniem cellSens Standard 2.1		
Miniciemnia z lampami UV	CN-6, VILBER; z lampą 254 nm oraz 365 nm		
NTA	NanoSight Pro, Malvern Panalytical Ltd.		
	z oprogramowaniem NS XPLORER v 1.1.0.6 i pompą		
	strzykawkową Malvern OEM Module 986778, Harvard		
	Apparatus		
Pompa próżniowa	LABOPORT N 810.3 FT.18, KNF Neuberger		
Skaningowo-transmisyjny	Hitachi SU8230		
mikroskop elektronowy, STEM			
(Dział Diagnostyki Medycznej, Centrum			
Zaawansowanych Materiałów i			
Technologii CEZAMAT Politechniki			
Warszawskiej)			
Spektrofluorymetr	JASCO FP-88550 wraz z termostatem cyrkulacyjnym		
	CD-200F, Julabo oraz oprogramowaniem Spectra		
	Manager wersja 2.5.		
Spektrofotometr	SPECORD 200 Plus, Analytik Jena AG		
	z oprogramowaniem WinASPECT PLUS, wersja 4.2.0.0.		
Spektrofotometr UV/VIS do	NanoDrop OneC, Thermo Scientific; oprogramowanie		
mikroobjętości	wersja 2.2.0.16		
Suszarka laboratoryjna	OV2, Biometra		
System LC-MS	Evosep One (Evosep Biosystems) sprzężony ze		
(Środowiskowej Pracowni Spektrometrii	<i>i</i> spektrometrem mas Orbitrap Exploris 480 (Thermo Fisher		
Mas, Instytut Biochemii i Biofizyki	Scientific) poprzez źródło jonów Flex nanoESI (Thermo		
Państwowej Akademii Nauk)	Scientific)		

Termoblok	Dry Block Thermostat Bio TDB-100, bioSan				
Termocykler do real-time PCR	CFX Opus 96 Real-Time PCR System, BIO-RAD				
	z oprogramowaniem Bio-Rad CFX Maestro 2.2				
	(5.2.008.0222)				
Transmisyjny mikroskop	JEM 1400, JEOL Ltd.				
elektronowy, TEM					
(Pracownia Mikroskopii Elektronowej,					
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M.					
Nenckiego Polskiej Akademii Nauk)					
Urządzenie do elektroporacji	MicroPulser Electroporator, BIO-RAD				
Urządzenie do obrazowania	Fluorescent Cell Imager ZOE Fluorescent Cell Imaging				
komórek	System, Bio-Rad				
	CELLOGER NANO (jasne pole, fluorescencja zielona,				
	4X), CURIOSIS				
Wirówka	Centrifuge 5804R, Eppendorf D2012 plus, Chemland miniSpin, Eppendorf MPW-351R, MPW				
	MPW-56, MPW				
Wirówka do ExoDISC	ExoDiscovery, LabSpinner				
Worteks	Multi-Vortex V-32, bioSan				
	MX-S, Chemland				
	D-6012, neoLab				
	SU1900, sunlab				
Wyparka	Laborota 4000, Heidolph z pompą próżniową: PL-2, AGA				
	LABOR				
Wytrząsarka do płytek	Mini-Shaker PSU-2T, bioSan				
wielodołkowych					
Wytrząsarka laboratoryjna	KS 4000 ic control, IKA				
Zamrażalka niskotemperaturowa	ULT 70086, Infrico medcare				
Zestaw do elektroforezy i	Mini-PROTEAN® Tetra Cell, Mini Trans-Blot® Module				
transferu	z zasilaczem PowerPac™ HC Power Supply (1658035,				
	BIO-RAD)				

Zestaw do Slot-blot	aparat Bio-Dot SF (1706542, BIO-RAD) wraz z pompą				
	próżniową LABOPORT N 810.3 FT.18 (KNF Neuberger)				
Zestaw do elektroforezy kwasów	Mupid-One Electrophoresis System, ADVANCE				
nukleinowych					
Zestaw do wysokosprawnej	Network Chromatography Interface NCI 900, PE				
chromatografii cieczowej	NELSON; 785A UV/VIS Detector, PERKIN ELMER;				
(HPLC)	Series 200 Pump, PERKIN ELMER; 600 Series LINK,				
	PE NELSON wraz z oprogramowaniem: TotalChrom				
	Workstation (TCNav) wersja 6.3.2, PerkinElmer Inc.				

3.3.Metody:

3.3.1. Hodowle mikroorganizmów:

Hodowlę drożdży (Sb oraz WUT240) rozpoczęto od wysiania mikroorganizmów, z banku szczepów przechowywanego w -80°C, na płytki ze stałym podłożem agarowym YPD. Następnie inkubowano je przez 24 h w 37°C. Po tym czasie szalki przechowywano w 4°C, przez okres do 1 miesiąca.

Hodowle wgłębne drożdży prowadzono przez zaszczepienie 10 mL płynnego medium YPD, pojedynczą kolonią drożdżową pobraną, w warunkach sterylnych, z szalki. Hodowle prowadzono przez 16 – 24 h w 37°C, w inkubatorze z wytrząsaniem 240 rpm.

W przypadku bakterii *J. lividum* materiał z fiolek przechowywanych w -80°C wysiewano na podłoże $\frac{1}{2}$ LB_{agar} i umieszczano na 5 dni w 20°C. Po tym czasie szalki przechowano w warunkach chłodniczych. Natomiast hodowlę płynną w 100 mL medium $\frac{1}{2}$ LB prowadzono poprzez zaszczepienie pożywki pojedynczą kolonią i inkubacją przez 2 – 5 dni w 20°C przy wytrząsaniu 120 rpm.

Hodowlę bakterii na inokulum produkcyjne prowadzono w 20 mL medium ½ LB umieszczonych w 300-mL kolbie Erlenmeyer'a. Trwała ona 2 dni (20°C, wytrząsanie 110 rpm), po których wymieszano hodowlę z glicerolem (osiągając końcowe stężenie 17%). Otrzymaną mieszaninę podzielono na kriofiolki po 1,5 mL zawiesiny w każdej i zamrożono w -80°C.

3.3.2. Hodowle linii komórkowych:

Linie komórkowe hodowano w dedykowanych dla nich mediach z 10% dodatkiem surowicy i 1% antybiotyków (penicyliny oraz streptomycyny) w inkubatorze utrzymującym stałe warunki (37°C, 5% CO₂ oraz 95% wilgotności). Rutynowe pasaże wykonywano, gdy hodowle osiągały ok. 80 - 90% konfluencji. Wtedy odbierano zmetabolizowane medium hodowlane, komórki przemywano sterylnym DPBS (bez jonów wapnia i magnezu) i odklejano od powierzchni naczyń hodowlanych z wykorzystaniem 0,25% trypsyny (25200072, Gibco) (ok. 5 min, 37°C). W przypadku komórek LUVA odebrane medium poddawane było wirowaniu $(5 \text{ min}, 200 \times g)$ i połączone z komórkami, które zostały zebrane z naczynia hodowlanego. Neutralizację trypsyny przeprowadzano poprzez dodanie pełnego medium hodowlanego w objętości równej ilości dodanego enzymu. Zawiesinę komórek przeniesiono do probówki wirówkowej i poddano wirowaniu (5 min, $200 \times g$) w celu oddzielenia biomasy komórkowej. Następnie komórki zawieszano w DPBS, w celu wyznaczenia ich ilości, a zawiesinę ponownie Liczbę komórek obliczano poddawano wirowaniu. wykorzystując komorę hemocytometryczną, w której umieszczano zawiesinę komórek wymieszaną 1:1 z 0,4% błękitem trypanu (barwi komórki martwe na niebiesko). W celu wyznaczenia liczby komórek i ich żywotności korzystano z poniższych wzorów (1) oraz (2).

$$liczba \ komórek = \frac{liczba \ komórek \ 2ywych}{liczba \ pól} \cdot 10^4 \cdot 2 \cdot rozcieńczenie \cdot V \tag{1}$$

- 10⁴ mnożnik umożliwiający przeliczenie gęstości komórek z 1 μL na 1 mL
- 2 uwzględnienie rozcieńczenia 1:1 z błękitem trypanu
- *rozcieńczenie* krotność ewentualnego rozcieńczenia próbki, jeśli były trudności z jej zliczeniem

V – objętość zawiesiny komórek [mL]

$$\dot{z}ywotność komórek [\%] = \frac{liczba komórek \dot{z}ywych}{całkowita liczba komórek} \cdot 100\%$$
(2)

Po zwirowaniu komórki zawieszano w odpowiedniej objętości dedykowanego dla nich pełnego medium hodowlanego, wysiewano do naczyń hodowlanych i umieszczano w inkubatorze do hodowli linii komórkowych.

3.3.3. Sterylizacja chemiczna wirówkowych filtrów membranowych

Na membrany naniesiono maksymalną możliwą objętość 70% roztwór alkoholu etylowego i pozostawiono na 30 - 45 min w RT. Po tym czasie przeprowadzono wirowanie (8 min, $3200 \times g$). przesącz odrzucono a na membrany naniesiono maksymalną możliwą objętość sterylnej wody Mili-Q i ponownie zwirowano (8 min, $3200 \times g$). Płukanie wodą przeprowadzono łącznie 3-krotnie. Jeśli filtry nie były wykorzystywane od razu zalano je sterylną wodą i umieszczono w 4°C. Tuż przed użyciem zwirowano filtry (8 min, $3200 \times g$), odrzucono wodę i przygotowano membranę do dalszej pracy poprzez jej przemycie DPBS. Po zwirowaniu DPBS odrzucono a na membranę naniesiono supernatant z hodowli mikroorganizmów.

Od momentu ich pierwszego zmoczenia, nie dopuszczono do wyschnięcia membran.

3.3.4. Podstawowa charakterystyka mikroorganizmów:

• Barwienie drożdżowych ciałek lipidowych (ang. *lipid droplets*) z wykorzystaniem barwnika Oil Red O

Pobrano po 500 μ L hodowli nocnej (prowadzonej zgodnie z opisem **3.3.1**.) drożdży Sb oraz WUT240, zwirowano (1 min, 1000× *g*), usunięto płyn, a osad komórkowy zawieszono w 500 μ L DPBS w celu usunięcia resztek pożywki. Zawiesiny komórek ponownie zwirowano (w tych samych warunkach) i powtórzono płukanie DPBS. Po ponownym zwirowaniu próbek, osady drożdżowe zawieszono w 100 μ L świeżo przygotowanego barwnika Oil Red O. Próbki inkubowano w ciemności i RT przez 15 min. Następnie 3-krotnie przemyto komórki DPBS, aby usunąć niezwiązany barwnik. Na koniec zawieszono osady drożdżowe w 250 μ L DPBS, naniesiono 10 μ L próbek na szkiełka podstawowe i zakryto szkiełkami nakrywkowymi. Na preparaty naniesiono po kropli olejku immersyjnego i oglądano je pod mikroskopem z obiektywem 100×. Wykonano zdjęcia preparatów w świetle białym.

Barwienie komórek bakteryjnych metodą Grama

W warunkach sterylnych pobrano z szalki pojedynczą kolonię bakteryjną *J. lividum*, przeniesiono ją do 1,5-mL probówki zawierającej 0,5 mL DPBS. Materiał zawieszono w buforze poprzez intensywne mieszanie na worteksie. Następnie szkiełko podstawowe odtłuszczono 70% alkoholem etylowym i naniesiono na nie 10 µL zawiesiny bakteryjnej. Za

pomocą jednorazowej końcówki do pipety automatycznej rozprowadzono materiał po możliwie największej powierzchni szkiełka podstawowego. Następnie wykonany rozmaz wysuszono przy palniku oraz termicznie utrwalono preparat w jego płomieniu. Na szkiełko naniesiono 0,5 mL 0,1% fioletu krystalicznego i inkubowano 2 min w temperaturze pokojowej. Następnie spłukano barwnik wodą Mili-Q, naniesiono na szkiełko 0,5 mL płynu Lugola i odczekano 1,5 min. Ponownie spłukano preparat wodą Mili-Q i naniesiono 0,5 mL acetonu na 30 sek. Spłukano rozpuszczalnik wodą Mili-Q i przystąpiono do barwienia safraniną (0,5 mL 0,4% roztworu safraniny), którą po 2 min spłukano wodą, a szkiełko pozostawiono do wyschnięcia. Na suche szkiełko naniesiono kroplę olejku imersyjnego i oglądano preparat pod obiektywem 100×.

3.3.5. Mikrobiologiczna produkcja pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (EVs)

• Hodowla drożdży

Wstępną hodowlę wgłębną (przeprowadzono zgodnie z **3.3.1.**) w 100-mL kolbie Erlenmeyer'a zawierającej 10 mL płynnego medium YPD. Właściwą hodowlę produkcyjną założono po 24 h poprzez rozcieńczenie 3 mL hodowli wstępnej w 150 mL medium YPD (w 300-mL kolbie Erlenmeyer'a), uzyskując hodowlę o startowym $OD_{600} \sim 0,200$. Hodowlę prowadzono przez 24 h w 37°C i wytrząsaniu z prędkością 240 rpm. Po tym czasie ustalono gęstość komórek w hodowli poprzez pobranie 100 µL próbki z hodowli drożdży i 1000-krotne jej rozcieńczenie w DPBS. Następnie 10 µL rozcieńczonej zawiesiny komórek naniesiono na komorę hemocytometryczną, zliczono komórki i wykorzystując poniższe równanie (1) wyznaczono gęstość zawiesiny komórek drożdżowych.

Równocześnie wyznaczono zawartość suchej biomasy w hodowli drożdży metodą wagową. Za pomocą pipety serologicznej przeniesiono całą objętość hodowli (jednocześnie notując zebrane objętości) do uprzednio zważonych 50-mL probówek wirówkowych i zwirowano (10 min, 4°C, $6000 \times g$). Supernatant odebrano w warunkach sterylnych do dalszej izolacji pęcherzyków – EVs, natomiast biomasę drożdżową wysuszono przez noc w 65°C. Następnie probówki ponownie zważono, aby wyznaczyć masę suchej biomasy drożdżowej zebranej z określonej objętości hodowli.

• Hodowla bakterii

Właściwą hodowlę produkcyjną założono poprzez rozmrożenie i rozcieńczenie 1 kriofiolki (przygotowanej uprzednio zgodnie z **3.3.1.**) w 100 mL uprzednio ogrzanego do 20°C medium $\frac{1}{2}$ LB (w 500-mL kolbie Erlenmeyer'a). Hodowlę prowadzono przez 5 dni w 20°C z wytrząsaniem z prędkością 110 rpm. Po tym czasie, pobrano 100 µL z hodowli bakterii, rozcieńczono 10000-krotnie w DPBS i przy użyciu hemocytometru oraz wzoru (1) wyznaczono określono liczbę komórek bakteryjnych w hodowli.

Podobnie jak w przypadku hodowli drożdży całą objętość zawiesiny bakteryjnej przeniesiono do probówek wirówkowych, poddano wirowaniu (15 min, 4°C, 47808× g) i osad komórkowy wysuszono.

3.3.6. Izolacja EVs, pochodzenia mikrobiologicznego:

• zewnątrzkomórkowe pęcherzyki drożdżowe (Rys. 15.)

Po 24 h, hodowlę właściwą drożdzy zwirowano (10 min, 4°C, $6000 \times g$), a biomasę przeznaczono na wyznaczenie wydajności produkcji EVs przez drożdże (zgodnie z punktem 3.3.5.). Odebrany w warunkach sterylnych supernatant przeniesiono na filtr butelkowy PES o porach średnicy 0,2 µm (PES Filter Unit, VWR International) i przefiltrowano, aby usunąć pozostałe, drobne zanieczyszczenia komórkowe. Następnie uzyskany przesącz został zagęszczony przy użyciu wirówkowych filtrów membranowych o punkcie odcięcia 100 kDa (Amicon Ultra – 15, membrana z regenerowanej celulozy; UFC910024, MERCK) (8 min, 4°C, $3200 \times g$). Po każdym cyklu wirowania nadsącz zgromadzony nad filtrem i zawierający EVs, był odbierany i zbierany do 15-mL probówki wirówkowej typu Falcon umieszczonej na lodzie. Po przefiltrowaniu całego medium pohodowlanego zmierzono objętość uzyskanej frakcji pęcherzyków. Następnie frakcję tą rozcieńczono sterylnym DPBS do objętości końcowej 15 mL, przeniesiono na filtr wirówkowy i zwirowano. Przeprowadzono 3-krotne płukanie frakcji EVs z wykorzystaniem sterylnego DPBS poprzez rozcieńczanie i zatężanie frakcji. Po ostatnim płukaniu zmierzono objętość frakcji EVs i rozcieńczono ją sterylnym DPBS do objętości jaką uzyskano z zatężania medium pohodowlanego (objętość frakcji tuż przed płukaniem). Ostatecznie uzyskaną zawiesinę pęcherzyków podzielono na 0,5-mL porcje i przechowywano w -80°C.



Rysunek 15. Schemat przedstawiający sposób w uproszczony pracę z hodowlą drożdżową (procedura w punkcie 3.3.5. – hodowla drożdży) a także izolację EVs-Sb oraz EVs-WUT240 (procedura w punkcie 3.3.6. – zewnątrzkomórkowe pęcherzyki drożdżowe). Grafikę przygotowano wykorzystując https://www.biorender.com/.

• zewnątrzkomórkowe pęcherzyki bakteryjne (Rys. 16.)

Po 5 dniach hodowlę bakterii zwirowano (15 min, 4°C, 47808× g), a biomasę przeznaczono na wyznaczenie wydajności produkcji pęcherzyków przez bakterie (zgodnie z punktem **3.3.5.**) lub izolację wiolaceiny (zgodnie z punktem **3.3.9.**). Supernatant przefiltrowano przez filtr butelkowy PES o porach średnicy 0,2 µm, aby usunąć pozostałe drobne zanieczyszczenia komórkowe. Uzyskany przesącz został zagęszczony przy użyciu wirówkowych filtrów membranowych o punkcie odcięcia 100 kDa (Amicon Ultra – 15) (20 min, 4°C, 4900× g). Izolację pęcherzyków wykonano w ten sam sposób jak w przypadku EVs drożdżowych. Po ostatnim płukaniu pobrano próbkę o objętości 20 µL w celu oznaczenia stężenia wiolaceiny (metoda: **3.3.10.**). Ostatecznie uzyskaną zawiesinę pęcherzyków rozdzielono, do 1,5-mL probówek, na porcje po 0,5 mL i zamrożono w -80°C.



Rysunek 16. Schemat przedstawiający w uproszczony sposób pracę z hodowlą bakteryjną (procedura w punkcie 3.3.1. – hodowla bakterii), izolację EVs-VIO (procedura w punkcie 3.3.6. – zewnątrzkomórkowe pęcherzyki bakteryjne) oraz izolację Ex-VIO (procedura w punkcie 3.3.9.). Grafikę przygotowano wykorzystując <u>https://www.biorender.com/</u>.

3.3.7. Inne przetestowane metody izolacji EVs:

Ciecze po hodowli mikroorganizmów oddzielono od biomasy i przefiltrowano tak jak to opisano w punkcie **3.3.6.** Z każdej z nich zachowano próbkę przed izolacją i wraz z resztą zmierzono je z wykorzystaniem NTA, aby wyznaczyć, ile pęcherzyków było w cieczy przed poddaniem jej różnym metodom izolacji.

● Metoda wykorzystująca zestaw ExoPRISM™

Zestaw ExoPRISMTM (ExoPRISMTM EV isolation Kit for CCS and Urine; EP-CU020(SAMPLE), LabSpinner) przeznaczony jest do izolacji pęcherzyków z medium po hodowli komórek ssaczych (ang. *Cell Culture Supernatant*, CCS) oraz z próbek moczu. Do 15-mL probówek przeniesiono po 2 mL przesączu po hodowli Sb oraz WUT240. Następnie dodano do nich po 2 mL Odczynnika B (zawierającego czynnik strącający EV), wymieszano poprzez 10-krotne odwrócenie probówek i pozostawiono na 10 min w RT. Po tym czasie probówki zwirowano (10 min, RT, 10000× g), a uzyskany "osad" był niewidoczny gołym okiem. Dokładnie odebrano ciecz znad dna probówki, a następnie dodano do nich po 0,2 mL odczynnika C (bufor płuczący) i obmyto nimi wewnętrze ścianki probówki, aby ponownie zawiesić EVs. Zawiesinę przeniesiono na wirówkowy filtr membranowy o punkcie odcięcia 10 kDa (Amicon Ultra – 0,5, membrana z regenerowanej celulozy; UFC501096, MERCK). Następnie do 15-mL probówki dodano jeszcze 0,1 mL odczynnika C, obmyto ścianki, przeniesiono roztwór na filtr wirówkowy i zwirowano (10 min, RT, 10000× *g*). Następnie odrzucono przesącz, a do zatrzymanych na membranie EVs dodano 0,2 mL odczynnika C. Ponownie zwirowano filtry (10 min, RT, 10000× *g*), odrzucono przesącz i zawieszono EVs w 0,4 mL DPBS. Próbki odwirowano (10 min, RT, 10000× *g*), przesącz odrzucono, zmierzono objętość frakcji zatrzymanej na filtrze – zawierającej EVs i sprawdzono ich ilość na podstawie pomiarów NTA.

• Metoda wykorzystująca ExoDISC-20

ExoDISC-20 (EX-D0020, LabSpinner) jest to dysk do izolacji EVs zaprojektowany przez firmę LabSpinner. Dysk składa się z 6 niezależnych od siebie obszarów izolacyjnych, dzięki czemu możliwa jest izolacja 6 próbek jednocześnie (Rys. 17.). Przez "otwór do nadawania próbki i buforów", na 3 kolejne obszary do izolacji, naniesiono po 1 mL *Priming buffer*, aby zwilżyć membranę zatrzymującą EVs. Następnie umieszczono dysk w dedykowanej do niego wirówce ExoDiscovery, Lab Spinner. Wybrano zakładkę ExoDisc-H, a następnie program *Prime*, który zatrzymano ręcznie po 30 sek. Po tym czasie sprawdzono szczelność membrany i umieszczono dysk w wirówce. Ponownie uruchomiono program *Prime*, który zakończył się samoczynnie po 1,5 min.

Przez "otwór do nadawania próbki i buforów" (na Rys. 17. zaznaczono na fioletowo) wprowadzono 1 mL przesączu z hodowli kolejnych mikroorganizmów (Sb, WUT240 oraz VIO) i umieszczono dysk w wirówce. Z tej samej zakładki ExoDisc-H wybrano 5-min program *Enrich*. Gdy dysk się zatrzymał, a "komora nadawcza" (na Rys. 17. zaznaczona na zielono) była pusta naniesiono do niej kolejny 1 mL przesączu z hodowli. Powtórzono wirowanie, a po 5 min przez "otwór do usuwania przesączy" (na Rys. 17. zaznaczono na czerwono) opróżniono "komorę zbiorczą przesączy" (na Rys. 17. zaznaczono na kolor błękitny). Następnie jeszcze 3-krotnie powtórzono ładowanie EVs (łącznie przefiltrowano 5 mL przesączu z hodowli drożdży i 3 mL przesączu z hodowli bakterii) i opróżniono (w ten sposób co wcześniej) komorę zbiorczą przesączy.

Przystąpiono do odpłukania medium po hodowli mikroorganizmów z próbek. W tym celu przez "otwór do nadawania próbki i buforów" naniesiono na dysk 1 mL DPBS. Na wirówce w zakładce ExoDisc-H wybrano program *Wash*. Po 5 min naniesiono kolejny 1 mL DPBS, zwirowano i powtórzono płukanie po raz 3-ci. Po ostatnim zwirowaniu znad "komory filtracji tangencjalnej – TFF" (na Rys. 17. zaznaczono na kolor ciemno niebieski) odklejono zabezpieczenie i odblokowano "otwór do odebrania zatężonej próbki" (na Rys. 17. zaznaczono na żółto). Zmierzono objętości zebranych próbek i poddano je pomiarom z wykorzystaniem NTA.



Rysunek 17. Schemat przedstawiający ExoDISC-20. Źródło: <u>https://www.exodiscovery.com/exodisc.</u>

• Strącanie EVs z wykorzystaniem czynników precypitujących

Do 15-mL probówek przeniesiono przefiltrowany uprzednio przesącz z hodowli drożdży (Sb lub WUT240) lub bakterii (VIO) w ilości zgodnej z Tabelą 3. Następnie do każdej probówki dodano jednego z testowanych czynników strącających, czyli PEG6000 (wymieniany wielokrotnie w literaturze naukowej ^{51,190,191}) oraz odczynnik B z zestawu ExoPRISM, który jest najprawdopodobniej elektrolitem o małej masie cząsteczkowej (na podstawie znikomych informacji na temat zestawu izolacyjnego podanych przez producenta) i indukuje wytrącanie EVs poprzez modulację siły jonowej (ang. *precipitation by ionic strength modulation*). Objętości odczynników indukujących wytrącanie zestawiono w poniższej Tabeli 3.

wariant izolacji	przesącz z hodowli drożdży [mL]	czynnik precypitujący [mL]		przesącz z hodowli bakterii [mL]	czynnik precypitujący [mL]	
	Sb / WUT240	PEG ^	"B" *	VIO	PEG ^	"B" *
2,5% PEG_4°C	4,00	1,00	-	4,00	1,00	-
5,0% PEG_4°C	3,00	1,00	-	1,50	0,50	-
10,0% PEG_4°C	2,00	1,00	-	1,50	0,75	-
5,0% PEG_RT	3,00	1,00	-	1,50	0,50	-
10,0% PEG_RT	2,00	1,00	-	1,50	0,75	-
EVs:B_10:1_4°C	5,00	-	0,50	n.d.	-	-
EVs:B_5:1_4°C	5,00	-	1,00	n.d.	-	-
EVs:B_5:2_4°C	5,00	-	2,00	n.d.	-	-
EVs:B_10:1_RT	5,00	-	0,50	n.d.	-	-
EVs:B_5:1_RT	5,00	-	1,00	n.d.	-	-

Tabela 3. W poniższej tabeli zestawiono objętości próbek oraz czynników precypitacyjnych (20% PEG6000 – PEG oraz odczynnik precypitujący B z zestawu ExoPRISM firmy LabSpinner – "B").

n.d. – nie dotyczy

^ 20% PEG6000 w DPBS

* odczynnik B z zestawu ExoPRISM, LabSpinner

Po dodaniu do probówek czynników precypitujących, wymieszano zawartość poprzez ich 10-krotne odwrócenie. Następnie probówki pozostawiono na noc odpowiednio w temperaturze pokojowej (RT, ok. 20°C) lub w temperaturze 4°C. Następnie wszystkie próbki zwirowano (1 h, 4°C, 10440× g). Niestety osad nie był widoczny okiem nieuzbrojonym, dlatego też delikatnie odebrano ciecz wzdłuż przeciwległej ścianki probówki niż ta, przy której powinien zebrać się osad z pęcherzykami. Do każdej probówki dodano po 500 μ L DPBS i wymieszano ich zawartość poprzez kilkukrotne pipetowanie góra-dół. Następnie zmierzono objętości próbek i poddano je pomiarom na NTA.

3.3.8. Wyliczanie wydajności izolacji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych

Wydajność izolacji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych obliczono na podstawie wykonanych pomiarów NTA. Przed przeprowadzeniem izolacji różnymi metodami pomiarom zostały poddane media po hodowli badanych mikroorganizmów. Na podstawie uzyskanych wyników oraz objętości cieczy poddanej izolacji w każdej z testowanych metod (Amicon – 225 mL medium po hodowli drożdży oraz 100 mL medium po hodowli bakterii; ExoPRISM – 2 mL; ExoDISC – 5 mL medium po hodowli drożdży oraz 3 mL po hodowli bakterii;

precypitacja – zgodnie z Tab. 3.) obliczono, ile teoretycznie można by uzyskać EVs, gdyby wydajność izolacji wyniosła 100%. Następnie na podstawie wyników pomiarów NTA próbek uzyskanych po izolacji oraz objętości zebranych frakcji zawierających EVs wyznaczono rzeczywistą uzyskaną ilość pęcherzyków, a wydajność metod obliczono korzystając ze wzoru (3).

$$wydajność izolacji = \frac{teoretyczna maksymalna liczba EVs}{rzeczywisty usysk} \cdot 100\%$$
(3)

3.3.9. Ekstrakcja wiolaceiny z biomasy bakteryjnej

Biomasę bakteryjną, oddzieloną od medium pohodowlanego (zgodnie z punktem **3.3.6.**), w 50-mL probówce wirówkowej zalano 20 mL alkoholu metylowego (cz.d.a.) i zawieszono poprzez intensywne wymieszanie na worteksie. Następnie umieszczono ją na 30 min w RT (~25°C) na wytrząsarce laboratoryjnej nastawionej na 150 rpm. Po tym czasie zwirowano biomasę (15 min, 47808× g) i odebrano fioletową frakcję alkoholową, tak aby nie wzburzyć osadu bakteryjnego. Następnie biomasę zalano kolejną porcją alkoholu metylowego, zawieszono poprzez intensywne mieszanie na worteksie i inkubowano na wytrząsarce. Kroki ekstrakcji i wirowania powtarzano aż do momentu wizualnego odbarwienia biomasy i uzyskania bezbarwnej frakcji alkoholowej

Odbierane po ekstrakcji porcje alkoholu metylowego zawierające wiolaceinę zbierano w kolbie okrągłodennej, którą trzymano zamkniętą na lodzie. Po zakończeniu ekstrakcji całkowicie odparowano alkohol na wyparce z pompą próżniową. Uzyskany osad rozpuszczono w możliwie najmniejszej objętości alkoholu metylowego. Pobrano niewielką (ok. 50 μL) próbkę ekstraktu wiolaceiny, na oznaczenie stężenia związku (metoda **3.3.10.**), a resztę Ex-VIO podzielono na porcje po ok. 0,5 mL i przechowywano w -80°C.

3.3.10. Pomiar stężenia wiolaceiny w próbkach metanolowego ekstraktu z biomasy bakteryjnej (Ex-VIO) oraz wyizolowanych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (EVs-VIO)

Próbki Ex-VIO oraz EVs-VIO wyjściowo rozcieńczono ok. 50 – 100-krotnie, tak aby uzyskać delikatnie fioletowe zabarwienie. Intensywność fioletowego zabarwienia mierzono przy pomocy spektrofotometru, przy długości fali 577 nm. Próbki rozcieńczano do momentu osiągnięcia absorbancji w zakresie 0,100 – 0,150 AU. Tak wąski zakres wybrano, aby

uzyskiwane wyniki charakteryzowały się jak najmniejszymi rozbieżnościami. Jako próbę ślepą wykorzystano czysty alkohol metylowy.

Stężenie związku wyznaczano wykorzystując podstawowe prawo spektrometrii absorpcyjnej ¹⁹², równanie (4):

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot C \tag{4}$$

A – absorbancja [-]

 ε – molowy współczynnik absorpcji $\left[\frac{L}{mol \cdot cm}\right]$, dla wiolaceiny przy $\lambda = 577nm$, $\varepsilon_{VIO} = 1,7 \cdot 10^4 \frac{L}{mol \cdot cm}$ ¹⁹³

l – długość drogi optycznej [cm] (w przypadku używanej kuwety spektrofotometrycznej l = 1cm)

C – stężenie molowe związku $\left[\frac{mol}{L}\right]$

Po przekształceniu i uwzględnieniu rozcieńczenia próbki, otrzymujemy równanie (5):

$$C_{VIO} = \frac{A}{\varepsilon \cdot l} \cdot rozcieńczenie \cdot M_{VIO}$$
(5)

 C_{VIO} – stężenie wiolaceiny $\left[\frac{g}{L}\right]$

 M_{VIO} – masa molowa wiolaceiny $\left[\frac{g}{mol}\right]$, $M_{VIO} = 343,3 \left[\frac{g}{mol}\right]$ [CAS: 548-54-9; PubChem CID: 11053; <u>https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11053</u>; Computed by PubChem 2.2 (PubChem release 2021.10.14)]

3.3.11. Porównanie widm fluorescencji wiolaceiny w próbkach metanolowego ekstraktu z biomasy bakteryjnej (Ex-VIO) oraz wyizolowanych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (EVs-VIO)

Przygotowano 100-krotne rozcieńczenia próbek EVs-VIO oraz Ex-VIO w alkoholu metylowym. Przeniesiono po 1 mL każdego z rozcieńczeń do kwarcowych celek pomiarowych (High Precision Cell 10x10mm; 101-10-40, Hellma Analytics) i umieszczono je w komorze pomiarowej aparatu FP-8550. Uruchomiono oprogramowanie "*Spectra manager*", wybrano

zakładkę umożliwiającą wykonanie pomiaru 3D ("3-D Spectra Measurement") oraz zakres długości fali wzbudzenia: 350 - 400 nm. Sygnał zbierano w zakresie 360 - 700 nm. Zebrane wyniki wizualizowano i analizowano w zakładce "Interval Data Analysis". Na podstawie intensywności zebranych widm emisyjnych wybrano długość fali wzbudzenia, dla której uzyskano najwyższe wartości fluorescencji, czyli λ =360 nm.

3.3.12. Porównanie widm absorpcyjnych i transmisyjnych wiolaceiny w próbkach metanolowego ekstraktu z biomasy bakteryjnej (Ex-VIO) oraz wyizolowanych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (EVs-VIO)

Próbki EVs-VIO oraz Ex-VIO rozcieńczono 100-krotnie w alkoholu metylowym, aby uzyskać absorbancję przy λ =577 nm w okolicach 0,100 – 0,150 AU. Przeniesiono po 1 mL każdego z rozcieńczeń do kuwetek spektrofotometrycznych 10x10x48 mm (67.754, Sarstedt) i umieszczono je w spektrofotometrze. Uruchomiono oprogramowanie "WinASPECT PLUS", w ustawieniach protokołu wybrano zakładkę "Mode" umożliwiającą wykonanie widma UV-Vis (Meas. Mode: Spectral Scan) przy długościach fali w zakresie 300 – 700 nm, przesunięciu fali o 1 nm i prędkości odczytu 50 nm/s (Range [nm]: 300 – 700; Delta lambda [nm]: 1,0; Speed [nm/s]: 50). Podczas pomiaru zebrano dane absorbancji oraz transmitancji światła przy przejściu przez próbkę. Jako próbę ślepą wykonano także pomiar dla czystego alkoholu metylowego, w którym rozcieńczane były próbki EVs-VIO oraz Ex-VIO. Zebrane dane program przedstawił w postaci wykresów absorbancji i transmitancji w funkcji długości fali.

3.3.13. Cienkowarstwowa chromatografia cieczowa (ang. *Thin Layer Chromatography*, TLC) wiolaceiny zawartej w metanolowym ekstrakcie z biomasy bakteryjnej (Ex-VIO) oraz bakteryjnych pęcherzykach zewnątrzkomórkowych (EVs-VIO)

Próbki EVs-VIO oraz Ex-VIO rozcieńczono 20-krotnie w alkoholu metylowym (5 μ L próbki + 95 μ L MeOH), intensywnie wymieszano na worteksie oraz zwirowano (2 min, 11900× g). Następnie za pomocą kapilary naniesiono około 20 μ L każdej z próbek na płytkę TLC z żelem krzemionkowym 60, pokrytą fluorescencyjnym indykatorem F254 (1.05554.0001; TLC Silica gel 60 F254, MERCK). Płytkę umieszczono w komorze chromatograficznej z układem aceton:chloroform:amoniak – 1:1:0,01. W momencie wyjęcia płytki z komory po jej rozwinięciu, zaznaczono punkt końcowy, którym było czoło układu. Wykonano zdjęcia

poglądowe płytki w świetle widzialnym oraz w miniciemni przy wykorzystaniu lamp UV o długościach fali 254 nm oraz 365 nm (CN-6, VILBER). Wyznaczono wartości współczynników retencji (ang. *retention factor*, Rf) związków widocznych w postaci prążków, zgodnie równaniem (6):

$$Rf = \frac{\text{odległości przebyta przez związek}}{\text{odległość przebyta przez czoło rozpuszczalnika}}$$
(6)

3.3.14. Wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. *high-performance liquid chromatography*, HPLC) do analizy Ex-VIO oraz komercyjnego wzorca wiolaceiny

Próbkę Ex-VIO oraz komercyjnego wzorca wiolaceiny (Violacein from *J. lividum*; V9389 1MG, Sigma Aldrich) rozcieńczono 250-krotnie w alkoholu metylowym i zwirowano (5 min, 11900× g), aby upewnić się, że wszystkie zanieczyszczenia stałe z próbki nie zostaną przeniesione na kolumnę. Uruchomiono chromatograf cieczowy, odpowietrzono układ i przygotowano kolumnę ze złożem C18 (COSMOSIL 5C18-MS-II Packed column, 120Å, 5 μ m, 4,6 mm ID x 250 mm; CO-38020-41, Nacalai Tesque) do pracy, poprzez jej przepłukanie. Następnie przygotowano układ do pracy poprzez napełnienie kolumny mieszaniną woda:alkohol metylowy – 50:50. Wprowadzono program liniowego gradientu alkoholu metylowego (Tab. 4.) w czasie, przy przepływie 1 mL/min i zbieraniu sygnału przy długości fali λ =575 nm. Następnie nastrzyknięto próbki i przeprowadzono analizy.

Tabela 4. Wykorzystany program gradientowego wzrostu stężenia alkoholu metylowego podczas rozdziału i analizy na HPLC.

krok programu	czas [mm:ss]		proporcja fazy ruchomej	
	ok programu od		H ₂ O	MeOH
1	00:00	00:30	50	50
2	00:30	35:00	25	75

Analiza HPLC posłużyła jedynie do porównania widm ekstraktu z biomasy bakterii oraz wzorca komercyjnego. Określanie stężeń wiolaceiny w próbkach wykonywano przy użyciu/wykorzystaniu spektrofotometru (metoda **3.3.10.**).

3.3.15. Dynamiczne rozpraszanie światła – DLS

Technika wykorzystana do oszacowania dystrybucji wielkości EVs w próbkach stacjonarnych. Próbki EVs-Sb oraz EVs-WUT240 przed pomiarem były 20-krotnie rozcieńczane (50 μL EVs drożdżowych + 950 μL DPBS), natomiast próbki EVs-VIO trzeba było rozcieńczyć 250-krotnie w DPBS (4 μL EVs bakteryjnych + 996 μL DPBS). Rozcieńczoną próbkę pęcherzyków umieszczano w plastikowej kuwecie spektrofotometrycznej 10x10x48 mm (67.754, Sarstedt) w objętości minimum 1 mL, zamykano dedykowanym przykryciem kuwety i umieszczano w celce pomiarowej urządzenia z nastawioną temperaturą inkubacji 25°C. Następnie wprowadzano dane pomiaru:

- typ pomiaru: rozmiar (Size).
- materiał badany: białka (protein; współczynnik załamania światła: 1,450; absorpcja: 0,001) – ze względu ma brak precyzyjniejszego wzorca w oprogramowaniu urządzenia wybrano "białka", które stanowią bardzo duży ładunek pęcherzyków zewnątrzkomórkowych,
- nośnik próbki: PBS (temperatura: 25°C; lepkość: 0,9061 cP; współczynnik załamania światła: 1,332),
- ustawienia ogólne: parametr A: 0,428; parametr K: 7,67 \cdot 10⁻⁵ $\left[\frac{cm^2}{s}\right]$ (ustawienie parametrów równania Mark'a-Houwink'a, pozwala na wyliczenie masy molekularnej cząsteczek z wykorzystaniem DLS),
- temperatura: 25°C; czas stabilizacji: 60 sek,
- typ kuwety pomiarowej: plastikowa kuweta o wymiarach 10x10x48 mm (67.754, Sarstedt),
- kąt pomiaru: 173° Backscatter (NIBS default) Non-Invasive Back-Scatter Technology,
- czas trwania pomiaru: ustawienie manualne; liczba powtórzeń w ramach pojedynczego pomiaru (runs): 11; czas pojedynczego powtórzenia: 10 sek,
- liczba pomiarów każdej próbki: 3 bez opóźnienia między kolejnymi powtórzeniami
- model analizy: ogólnego przeznaczenia o normalnej rozdzielczości (odpowiedni dla większości nośników i emulsji).

3.3.16. Analiza śledzenia nanocząstek – NTA

Rozkład wielkości i stężenia EVs w próbkach mierzona była z wykorzystaniem NanoSight Pro. Każda próbka mierzona była w 10 niezależnych powtórzeniach technicznych na podstawie zebranych filmików (750 klatek) w poniższych warunkach:

- czynnik rozcieńczający: woda,
- temperatura: $24,0 25,1^{\circ}C$,
- lepkość: 0,9100 0,8869 cP,
- prędkość przepływu próbki: 2,5 µL/min,
- czas ekspozycji: 29,5 31,2 ms,
- kontrast (contrast gain) -4,5-5,5,
- sposób detekcji: światło białe (light scatter filter).

Przed pomiarem, każda próbka rozcieńczana była 1x PBS (fabrycznie filtrowanym przez filtr 0,1 μm), aby otrzymać średnio 50 – 80 EVs na klatkę wykrytą w danym momencie przez kamerę. W przypadku EVs drożdżowych próbki rozcieńczane były 100 – 500-krotnie, podczas gdy EVs bakteryjne wymagały większych rozcieńczeń w zakresie 1000 – 16000-krotnie. Zebrane przez urządzenie dane analizowane były przy wykorzystaniu dedykowanego oprogramowania NS XPLORER v 1.1.0.6, zgodnie z modelem dystrybucji FTLA, który zapewnił najlepsze dopasowania pomiarów technicznych tej samej próbki.

3.3.17. Analiza śledzenia cząstek wybarwionych lipofilowymi barwnikami fluorescencyjnymi (DiO oraz PKH67).

Barwienie EVs mikrobiologicznych barwnikami lipofilowymi:

Roztwór DiO (1 mg/mL) oraz komercyjny barwnik PKH67 (1 mM) rozcieńczono w 1x PBS odpowiednio 250- lub 500-krotnie. Następnie do 450-µL próbek EVs dodano 50 µL jednego z barwników, wymieszano na worteksie i inkubowano przez 30 min w RT oraz ciemności. Przed pomiarami na NTA barwione próbki rozcieńczono 2-krotnie w 1x PBS uzyskując końcowe stężenia barwników 0,4 µg/mL (454 nM) DiO oraz 100 nM PKH67.

Analiza wybarwionych EVs przy użyciu NTA:

Rozkład wielkości i stężenia EVs w próbkach mierzona była z wykorzystaniem NanoSight Pro wyposażonego w niebieski laser, 488 nm oraz detektor 500 nm. Każda próbka mierzona była w 2 kanałach – świetle białym (*light scatter filter*) oraz we fluorescencji. Na pojedynczą analizę składało się 10 niezależnych powtórzeniach technicznych na podstawie zebranych filmików (150 klatek) w poniższych warunkach:

- czynnik rozcieńczający: woda;
- temperatura: 29,2 30,4°C,
- lepkość: 0,8084 0,7882 cP,
- prędkość przepływu próbki: 2,5 µL/min,
- czas ekspozycji: 7,3 40,0 ms,
- kontrast (*contrast gain*) -1,0-7,5.

Zebrane przez urządzenie dane analizowane były przy wykorzystaniu dedykowanego oprogramowania NS XPLORER, zgodnie z modelem dystrybucji RAW, który zapewnił najlepsze dopasowania pomiarów technicznych tej samej próbki.

3.3.18. Obrazowanie EVs z wykorzystaniem skaningowo-transmisyjnej mikroskopii elektronowej (ang. *Scanning Transmission Electron Microscopy*, STEM)

Aby zobrazować morfologię wyizolowanych EVs mikrobiologicznych wykorzystano mikroskop Hitachi SU8230 wyposażony w detektor skaningowo detekcyjny mikroskopii elektronowej (STEM) w Centrum Zaawansowanych Materiałów i Technologii CEZAMAT Politechniki Warszawskiej z pomocą dr. inż. Macieja Trzaskowskiego. Próbki EVs rozcieńczono 100-krotnie w Mili-Q, i przeprowadzono podwójne barwienie negatywowe z wykorzystaniem *UranyLess*/cytrynian ołowiu (DELTA Microscopies). Na parafilmie umieszczano w postaci kropli po 20 μL cieczy (kolejno: próbek, ddH₂O, *UranyLess* oraz cytrynianiu ołowiu) i zanurzano w nich miedzianą siatkę pokrytą koronkową powłoką węglową (Agar Scientific) zgodnie z poniższymi etapami ²¹:

- → 1,5 min inkubacji na kropli próbki wyizolowanych EVs,
- \rightarrow 1,0 1,5 min inkubacji na kropli odczynnika *UranyLess*,
- → 20 sek inkubacji na kropli wody Mili-Q płukanie siatki,
- → 1,0 min inkubacji na kropli cytrynianu ołowiu (wzór sumaryczny: (C₆H₅O₇)₂Pb₃ · 3H₂O),
- → 20 sek inkubacji na kropli wody Mili-Q płukanie siatki.

Tak przygotowaną siatkę suszono na powietrzu przez około 1 min. i umieszczano w kolumnie mikroskopu elektronowego. Próbki obrazowane były przy napięciu roboczym 30 kV.

3.3.19. Obrazowanie EVs z wykorzystaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej

Próbki EVs mikrobiologicznych przekazano do Laboratorium Mikroskopii Elektronowej w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego Polskiej Akademii Nauk, gdzie wykonano obrazowania zgodnie z metodyką laboratorium¹⁰⁵.

Próbkę pęcherzyków zewnątrzkomórkowych umieszczono na miedzianej siatce (o 200 oczkach pokrytej warstwą formwaru oraz węgla) i inkubowano ją w temperaturze pokojowej przez 20 min. Następnie osuszono siatkę na bibule i przystąpiono do utrwalania EVs w 1% glutaraldehydzie w DPBS (5 min, RT). Po tym czasie siatkę 10-krotnie przemyto wodą destylowaną i wybarwiono 2% wodnym roztworem octanu uranylu (5 min, RT, ciemność). Nadmiar octanu uranylu usunięto bibułą i pozostawiono siatkę do wyschnięcia (24 h, RT).

3.3.20. Izolacja białek z EVs, elektroforeza SDS-PAGE oraz analiza Western blot w celu wykrycia drożdżowej kinazy pirogronianowej

Izolacja białek z EVs

EVs mikrobiologiczne zagęszczono z początkowej objętości 1,1 mL do 90 µL w przypadku EVs-Sb oraz EVs-WUT240 oraz 155 µL w przypadku EVs-VIO. Następnie do każdej z próbek dodano po 50 µL 10% NP-40 oraz 5 µL mieszaniny inhibitorów proteaz i dopełniono ultraczystą wodą do końcowej objętości 500 µL. Próbki intensywnie wytrząsano w 4°C przez 30 min. Następnie, zgodnie z metodyką ¹⁹⁴, dodano po 50 µL 0,15% DOC, intensywnie wymieszano na worteksie i inkubowano przez 15 min w temperaturze pokojowej. Po tym czasie do próbek dodano po 25 µL 100% TCA i wymieszano przy użyciu worteksu. Strącanie uwolnionych białek przeprowadzono w 2 następujących po sobie etapach: (1) inkubacja w 4°C przez noc (około 16 h) oraz (2) 15 min inkubacja w -20°C. Następnie zwirowano próbki (15 min, 4°C, 10000× g). Supernatant odrzucono, natomiast osad białkowy przemyto (bez zawieszania) 500 µL lodowatego acetonu (-20°C). Ponownie zwirowano próbki (5 min, 4°C, 10000× g) i odrzucono supernatant.

Próbki drożdżowych EVs pozostawiono w otwartych probówkach, aby wyschły w temperaturze pokojowej. Następnie białka rozpuszczono w 40 µL buforu RIPA. Próbki białek z EVs-VIO 5-krotnie przemyto lodowatym acetonem, aby zredukować ilość wytrąconej wiolaceiny. Po ostatnim płukaniu usunięto rozpuszczalnik, a próbkę pozostawiono do

wyschnięcia. Na koniec podobnie jak próbki drożdżowe, białka z bakteryjnych EVs zawieszono w 40 μL buforze RIPA.

Oznaczanie stężenia białek w próbkach:

Do oznaczania stężenia białek w próbkach wybrano metodę ich strącania z wykorzystaniem TCA. Jako odniesienie wykorzystano albuminę bydlęcą (BSA) o wyjściowym stężeniu 10 mg/mL, którą wykorzystano do zrobienia krzywej standardowej. Punkty o znanych stężeniach (0, 100, 250, 500, 750, 1000, 1500 oraz 2000 µg BSA/mL) uzyskano rozcieńczając wyjściowy roztwór (10 mg/mL) albuminy w buforze RIPA. Następnie do dołków płytki 96-dołkowej naniesiono, w 3 powtórzeniach technicznych, po 5 µL każdej z próbek oraz każdego ze standardów i dodano do nich po 50 µL 46% TCA. Zawartość dołków wymieszano na wytrząsarce do płytek wielodołkowych. Inkubację prowadzono w temperaturze pokojowej w ciemności przez 15 min. Na koniec, przy użyciu spektrofotometru i fali o długości λ =570 nm, odczytano mętność wytrąconego w dołkach białka. Z uzyskanych wyników dla krzywej standardowej wykreślono wykres zależności absorbancji przy λ =570 nm – zmienna 'y', odpowiadającej zmętnieniu próbek, od stężenia białka w próbce [µg/mL] – zmienna 'x'. Stosując regresję liniową wyznaczone zostało równanie prostej, dla tej zależności. Stężenie białka w próbkach wyznaczono stosując równanie (7):

$$y_{pr\acute{o}bki} = a \cdot x_{pr\acute{o}bki} + b \rightarrow x_{pr\acute{o}bki} = \frac{y_{pr\acute{o}bki} - b}{a}$$
 (7)

gdzie:

 $x_{próbki}$ – stężenie białek w próbce [µg/mL]

 $y_{pr\delta bki}$ – absorbancja danej próbki przy λ =570 nm [-]

a – współczynnik nachylenia krzywej standardowej

b – punkt przecięcia krzywej standardowej z osią Y

Elektroforetyczny rozdział białek w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)

Aby przeprowadzić rozdział białek w polu elektrycznym przygotowano 2 żele poliakrylamidowe o jednakowym układzie próbek.

Bezpośrednio przed elektroforezą przygotowano próbki poprzez zmieszanie 30 μg białek wyizolowanych z badanych EVs oraz wzorca białka Pyk1-His o masie ~60 kDa (oczyszczone białko wyprodukowane w *E. coli* BL21 po zaindukowaniu ekspresji *CDC19_{S. cerevisiae}* w pET28;

dr hab. J. Mierzejewska) z 4x buforem obciążającym (4x Protein Loading Buffer Plus; E0269-01, EURx) i wodą Mili-Q – całkowita objętość próbki wynosiła 32 µL. Przygotowane próbki wraz z komercyjnym wzorcem mas (PageRuler Prestained Protein Ladder; 26616, Thermo Scientific) zdenaturowano w termobloku (5 min, 95°C). Po tym czasie przeniesiono je 5 min na lód i zwirowano (2 min,12528× g). Następnie przygotowane 2 żele poliakrylamidowe umieszczano w aparacie do elektroforezy firmy Bio-Rad, który wypełniono buforem do elektroforezy. Do kieszonek w żelu naniesiono po 16 µL kolejnych próbek białek wyizolowanych z EVs, komercyjny wzorzec wielkości białek – 4 µL oraz wzorzec białka Pyk1-His. Puste dołki wypełniono wodą zmieszaną z buforem obciążającym, aby zachować równy tor rozdziału próbek.

Elektroforezę prowadzono 2-etapowo: (1) zagęszczenie białek – 15 min przy napięciu 50 V, czyli do momentu aż próbki znajdą się na granicy żelu zagęszczającego i rozdzielającego; (2) rozdział białek – 50 min przy napięciu 200 V, elektroforezę zatrzymywano w momencie, gdy czoło próbek znajdowało się 3 – 5 mm przed dolną krawędzią szkiełka.

Wizualizacja prążków białkowych w żelu kontrolnym

Po zakończeniu rozdziału, jeden z przygotowanych żeli został zabarwiony roztworem *Coomassie Brilliant Blue R-250* (15 – 20 min na kołysce laboratoryjnej w RT). Niezwiązany z żelem barwnik został usunięty poprzez przemycie wodą a następnie umieszczono w buforze odbarwiającym (na kołysce laboratoryjnej w RT) do momentu uzyskania wyraźnych niebieskich prążków pochodzących od zabarwionych białek.

Transfer białek z żelu poliakrylamidowego na membranę

Aktywowano membranę PVDF (Immobilon®-P PVDF Membrane; IPVH00010, MERCK) w czystym alkoholu metylowym przez 45 sek, a następnie kondycjonowano w zimnym buforze do transferu (5 min, RT, kołyska laboratoryjna). Komorę do transferu umieszczono w plastikowym pudełku, obłożono lodem i całość ustawiono na mieszadle magnetycznym. Następnie do środka komory włożono element mieszający oraz zamrożony wkład termiczny, wlano uprzednio schłodzony bufor do transferu do ½ wysokości komory i uruchomiono mieszanie. W między czasie do osobnego naczynia wlano zimny bufor do transferu i zamoczono w nim gąbki i bibuły. Przystąpiono do zmontowania "kanapki transferowej" według poniższej kolejności:

CZARNA STRONA KASETY TRANSFEROWEJ (-) gąbka bibuła żel po elektroforezie uprzednio zaktywowana membrana PVDF bibuła gąbka PRZEŹROCZYSTA STRONA KASETY TRANSFEROWEJ (+)

Kasetę przed zamknięciem na zacisk 2-krotnie odpowietrzono za pomocą wałka: (1) po nałożeniu bibuły na membranę PVDF oraz (2) po ułożeniu ostatniej gąbki. Następnie umieszczono ją w komorze do transferu (czarną stroną kasety do katody) i uruchomiono przepływ prądu o stałym natężeniu 400 mA. Transfer prowadzono 90 min, kontrolując ilość lodu w płaszczu chłodzącym komorę do transferu. Po zakończonym transferze rozmontowano układ, a membranę ułożono "białkami do góry" w buforze DPBST na 15 min. Następnie wymieniono bufor na nowy i inkubowano kolejne 10 min na kołysce laboratoryjnej w RT.

Western blot

Po wypłukaniu membrany z buforu do transferu, przystąpiono do jej blokowania przy wykorzystaniu buforu DPBST z 2% mlekiem odtłuszczonym (mleko w proszku odtłuszczone granulowane; EAN: 5900691-033217, Spółdzielnia Mleczarska w Gostyniu) i umieszczono ją na 1 h na kołyskę laboratoryjną w RT. Następnie przygotowano rozcieńczenie króliczego poliklonalnego przeciwciała I-rzędowego anty-Pyk1 (1:30000)¹⁹⁵ w DPBST z 2% mlekiem odtłuszczonym. Membranę przeniesiono do suchej sterylnej szalki Petriego, umieszczono w 4°C i rozprowadzono na niej przygotowany roztwór przeciwciała. Szalkę zabezpieczono parafilmem przed odparowaniem i pozostawiono w warunkach chłodniczych na noc (ok. 16 h, 4°C). Następnie membranę 2-krotnie przemyto buforem DPBST z 2% mlekiem (2x 15 min na kołysce laboratoryjnej w RT). Przygotowano rozcieńczenie koziego anty-króliczego poliklonalnego przeciwciała II-rzędowego sprzężonego z peroksydazą chrzanową (ang. horseradish peroxidase, HRP; P 0448, Dako) (1:2000) w DPBST z 2% mlekiem odtłuszczonym. Membranę inkubowano z przeciwciałem na kołysce laboratoryjnej przez 1 h w RT. Detekcję miejsc związania przeciwciał z białkiem przeprowadzono wykorzystując zestaw na chemiluminescencji (SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate; 34580, Thermofisher). Tuż przed wizualizacją, stosując się do instrukcji producenta, zmieszano
równe objętości odczynnika zawierającego luminol oraz drugiego zawierającego nadtlenek (*Peroxide Solution*) i dodano mieszaninę na membranę. Inkubację prowadzono w ciemności, przez 5 min w RT. Po tym czasie przemyto membranę w wodzie Mili-Q i wykorzystując aparat G:BOX zebrano sygnał chemiluminescencyjny.

3.3.21. Spektrometria masowa białek wyizolowanych z EVs

Przygotowanie próbek

Po 3 próbki EVs (pochodzące z niezależnych hodowli i izolacji) o objętości 400 μ L zmieszano ze 100 μ L 100% TCA (EVs drożdżowe) lub 150 μ L 100% TCA + 0,15% DOC (2:1) i intensywnie mieszano na worteksie przez 10 min w 4°C a następnie inkubowano w tej samej temperaturze przez kolejne 30 min. Próbki zwirowano (5 – 15 min, 4°C, 15000× g), odrzucono supernatant, a osady białkowe przemyto 3-krotnie lodowatym acetonem, aby usunąć jak najwięcej TCA. Pozostały po płukaniu aceton odparowano w kilka minut w 37°C.

Analiza LC-MS/MS

Osady białkowe zamrożono i przekazano do Środowiskowej Pracowni Spektrometrii Mas działającej w Instytucie Biochemii i Biofizyki Państwowej Akademii Nauk, gdzie zostały wykonane analizy LC-MS/MS.

Białka z EVs drożdżowych rozpuszczono w 50 μ L 100 mM wodorowęglanu amonu, następnie dodano do nich 1 μ g trypsyny (Promega) i inkubowano próbki przez noc w 37°C. Po zakończeniu trawienia rozcieńczono próbki 50 mM roztworem wodorowęglanu trietyloamoniowego (ang. *triethylammonium bicarbonate*, TEAB) do końcowej objętości 100 μ L i zakwaszono kwasem mrówkowym (ang. *formic acid*, FA) do stężenia końcowego 0,1%.

Natomiast osady białkowe z EVs-VIO rozpuszczono w 50 µL 20% 2,2,2-trifluoroetanolu w 100 mM wodorowęglanie amonu, następnie dodano do nich 1 µg trypsyny i inkubowano próbki przez noc w 37°C. Po trawieniu próbki zostały poddane oczyszczaniu z wykorzystaniem jednopunktowej, stało-fazowej metody przygotowani próbek (SP3). W tym celu wykorzystano hydrofilowe oraz hydrofobowe kulki magnetyczne (09-981-121 oraz 09-981-123, GE Healthcare), które zmieszano ze sobą w równej ilości. Następnie kulki 3-krotnie przemyto wodą o stopniu czystości odpowiednim do przeprowadzenia spektrometrii mas (*MS grade*). Na

koniec zawieszono kulki uzyskując stężenie 10 $\mu g/\mu L$ i dodano je do próbek. Oczyszczone peptydy wymyto używając 2% acetonitrylu w wodzie MS grade. Roztwór odparowano w koncentratorze próżniowym SpeedVac i zawieszono, poprzez sonikację, w 80 μ L mieszaniny 0,1% kwasu trifluorooctowego i 2% acetonitrylu. Próbki poddano analizie za pomocą systemu LC-MS/MS, wykorzystując jednorazowe kolumny Evotips C18 (Evotips C18 trap columns, Evosep Biosystems). Najpierw kolumny aktywowano 25 μ L rozpuszczalnika B, czyli 0,1% kwasu mrówkowego w acetonitrylu (wirowanie: 1 min, 600× *g*), a następnie 2 min inkubacji w 2-propanolu. Po aktywacji, kolumny ustabilizowano przez przepuszczenie 25 μ L rozpuszczalnika A, czyli 0,1% kwasu mrówkowego w wodzie i zwirowano (1 min, 600× *g*). Następnie naniesiono na kolumny po 20 μ L każdej próbki i załadowano na fazę stałą poprzez zwirowanie (1 min, 600× *g*). Związane na kolumnie peptydy przemyto dwukrotnie 100 μ L (wirowanie: 1 min, 600× *g*) i pokryto 200 μ L rozpuszczalnika A.

Chromatografię przeprowadzono przy przepływie 250 nL/min, stosując 88-min gradient na kolumnie analitycznej EV1106 (Dr Maisch C18 AQ, kulki 1,9 µm, średnica wewnętrzna 150 µm, długość 15 cm, Evosep Biosystems). Dane zbierano w trybie dodatnim (*Positive mode*) za pomocą metody zależnej od danych, stosując następujące parametry:

- MS1: rozdzielczość 60000; znormalizowany cel AGC 300%; maksymalny czas wstrzykiwania: Auto; zakres skanowania – 300 – 1600 m/z,
- MS2: rozdzielczość 15000; znormalizowany cel AGC standardowy; maksymalny czas wstrzykiwania: Auto,
- do analizy MS/MS brano pod uwagę 40 najlepszych prekursorów w oknie izolacji 1,6 m/z,
- wykluczenie dynamiczne: 20 sek; tolerancja masy: ±10 ppm,
- prekursory rozdrobniono w trybie HCD przy znormalizowanej energii zderzenia 30%,
- napięcie natrysku: 2,1 kV,
- poziom RF lejka: 40,
- temperatura podgrzewanej kapilary: 275°C.

Analiza wyników

Dane uzyskane z analiz MS/MS zostały przetworzone za pomocą oprogramowania Mascot Distiller (wersja 2.4.2.0, Matrix Science). Masy peptydów i widma fragmentacji zostały porównane z bazami danych *Saccharomyces Genome Database* (SGD, 2016) – dla EVs-Sb oraz

NCBIprot - dla *Kluyveromyces marxianus* lub *Janthinobacterium lividum* odpowiednio dla EVs-WUT240 lub EVs-VIO. W tym celu wykorzystano wyszukiwarkę Mascot – Mascot Daemon (wersja 2.4.0, Matrix Science) oraz Mascot Server (wersja 2.4.1, Matrix Science), przy poniższych założeniach wyszukiwania:

- specyficzność enzymu: trypsyna,
- tolerancja masy peptydów: 5 ppm,
- tolerancja masy fragmentów: 0,01 Da,
- modyfikacja stała: metylacja cysteiny,
- modyfikacja zmienna: oksydacja metioniny,
- masa białka: nieograniczona,
- maksymalna liczba miejsc nieprzeciętych: 2.

W przypadku próbek EVs-Sb oraz EVs-VIO wyniki zostały zdeponowane w ProteomeXchange Consortium poprzez repozytorium PRIDE (EVs-Sb: PXD042660; EVs-VIO: PXD050374).

Aby znaleźć białka wspólne dla 3 powtórzeń biologicznych lub też porównania wyników z literaturą wykorzystano narzędzie online w postaci generatora wykresów Vienn'a (https://www.biovenn.nl/; dostęp: 26.12.2024).

3.3.22. Pomiar potencjału elektrokinetycznego błony komórkowej (potencjału zeta, ζ)

Zeta potencjał EVs oraz zmiany w ładunku błonowym komórek pod wpływem EVs sprawdzano przy użyciu Zetasizer Nano. Komórki HT-29, HCT116 oraz CCD-841 CoN odklejono od powierzchni naczyń hodowlanych, zliczono i rozcieńczono w DPBS do gęstości $7,5\cdot10^5$ komórek/mL ¹⁹⁶. Następnie przygotowano 4 probówki dla każdej z testowanych linii i umieszczono w nich po 400 µL przygotowanych zawiesin komórek (w każdej z prób było $3,0\cdot10^5$ komórek), do których dodano kolejno: (1) 600 µL DPBS, (2) 600 µL EVs-Sb w DPBS ($1,0\cdot10^5$ EVs/komórkę), (3) 600 µL EVs-WUT240 w DPBS ($1,0\cdot10^5$ EVs/komórkę) oraz (4) 600 µL 0,5 µM EVs-VIO rozcieńczonych w DPBS. Probówki intensywnie wymieszano na worteksie i umieszczono na 60 min w inkubatorze (37° C). Co 10 min delikatnie mieszano zawartość probówek, poprzez kilkukrotne odwracanie ich do góry dnem. Po zakończeniu inkubacji próbki zwirowano. Osad komórkowy zawieszono w 1 mL 1x PBS, w całości przeniesiono do kuwety pomiarowej z elektrodami (Folded capillary cells; DTS1060,

MALVERN Instruments) i wykonywano pomiary potencjału błonowego komórek, zgodnie z poniższymi parametrami:

- typ pomiaru: potencjał zeta (Zeta Potential),
- materiał badany: białka (protein; współczynnik załamania światła: 1,450; absorpcja: 0,001) – ze względu ma brak precyzyjniejszego wzorca w oprogramowaniu urządzenia wybrano "białka", które stanowią bardzo duży ładunek pęcherzyków zewnątrzkomórkowych,
- nośnik próbki: PBS (temperatura: 25°C; lepkość: 0,9061 cP; współczynnik załamania światła: 1,332; stała dielektryczna: 78,5),
- ustawienia ogólne: model Smoluchowskiego; parametr F(κa): 1,50,
- temperatura: 25°C; czas stabilizacji: 60 sek,
- typ kuwety pomiarowej: kapilarna, Green Cell,
- kąt pomiaru: 173° Backscatter (NIBS default) Non-Invasive Back-Scatter Technology,
- czas trwania pomiaru: ustawienie manualne; liczba powtórzeń w ramach pojedynczego pomiaru (*runs*): 11; czas pojedynczego powtórzenia: 10 sek,
- liczba pomiarów każdej próbki: 3 bez opóźnienia między kolejnymi powtórzeniami,
- model analizy: automatyczny.

3.3.23. Test na aktywność metaboliczną komórek (ang. MTT assay)

Komórki HT-29 oraz HCT116 wysiano na płytkę 96-dołkową w ilości $5,0\cdot10^3$ komórek/dołek w pełnym medium McCoy's $5A^+$. Ze względu na znacznie większe rozmiary (w porównaniu z komórkami nowotworowymi) komórki prawidłowe CCD841 CoN wysiano na taką samą płytkę w mniejszej ilości $(2,5\cdot10^3$ komórek/dołek) w pełnym medium MEM⁺. Komórki umieszczono w inkubatorze (37° C, 5% CO₂, 95% wilgotności) na 24 h. Po tym czasie przygotowano różne stężenia EVs w pełnym medium hodowlanym. Aby zachować odpowiednią proporcję liczby pęcherzyków przypadających na pojedynczą komórkę, przygotowano 2 zestawy różnych stężeń EVs: $9,0\cdot10^7$, $9,0\cdot10^8$, $4,5\cdot10^9$ i $9,0\cdot10^9$ EVs/mL w medium McCoy's $5A^+$ (dla komórek HT-29 i HCT116); oraz $4,5\cdot10^7$, $4,5\cdot10^8$, $2,3\cdot10^9$ i $4,5\cdot10^9$ EVs/mL w podłożu MEM⁺ (dla komórek CCD841 CoN). Wymieniono medium hodowlane na świeże, zawierające EVs (100μ L/dołek) i prowadzono hodowlę w jednakowych warunkach przez kolejne 24 h. Następnego dnia przygotowano rozcieńczenia soli MTT

w odpowiednich pożywkach (1 mg/mL w MEM – CCD841 CoN oraz 0,5 mg/mL w McCoy's 5A – HT-29, HCT116). Medium hodowlane z EVs zostało odebrane z dołków, a komórki delikatnie przemyto DPBS (100 µL/dołek). Do każdego dołka dodano 100 µL medium McCoy's 5A z 0,5 mg/mL soli MTT (w przypadku komórek HT-29 oraz HCT116) lub 100 µL medium MEM z 1,0 mg/mL soli MTT (w przypadku komórek CCD841 CoN). Komórki umieszczono w inkubatorze (w tych samych co wcześniej warunkach) na kolejne 2 h. Następnie medium odebrano z dołków, a komórki delikatnie przemyto DPBS (100 µL/dołek). Odebrano DPBS i do każdego dołka dodano po 50 µL czystego DMSO (423635509, CHEMPUR). Płytkę z komórkami umieszczono w nieprzeźroczystym pojemniku, aby zapewnić ciemność i inkubowano w RT przez 5 min. na kołysce laboratoryjnej. Po tym czasie za pomocą czytnika płytek zmierzono absorbancję przy długości fali 570 nm.

Aktywność metaboliczną komórek hodowanych w obecności EVs mikrobiologicznych wyznaczono jako procent aktywności metabolicznej komórek kontrolnych (hodowanych w pełnym medium bez dodatkowych czynników), stosując równanie (8).

$$aktywność metaboliczna = \frac{absorbancja_{komórek pod wpływem EVs}}{absorbancja_{komórek kontrolnych}} \cdot 100\%$$
(8)

3.3.24. Test na poziom produkcji reaktywnych form tlenu (ang. *Reactive Oxygen Species assay*, ROS)

Bazując na metodyce ¹⁹⁷, badane komórki oraz EVs w mediach hodowlanych przygotowano zgodnie z metodyką opisaną w **3.3.23.** Oprócz nich przygotowano także kontrolę pozytywną (100 μ M t-BHP) oraz negatywną (5 mM GSH) generowania ROS przez komórki (wyniki kontroli stanowią **Załącznik 1.**), a także 20 μ M roztwór dcFDA w odpowiednich mediach hodowlanych Medium hodowlane z dołków zostało odebrane, a komórki delikatnie przemyto DPBS (100 μ L/dołek). Następnie do każdego dołka dodano po 100 μ L świeżo przygotowanego 20 μ M roztworu dcFDA w odpowiednim dla komórek medium (McCoy's 5A/MEM) i umieszczono je ponownie w inkubatorze (w ciemności i 37°C) na 1 h. Po tym czasie z dołków dodano po 100 μ L świeżo przygotowanych wariantów testowych w odpowiednich dla komórek mediach (McCoy's 5A⁺/MEM⁺): 100 μ M t-BHP, 5 mM GSH oraz różne stężenia EVs mikrobiologicznych. Komórki umieszczono w inkubatorze na kolejne 24 h. Następnego dnia za pomocą czytnika płytek Synergy H4 Hybrid zmierzono intensywność fluorescencji przy 485±9/535±9 nm (wzbudzenie/emisja).

Poziom produkcji ROS przez komórki hodowane w obecności EVs mikrobiologicznych/kontroli pozytywnej/kontroli negatywnej wyznaczono jako procent poziomu produkcji ROS przez komórki kontrolne (hodowane w pełnym medium bez dodatkowych czynników), równanie (9).

 $poziom \ produkcji \ ROS = \frac{intensywność \ fluorescencji_{komórek \ pod \ wpływem \ EVs/t-BHP/GSH}{intensywność \ fluorescencji_{komórek \ kontrolnych}} \cdot 100\%$ (9)

3.3.25. Barwienie fioletem krystalicznym, wyznaczanie zmian w liczebności próby (ang. *Crystal Violet assay*, CV)

Płytki z komórkami po spektrofotometrycznym odczycie fluorescencji (punkt **3.3.23.**) zostały wykorzystane do oznaczenia zmian liczebności hodowli. W tym celu z dołków odebrano medium hodowlane, a komórki delikatnie przemyto DPBS (100 μ L/dołek). Po czym do każdego dołka dodano 50 μ L 3,7% paraformaldehydu w DPBS i inkubowano płytkę w ciemności przez 15 min w RT. Usunięto PFA, a komórki delikatnie przemyto DPBS (100 μ L/dołek), a następnie dodano po 50 μ L 0,05% roztworu fioletu krystalicznego. Płytki delikatnie bujano na kołysce laboratoryjnej w RT przez 45 – 60 min. Po czym odebrano barwnik z dołków i delikatnie przemyto komórki, najpierw DPBS (300 μ L/dołek), a następnie 2-krotnie wodą Mili-Q. Przy każdym z płukań pozostawiono płytkę w RT na 5 min na kołysce laboratoryjnej. Po wypłukaniu niezwiązanego barwnika, pozostawiono płytkę w RT do wyschnięcia. Następnego dnia do każdego dołka dodano 50 μ L czystego alkoholu metylowego i umieszczono płytkę na 5 min na kołysce laboratoryjnej. Po tym czasie odczytano absorbancję w dołkach przy użyciu czytnika płytek i przy długości fali 570 nm, a liczebność hodowli wyznaczono jako procent liczebności hodowli kontrolnej ze wzoru (10).

$$liczebność hodowli = \frac{absorbancja_{komórek pod wpływem EVs}}{absorbancja_{komórek kontrolnych}} \cdot 100\%$$
(10)

3.3.26. Barwienie EVs lipofilowym barwnikiem Nile Red oraz potwierdzenie przeniesienia barwnika między pęcherzykiem a komórką ludzką

Barwienie EVs Nile Red

Roztwór wyjściowy Nile Red w acetonie (2,5 mg/mL) rozcieńczono 26-krotnie, poprzez dodanie 4 μ L barwnika do 100 μ L EVs mikrobiologicznych w DPBS (po 2,8·10⁹ EVs/mL). Jednocześnie przygotowano kontrolę oczyszczania (4 μ L Nile Red + 100 μ L DPBS). Próbki wymieszano na worteksie, delikatnie zwirowano i inkubowano przez 15 min w ciemności,

w RT. Następnie przeniesiono próbki na filtry wirówkowe o punkcie odcięcia 10 kDa i zwirowano (15 min, 14000× g). Odrzucono przesącz, a zatrzymane na filtrach EVs przemyto 6-krotnie 400 µL DPBS, aby spłukać niezwiązany barwnik. Płukanie próbek wykonano poprzez następujące po sobie dodawanie 400 µL DPBS, wirowanie (15 min, 14000× g) i odrzucenie przesączu. Po ostatnim płukaniu, odwróconą do góry dnem, kolumienkę umieszczono w nowej 2,0-mL probówce i zebrano próbkę poprzez odwrócone wirowanie tzw. *reverse spin* (2 min, 1000× g). Następnie, za pomocą pipety automatycznej, zmierzono objętość zebranej z filtra frakcji zawierającej wybarwione pęcherzyki (EVs_NR) i dodano DPBS do początkowej objętości 100 µL. Kontrola oczyszczania w postaci DPBS z Nile Red była niezbędna do oceny czy cały barwnik nie związany z EVs został wymyty.

Inkubacja komórek eukariotycznych z EVs NR

Dzień przed barwieniem EVs na sterylne szkiełka o $\emptyset 10 \text{ mm}$ (Microscope Cover Glasses 10 mm \emptyset ; 0111500, Paul Marirnfeld GmbH) umieszczone w płytce 24-dołkowej wysiano komórki HT-29, HCT116, CCD-18Co oraz CCD841 CoN w ilości 2,5 $\cdot 10^4$ komórek/dołek (w objętości 400 µL pełnego medium hodowlanego). Płytki umieszczono w inkubatorze (37°C, 5% CO₂, 95% wilgotności) na 24 h.

Następnego dnia przygotowano media hodowlane z EVs_NR poprzez 10-krotne rozcieńczenie następujących czynników w odpowiednim pełnym medium hodowlanym: (1) DPBS, (2) EVs-Sb_NR, (3) EVs-Sb, (4) EVs-WUT240_NR, (5) EVs-WUT240, lub (6) EVs-VIO_NR czy (7) EVs-VIO (rozcieńczonych w DPBS tak aby końcowe stężenie wiolaceiny w dołku wynosiło 0,5 μM), a także (8) DPBS_NR (jako kontrolę procesu oczyszczania). Następnie odebrano znad komórek całe medium i dodano do każdego dołka po 250 μL mediów zawierających EV_NR, DPBS_NR lub DPBS (jako kontrolę negatywną barwienia). Płytki umieszczono w inkubatorze na kolejne 24 h.

Utrwalanie preparatów i barwienie chromatyny

Po zakończonej inkubacji odebrano znad komórek medium hodowlane i przemyto komórki DPBS (400 µL/dołek). Odebrano DPBS i delikatnie dodano na dołki po 250 µL 3,7% paraformaldehydu w DPBS. Płytkę inkubowano przez 20 min w ciemności i RT. Następnie odebrano roztwór utrwalający, naniesiono po 250 µL 0,5 µg/mL Hoechst 33342 w DPBS i ponownie trzymano płytkę w zaciemnieniu przez 20 min. Następnie odebrano roztwór

barwnika, 2-krotnie przemyto komórki DPBS (2x 5 min w RT i zaciemnieniu). Na koniec dodano do dołków po 500 μL sterylnej wody Mili-Q. Tak przygotowane preparaty przechowywano w 4°C i ciemności przez maksymalnie 7 dni.

Dokumentacja fotograficzna

Szkiełka z utrwalonymi preparatami oglądano na mikroskopie fluorescencyjnym przy 600-krotnym powiększeniu (obiektyw $60 \times$ – Nikon, Plan Fluor objective lens $60 \times /0.85 \infty / 0.11 - 0.23$ WD 0.40-0.31 B oraz okular $10 \times$) w świetle:

- (1) białym (DIC),
- (2) niebieskim (wzbudzenie: FF01-392/23 nm, emisja: FF02-447/60 nm) Hoechst 33342,
- (3) czerwonym (wzbudzenie: FF01-554/23 nm, emisja: FF02-609/54 nm) NR,
- (4) zielonym (wzbudzenie: FF01-474/27 nm, emisja: FF02-525/45 nm) wiolaceina.

3.3.27. Ładowanie EVs doksorubicyną (EVs_DOX) oraz oranżem akrydyny (EVs_AO) i potwierdzenie przeniesienia ładunku do wnętrza komórek ludzkich

ładowanie EVs doksorubicyną (EVs_DOX)

Do probówek 1,5-mL zawierających po 500 μ L: (1) EVs-Sb, (2) EVs-WUT240 lub (3) 500 μ L sterylnego DPBS (kontrola oczyszczania) dodano po 500 μ L 2,5 mg/mL doksorubicyny. Próbki wymieszano na worteksie i delikatnie zwirowano (30 sek.), aby zebrać ciecz ze ścianek probówki. Następnie próbki inkubowano w 4°C w ciemności przez 20 h. Kolejnego dnia próbki wymieszano na worteksie i wirowano (5 min, 11400× *g*, RT). Aby usunąć niezaładowaną do EVs doksorubicynę, próbki przeniesiono na filtr wirówkowy o punkcie odcięcia 50 kDa i wirowano (15 min, 14000× *g*, RT). Przesącz zawierający niezaładowaną doksorubicynę odrzucono i dodano na pęcherzyki 500 μ L DPBS. Ponownie odrzucono przesącz a płukanie powtarzano, aż zniknęło różowo-pomarańczowe zabarwienie próbek, czyli przeprowadzano łącznie min. 5 płukań. Za pomocą pipety automatycznej zmierzono objętość frakcji pęcherzykowych zatrzymanych na membranach i dopełniono je DPBS do początkowej objętości 400 μ L.

Ładowanie EVs-WUT240 oranżem akrydyny

Do dwóch probówek 1,5-mL zawierających (1) 500 µL EVs-WUT240 lub (2) 500 µL sterylnego DPBS (kontrola oczyszczania) dodano 500 µL oranżu akrydyny o stężeniu 125 µg/mL. Próbki krótko wymieszano na worteksie i delikatnie zwirowano, aby zebrać ciecz ze ścianek probówek. Stężenie robocze oranżu akrydyny podczas ładowania wynosiło 62,5 µg/mL. Następnie umieszczono próbki w ciemności w 4°C na około 20 h. Po tym czasie próbki wymieszano na worteksie i zwirowano (5 min, $11400 \times g$, RT). Aby usunąć niezwiązany oranż akrydyny, próbki przeniesiono na wirówkowe filtry membranowe o punkcie odcięcia 10 kDa (Amicon Ultra – 2, membrana z regenerowanej celulozy; UFC201024, MERCK) (15 min, 14000× g, RT). Odrzucono przesącz, a do EVs-WUT240, które zostały zatrzymane na filtrze dodano 500 µL sterylnego DPBS. Ponownie zwirowano próbkę. Etapy odrzucania przesączu, dodawania DPBS oraz wirowania stanowiły proces oczyszczania EVs-WUT240 z niezwiązanego związku i przeprowadzono je łącznie 5-krotnie. Po ostatnim płukaniu odwrócony filtr umieszczono w nowej, sterylnej probówce o objętości 2 mL i zwirowano (2 min, 1000× g, RT), aby zebrać próbkę zatrzymaną na tym filtrze. Sprawdzono objętość odzyskanej próbki rozcieńczono ją taką objętością sterylnego DPBS, aby uzyskać 500 µL EVs-WUT240 AO.

Inkubacja komórek ludzkich z EVs DOX oraz EVs-WUT240 AO

Inkubację EVs_DOX i EVs-WUT240_AO z ludzkimi komórkami przeprowadzono zgodnie z procedurą dla EVs-NR, opisaną w punkcie **3.3.26**.

Kontrolą pozytywną była wolna doksorubicyna i oranż akrydyny o końcowych stężeniach w dołkach z komórkami odpowiednio 0,125 mg/mL i 1 µg/mL.

Dokumentacja fotograficzna

Obserwacje i dokumentację fotograficzną prowadzono, tak jak w punkcie **3.3.26.**, na mikroskopie fluorescencyjnym przy 600-krotnym powiększeniu w 4 kanałach świetlnych: białym – DIC, niebieskim – Hoechst 33342, czerwonym – DOX, zielonym – AO oraz wiolaceina.

3.3.28. Inne przetestowane metody wprowadzania do EVs doksorubicyny

• elektroporacja

Do sterylnych probówek 1,5-mL przeniesiono 300 µL 0,17 mg/mL DOX i dodano po 100 µL EVs drożdżowych (EVs-Sb oraz EVs-WUT240). Jako kontrolę negatywną procesu ładowania oraz oczyszczania przygotowano próbkę, w której zamiast 100 µL EVs dodano 100 µL DPBS.

Mieszaniny delikatnie wymieszano poprzez pipetowanie góra-dół i przeniesiono do sterylnych kuwet do elektroporacji (Gene Pulser Cuvettes mini pack – 0,2 cm gap; 1652082, BIO-RAD). Próbki kolejno umieszczano w elektroporatorze i wykonano pojedynczy impuls (250 V; 0,8 ms). Następnie zebrano próbki i przeniesiono mieszaniny na wirówkowe filtry membranowe o punkcie odcięcia 10 kDa (Amicon Ultra – 0,5; UFC501096, MERCK) i zwirowano próbki (15 min, 14000× g, RT). Odrzucono przesącz zawierający wolną doksorubicynę i 5-krotnie przemyto pęcherzyki 500 μ L DPBS. Po ostatnim płukaniu, odwrócony filtr umieszczono w nowej, sterylnej o objętości 2 mL i zwirowano (2 min, 1000× g, RT), aby zebrać próbkę zatrzymaną na tym filtrze. Sprawdzono objętość odzyskanej próbki i rozcieńczono ją taką objętością sterylnego DPBS, aby uzyskać 100 μ L EVs_DOX_{elektroporacja}.

• elektroporacja i następujące po niej ładowanie bierne

Pierwszy krok ładowania (włącznie z elektroporacją) wykonano zgodnie z procedurą opisaną w punkcie **3.3.28.** podpunkt elektroporacja. Następnie zebrano próbki i przeniesiono mieszaniny do sterylnych 1,5-mL probówek, zabezpieczono je folią aluminiową i umieszczono na noc (około 16 h) w 4°C. Następnego dnia zawartość probówek przeniesiono na wirówkowe filtry membranowe o punkcie odcięcia 10 kDa i oczyszczono tak jak opisano w punkcie **3.3.28.** podpunkt elektroporacja. Sprawdzono objętość odzyskanej próbki rozcieńczono ją taką objętością sterylnego DPBS, aby uzyskać 100 μL EVs_DOX _{elektroporacja+bierne}.

ładowanie bierne w obecności sacharozy

Pod komorą laminarną, do probówek 1,5-mL przeniesiono po 100 μ L 4 mg/mL lub 2 mg/mL DOX, do których dodano 100 μ L EVs drożdżowych oraz 200 μ L 400 mM sacharozy. Jako kontrolę negatywną procesu ładowania oraz oczyszczania przygotowano próbkę, w której zamiast 100 μ L EVs dodano 100 μ L DPBS. Próbki wymieszano na worteksie i delikatnie zwirowano, aby zebrać ciecz ze ścianek probówek. Następnie owinięto je folią aluminiową i umieszczono na noc (około 16 h) w 4°C.

Po zakończonej inkubacji, próbki przeniesiono na wirówkowe filtry membranowe o punkcie odcięcia 10 kDa i oczyszczono tak jak opisano powyżej. Na koniec sprawdzono objętość odzyskanej próbki i rozcieńczono ją taką objętością sterylnego DPBS, aby uzyskać 100 μL EVs_DOX sacharoza.

3.3.29. Monitorowanie szybkości wchłaniania EVs-WUT240_AO oraz EVs_NR przez komórki eukariotyczne

Komórki (HT-29, HCT116 oraz CCD841 CoN) wysiano na płytkę 24-dołkową po $2,5\cdot10^4$ komórek/dołek w 400 µL odpowiedniego, pełnego medium hodowlanego. Płytkę z komórkami umieszczono w inkubatorze na 24 h (37°C, 5% CO₂, 95% wilgotności).

Następnego dnia przygotowano media hodowlane z EVs-WUT240_AO w ilości $5,0\cdot10^5$ EVs/komórkę oraz EVs-VIO_NR o 50 µM stężeniu wiolaceiny. Usunięto medium znad komórek i dodano po 250 µL/dołek mediów z pęcherzykami.

Zaraz po dodaniu mediów do dołków, płytkę umieszczono na urządzeniu do obrazowania, które umieszczone było w inkubatorze do hodowli komórek – Celloger Nano (CURIOSIS) lub w temperaturze pokojowej – ZOE (Bio-Rad).

Zdjęcia na Celloger wykonywane były automatycznie co 15 min w świetle białym oraz w zielonej fluorescencji (CWL/BW [nm] – wzbudzenie: 480/30; emisja: 535/40). Natomiast zdjęcia wykonywane przy użyciu ZOE robione były co ok. 60 sek przez 5 min. Urządzenie pracowało w 3 trybach: światło białe; zielona fluorescencja (CWL/BW [nm] – wzbudzenie: 480/17; emisja: 517/23); oraz czerwona fluorescencja (CWL/BW [nm] – wzbudzenie: 556/20; emisja: 615/61).

- CWL (ang. *center wavelength*, CWL) oznacza centralną/średnią długość fali promieniowania
- BW (ang. bandwidth, BW) oznacza szerokość pasma, czyli zakres długości fal, w którym skupiona jest większość energii promieniowania

3.3.30. Wyznaczenie wydajności ładowania doksorubicyny (DOX) oraz oranżu akrydyny (AO) do EVs

Przygotowano szereg stężeń oranżu akrydyny oraz doksorubicyny w wodzie Mili-Q do wyznaczenia krzywej wzorcowej. Próbek DPBS, EVs, EVs_AO, DPBS_AO, EVs_DOX oraz

DPBS_DOX nie rozcieńczano. Na dołki płytki 96-dołkowej naniesiono, w 3 powtórzeniach technicznych, po 100 µL wzorców i próbek, a czytnikiem płytek rejestrowano intensywność fluorescencji związków:

- (1) oranż akrydyny: 0; 0,005; 0,010; 0,025; 0,050; 0,100; 0,250; 0,500; 1000 [ng/mL]
 (wzbudzenie: 495±9 nm/ emisja: 518±9 nm) linia trendu: wielomianowa, stopień: 2,
- (2) doksorubicyna: 0; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 2,5 [μg/mL] (wzbudzenie: 470±9 nm/ emisja: 595±9 nm) linia trendu: liniowa.

Na podstawie przygotowanych krzywych standardowych intensywności fluorescencji uzyskane dla próbek odczyty przeliczono na stężenia związków (AO lub DOX). Natomiast wydajność ładowania wyliczono poprzez odniesienie uzyskanych stężeń do wyjściowych stężeń związków użytych podczas ładowania (AO – 62,5 µg/mL; DOX – 1 mg/mL).

3.3.31. Hodowla długoterminowa (ang. LongTerm assay)

Komórki (CCD-18Co, CCD841 CoN, HT-29 oraz HCT116) wysiano na butelki hodowlane o powierzchni 25 cm² (T25) w ilości $1,0.10^5$ komórek na butelkę, w objętości 5 mL pełnego medium hodowlanego (odpowiednio MEM⁺ lub McCoy's 5A⁺). Butelki umieszczono na 24 h w inkubatorze (37°C, 5% CO₂, 95% wilgotności). Po tym czasie medium zastąpiono 2 mL odpowiedniego pełnego medium hodowlanego zawierającego EVs mikrobiologiczne w ilości 1,0.10⁵ EVs/komórkę (w przypadku EVs-Sb oraz EVs-WUT240) lub EVs-VIO odpowiadających 0,5 µM wiolaceiny. Hodowle kontrolne znajdowały się w tych samych warunkach z tą różnicą, że medium pozbawione było EVs. Komórki hodowano przez 7 dni, przy czym w 5-tym dniu hodowli do butelek hodowlanych dodano po 2 mL odpowiedniego pełnego medium hodowlanego (bez EVs). W dniu 7 wykonano zdjęcia poglądowe hodowli w świetle białym. Następnie przemyto komórki DPBS i dodano po 1 mL 0,25% trypsyny. Komórki umieszczono w inkubatorze na 5 - 10 min w celu dysocjacji enzymatycznej od powierzchni naczynia. Po zakończonej inkubacji trypsynę zneutralizowano poprzez dodanie 1 mL odpowiedniego pełnego medium hodowlanego i przeniesiono komórki do 15-mL probówki wirówkowej. Naczynia hodowlane przemyto 2-krotnie 2 mL DPBS, który zebrano do tych samych probówek co zawiesiny komórek. Następnie zliczono całkowitą liczbę komórek, które były w naczyniach hodowlanych wykorzystując równanie (10).

$$całkowita liczba komórek [komórek] = \frac{zliczona liczba komórek}{liczba pól} \cdot 10^4 \cdot 6$$
(10)

10⁴ – mnożnik umożliwiający przeliczenie gęstości komórek z 1 μL na 1 mL

6 – objętość zawiesiny komórek uzyskanej z każdego naczynia hodowlanego

3.3.32. Hodowla długoterminowa obciążona doksorubicyną (ang. LongTerm-DOX assay)

Na płytki 96-dołkowe (osobna płytka na test MTT oraz wspólna na testy ROS i CV) wysiano komórki (HT-29, HCT116, CCD841 CoN) w ilości $2,0\cdot10^3$ komórek/dołek w 100 µL odpowiedniego pełnego medium hodowlanego (McCoy's 5A⁺ lub MEM⁺). Płytki umieszczono w inkubatorze na 24 h (37°C, 5% CO₂ oraz 95% wilgotności).

Następnego dnia z płytek przeznaczonych na oznaczanie poziomu reaktywnych form tlenu odebrano medium, komórki przemyto DPBS i dodano po 100 μ L świeżo przygotowanego 20 μ M roztworu dcFDA w odpowiednim dla komórek medium (McCoy's 5A / MEM) i umieszczono je ponownie w inkubatorze (w ciemności i 37°C) na 1 h, zgodnie z wcześniej opisaną procedurą (**3.3.24.**).

W czasie inkubacji komórek z dcFDA przygotowano media hodowlane zawierające zewnątrzkomórkowe pęcherzyki mikrobiologiczne w ilości $1,0 \cdot 10^5$ EVs_DOX przypadających na pojedynczą komórkę (w przypadku EVs-Sb oraz EVs-WUT240) w 50 µL medium lub EVs-VIO_DOX odpowiadających 0,5 µM wiolaceiny. Każdy z testowanych wariantów wykonano w 3 powtórzeniach technicznych. Ponadto zastosowano 2 rodzaje kontroli, w których komórki hodowano: (1) w obecności niezaładowanych EVs mikrobiologicznych, dodanych w jednakowej ilości jak EVs po załadowaniu DOX oraz (2) bez dodatku jakichkolwiek EVs.

Wszystkie testowane warianty umieszczono na tej samej płytce i hodowano w jednakowych warunkach przez 7 dni. W 5-tym dniu hodowli do wszystkich komórek dodano po 50 μ L odpowiedniego pełnego medium hodowlanego bez EVs. Ostatniego, 7-ego dnia komórki delikatnie przemyto DPBS i przeprowadzono testy MTT oraz ROS zgodnie z procedurami opisanymi wcześniej (MTT – **3.3.23.** aktywność dehydrogenazy mitochondrialnej oraz ROS – **3.3.24.**) a także barwienie FDA/Pi (procedura opisana w punkcie **3.3.41.**). Po odczytaniu intensywności fluorescencji z płytki służącej do oznaczenia poziomu ROS, odebrano medium hodowlane, przemyto komórki DPBS, utrwalono je 3,7% PFA i wykonano test CV (zgodnie z procedurą opisaną w punkcie **3.3.25.**).

3.3.33. Badanie tempa proliferacji komórek (ang. BrdU assay)

Analogicznie jak podczas prowadzenia testów MTT (**3.3.23.**), ROS (**3.3.24.**) a także CV (**3.3.25.**), komórki HT-29 oraz HCT116 wysiano na płytkę 96-dołkową w ilości $5,0\cdot10^3$ komórek/dołek w pełnym medium McCoy's $5A^+$, natomiast komórki prawidłowe CCD841 CoN wysiano na taką samą płytkę w mniejszej ilości (2, $5\cdot10^3$ komórek/dołek) w pełnym medium MEM⁺. Komórki umieszczono w inkubatorze (37°C, 5% CO₂, 95% wilgotności) na 24 h. Po tym czasie przygotowano EVs-WUT240 oraz EVs-WUT240_DOX w pełnym medium hodowlanym, tak aby na każdą komórkę przypadało 1,0 · 10⁵ pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Przygotowano także rozcieńczenia samej doksorubicyny w pełnych mediach hodowlanych o stężeniach 2 µg/mL (do traktowania komórek HT-29 oraz HCT116) oraz 1 µg/mL (do traktowania komórek CCD841 CoN). Następnie wymieniono medium na płytkach hodowlanych na świeże, zawierające EVs, EVs-DOX lub czystą doksorubicynę (100 µL/dołek) i umieszczono komórki w inkubatorze na 2 h.

W tym czasie przygotowano roztwór roboczy BrdU, wykorzystując BrdU Reagent z zestawu BrdU Cell Proliferation Assay (2750, Merck), który rozcieńczono 500-krotnie w odpowiednim medium hodowlanym. Po 2 h od dodania EVs do każdego testowanego dołka dodano po 10 μ L przygotowanego roztworu BrdU i umieszczono komórki ponownie w inkubatorze na kolejne 22 h.

Następnego dnia medium hodowlane zawierające EVs zostało odebrane z dołków, a na komórki dodano po 100 μ L roztworu do utrwalania – *Fixing solution* (wcześniej ogrzanego do RT) i inkubowano płytkę przez 30 min w RT. W tym czasie przygotowano roztwór płuczący poprzez 50-krotne rozcieńczenie 50X *Plate Wash Concentrate* w wodzie Mili-Q. Po zakończonej inkubacji odebrano roztwór utrwalający, a komórki 3-krotnie przemyto przygotowanym buforem płuczącym (1x 200 μ L oraz 2x 150 μ L buforu/dołek). Następnie odebrano z dołków bufor i dodano po 50 μ L roztworu mysiego monoklonalnego przeciwciała I-rzędowego Anty-BrdU, klon BU-1 (MAB3510, Merck), które uprzednio rozcieńczono 7500-krotnie w DPBST. Płytkę inkubowano przez 1 h w RT. Następnie tak jak wcześniej przemyto komórki buforem płuczącym (1x 200 μ L oraz 2x 150 μ L buforu/dołek).

Pod koniec inkubacji komórek z przeciwciałem I-rzędowym przygotowano roztwór koziego anty-mysiego przeciwciała II-rzędowego sprzężonego z peroksydazą chrzanową (*Goat anti-Mouse IgG, Peroxidase labeled*). W tym celu przeciwciała z zestawu rozcieńczono 2000-krotnie w *Conjugate Diluent*. Po odebraniu buforu po ostatnim płukaniu na dołki dodano po 50 µL przygotowanego roztworu przeciwciała II-rzędowego i inkubowano płytkę 30 min

w RT. Po tym czasie odebrano roztwór przeciwciała i ponownie przeprowadzono 3-krotne płukanie buforem płuczącym. Na koniec przemyto dołki 200 μL wody Mili-Q. Usunięto wodę i osuszono dołki, poprzez położenie płytki do góry dnem na ręczniku papierowym.

Do dołków dodano po 50 µL TMB (ang. *tetramethylbenzidine*) z zestawu, płytkę umieszczono w nieprzeźroczystym pojemniku, aby zapewnić ciemność i inkubowano w RT przez 30 min (w wyniku reakcji peroksydazy chrzanowej z TMB powstaje produkt o niebieskim zabarwieniu). Następnie zatrzymano reakcję poprzez dodanie do dołków po 50 µL buforu hamującego (*Stop Solution*), czyli 2,5 N kwasu siarkowego (VI). W wyniku zakwaszenia następuje zmiana zabarwienia z niebieskiego na żółte. Przy użyciu czytnika płytek wykonano odczyt absorbancji przy długościach fali 450 oraz 550 nm.

Tempo proliferacji komórek hodowanych w obecności EVs, EVs_DOX lub wolnej doksorubicyny wyznaczono jako procent tempa proliferacji komórek kontrolnych (hodowanych w pełnym medium bez dodatkowych czynników), równanie (11).

$$tempo \ proliferacji = \frac{absorbancja_{komórek \ pod \ wpływem \ EVs}}{absorbancja_{komórek \ kontrolnych}} \cdot 100\%$$
(11)

3.3.34. Barwienie komórek oranżem akrydyny oraz jodkiem propidyny (barwienie AO/Pi)

Sterylne szkiełka nakrywkowe (Microscope Cover Glasses 10 mm ø; 0111500, Paul Marirnfeld GmbH) umieszczono w płytce 24-dołkowej. Do dołków dodano komórki w ilości 2,5 \cdot 10⁴ komórek/dołek (HT-29, HCT116 i CCD841 CoN) w 300 µL kompletnego medium odpowiedniego dla komórek (McCoy's 5A⁺ lub MEM⁺). Płytkę umieszczono na 24 h w inkubatorze (37°C, 5% CO₂, 95% wilgotności). Następnego dnia przygotowano pełne media hodowlane z EVs mikrobiologicznymi w ilości 1,0 \cdot 10⁵ EVs/komórkę (EVs-Sb lub EVs-WUT240) w 250 µL medium. Dodano świeżo przygotowane medium na komórki i prowadzono hodowlę przez 7 dni, podczas której w 5-tym dniu dodano 200 µL pełnego medium hodowlanego (bez EVs). Ostatniego, 7-ego dnia, komórki poddano barwieniu AO/Pi. Tuż przed barwieniem przygotowano mieszaninę barwiącą AO/Pi w DPBS (z roztworów wyjściowych AO: 5,0 mg/mL w DPBS; roztwór Pi: 1,0 mg/mL w DMSO), o końcowym stężeniu obu związków 2,0 µg/mL. Znad komórek odebrano medium hodowlane i dodano po 250 µL przygotowanej mieszaniny. Barwienie przemyto komórki 300 µL DPBS. Następnie odebrano bufor i dodano do komórek 300 µL czystego DPBS.

Wykorzystując mikroskop fluorescencyjny przeprowadzono obserwacje przyżyciowe przy 600-krotnym powiększeniu w świetle białym (DIC), czerwonej fluorescencji (wzbudzenie: FF01-554/23 nm, emisja: FF02-609/54 nm) – Pi, i zielonej fluorescencji (wzbudzenie: FF01-474/27 nm, emisja: FF02-525/45 nm) – AO.

3.3.35. Izolacja mRNA z komórek ludzkich, odwrotna transkrypcja oraz qPCR

Hodowla komórek

Komórki HT-29, HCT116 oraz CCD841 CoN wysiano na płytkę 12-dołkową w ilości $5,0\cdot10^5$ komórek/dołek w 1,5 mL odpowiedniego, kompletnego medium hodowlanego (odpowiednio McCoy's 5A⁺ lub MEM⁺). Płytkę umieszczono na 24 h w inkubatorze (37°C, 5% CO₂, 95% wilgotności). Następnego dnia przygotowano po 1,5 mL pełnych pożywek hodowlanych z EVs mikrobiologicznymi w ilości $1,0\cdot10^5$ EVs/komórkę (EVs-Sb lub EVs-WUT240) lub EVs-VIO odpowiadających 0,5 µM wiolaceinie. W hodowlach wymieniono pożywki na świeżo przygotowane i ponownie inkubowano płytki przez 24 h, w tych samych warunkach. Po zakończonej inkubacji, odebrano medium z EVs, komórki delikatnie przemyto DPBS, dodano 0,5 mL 0,25% trypsynę i umieszczono w inkubatorze (37°C, 5% CO₂, 95% wilgotności) na 10 min. Po tym czasie skontrolowano czy wszystkie komórki zostały odklejone od powierzchni naczynia. Dodano 0,5 mL odpowiedniego pełnego medium hodowlanego (McCoy's 5A⁺ / MEM⁺) w celu neutralizacji działania enzymu. Dokładnie zawieszono komórki przez pipetowanie góra-dół i przeniesiono je do probówek 1,5-mL, które wcześniej były 2-krotnie poddane sterylizacji za pomocą autoklawu (121°C, 20 min).

Izolacja mRNA

Wszystkie końcówki do pipet i probówki, które wykorzystywano przy izolacji i pracy z RNA były wcześniej 2-krotnie poddane sterylizacji za pomocą autoklawu (121°C, 20 min).

Zamknięte probówki umieszczono na 5 min na lodzie. Następnie zwirowano zawiesiny komórkowe (3 min, 4°C, $2000 \times g$). Dokładnie odebrano ciecz znad biomasy i zawieszono komórki w 500 µL zimnego – wyjętego z lodówki – RNA Extracol (E3700-02, EURx) poprzez intensywne wytrząsanie, a następnie próbki zamrożono w -80°C.

Aby przystąpić do dalszej izolacji mRNA, wyjęto probówki z zamrażarki niskotemperaturowej i rozmrażano je przez około 5 min w RT. Następnie dodano po 100 μ L chloroformu (cz.d.a.; 234431116, POCH S.A.) i wymieszano zawartość probówek poprzez ich ręczne odwracanie przez około 15 sek. Odstawiono próbki na statyw (5 min w RT) i następnie zwirowano (10 min, 4°C, 20000× g). Ostrożnie wyjęto probówki z wirówki, aby nie wymieszać faz i przeniesiono górną z nich (przeźroczystą fazę wodną zawierającą mRNA) do nowych probówek 1,5-mL.

Do każdej próbki dodano po 2 μ L ko-precypitantu DNA/RNA (Vivid Violet DNA/RNA Co-precipitate; E4502-01, EURx). Następnie dodano do nich także po 250 μ L zimnego – wyjętego z -20°C – alkoholu izopropylowego (cz.d.a., 751500111, POCH S.A.) i wymieszano probówki poprzez ich ręczne odwracanie. Następnie umieszczono próbki na lodzie i pozostawiono je na 30 min. Probówki zwirowano (10 min, 4°C, 20000× *g*) by osadzić na dnie probówki wytrącone RNA. Osad przemyto, poprzez dodanie 500 μ L 75% lodowatego (wyjętego z -20°C) alkoholu etylowego (396480111, POCH S.A.; w wodzie DEPC) i ręcznie wymieszano zawartość probówki poprzez jej kilkukrotne odwrócenie. Następnie zwirowano próbki (5 min, 4°C, 12000× *g*), odebrano supernatant i pozostawiono na dnie probówki osad do wyschnięcia (otwarte probówki, ok. 10 min w RT). Osuszone RNA zawieszono w 10 μ L wody wolnej od nukleaz (AmbionTM Nuclease-Free Water; AM9937, Invitrogen) i pozostawiono na 5 min w RT. Po tym czasie próbki wymieszano przez pipetowanie góra-dół i pobrano 2x 1 μ L do sprawdzenia ilości i jakości RNA. Pozostałe 8 μ L RNA zamrożono w -80°C.

Sprawdzenie ilości i czystości RNA:

Wykorzystując NanoDrop oznaczono stężenie RNA w wyizolowanych próbkach. Na urządzeniu wybrano program "RNA" i umieszczono 1 µL wody RNase/DNase-free na dolnej końcówce pomiarowej i opuszczono ramię urządzenia. Automatycznie uruchomił się pomiar próby ślepej, następnie oczyszczono końcówki pomiarowe i naniesiono kolejno po 1 µL wyizolowanych próbek. Po każdym pomiarze oczyszczano końcówki pomiarowe urządzenia.

Zebrano dane:

A260/A230 = 1,9 ÷ 2,1 (RNA uznaje się za "czyste", gdy wartość współczynnika mieści się w zakresie 1,8 – 2,2; A260/A230 < 1,8 oznacza zanieczyszczenie EDTA, polisacharydami, etanolem lub fenolem),

- A260/A280 = 1,9 ÷ 2,0 (RNA uznaje się za "czyste", gdy wartość współczynnika wynosi ~ 2,0; A260/A280 < 2,0 oznacza zanieczyszczenie białkami bądź fenolem lub też niskie stężenie RNA w próbce),
- stężenia RNA [ng/μL].

Sprawdzenie jakościowe otrzymanych próbek RNA

Oczyszczono zestaw do elektroforezy kwasów nukleinowych, poprzez wymoczenie go w 3% nadtlenku wodoru przez minimum 30 min w RT. Następnie zlano nadtlenek wodoru i przemyto wszystkie elementy w wodzie DEPC. Zmontowano układ do elektroforezy i przygotowano 1% żel agarozowy. Gdy żel stężał zalano go buforem 1xTAE w wodzie DEPC.

Zmieszano 1 μL wyizolowanego RNA, 1 μL barwnika (6x Loading Buffer BLUE; E0260-01, EURx) oraz 4 μL formamidu (F9037, Sigma-Aldrich). Przygotowane próbki oraz 5 μL znakowanego markera (Perfect Plus MWQ DNA Ladder; E3161-01, EURx) naniesiono w dołki żelu agarozowego i przeprowadzono elektroforezę (100 V, 30 min). Po zakończonym rozdziale elektroforetycznym żel umieszczono w aparacie G:Box i wykonano zdjęcie w UV-Vis.

Reakcja odwrotnej transkrypcji

Na podstawie zmierzonych na NanoDrop stężeń, z każdej próbki pobrano po 1 μ g RNA i dodano wody do końcowej objętości 10,8 μ L. Następnie do każdej z próbówek dodano po 1,2 μ L świeżo przygotowanej mieszaniny reakcyjnej 1 – MIX1 (Tab. 5.). Próbki umieszczono na 5 min w termobloku nagrzanym do 65°C, po tym czasie umieszczono próbki na 2 min w lodzie. Po schłodzeniu do próbek dodano po 8,0 μ L świeżo przygotowanej mieszaniny reakcyjnej 2 – MIX2 (Tab. 5.), wymieszano delikatnie na worteks i inkubowano przez 5 min w 25°C a następnie 60 min w 42°C. Reakcję zakończono poprzez podgrzanie próbek do 70°C na 5 min. Otrzymane cDNA umieszczono na lodzie, pobrano 1 μ L próbki do pomiaru stężenia na NanoDrop One^C i przygotowano rozcieńczenia w wodzie wolnej od RNaz o stężeniu końcowym 100 ng/ μ L. Zarówno stężone jak i rozcieńczone cDNA przechowywano w -20°C.

Tabela 5. Skład mieszanin reakcyjnych 1 (MIX1) oraz 2 (MIX2) wykorzystywanych do reakcji odwrotnej transkrypcji, a także skład mieszaniny reakcyjnej 3 (MIX3) wykorzystywanej do przeprowadzenia qPCR, wraz z ilościami poszczególnych komponentów przypadających na pojedynczą próbkę.

	składnik mieszaniny	objętość na 1 reakcję
MIX1	startery losowe (Random Hexamer Primer – 100 μM) *	0,1 μL
(1,2 µL/ próbkę)	startery oligo(dT) ₁₈ (100 µM) *	0,1 μL
	dNTPs (10 mM) *	1,0 µL
ΜΙΧ2 (8,0 μL/ próbkę)	Bufor reakcyjny (5x) (250 mM Tris-HCl – pH 8,3, 250 mM KCl, 20 mM MgCl ₂ , 50 mM DTT) *	4,0 µL
	0,1 M DTT #	2,0 µL
	Inhibitor RNaz (RiboLock RNase Inhibitor – 20 U/µL) *	0,5 μL
	Odwrotna transkryptaza (RevertAid RT – 200 U/µL) *	0,5 μL
	Woda wolna od nukleaz *	1,0 µL
MIX3	woda wolna od RNaz ^	2,0 µL
(9,0 µL/ reakcję)	RT PCR Mix SYBR [®] ^	5,0 μL
	starter Przedni (10 μ M) – 0,2 μ L [#] + starter Wsteczny (10 μ M) – 0,2 μ L [#] w wodzie wolnej od RNaz – 1,6 μ L ^	2,0 µL

* – odczynnik z zestawu RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (K1622, Thermo Scientific)

[#] – odczynnik nie pochodzący z żadnego zestawu

^ – odczynnik z zestawu RT PCR Mix SYBR[®] (2008-1000, A&A Biotechnology)

Reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. *quantitative polymerase chain reaction*, qPCR)

W probówkach 1,5-mL przygotowano mieszaniny reakcyjne do przeprowadzenia qPCR. Dlatego też dla każdego celu molekularnego przygotowano odrębny MIX3, w skład, którego wchodziły odpowiednio dobrane startery. Do każdego dołka 96-dołkowej płytki do PCR (781366, Brand GmbH) naniesiono po 9 μ L MIX3 i dodano do nich po 1 μ L, 100 ng/ μ L cDNA. Płytkę zaklejono specjalną folią do qPCR (781391, Brand GmbH) i zwirowano (2 min, 1000× *g*). Następnie umieszczono ją w aparacie do qPCR i uruchomiono program termiczny (Tab. 6.).

krok	czas	temperatura	liczba cykli
wstępna denaturacja	3 min	95°C	1
denaturacja	15 sek	95°C	
przyłączanie starterów, tzw. hybrydyzacja (ang. <i>annealing</i>)	60 sek	50°C	x 40
wydłużanie łańcucha, tzw. elongacja	45 sek	72°C	
krzywa topnienia produktu (ang. <i>melting curve</i>)	0,5°C/5 sek	65°C – 95°C	1

Tabela 6. Program termiczny qPCR dla celów molekularnych: GAPDH, MMP2, MMP9, TIMP1, TIMP2 oraz TIMP3.

Analiza i interpretacja wyników qPCR

Na podstawie analizy krzywej topnienia weryfikowano, czy powstał pojedynczy pik świadczący o obecności 1 produktu. Następnie oprogramowanie CFX Maestro automatycznie wyznaczało linię progową (*treshold line*), na podstawie, której wyznaczone zostały wartości C_t, (ang. *Cycle threshold*) będące punktem przecięcia krzywej amplifikacji z uzyskaną linią.

Obliczono ekspresję badanych genów metodą $\Delta\Delta C_t$ w poniższych krokach.

Wyliczono średnią wartość Ct dla:

- każdego z testowanych genów w próbkach inkubowanych z EVs \rightarrow TE
- genu referencyjnego (GAPDH) w próbkach inkubowanych z EVs → HE
- każdego z testowanych genów z hodowli kontrolnych \rightarrow TC
- genu referencyjnego (GAPDH) w hodowlach kontrolnych \rightarrow HC

Następnie obliczono wartości ΔC_t dla:

- testowanych genów: $\Delta CTE = TE - HE$

- genów referencyjnych: $\Delta CTC = TC - HC$ (13)

Expresse genow wyznaczono wykorzystując wzor. $eksprestu uenu = 2$	Ekspresie	genów v	vvznaczono	wykorzystując	wzór: <i>ek</i>	spresia	$aenu = 2^{2}$	$-\Delta\Delta C_t$ (]	15)
--	-----------	---------	------------	---------------	-----------------	---------	----------------	------------------------	-----

3.3.36. Zymografia

Przeprowadzenie hodowli i zebranie próbek

Komórki (HT-29, HCT116 oraz CCD841 CoN) wysiano na płytkę 24-dołkową w ilości $5,0\cdot10^5$ komórek/dołek i objętości 400 µL odpowiedniego, pełnego medium hodowlanego (McCoy's 5A⁺ lub MEM⁺). Płytkę umieszczono na 24 h w inkubatorze (37°C, 5% CO₂, 95% wilgotności).

Następnego dnia przygotowano media hodowlane (nie zawierające FBS ani antybiotyków) z EVs mikrobiologicznymi w ilości $1,0 \cdot 10^5$ EVs/komórkę (w przypadku EVs drożdżowych) lub EVs bakteryjnymi odpowiadającymi 0,5 µM stężeniu wiolaceiny. Odrzucono medium hodowlane, komórki przemyto 2-krotnie 400 µL DPBS i dodano po 200 µL odpowiedniego dla komórek medium hodowlanego z EVs. Hodowle kontrolne poddane były tym samym warunkom, ale bez obecności EVs w medium hodowlanym. Ponownie umieszczono płytkę w inkubatorze na 24 h. Po zakończonej inkubacji, ze wszystkich dołków, do osobnych probówek zebrano całe medium hodowlane i zwirowano (15 min, 4°C, 13780× g) w celu pozbycia się z medium pozostałości komórek. Medium znad osadu przeniesiono do nowych probówek 1,5-mL i zamrożono w -80°C.

Przygotowanie próbek białkowych i przeprowadzenie elektroforezy

Media pohodowlane rozmrożono i wymieszano na worteksie. Następnie pobrano po 16 μ L każdej z próbek i zmieszano je z 4 μ L 5x nieredukującego buforu obciążającego do próbek. Naniesiono próbki do kieszonek w żelu zagęszczającym i przeprowadzono rozdział elektroforetyczny w 2 etapach: (1) 15 min przy napięciu 50 V, a następnie (2) 1,5 h przy napięciu 100 V.

Wizualizacja wyniku zymografii

W procedurze wykorzystano nieco zmodyfikowaną metodę firmy Abcam [https://docs.abcam.com/pdf/protocols/gelatin-zymography-protocol-mmp-9.pdf; dostęp: 05.01.2025]. Uzyskany po elektroforezie, żel 2-krotnie przemyto poprzez 30-min inkubację w buforze płuczącym w RT i na kołysce laboratoryjnej. Następnie odebrano bufor płuczący, a żel zalano buforem do inkubacji i umieszczono go na 10 min w 37°C. Po tym czasie wymieniono bufor na świeży i ponownie umieszczono żele w 37°C. Inkubację prowadzono

przez 24 h, aby umożliwić enzymom trawienie żelatyny. Następnie żel zalano buforem barwiącym do zymografii i trzymano 45 min na kołysce laboratoryjnej w RT. Niezwiązany barwnik został usunięty z żelu poprzez przemywanie go w wodzie Mili-Q, aby odmyć większość barwnika z jego powierzchni. Po kilku minutach na kołysce laboratoryjnej odebrano zabarwioną wodę i zalano żel buforem odbarwiającym do zymografii. Pozostawiono żel na kołysce laboratoryjnej RT na 30 min. Po tym czasie zlano bufor i zweryfikowano, czy pojawiły się odbarwione obszary w żelu. Jeśli tak, to zalano żel wodą Mili-Q, natomiast jeśli nie to wymieniano bufor odbarwiający na świeży. Odbarwianie żeli prowadzono tak długo, aż odbarwione prążki stały się wyraźne. Następnie wykonywano_dokumentację fotograficzną przy wykorzystaniu G:Box. Na uzyskanych obrazach odwrócono kolory, aby uzyskać ciemne prążki na jasnym tle. Uzyskane prążki dla MMP-2 oraz MMP-9 analizowano pod kątem powierzchni (*area*) oraz intensywności zabarwienia (*mean grey value*) wykorzystując oprogramowanie ImageJ 1.54f. Aktywność MMP hodowli badanych została odniesiona do aktywności hodowli kontrolnej.

3.3.37. Izolacja białek z komórek eukariotycznych, elektroforeza SDS-PAGE, analizaWestern blot oraz Slot blot

Izolacja frakcji białkowej z komórek:

Komórki (HT-29, HCT116, CCD-18Co, CCD841 CoN oraz LUVA) wysiano w odpowiednich dla nich pełnych mediach hodowlanych w ilości $1,5 \cdot 10^4$ komórek na dołek płytki 24-dołkowej. Płytkę umieszczono w inkubatorze (37°C, 5% CO₂, 95% wilgotności) na 24 h. Po tym czasie z dołków odebrano medium, a komórki delikatnie przemyto DPBS. Następnie do każdego dołka dodano po 250 µL odpowiedniego medium (McCoy's 5A, MEM lub IMDM bez dodatku FBS suplementowanego EVs mikrobiologicznymi oraz antybiotyków) W ilości $1,0.10^5$ EVs/komórkę oraz EVs-VIO 0,5 µM stężeniu wiolaceiny. Hodowlę prowadzono w inkubatorze przez kolejne 24 h (37°C, 5% CO₂, 95% wilgotności). Następnego dnia odebrano medium, przemyto komórki DPBS i dodano na dołki po 150 µL 0,1% roztworu NP-40 z mieszaniną inhibitorów proteaz (SigmaFAST Protease Inhibitor Coctail Tablet, EDTA free; S8830, Sigma Aldrich), aby spowodować lizę komórek i uwolnić z nich białka. Po czym płytkę umieszczono na lodzie na kołysce laboratoryjnej na 30 – 45 min. Następnie z każdego dołka odebrano lizaty białkowe i zebrano je w probówkach 1,5-mL, które poddano wirowaniu (15 min, 4°C, 13780× g) w celu usuniecia nienaruszonych komórek i nierozpuszczonych fragmentów komórkowych. Supernatanty przeniesiono do nowych probówek, a z każdego izolatu pobrano po 5 μ L, aby oznaczyć stężenie białka (zgodnie z procedurą **3.3.20.**) i resztę zamrożono w -80°C.

Elektroforeza SDS-PAGE, transfer oraz analiza Western blot:

Każdą próbkę lizatu komórkowego naniesiono na 3 niezależne żele poliakrylamidowe i przeprowadzono rozdział elektroforetyczny białek zgodzie w procedurą opisaną w **3.3.20.** Po elektroforezie, jeden żel poddano barwieniu Coomassie w celu kontroli rozdziału elektroforetycznego. Dwa pozostałe żele poddano procedurze transferu białek na membranę. Po przeprowadzeniu transferu żele poliakrylamidowe wybarwiono za pomocą *Coomassie Brilliant Blue R-250* zgodnie z **3.3.20**, aby mieć pewność, że proces zaszedł poprawnie. Membrany z białkami 2-krotnie przemyto w DPBST (15 min, kołyska laboratoryjna, RT) i przeprowadzono blokowanie buforem DPBST z 5% odtłuszczonym mlekiem. Następnie pocięto je na podstawie markera mas, zgodnie z poniższym schematem (Rys. 18.).



Rysunek 18. Rozkład wielkości badanych interleukin (IL-4, IL-6, IL-8 oraz TNFa) i białka kontrolnego (aktyna) w odniesieniu do używanego markera mas białek (26616, Thermo Scientific).

Kawałki membran umieszczono w buforze DPBST z rozcieńczonym przeciwciałem I-rzędowym:

- aktyna (MA5-11869, Invitrogen) mysie: rozcieńczenie 1:5000 w DPBST z 2% mlekiem;
- IL-4 (orb360766, Biorbyt) królicze: rozcieńczenie 1:1500 w DPBST z 2% mlekiem;

- IL-6 (orb239372, Biorbyt) królicze: rozcieńczenie 1:1500 w DPBST z 2% mlekiem;
- IL-8 (orb161453, Biorbyt) królicze: rozcieńczenie 1:1500 w DPBST z 2% mlekiem;
- TNFα (orb129753, Biorbyt) królicze: rozcieńczenie 1:1500 w DPBST z 2% mlekiem.

Inkubację z przeciwciałami prowadzono przez noc w chłodni (ok. $4 - 10^{\circ}$ C) z mieszaniem na kołysce. Następnie zebrano przeciwciała, a membrany 3-krotnie (5 min, RT, na kołysce) przemyto buforem DPBST z 2% mlekiem. W trakcie płukań przygotowano rozcieńczenia przeciwciał II-rzędowych:

- kozie anty-mysie z HRP (P0447, Dako); rozcieńczenie 1:1000 w DPBST z 2% mlekiem;
- kozie anty-królicze z HRP (P0448, Dako): rozcieńczenie 1:1000 w DPBST z 2% mlekiem.

Membrany umieszczono ponownie na kołysce laboratoryjnej na 1 h w RT. Po tym czasie odebrano przeciwciała, a membrany 3-krotnie (5 min, RT, na kołysce) przemyto DPBST. Następnie dodano substrat dla HRP i postępowano tak jak w punkcie **3.3.20**.

Analiza Slot blot:

Całość wyizolowanego z komórek białka oraz zebrane znad nich medium po 24-h hodowli z EVs, uzupełniono DPBS do objętości 2,5 mL, rozcieńczając tym samym próbki 20-krotnie. Aktywację membrany PVDF przeprowadzono tak jak w **3.3.20.** a następnie zmontowano aparat Bio-Dot SF zgodnie z poniższym schematem:

SZABLON PRÓBEK (góra aparatu) uprzednio zaktywowana membrana PVDF bibuła uszczelka płyta podtrzymująca KOLEKTOR PRÓŻNIOWY Z PRZYŁĄCZEM DO POMPY PRÓŻNIOWEJ (spód aparatu)

Po 500 µL każdej z próbek (uprzednio rozcieńczonych DPBS) naniesiono na 5 kolejnych pól aparatu (w rzędzie) i uruchomiono pompę próżniową. Po zatężeniu białek rozmontowano układ, a membranę pocięto na kolumny. Otrzymane paski inkubowano z przeciwciałami i wywoływano tak jak membranę po Western blot (podpunkt powyżej).

3.3.38. Multipleksowa analiza wybranych analitów wykonywana metodą cytometrii przepływowej (ang. *Cytometric Bead Array*, CBA)

Przygotowanie próbek:

Komórki (HT-29, HCT116, CCD-18Co, CCD841 CoN oraz LUVA) wysiano w odpowiednich dla nich pełnych mediach hodowlanych w ilości $1,5 \cdot 10^4$ komórek na dołek płytki 24-dołkowej. Płytkę umieszczono w inkubatorze (37°C, 5% CO₂, 95% wilgotności) na 24 h. Po tym czasie z dołków odebrano medium, a komórki delikatnie przemyto DPBS. Następnie do każdego dołka dodano po 250 µL odpowiedniego medium (McCoy's 5A, MEM lub IMDM bez dodatku FBS oraz antybiotyków) suplementowanego EVs mikrobiologicznymi w ilości $1,0\cdot10^5$ EVs/komórkę. Hodowlę prowadzono w inkubatorze przez kolejne 24 h (37°C, 5% CO₂, 95% wilgotności). Po zakończonej inkubacji z każdego z dołków odebrano medium do osobnej probówki 1,5-mL i je zwirowano (15 min, 4°C, 13780× *g*), aby pozbyć się z medium pozostałości komórek. Zebrany znad osadu supernatant przeniesiono do nowych probówek i zamrożono w -80°C. Próbki poddano analizie cytometrycznej w ciągu 2 tygodni od zakończenia doświadczenia.

Natomiast komórki, które pozostały przyklejone do powierzchni hodowlanej dołka przeznaczono na bezzwłoczną izolację białek z komórek zgodnie z metodą opisaną w punkcie **3.3.37**.

Analiza cytometryczna:

Do analizy stężenia interleukin wykorzystano zestawy oparte na kulkach, na których wyłapywane są selektywnie interleukiny (Tab. 7.).

cel	nazwa zestawu	nr katalogowy, producent
TNFα	BD CBA - Human TNF Enhanced Sensitivity Flex Set, bead position: C4	561516, BD Biosciences
IL-8	BD CBA - Human IL-8 Enhanced Sensitivity Flex Set, bead position: A9	561513, BD Biosciences
IL-6	BD CBA - Human IL-6 Enhanced Sensitivity Flex Set, bead position: A7	561512, BD Biosciences
IL-4	BD CBA - Human IL-4 Enhanced Sensitivity Flex Set, bead position: A5	561510, BD Biosciences
bufory	BD CBA Human Enhanced Sensitivity Master Buffer Kit	561521, BD Biosciences

Tabela 7. Zestawienie informacji katalogowych o wykorzystanych do badania zestawach kulek wychwytujących.

a. Przygotowanie standardów

Zliofilizowane standardy dla IL-4, IL-6, IL-8 oraz TNFα przeniesiono do wspólnej 15-mL probówki i dodano 4 mL *Assay Diluent*. Standardy inkubowano 15 min w RT, a następnie delikatnie wymieszano poprzez ich pipetowanie góra-dół. Przygotowano rozcieńczenia standardów zgodnie z poniższym rysunkiem (Rys. 19. **a.**). W wyniku wykonania serii 3-krotnych rozcieńczeń otrzymano następujące stężenia interleukin: 200 000, 66 667, 22 222, 7 407, 2 469, 823, 274 oraz 0 fg/mL.



Rysunek 19. Schemat przedstawiający wykonanie testu z wykorzystaniem kulek cytometrycznych **a.** etap przygotowania standardów stężeń, **b.** etap wiązania interleukin na kulkach oraz ich detekcji. Grafikę przygotowano wykorzystując <u>https://www.biorender.com/</u>.

b. Przygotowanie mieszaniny kulek:

Wszystkie kulki dokładnie wymieszano na worteksie (min. 15 sek), a następnie w 5-mL probówce przygotowano mieszaninę:

3 135 µL Detection Reagent Diluent

+ 209 μL roztwór wyjściowy kulek wychwytujących IL-4

+ 209 μL roztwór wyjściowy kulek wychwytujących IL-6

+ 209 µL roztwór wyjściowy kulek wychwytujących IL-8

+ 209 μ L roztwór wyjściowy kulek wychwytujących *TNFa*

c. Przygotowanie odczynnika do detekcji "A":

W trakcie uwadniania standardów, w 5-mL probówce przygotowano odczynnik do detekcji "A":

3 135 µL Detection Reagent Diluent

+ 209 μL roztwór wyjściowy IL-4 odczynnika do detekcji "A"

+ 209 μL roztwór wyjściowy IL-6 odczynnika do detekcji "A"

+ 209 μL roztwór wyjściowy IL-8 odczynnika do detekcji "A"

+ 209 μL roztwór wyjściowy TNFα odczynnika do detekcji "A"

Przygotowany odczynnik przechowywano w 4°C i w ciemności aż do użycia.

d. Przygotowanie odczynnika do detekcji "B":

W trakcie uwadniania standardów, uwodniono również 3 fiolki liofilizatów *Enhanced* Sensitivity Detection Reagent "B" w 550 µL Detection Reagent Diluent każdą i pozostawiono na 15 min w RT. Do 50-mL probówki dodano 13,5 mL Detection Reagent Diluent oraz 1,5 mL Enhanced Sensitivity Detection Reagent "B" i delikatnie wymieszano na worteksie.

e. Procedura wykonania testu (Rys. 19. b.):

Do probówek okrągłodennych przeznaczonych do pracy z cytometrem dodano po 47,5 µL standardów oraz próbek. Następnie dodano do nich po 19 µL mieszaniny kulek i delikatnie wymieszano na worteksie. Próbki inkubowano przez 2 h w RT, po czym do każdej probówki

dodano po 19 μ L odczynnik do detekcji "A". Ponownie delikatnie wymieszano na worteksie i inkubowano przez 2 h w RT. Następnie do wszystkich probówek dodano po 1 mL buforu płuczącego i zwirowano (5 min, 200× g). Ciecze odrzucono i nie odwracając probówki osuszono jej brzeg na ręczniku papierowym.

Do każdej probówki dodano po 95 μ L odczynnika do detekcji "B", delikatnie wymieszano na worteksie i inkubowano przez 1 h w RT i ciemności. Po tym czasie do wszystkich probówek dodano po 1 mL buforu płuczącego i ponownie zwirowano (5 min, 200× g). Na koniec próbki zawieszono w 300 μ L buforu płuczącego, wymieszano na worteksie i poddano analizie cytometrycznej na cytometrze BD FACSVerse, BD Biosciences.

f. Analiza cytometryczna

Uzyskane z cytometru dane zanalizowano w oprogramowaniu FCAP Array (wersja 3), BD Biosciences. Każda z interleukin miała odczyt w innym polu zależności CBA NIR-A (CBA Red-A). Były to pozycje: A5 – IL-4; A9 – IL-8, A7 – IL-6 oraz C4 – TNFα. Na podstawie odczytanych standardów oprogramowanie wyznaczyło krzywe standardowe dla każdej interleukiny niezależnie. Były to zależności średniej intensywności fluorescencji (ang. *mean fluorescence intensity*, MFI) od dodanych stężeń [fg/mL], dla których zostało zastosowane dopasowanie 5-parametryczne logistyczne (ang. *5 Parameter Logistic*, 5PL). Dla każdej z analizowanych próbek program przeliczał wartość MFI na stężenie badanych interleukin.

3.3.39. Hodowla długoterminowa ko-kultury komórek prawidłowych oraz nowotworowych (ang. *Co-culture LongTerm assay*)

Sterylne okrągłe, szkiełka nakrywkowe (Microscope Cover Glasses 10 mm ø; 0111500, Paul Marirnfeld GmbH) umieszczono w dołkach 24-dołkowej pływki hodowlanej. Wysiano do nich po 1,0·10⁴ komórek prawidłowych (CCD841 CoN, CCD-18Co) i 2,0·10³ komórek nowotworowych (HT-29, HCT116) w 300 μ L kompletnego medium MEM⁺. Płytkę umieszczono na 24 h w inkubatorze (37°C, 5% CO₂ oraz 95% wilgotności). Następnego dnia medium hodowlane zostało wymienione na 250 μ L kompletnego medium MEM⁺ z EVs w ilości 1,0·10⁵ EVs/komórkę (w przypadku EVs-Sb oraz EVs-WUT240). Kontrolne ko-kultury prowadzone były w tych samych warunkach, ale bez dodatku EVs mikrobiologicznych. Hodowle prowadzono przez 7 dni, podczas których w dniu 3., 5. oraz 7. wykonano zdjęcia

kontrolne ko-hodowli. W dniu 5-tym hodowli do wszystkich ko-kultur dodano 200 μL medium MEM⁺. Ostatniego, 7. dnia ko-hodowli, komórki wybarwiono oranżem akrydyny, jodkiem propidyny oraz Hoechst 33342 i przeprowadzono obserwacje mikroskopowe (metoda opisana poniżej **3.3.40.**).

3.3.40. Barwienie komórek AO, Pi oraz Hoechst 33342 (barwienie AO/Pi/H)

Pierwszy krok procedury oparto na metodyce barwienia AO/Pi opisanej w **3.3.34**.

Po wybarwieniu próbek odebrano barwniki, a komórki delikatnie przemyto 300 µL DPBS. Następnie dodano na nie po 250 µL Hoechst 33342 rozcieńczonego w DPBS do stężenia końcowego 0,5 µg/mL. Próbki inkubowano przez 30 min w ciemności i RT. Po tym czasie odebrano barwnik i przemyto komórki w 500 µL DPBS. Próbki obserwowano na mikroskopie fluorescencyjnym przy 600-krotnym przybliżeniu w 4 kanałach świetlnych: białym – DIC, niebieskim – Hoechst 33342, czerwonym – Pi, zielonym – AO.

3.3.41. Barwienie tzw. żywe/martwe komórki (barwienie FDA/Pi)

Hodowlę komórek prowadzono przez 7 dni zgodnie z procedurą opisaną w **3.3.32**. W momencie zakończenia hodowli odebrano znad komórek medium i przemyto komórki delikatnie DPBS, następnie do każdego dołka dodano po 90 μ L czystego DPBS i dodano po 10 μ L roztworu roboczego barwników FDA/Pi (8 μ g/mL / 3 μ g/mL). Płytkę umieszczono w ciemnym pudełku i inkubowano przez 5 min w RT. Następnie wykonano odczyt fluorescencji w dwóch kanałach:

- FDA (wzbudzenie: 490±9 nm/ emisja: 526±9 nm);
- Pi (wzbudzenie: 535±9 nm/ emisja: 635±9 nm).

Udział żywych komórek w populacji hodowanej w obecności EVs mikrobiologicznych wyznaczono jako procent populacji żywych komórek kontrolnych (hodowanych w pełnym medium bez dodatkowych czynników), równanie (16).

$$udzia{} \dot{z}ywych \, komórek \, w \, populacji = \frac{IFU^{490/526} komórek \, pod \, wp{}^{1}ywem \, EVs}{IFU^{490/526} komórek \, kontrolnych} \cdot 100\%$$
(16)

IFU^{490/526} – intensywność fluorescencji przy wzbudzeniu falą o długości 490 nm i detekcją emisji fali o długości 526 nm Natomiast udział martwych komórek w populacji hodowanej w obecności EVs mikrobiologicznych wyznaczono jako procent populacji martwych komórek kontrolnych (hodowanych w pełnym medium bez dodatkowych czynników), równanie (17).

$$udział martwych komórek w populacji = \frac{IFU^{535/635}_{komórek pod wpływem EVs}}{IFU^{535/635}_{komórek kontrolnych}} \cdot 100\%$$
(17)

IFU^{535/635} – intensywność fluorescencji przy wzbudzeniu falą o długości 535 nm i detekcją emisji fali o długości 635 nm

4. Wyniki i dyskusja

Praca badawcza została podzielona na 3 etapy, które zobrazowano na Rys. 20. W pierwszym z nich skoncentrowano się na produkcji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych pochodzenia mikrobiologicznego pozyskiwanych z drożdży S. boulardii i K. marxianus oraz bakterii J. lividum (Rozdział 7.1.). Prace obejmowały wybór metody izolacji EVs, warunków ich przechowywania (zarówno krótko- jak i długoterminowego), a także sposobu analizy wielkości i ilości tych struktur. Dodatkowo przeprowadzono charakterystykę proteomiczną, wydajność a w przypadku **EVs-VIO** oceniono także bioprodukcji zwiazku aktywnego-wiolaceiny. Drugi etap badań (Rozdział 7.2.) obejmował zbadanie wpływu natywnych (niezaładowanych egzogennie) pęcherzyków na komórki ssacze, na przykładzie linii komórkowych jelita grubego człowieka. W badaniach wykorzystano zarówno model komórek nowotworowych - HT-29, HCT116 jak i komórek prawidłowych - CCD841 CoN, CCD-18 Co. Po potwierdzeniu interakcji EVs mikrobiologicznych z komórkami ludzkimi sprawdzono jaki wpływ moją one na ogólną kondycję komórek. W tym celu przeprowadzono testy na aktywność metaboliczną, żywotność, liczebność hodowli, produkcję reaktywnych form tlenu oraz wybranych interleukin (II-4, IL-6, IL-8 oraz TNFα). Badania obejmowały zarówno krótko- jak i długookresowy wpływ EVs na komórki, testując efekty po 24-h oraz 168-h ekspozycji komórek na działanie EVs. W ostatnim etapie prac (Rozdział 7.3.) sprawdzono potencjał EVs pochodzenia mikrobiologicznego jako nowych nośników leków. Etap ten rozpoczęto od wyboru metody egzogennego ładowania EVs. Następnie porównano wpływ, krótko- oraz długookresowy, jaki wywiera na komórki związek aktywny w postaci wolnej (niezaładowany do EVs) oraz po załadowaniu go do nośnika, jakim są EVs pochodzenia mikrobiologicznego. Jako modelowy związek wybrano stosowany w medycynie cytostatyk - doksorubicynę.



Rysunek 20. Schemat przedstawiający podział pracy badawczej na kolejne etapy. Grafikę przygotowano wykorzystując https://www.biorender.com/.

4.1. Izolacja i charakterystyka pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z hodowli drożdży *S. boulardii* i *K. marxianus* oraz bakterii *J. lividum*

4.1.1. Wybór metody izolacji EVs

Prace badawcze rozpoczęto od sprawdzenia opisywanych w literaturze technik izolacji EVs z materiału ludzkiego, czyli ultrafiltracji oraz precypitacji z PEG 52. Do testów wykorzystano także komercyjne zestawy ExoDISC oraz ExoPRISM dedykowane do izolacji EVs np. z moczu oraz z medium po hodowli linii komórkowych in vitro. Niestety ze względu na brak dostępu do aparatury pozwalającej na wirowanie próbek z prędkością ok. 100000× g, niemożliwe było przetestowanie metody opartej na ultrawirowaniu. W tabeli 8. przedstawiono wydajności izolacji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z medium pohodowlanego mikroorganizmów. Przedstawione wartości oznaczają jaką część pęcherzyków z hodowli udało się odebrać z filtrów po izolacji daną metodą w odniesieniu do maksymalnej ilości EVs, którą w teorii można by uzyskać przy 100% wydajności izolacji. Maksymalną ilość EVs, jaką można by wyizolować obliczono na podstawie stężenia pęcherzyków w permeacie cieczy pohodowlanej po przefiltrowaniu jej przez filtr 0,2 µm. Stężenie EVs w próbkach wyznaczono z wykorzystaniem NTA. Ze względu na ograniczoną ilość zestawów ExoDISC oraz ExoPRISM, które były dostępne tylko w wersji demonstracyjnej podjęto decyzję o ujednoliceniu ilości wykonanych testów i przegląd metod został wykonany w 1 powtórzeniu biologicznym dla każdego z badanych mikroorganizmów.

	mikroorganizm			
metoda izolacji Evs	Sb	WUT240	VIO	
Amicon 100 kDa	13,3%	12,8%	15,4%	
ExoDISC	4,5%	11,5%	8,0%	
ExoPRISM	0,3%	0,2%	b.d.	
2,5% PEG_ON 4°C	6,5%	1,2%	1,3%	
5,0% PEG_ON 4°C	5,0%	0,7%	2,7%	
10,0% PEG_ON 4°C	2,7%	0,3%	1,7%	
5,0% PEG_ON RT	6,5%	0,9%	1,8%	
10,0% PEG_ON RT	2,7%	0,6%	0,3%	

Tabela 8. Zestawienie wydajności izolacji EVs z hodowli płynnych trzech mikroorganizmów - S. boulardii (Sb), K. marxianus (WUT240) i J. lividum (VIO) z wykorzystaniem różnych metod (n=1).

* b.d. – brak danych

Oprócz samej wydajności izolacji są także inne bardzo ważne czynniki i cechy, które bezwzględnie należy wziąć pod uwagę, aby odpowiednio wybrać metodykę do dalszej pracy. Każdą z metodyk, które przetestowano, oceniono i spisano ich największe zalety oraz wady, co zestawione zostało w Tabeli 9.

	zalety	wady
Amicon	 prosta metodyka szybka w porównaniu do innych testowanych metod uniwersalna aparatura laboratoryjna (wirówka) 	 konieczna sterylizacja chemiczna filtra przed izolacją koszt filtrów w zależności od mikroorganizmu i metabolitów obecnych w cieczy pohodowlanej pory filtrów mogą ulegać blokadzie, co prowadzi do obniżenia wydajności izolacji
ExoDISC	• prosta metodyka	 wysoki koszt materiałów ryzyko przebicia membrany podczas odbierania zatężonej próbki potrzebna dedykowana wirówka bardzo mała objętość robocza poddawana izolacji (1 mL na filtr na cykl wirowania), zupełnie nie nadaje się do izolacji z próbek o dużych objętościach czasochłonna procedura w zależności od mikroorganizmu i metabolitów obecnych w cieczy pohodowlanej pory filtrów mogą ulegać blokadzie, co prowadzi do obniżenia wydajności izolacji
ExoPRISM	 można poddać procedurze izolacji duże objętości cieczy pohodowlanej sterylne odczynniki 	 wysoki koszt czasochłonna procedura uzyskane EVs są posklejane, niezależnie od przeprowadzonego płukania konieczne jest wprowadzenie etapu oczyszczania z czynnika strącającego

Tabela 9. Zestawienie zalet i wad testowanych metod izolacji EVs z płynnych hodowli bakterii i drożdży

Precypitacja	• można poddać procedurze izolacji	• konieczna sterylizacja odczynników
z PEG	duże objętości cieczy pohodowlanej	przed izolacją
		•uzyskane EVs są posklejane
		czynnikiem strącającym
		• konieczne jest wprowadzenie etapu
		oczyszczania z czynnika
		strącającego

tylko Pomimo wykonania jednego powtórzenia biologicznego każdego dla z mikroorganizmów, czyli trzech niezależnych prób biologicznych różnych na mikroorganizmach, można zauważyć, że najwyższym odzyskiem EVs z cieczy pohodowlanej charakteryzuje się ultrafiltracja z wykorzystaniem filtrów Amicon o punkcie odcięcia 100 kDa. Metoda ta okazała się także najszybsza, najwygodniejsza oraz pozwalała na zachowanie sterylności próbek, dlatego też to właśnie ultrafiltracja została wytypowana do przeprowadzenia wszystkich kolejnych izolacji i badań.

4.1.2. Testowanie warunków przechowywania próbek EVs

Po wyizolowaniu EVs ważnym aspektem był wybór metody ich przechowywania. Bazując na danych literaturowych ¹⁹⁸, próbki EVs w DPBS, zaraz po izolacji były dzielone na 0,5-mL porcje i mrożone, bez dodatkowych czynników, w -80°C. Podczas prowadzonych badań nad rozprawą doktorską, pęcherzyki przechowywane były przez okres do 6 miesięcy, podczas których wykonywano kolejne badania biologiczne. Wcześniejsze podzielenie na niewielkie porcje pozwoliło także na uniknięcie sekwencyjnego zamrażania i rozmrażania dużych objętości zawiesiny pęcherzyków. Gdy zamrożone próbki się kończyły wykonywano kolejne izolacje EVs. Równocześnie podjęto się także przeprowadzenia badania pilotażowego, aby sprawdzić czy dodatek czynników krio-protekcyjnych, tj. DMSO oraz FBS może wpłynąć pozytywnie na przechowywany materiał. W tym celu podczas jednej z izolacji pęcherzyków przygotowano szereg próbek o jednakowym końcowym stężeniu EVs i przechowywano je w -80°C przez 30 miesięcy. Po tym czasie próbki rozmrożono i wykonano pomiary ich stężenia i wielkości stosując analizę śledzenia nanocząstek (NTA) (Tab. 10.). Ze względu na pilotażowy charakter przeprowadzonego badania, przegląd wariantów przechowywania długoterminowego został wykonany w 1 powtórzeniu biologicznym dla EVs z hodowli drożdży (Sb i WUT240) wyizolowanych w 2021 roku. Odzysk został wyznaczony w odniesieniu do wariantu, w którym pozostało najwięcej EVs, czyli do mrożenia w -80°C bez dodatku czynników krio-protekcyjnych.

Tabela 10. Zestawienie stężeń EVs drożdżowych w próbkach przechowywanych przez 30 miesięcy w postaci zamrożonej z oraz bez dodatków krio-protekcyjnych. Przedstawione wyniki uzyskano w oparciu o pomiary NTA (n=1).

· . 11	EVs-Sb		EVs-WUT240	
przechowywania EVs	stężenie [EVs/mL]	odzysk	stężenie [EVs/mL]	odzysk
-80°C	5,91·10 ¹⁰	100,0%	$7,70 \cdot 10^{10}$	100,0%
-80°C + 5% DMSO	$2,90 \cdot 10^{10}$	49,1%	$4,77 \cdot 10^{10}$	61,9%
-80°C + 10% DMSO	$1,30 \cdot 10^{10}$	22,0%	$2,91 \cdot 10^{10}$	37,8%
-80°C + 50% FBS	$4,75 \cdot 10^{10}$	80,4%	5,91·10 ¹⁰	76,7%
-80°C + 50% FBS + 5% DMSO	$4,67 \cdot 10^{10}$	79,0%	$3,44 \cdot 10^{10}$	44,7%
-80°C + 50% FBS + 10% DMSO	4,01·10 ¹⁰	67,9%	$3,20 \cdot 10^{10}$	41,6%

Na podstawie wyników, uzyskanych z tego badania pilotażowego, potwierdzono, że najlepszym sposobem na długoterminowe przechowywanie zawiesiny EVs mikrobiologicznych w DPBS jest ich zamrożenie, bez dodatków krio-protekcyjnych, i przechowywanie w -80°C.

Kolejnym aspektem jaki należało rozważyć było przechowywanie EVs po rozmrożeniu, czyli przechowywanie krótkookresowe między wykonywanymi doświadczeniami. W tym celu przygotowano różne wyjściowe koncentracje EVs i przechowywano je przez 24 h w 3 temperaturach – -20°C, 4°C oraz 37°C (Tab. 11.). Przegląd wariantów przechowywania krótkookresowego został wykonany, w sposób ilościowy, w 1 powtórzeniu biologicznym dla EVs-Sb oraz EVs-WUT240. To badanie miało na celu sprawdzenie, czy EVs po rozmrożeniu można w ogóle przechowywać, czy też do każdego doświadczenia najlepiej używać nowej próbki z zapasu zgromadzonego w -80°C po izolacji. Odzysk został wyznaczony na podstawie wyników z pomiarów NTA w odniesieniu do wyjściowego stężenia EVs.
	wyjściowe	temperatury przechowywania EVs przez 24 h od momentu ich rozmrożenia z -80°C					
	stężenie FVs	-20°C		4°C		37°C	
	[EVs/mL]	stężenie [EVs/mL]	odzysk	stężenie [EVs/mL]	odzysk	stężenie [EVs/mL]	odzysk
	$1,00.10^{8}$	8,89·10 ⁷	89%	$6,02 \cdot 10^7$	60%	5,20·10 ⁷	52%
EVs-Sb	$2,00 \cdot 10^8$	$1,80.10^{8}$	90%	$1,27 \cdot 10^{8}$	64%	$1,10.10^{8}$	55%
	$1,00.10^{9}$	9,56·10 ⁸	96%	$7,57 \cdot 10^8$	76%	$6,12 \cdot 10^{8}$	61%
	$2,00.10^9$	$1,94 \cdot 10^{9}$	97%	$1,67 \cdot 10^9$	83%	$1,33 \cdot 10^{9}$	66%
s-WUT240	$1,00.10^{8}$	1,26.107	63%	$1,05 \cdot 10^{7}$	52%	$9,55 \cdot 10^{6}$	48%
	$2,00.10^{8}$	$6,64 \cdot 10^{7}$	66%	5,93·10 ⁷	59%	5,20·10 ⁷	52%
	$1,00.10^9$	$1,68 \cdot 10^8$	84%	$1,54 \cdot 10^{8}$	77%	$1,22 \cdot 10^{8}$	61%
EV	2,00·10 ⁹	$1,87 \cdot 10^9$	93%	1,61·10 ⁹	80%	$1,23 \cdot 10^9$	61%

Tabela 11. Zestawienie stężenia EVs w próbkach przechowywanych przez 24 h w różnych rozcieńczeniach oraz w 3 wybranych temperaturach. Przedstawione wyniki uzyskano w oparciu o pomiary NTA (n=1).

Zauważono, że im większa koncentracja EVs w próbce, a także im niższa jest temperatura jej przechowywania tym jest ona stabilniejsza. W związku z tym, a także aby unikać nadmiernej degradacji EVs na skutek powtarzania cykli zamrażania i rozmrażania po rozmrażaniu EVs z -80°C niezużyte, nierozcieńczone próbki przechowywano maksymalnie przez 24 h w 4°C. Warunki przechowywania ustalone na EVs drożdżowych zastosowano również dla EVs-VIO.

4.1.3. Wydajność produkcji EVs przez mikroorganizmy

W badaniach analizowano 3 szczepy mikroorganizmów niepatogennych (2 szczepy drożdży probiotycznych oraz 1 szczep bakterii). Warto podkreślić, że wcześniej nie były one scharakteryzowane pod kątem produkcji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w badanych, w ramach rozprawy, warunkach hodowli. Aby poznać ich predyspozycję do wytwarzania takich struktur przeprowadzono hodowle mikroorganizmów, na podstawie których oznaczono (Tab. 12.): masę całkowitą suchej biomasy mikroorganizmów; liczbę komórek drożdżowych i bakteryjnych w prowadzonych hodowlach płynnych; całkowitą ilość EVs w medium hodowlanym zarówno tuż po oddzieleniu biomasy (przesącz po przefiltrowaniu supernatantu z hodowli) jak i w próbkach uzyskanych po izolacji i oczyszczaniu z wykorzystaniem

membranowych filtrów wirówkowych – Amicon o punkcie odcięcia 100 kDa. Hodowla produkcyjna EVs w przypadku drożdży prowadzona była przez 24 h w 150 mL pożywki YPD, natomiast w przypadku bakterii trwała ona 5 dni w 100 mL pożywki ½ LB.

analizawany nanomata	mikroorganizm			
analizowany parametr	Sb	WUT240	VIO	
uzysk EVs z 1 hodowli	$(3,20\pm0,59)\cdot10^{12}$	$(2,75\pm0,47)\cdot10^{11}$	$(2,38\pm0,29)\cdot10^{13}$	
uzysk EVs z pojedynczej komórki	308±30	91±6	5198±378	
uzysk EVs z 1g suchej biomasy	$(1,90\pm0,38)\cdot10^{13}$	$(9,57\pm1,68)\cdot10^{11}$	$(1,19\pm0,17)\cdot10^{14}$	
stężenie EVs w próbce po izolacji i oczyszczaniu [EVs/mL]	$(1,00\pm0,03)\cdot10^{11}$	$(5,09\pm0,11)\cdot10^{10}$	$(7,04\pm0,64)\cdot10^{12}$	

Tabela 12. Zestawienie danych zebranych o każdym z badanych mikroorganizmów jako producencie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (n=3).

Najwydajniejszym producentem EVs spośród testowanych, okazała się bakteria *J. lividum*. Najprawdopodobniej jest to nieodłącznie skorelowane z czasem prowadzonej hodowli, który jest 5-krotnie dłuższy niż hodowla drożdży. Jednak nawiązując do charakterystyki szczepu, (Rys. 21.), można uznać, że wzrost gęstości biomasy bakteryjnej następuje w ciągu pierwszych 24 h hodowli. Natomiast pozostałe 4 dni to okres fazy stacjonarnej hodowli w trakcie, którego rośnie stężenie EVs w medium hodowlanym. W związku z tym można szacować, że wydajność produkcji EVs, w teoretycznej hodowli skróconej do 24 h, wyniosłaby ok. 1,0·10¹², a na pojedynczą komórkę przypadłaby produkcja ok. 1000 EVs. Są to wartości o rząd wielkości większe niż w przypadku *S. boulardii*, który jest 10-krotnie wydajniejszym producentem pęcherzyków niż *K. marxianus* WUT240.

Ponadto na przykładzie Sb, które hodowane stacjonarnie na płytkach YPD_{agar} (24 h, 37°C) wyprodukowały 400-krotnie mniej EVs w przeliczeniu na pojedynczą komórkę drożdżową $(3 \cdot 10^8 \text{ komórek wyprodukowało ok. } 2,3 \cdot 10^8 \text{ pęcherzyków, w przeliczeniu } 100 \text{ komórek drożdżowych wyprodukowało ok. } 77 EVs)^{20}$. Można zatem stwierdzić, że hodowla płynna tych mikroorganizmów jest zdecydowanie wydajniejsza pod kątem produkcji EVs.

Pomimo wskazanej różnorodności, można uznać wszystkie badane mikroorganizmy za interesujących i wydajnych producentów EVs.



Rysunek 21. Tempo wzrostu bakterii J. lividum PCM 3520 w temperaturze 20°C i wytrząsaniu 110 rpm. Ciemnofioletowe punkty (powyżej 40 h) oznaczają pojawienie się barwy fioletowej w medium, świadczącej o produkcji wiolaceiny (n=8).

4.1.4. Charakterystyka EVs na podstawie pomiarów NTA oraz DLS

Obecnie, aby ocenić wielkość, liczbę oraz rozkład ilości EVs w zależności od ich wielkości w próbce, najczęściej wykorzystywane są 2 techniki – DLS oraz NTA. W niniejszej pracy wstępną charakterystykę EVs pochodzenia mikrobiologicznego, wszystkich badanych pęcherzyków, wykonano przy użyciu DLS. Na podstawie zebranych danych z pomiaru próbki stacjonarnej, dedykowane dla urządzenia oprogramowanie wykreśla zależności intensywności światła rozpraszanego od wielkości cząstek badanego materiału oraz estymuje ilość cząstek w próbce. Na poniższym Rys. 22. przedstawiono przykładowe wyniki takich pomiarów jednego powtórzenia biologicznego pęcherzyków każdego z badanych mikroorganizmów (Rys. 22.a. EVs-Sb, b. EVs-WUT240, c. EVs-VIO). Niestety, technika DLS ma jednak swoje ograniczenia, które wskazują, że nie jest ona najlepszym wyborem do analizy próbek biologicznych o nieujednoliconym składzie. Mieszanina heterogenna jaką jest próbka pęcherzyków zewnątrzkomórkowych o niejednorodnej średnicy w przeciwieństwie do np. próbek syntetycznych odbierana jest przez urządzenie jako próbka niewłaściwa, dla której wynik pomiarów może być obarczony znacznym błędem. Różnica ta jest szczególnie widoczna po wykonanej przez program estymacji ilość cząstek w odniesieniu do ich średnicy. Jego następstwem są uzyskiwane podczas pomiarów różnice, które zobrazowano na przykładzie EVs-VIO (Rys. 22. c. oraz d.) warto podkreślić, że takie same rozbieżności obserwowano także w przypadku EVs-Sb oraz EVs-WUT240.



Rysunek 22. Przykładowe wykresy zależności intensywności światła rozpraszanego w zależności od wielkości cząstek, wygenerowane przez DLS podczas analizy pęcherzyków: **a.** EVs-Sb (3 powtórzenia techniczne pomiaru), **b.** EVs-WUT240 (3 powtórzenia techniczne pomiaru), **c.** EVs-VIO (4 powtórzenia techniczne pomiaru) oraz **d.** wykres przedstawiający estymację ilości cząstek w stosunku do ich wielkości, wygenerowany przez DLS z tej samej analizy co wykres **c.** Kolorami zaznaczono poszczególne powtórzenia techniczne.

W Tabeli 13. zestawiono uzyskane średnie wartości wielkości EVs wyznaczone przez oprogramowanie na podstawie intensywności światła rozpraszanego oraz ilości cząstek w zależności od ich wielkości. Średnice EVs wskazane w obu przypadkach znacznie się od siebie różniły, co wprowadza wątpliwości, który wynik powinien zostać uznany za wiążący oraz jaki jest rzeczywisty rozkład wielkości nanocząstek w próbce.

analizowany parametr	EVs-Sb	EVs-WUT240	EVs-VIO
dominujący pik pod względem udziału w intensywności światła rozpraszanego [nm]	260,3±55,3	187,2±44,9	108,9±22,9
drugi pik pod względem udziału w intensywności światła rozpraszanego [nm]	25,6±5,5	18,3±4,28	nd.
dominujący pik pod względem ilości cząstek [nm]	17,5±3,7	10,1±2,4	37,8±8,9

Tabela 13. Zestawienie średnicy EVs na podstawie DLS (nevs-sb=10, nevs-wut240=11, nevs-vio=12).

* nd. – nie dotyczy

Pomiary w celu określenia rozkładu wielkości badanych EVs w próbkach przeprowadzono również przy użyciu NTA. Urządzenie rejestruje obraz mikroskopowy próbek w przepływie oraz wykonuje pomiary rozpraszania światła, na podstawie których uzyskano rozkład stężenia EVs w zależności od ich wielkości, z dokładnością do 0,5 nm (Rys. 23.). Dane z pomiarów zostały dopasowane modelem dystrybucji FTLA (ang. *Finite Track Length Adjustment*), który uwzględnia ograniczenia długości ścieżki, jakie cząstki mogą przebywać w polu widzenia aparatu oraz pozwala na uzyskanie precyzyjnych wielkości i stężenia cząstek w próbkach polidyspersyjnych (<u>https://www.malvernpanalytical.com/en/learn/knowledge-center/technical-notes/tn241015-nanosight-size-distribution-flta-raw; dostęp: 26.01.2024</u>).



Rysunek 23. Wykresy przedstawiające zależności stężenia EVs od ich średnicy dla **a**. EVs-Sb, **b**. EVs-WUT240 oraz **c**. EVs-VIO. Dopasowanie, 10 pomiarów technicznych każdej z próbek, zgodnie z modelem dystrybucji FTLA (n_{EVs-Sb}=33, n_{EVs-WUT240}=28, n_{EVs-VIO}=22).

Uzyskane na podstawie pomiarów NTA, wyniki średniej wielkości EVs w próbce oraz średnica dominującej, pod względem ilościowym, frakcji pęcherzyków (Tab. 14.) były do siebie zdecydowanie bardziej zbliżone niż wyniki uzyskane przy wykorzystaniu DLS, dzięki czemu można je uznać za wiążące i lepiej opisujące rozkład wielkości wyizolowanych pęcherzyków. Ponadto, w przypadku *S. boulardii* wielkość EVs jest też analogiczna względem pęcherzyków wyizolowanych z wykorzystaniem ultrawirowania (średnica ok. 142 nm)²⁰.

Zauważono także, że wyniki uzyskane dla EVs drożdżowych przy użyciu DLS są zawyżone w stosunku do wartości wskazanych przez NTA, natomiast w przypadku EVs bakteryjnych jest odwrotnie. Obserwacja ta jest również zgodna z literaturą, gdzie badano EVs *Pseudomonas fluorescens* (DLS: 109,61±11,71 nm *vs* NTA: 135,4±52,8 nm), *Staphylococcus aureus* (DLS: 118,96±31,53 nm *vs* NTA: 150,6±69,5 nm) oraz *S. cerevisiae* (DLS: 315,21±168,88 nm *vs* NTA: 127,8±54,2 nm)¹⁹⁹.

analizowany parametr	EVs-Sb	EVs-WUT240	EVs-VIO
średnia wielkość EVs [nm]	158,4±15,6	144,8±17,2	$150,5{\pm}1,2$
dominująca frakcja EVs [nm]	125,1±18,4	110,7±16,9	121,1±0,8
stężenie wiolaceiny [fM/EVs]	nd.	nd.	6,51±0,67

Tabela 14. Zestawienie wielkości EVs na podstawie NTA oraz wyznaczenie średniego stężenia wiolaceiny przypadającego na pojedynczy pęcherzyk ($n_{EVs-Sb}=33$, $n_{EVs-WUT240}=28$, $n_{EVs-VIO}=22$).

* nd. – nie dotyczy

Na podstawie danych uzyskanych przy wykorzystaniu NTA zauważono, że wielkości EVs drożdżowych i bakteryjnych są do siebie bardzo zbliżone pomimo różnic w wielkości mikroorganizmów je produkujących (Sb – średnica komórki: ~5,15 µm; WUT240 – wymiary komórki: ~5,35×3,39 µm; VIO – wymiar komórki: ~2,45×0,53 µm). Dla porównania wielkości EVs produkowanych przez drożdże *S. cerevisiae* – 127,8±54,16 nm czy też bakterie *S. aureus* – 150,6±69,5 nm, *P. fluorescens* – 135,4±52,8 nm ¹⁹⁹, *Propionibacterium freudenreichii* – 84,8±2,3 nm ²⁰⁰, *E. coli* – 119,4±10,7 nm (szczep uropatogenny UPEC) oraz 160,6±16,9 nm (szczep probiotyczny Nisse) ²⁰¹ również mają wymiary uniezależnione od wielkości komórek.

4.1.5. Wpływ fluorescencyjnych barwników lipofilowych na EVs

Urządzenie NanoSight Pro umożliwia wykonywanie pomiarów NTA w 2 trybach detekcji wykorzystując (1) światło białe (*Light scatter*) lub (2) fluorescencję (wzbudzenie laserem 488 nm; filtr emisyjny 500 nm). Aby zyskać pewność, że w badanych próbkach znajdują się struktury otoczone błoną fosfolipidową, wybrano 2 lipofilowe barwniki fluorescencyjne, które po związaniu z EVs mogły zostać wykryte przez urządzenie:

- DiO (nadchloran 3,3'-Dioktadecyloksakarbocyjaniny, DiOC₁₈(3)) barwnik o stężeniu 1 mg/mL przygotowany w DMSO (wzbudzenie/emisja: 484/501 nm),
- PKH67 (PKH67 Fluorescent Cell Linker Kits, Sigma-Aldrich) barwnik fabrycznie rozpuszczony w alkoholu etylowym (wzbudzenie/emisja: 490/502 nm).

Wykonanie pomiarów NTA, po wybarwieniu EVs wspomnianymi barwnikami, w trybie podwójnej detekcji (zarówno w świetle białym jak i we fluorescencji) pozwoliło na potwierdzenie, że badane próbki zawierają cząsteczki lipidowe. Jednocześnie zaobserwowano, że w próbkach poddanych barwieniu, wielkości oraz stężenie EVs były zawyżone w stosunku

do tych samych pęcherzyków bez inkubacji z barwnikiem. Ponadto wielkości cząstek uzyskane z pomiarów tej samej próbki (analizowanej najpierw we fluorescencji, a następnie w świetle białym) znacznie się od siebie różniły. Sugerowałoby to, że ok. 10% próbki mogą stanowić zanieczyszczenia nielipidowe. Testy wykonano 3-krotnie, zarówno na EVs drożdżowych jak i bakteryjnych, i zaobserwowano pojawianie się takich samych rozbieżności oraz tendencji w wynikach. Przedstawione poniżej rezultaty eksperymentu są przykładowe i pochodzą z jednego z powtórzeń wykonanych z wykorzystaniem EVs-VIO (Rys. 24. oraz Tab. 15.). Dane zestawione w tabeli zostały pobrane z urządzenia i w przeciwieństwie do wygenerowanych wykresów, uwzględniają dodatkowo rozcieńczenie próbek.

Za prawdopodobne można by było uznać, gdyby ilość cząstek wykryta we fluorescencji (po barwieniu PKH67 lub DiO) była niższa niż w świetle białym dla próbki niepoddanej barwieniu. Oznaczałoby to, że w próbce wykrywane są także struktury nieposiadające błony lipidowej. Z drugiej strony w trybie pomiarów fluorescencji wykrywane cząstki mają większą średnicę, co mogłoby sugerować agregację lub łączenie się mniejszych pęcherzyków. Jednak w takiej sytuacji zaobserwowano by niższe stężenie EVs w próbce po barwieniu niż w próbce niepoddanej działaniu barwników.



Rysunek 24. Rozkład wielkości EVs-VIO w próbce niebarwionej oraz próbkach barwionych barwnikami fluorescencyjnymi przy detekcji, przykładowy wykres z jednego z pomiarów: **a**. w świetle białym; **b**. we fluorescencji. Wynik dla każdej z próbek składa się z automatycznej analizy 10 niezależnych filmików zgodnie z modelem dystrybucji RAW (n=1).

Tabela 15. Zestawienie wyników pomiarów otrzymanych 2 metodami detekcji: (1) światło białe oraz (2) fluorescencja przy wzbudzeniu 488 nm i emisji 500 nm. Wyniki przykładowe uzyskane dla jednego z powtórzeń biologicznych (n=1).

detekcja	próbka	stężenie EVs [EVs/mL]	średnia wielkość EVs [nm]	dominująca w próbce frakcja EVs [nm]
Światło białe	EVs-VIO	$(5,33\pm0,59)\cdot10^{11}$	147,1±4,2	111,8±7,3
	EVs-VIO_DiO	$(7,61\pm0,37)\cdot10^{11}$	270,2±9,3	173,1±28,4
	EVs-VIO_PKH67	$(7,58\pm0,49)\cdot10^{11}$	258,4±14,5	165,0±24,5
Fluorescencja	EVs-VIO_DiO	$(6,72\pm0,30)\cdot10^{11}$	451,8±73,0	191,9±38,9
(488/500 nm)	EVs-VIO_PKH67	$(6,75\pm0,36)\cdot10^{11}$	347,4±18,5	173,3±24,0

Wykorzystanie barwników lipofilowych pozwoliło na potwierdzenie, że EVs są strukturami otoczonymi błoną lipidową. Równocześnie wykorzystane barwniki lipofilowe powodują zmiany w stężeniu i wielkości EVs w badanych próbkach. Aby móc dokładniej przeanalizować zaobserwowane różnice, można w przyszłości poddać próbki, barwione i natywne, mikroskopii elektronowej, która pozwoli na ocenę wizualną pęcherzyków. Warto również przetestować pęcherzyki produkowane przez inne komórki, zarówno mikroorganizmy jak i komórki ludzkie.

Na podstawie przeprowadzonych badań uznano, że zaobserwowane odmienne wartości, zarówno liczby jak i wielkości pęcherzyków, dyskwalifikują używanie trybu fluorescencyjnego pomiarów NTA jako wiarygodnej metody pomiarowej pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. W związku z powyższym wszystkie próbki wykorzystywane w dalszych badaniach poddane były pomiarom NTA z detekcją w świetle białym.

4.1.6. Ocena morfologii pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej

Aby uzyskać dokładną wizualizację struktury oczyszczonych EVs podjęto decyzję o zastosowaniu także mikroskopii elektronowej, która jest ważnym narzędziem pozwalającym na potwierdzenie, że w preparatach znajdują się cząstki sferyczne. Dlatego też próbki EVs zostały poddane obrazowaniu z wykorzystaniem skaningowo-transmisyjnej mikroskopii elektronowej (Rys. 25.).



Rysunek 25. Zdjęcia reprezentatywne badanych EVs mikrobiologicznych wykonanych przy użyciu STEM.

W wyniku obrazowania przy pomocy STEM uwidoczniono pęcherzyki, jednak uzyskane obrazy charakteryzowały się słabą rozdzielczością. Dlatego też, w celu dokładniejszej wizualizacji, próbki EVs przekazano do Pracowni Mikroskopii Elektronowej w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego Polskiej Akademii Nauk, gdzie zlecono wykonanie obserwacji przy użyciu transmisyjnej mikroskopii elektronowej. Uzyskane zdjęcia (Rys. 26.) pozwoliły na potwierdzenie, że w próbkach znajdują się pęcherzyki zewnątrzkomórkowe otoczone błoną biologiczną.



Rysunek 26. Zestawienie przykładowych zdjęć z transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM), uzyskanych przy 120000-krotnym powiększeniu.

Podczas przygotowywania preparatów na TEM, okazało się, że głównym problem było osadzenie i utrzymanie EVs na miedzianej siatce pokrytej warstwą formwaru oraz węgla. Pomimo zastosowania kilku modyfikacji metodyki pęcherzyki odrywały się od powierzchni siatki podczas kolejnych płukań. Ponadto procedura przygotowania preparatów jest wieloetapowa i bardzo inwazyjna, gdyż może wpływać zarówno na zmiany wielkości i jak i morfologii próbek biologicznych. W związku z tym, w przeciwieństwie do niektórych

publikacji ^{202–206}, niemożliwy jest wiarygodny pomiar ilości oraz wielkości EVs na podstawie zdjęć z mikroskopii elektronowej.

4.1.7. Analiza proteomiczna ładunku mikrobiologicznych EVs

Kolejnym, ważnym elementem badania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych jest poznanie ich ładunku białkowego. W tym celu wyizolowano białka ze wszystkich badanych EVs i przeprowadzono elektroforezę w żelach poliakrylamidowych w warunkach denaturujących (SDS-PAGE), które następnie wybarwiono roztworem *Commasie Briliant Blue*. Pozwoliło to na wizualizację prążków i poznanie rozkładu mas białek ładowanych przez mikroorganizmy do pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (Rys. 27. **a.** oraz Rys. 28. **a.**). Na ich podstawie stwierdzono, że białka enkapsulowane zarówno w EVs-Sb jak i EVs-VIO są równomiernie ładowane niezależnie od ich masy. Zupełnie inną sytuację zauważono w przypadku EVs-WUT240, gdzie zaobserwowano silne zagęszczenie białek o masie w przedziale 70 – 100 kDa.



Rysunek 27. **a.** Układ prążków na żelach poliakrylamidowych uzyskanych w wyniku elektroforezy (SDS-PAGE) białek wyizolowanych z EVs drożdżowych; **b.** Wizualizacja membrany PVDF uzyskanej w wyniku wykrywania drożdżowej kinazy pirogronianowej (Pyk1, ok. 56 kDa) w pęcherzykach drożdżowych, za pomocą metody Western blot.

Próbki wyizolowanych białek wysłano również do laboratorium zajmującego się spektrometrią mas (MS Lab Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk). Uzyskane wyniki z analizy LC-MS/MS białek EVs-Sb (zdeponowane w PRIDE: PXD042660), zostały porównane z dostępnymi rekordami w bazie *Saccharomyces Genome Database* (SGD). Zidentyfikowano 543 białka wspólne dla 3 prób biologicznych, opublikowane ²¹. Natomiast wyniki uzyskane dla EVs-WUT240, zostały porównane z bazą NCBI, przy zawężeniu wyników do *Kłuyveromyces marxianus*. Uzyskano w ten sposób listę 397 białek wspólnych dla pęcherzyków z 3 niezależnych hodowli tego szczepu (**Załącznik 2.**). Wśród białek wyizolowanych z pęcherzyków obu szczepów drożdżowych znaleziono kinazę pirogronianową (YAL038W – EVs-Sb, KAG0675125.1 – EVs-WUT240). Jest to enzym biorący udział w ostatnim etapie glikolizy, czyli przekształcaniu fosfoenolopirogronianiu w pirogronian ^{207,208}. Ze względu na wcześniejsze prace zespołu nad tym białkiem, możliwe było również wykonanie Western blot w celu potwierdzenia obecności Pyk1 w białkach wyizolowanych z EVs drożdżowych (Rys. 27. **b.**).

W przypadku EVs-VIO, dane z analizy MS (zdeponowane w PRIDE: PXD050374) zostały porównane z bazą NCBI, zawężoną do taksonu *Janthinobacterium lividum*. W 3 powtórzeniach biologicznych, udało się zidentyfikować 932 białka wspólne dla wszystkich izolacji (opublikowane w ¹⁰⁵), spośród których 77 to proteazy (**Załącznik 3.**). Zostały one sprawdzone w bazie MEROPS ²⁰⁹ i pogrupowano na: peptydazy serynowe – 37, metaloproteinazy – 21, karboksypeptydazy – 9, aminopeptydazy – 8, aminoacylazy – 1, aminohydrolazy – 1.



Rysunek 28. **a.** Układ prążków na żelach poliakrylamidowych uzyskanych w wyniku elektroforezy białek wyizolowanych z EV-VIO.; **b.** Wynik zymografii przeprowadzonej na pęcherzykach EVs-VIO, potwierdzający obecność w tych strukturach aktywnych proteinaz zdolnych do hydrolizy żelatyny.

Wśród wykrytych za pomocą LC-MS/MS białek wyizolowanych z EVs-VIO, zauważono rodziny białek, które można posądzać o zdolność do rozkładu żelatyny, tak jak np. S9²¹⁰ bądź kolagenu, gdyż żelatyna jest niczym innym jak częściowo zdegradowanym kolagenem ²¹¹. Taką aktywność enzymatyczną białek z EVs-VIO potwierdziła wykonana zymografia (Rys. 28. **b.**).

4.1.8. Porównanie wiolaceiny z pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (EVs-VIO) oraz z biomasy komórek bakteryjnych (Ex-VIO)

Wiolaceina jest produkowana jako nierozpuszczalny w wodzie ²¹² metabolit wtórny przez różne gatunki bakterii ²¹³, w tym przez *J. lividum* i kumulowana wewnątrz komórek oraz eksportowana do środowiska w formie zamkniętej w EVs ¹⁰⁴. W związku z tym kolejnym etapem badań była analiza z jaką wydajnością szczep *J. lividum* wydziela wiolaceinę w EVs oraz czy transportowany w ten sposób związek zachowuje swoje właściwości. W tym celu przygotowano ekstrakt metanolowy wiolaceiny z biomasy komórkowej, a próbki EVs-VIO były roztwarzane w czystym metanolu. Następnie porównywano jakościowo i ilościowo uzyskane roztwory wiolaceiny.

Na wstępie, korzystając z próbki komercyjnej wiolaceiny (V9389, Sigma Aldrich), wykonano analizę HPLC i porównano wynik z chromatogramem uzyskanym dla próbki Ex-VIO (Rys. 29.). Uzyskane piki pokrywały się ze sobą świadcząc o identyczności składu chemicznego oraz obecności wiolaceiny w próbce Ex-VIO. Tego rodzaju zgodność potwierdza, że wiolaceina w próbce Ex-VIO jest tożsama z komercyjnie dostępnym produktem. Dlatego w kolejnych eksperymentach zrezygnowano ze stosowania dodatkowej kontroli preparatu komercyjnego.



Rysunek 29. Chromatogramy komercyjnie dostępnej wiolaceiny rozpuszczonej w alkoholu metylowym oraz metanolowego ekstraktu wiolaceinowego z biomasy J. lividum PCM 3520 (Ex-VIO).

Badania próbki EVs-VIO przy użyciu HPLC nie wykonano, ze względu na oczekiwane duże ilości białek i lipidów, których obecność mogłaby wpłynąć na oznaczenie. W kolejnym kroku wykonano chromatografię cienkowarstwową – TLC w układzie aceton:chloroform:amoniak (1:1:0,01). Przedstawiona płytka była obrazowana w świetle dziennym (Rys. 30.), natomiast w świetle ultrafioletowym o długościach fali 254 oraz 365 nm nie zaobserwowano żadnych dodatkowych frakcji. Zaobserwowano natomiast 2 fioletowe frakcje (dolna – wiolaceina; górna – deoksywiolaceina) co jest zgodne z literaturą. Jednak dodatek amoniaku do układu, który poprawił rozdział tych frakcji spowodował także przesunięcie współczynników retencji (ang. *retention factor*, Rf) widocznych prążków, w porównaniu z danymi literaturowymi dla układu aceton:chloroform (1:1) ($Rf_{wiolaceina} = 0,43$; $Rf_{deoksywiolaceina} = 0,58$)²¹⁴.



Rysunek 30. Płytka do chromatografii cienkowarstwowej (TLC) ze złożem SilicaGel60, przedstawiająca rozdział ekstraktów zawierających wiolaceinę z pęcherzyków (EVs-VIO) oraz z biomasy bakteryjnej (Ex-VIO). Alkohol metylowy (MeOH) został umieszczony na płytce jako kontrola czystości rozpuszczalnika, w którym rozpuszczona była wiolaceina.

Ponadto wykonano także widma absorbancji i transmitancji przygotowanych prób (Rys. 31.). Wykonane, przy długości fali w zakresie 300 - 700 nm, skany absorbancji (określenie ilości światła pochłanianej przez badaną próbkę) oraz transmitancji (określenie ilości światła przechodzącego przez próbkę) EVs-VIO – 12,2 µM oraz Ex-VIO – 14,8 µM, nie wykazały różnic innych niż te wynikające z różnicy w stężeniu związku. Uzyskane widmo absorbancji można było także porównać z danymi literaturowymi ²¹⁵ zyskując kolejne potwierdzenie obecności wiolaceiny w próbkach.



Rysunek 31. Widma (**a**.) absorbancji oraz (**b**.) transmitancji zebrane dla wiolaceiny zamkniętej w pęcherzykach (EVs-VIO), izolowanej z biomasy bakteryjnej (Ex-VIO).

Wykonano widma 3D intensywności fluorescencji obu preparatów (Rys. 32.). Skan wykonano przy fali wzbudzenia w zakresie 350 - 400 nm oraz zbierano sygnał emisji w zakresie 360-700 nm. Na podstawie uzyskanych danych wyznaczono długość fali wzbudzenia $(\lambda_{ex}=360 \text{ nm})$ oraz emisji $(\lambda_{em}=430 \text{ nm})$. Otrzymane dane różnią się od tych znajdowanych w literaturze, gdzie wiolaceina wykazywała wzbudzenie przy 575 nm i emisję przy 675 nm, należy mieć uwadze, różnice zastosowanych rozpuszczalnikach jednak na W (we wspomnianym przypadku było to DMSO)²¹⁶. Takie różnice można zaobserwować w przypadku wielu innych związków ^{217,218}.



Rysunek 32. Widma 3D intensywności fluorescencji wiolaceiny z **a**. pęcherzyków (EVs-VIO) oraz **b**. biomasy bakteryjnej (Ex-VIO). Zakres długości fali wzbudzenia $\lambda_{ex}=350 - 400$ nm, zakres długości fali emisji $\lambda_{em}=360 - 700$ nm.

W przypadku wiolaceiny porównano, ile związku bakterie ładują do EVs oraz ile kumulują w biomasie komórkowej (Tab. 16.).

Tabela 16. Zestawienie ilości wiolaceiny otrzymanej z pęcherzyków (EVs-VIO) oraz z biomasy bakteryjnej (Ex-VIO) (n=3).

całkowity uzysk wiolaceiny ze 100 mL hodowli	EVs-VIO	Ex-VIO
[mg]	58,62±2,74	35,43±5,29
[mmol]	0,17±0,01	0,10±0,01

Całkowity uzysk wiolaceiny ze 100-mL hodowli *J. lividum* PCM 3520 wynosi ok. 94 mg, z których 62,33% związku jest natywnie enkapsulowane w EVs.

4.2. Wpływ mikrobiologicznych EVs na linie komórkowe z jelita grubego człowieka

4.2.1. Potwierdzenie zdolności EVs do interakcji z komórkami ludzkimi (EVs-NR)

W celu potwierdzenia, że EVs mikrobiologiczne mogą wchodzić w interakcje z komórkami ludzkimi wykorzystano lipofilowy barwnik fluorescencyjny – Nile Red, który dodano w ilości ok. $1,0 \cdot 10^5$ EVs drożdżowych w przeliczeniu na komórkę lub EVs-VIO uzyskując 0,5 µM stężenie wiolaceiny. Wybarwione EVs są bardzo słabo widoczne na przedstawionych fluorescencyjnych obrazach mikroskopowych ze względu na swoje niewielkie rozmiary oraz słabą jednostkową fluorescencję (Rys. 33.). Dopiero w momencie kontaktu z komórką ludzką, następuje w jej obrębie kumulacja barwnika, którą bez problemu można zaobserwować pod mikroskopem fluorescencyjnym. Podczas badań potwierdzono zdolność do interakcji wszystkich badanych EVs z każdą z testowanych linii komórek jelitowych, co przedstawiono na przykładzie linii HT-29 oraz badanych EVs mikrobiologicznych (Rys. 34.). Istnieje wiele mechanizmów wnikania EVs do komórek ssaczych ²¹⁹. Niestety na tym etapie badań niemożliwym było stwierdzenie w jaki sposób mikrobiologiczne EVs integrują z komórkami ludzkimi.



Rysunek 33. Zdjęcie poglądowe próbki EVs-Sb_NR, potwierdzające ich słabą jednostkową fluorescencję²¹.



Rysunek 34. Zestawienie zdjęć z obserwacji mikroskopowych, przedstawiających integrację EVs mikrobiologicznych wybarwionych Nile Red do komórek ssaczych, na przykładzie linii HT-29. Jądra komórkowe zostały wybarwione, jako punkty odniesienia, przy użyciu Hoechst 33342. Kontrola negatywna zarówno w postaci komórek nieinkubowanych z żadnymi EVs jak i inkubowanymi z EVs niebarwionymi nie wykazywały czerwonej fluorescencji, dlatego też przedstawiono jedynie zdjęcia poglądowe. Skala 50 µm.

Kolejnym parametrem, który zbadano podczas charakterystyki wyizolowanych pęcherzyków był ich potencjał błonowy. Zaobserwowano, że badane pęcherzyki charakteryzują się niewielkim ładunkiem ujemnym (Tab. 17.). Doniesienia literaturowe pokazują, że zeta potencjał EVs przyjmuje zróżnicowane wartości w zależności od mikroorganizmu, który je produkuje – *Lacbobacillus casei* -0,5 mV ²²⁰, *S. cerevisiae* ok. -7,5 mV, *P. fluorescens* ok. -15 mV, *S. aureus* ok. -17 mV ¹⁹⁹, *L. johnsonii* N6.2 -18,05 mV ²²¹, *L. rhamnosus* -19,4 mV ¹⁵², *E. coli* -35 – -45 mV, *Pediococcus pentosaceus* ok. -45 mV bądź też dla *L. salivarius* -45 – -50 mV ²²². Za stabilne struktury, które nie ulegają łatwo agregacji uznaje się cząstki o ładunku bliskim -20 mV i niższym wang^{58,152}. W związku z tym, można się spodziewać, że badane mikrobiologiczne EVs będą bardzo łatwo agregowały.

Tabela 17. Wyniki pomiaru potencjału zeta mikrobiologicznych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w tym stężeniu, które było dodawane do komórek ludzkich (n=3).

	EVs-Sb	EVs-WUT240	EVs-VIO
Z [mV]	$-4,35 \pm (-0,73)$	-5,68± (-0,22)	$-3,53 \pm (-0,18)$

Oprócz potencjału błonowego pęcherzyków, sprawdzono także potencjał komórek oraz komórek inkubowanych przez 60 min z pęcherzykami. Zaobserwowano niewielkie różnice ładunku pomiędzy komórkami kontrolnymi i inkubowanymi z EVs (Rys. 35.).



Rysunek 35. Wykres przedstawiający zmiany wartości zeta potencjału błony komórek inkubowanych z mikrobiologicznymi EVs; * istotność statystyczna na poziomie α =5,0%, w odniesieniu do hodowli kontrolnej (n=3).

Tak jak wskazuje literatura, interakcja EVs z komórkami odbywa się na podstawie różnych mechanizmów ²²³. Gdyby selektywnie dochodziło do fuzji błon komórkowych powinna być zauważalna tendencja malejącego potencjału zeta ²²⁴. W związku z brakiem takich obserwacji,

uzyskane wyniki bardziej skłaniają do stwierdzenia, że mikrobiologiczne pęcherzyki zewnątrzkomórkowe są pobierane, przez komórki ludzkie najprawdopodobniej na drodze endocytozy. Aczkolwiek, dominujący mechanizm może być inny ²²⁵ i trudny do zaobserwowania w zaproponowanym układzie. Warto to dokładniej zbadać, np. poprzez wykorzystanie mikroskopii konfokalnej z wykorzystaniem barwników fluorescencyjnych.

4.2.2. Zbadanie wpływu pęcherzyków mikrobiologicznych na ogólną kondycję hodowli komórkowych

Po potwierdzeniu interakcji EVs z komórkami, dla każdego rodzaju badanych pęcherzyków (EVs-Sb, EVs-WUT240 oraz EVs-VIO) sprawdzono jak ich ilość wpływa na aktywność metaboliczną i produkcję reaktywnych form tlenu, będących pierwszą reakcją stanu zapalnego komórek oraz na całkowitą liczebność testowanych hodowli.

W przypadku EVs-Sb po 24-h inkubacji nie zaobserwowano negatywnego ani pozytywnego wpływu EVs na liczebność i aktywność metaboliczną badanych linii komórkowych (Rys. 36. **a.**, **c.**). Jedynie w przypadku komórek linii HCT116 zaobserwowano zależność stężenia EVs i rosnącego poziomu ROS. Przy najwyższej zastosowanej ilości pęcherzyków (1,8·10⁵ EVs/komórkę) zaobserwowano produkcję ROS na poziomie o 31% wyższym niż w hodowli kontrolnej (Rys. 36. **b.**). Istotności statystyczne poziomu produkcji ROS przez komórki linii CCD841 CoN dotyczą zmian, które nie przekraczają 20%.



Rysunek 36. Wyniki testów (**a**. MTT, **b**. ROS, **c**. CV) przeprowadzonych po 24-h inkubacji z różną ilością EVs-Sb przypadających na pojedynczą komórkę. Czarną, przerywaną linią oznaczono poziomy odpowiedzi hodowli kontrolnej; * istotność statystyczna na poziomie α =5,0% w odniesieniu do hodowli kontrolnej (n=4).

Analogiczne badania przeprowadzono stosując jako czynnik aktywny EVs-WUT240. W ich przypadku po 24-h inkubacji nie zaobserwowano zmian ani ilości komórek ani poziomu produkcji ROS (Rys. 37. b., c.). Natomiast w przypadku aktywności metabolicznej komórek zauważono znaczne zmiany w zależności od typu komórek. Komórki prawidłowe CCD841 CoN były metabolicznie stymulowane w obecności EVs, w przeciwieństwie do komórek nowotworowych, w przypadku których odnotowano ponad 20% zahamowanie metabolizmu w odniesieniu do kontroli (Rys. 37. a.).



Rysunek 37. Wyniki testów (a. MTT, b. ROS, c. CV) przeprowadzonych po 24-h inkubacji z różną ilością EVs-WUT240 przypadających na pojedynczą komórkę. Czarną, przerywaną linią oznaczono poziomy odpowiedzi hodowli kontrolnej; * istotność statystyczna na poziomie α =5,0% w odniesieniu do hodowli kontrolnej (n=4).

Do dalszych badań wytypowano ilość EVs drożdżowych jednakową dla obydwu badanych szczepów, która co prawda w przypadku EVs-WUT240 inicjowała bardzo wysokie rozbieżności aktywności metabolicznej komórek w odniesieniu do kontroli, ale jednocześnie nie stymulowała nadmiernej produkcji ROS. Była to wartość $9,2\cdot10^4$ EVs/komórkę, którą zaokrąglono do $1,0\cdot10^5$ EVs/komórkę. Najprawdopodobniej jest to duży nadmiar w stosunku do warunków fizjologicznych w organizmie człowieka, gdzie mikrobiota składa się z ok. $10^{13} - 10^{14}$ mikroorganizmów ^{226,227} co w porównaniu z ilością komórek śródbłonka formujących okrężnicę stanowi 1 - 10-krotny nadmiar ^{226,228,229}. Przy uwzględnieniu, że ok. 90% mikrobioty stanowią bakterie *Bacteroidetes* spp. oraz *Firmicutes* spp. ^{230,231}, a drożdże stanowią niespełna 0,1% ²³² można szacować, że przy idealnym, równomiernym rozłożeniu na pojedynczą komórkę jelita przypadałoby raptem kilka EVs drożdżowych.

W przypadku EVs-VIO, za właściwe uznano, że ilość pęcherzyków ma mniejsze znaczenie niż końcowe stężenie wiolaceiny w nich zawartej. Podobnie jak w przypadku EVs drożdżowych przeprowadzono testy aktywności metabolicznej, produkcji ROS oraz liczebności hodowli

(Rys. 38.). W tym celu przygotowano szereg rozcieńczeń EVs-VIO oraz Ex-VIO, jako kontroli dla działania samej wiolaceiny. Przetestowano stężenia wiolaceiny w zakresie $0,125 - 16 \mu$ M. Biorąc pod uwagę ilość EVs-VIO i zawartość w nich wiolaceiny oszacowano, że na pojedynczą komórkę nowotworową przypadało $7,0\cdot10^3 - 8,0\cdot10^5$ EVs. Natomiast w przeliczeniu na pojedynczą komórkę prawidłową były to 2-krotnie wyższe wartości, gdyż ze względu na ich znacznie większe wymiary konieczne było wysianie o połowę mniejszej ilości komórek w naczyniach hodowlanych.



Rysunek 38. Wyniki testów (**a**. MTT, **b**. ROS, **c**. CV) przeprowadzonych po 24-h inkubacji z różnymi stężeniami wiolaceiny zawartej w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych (EVs-VIO) oraz wyizolowanej z biomasy bakteryjnej (Ex-VIO) zastosowanej jako odniesienie dla działania samego związku. Czarną, przerywaną linią oznaczono poziomy odpowiedzi hodowli kontrolnej; * istotność statystyczna na poziomie α =5,0% w odniesieniu do hodowli kontrolnej (n=4).

W badanych stężeniach, wiolaceina wykazywała silne działanie zarówno na komórki nowotworowe jak i komórki prawidłowe. Jednak jej wpływ znacznie różnił się w zależności od

postaci (EVs lub ekstrakt) w jakiej była aplikowana. W związku z tym, wyznaczono wartość połowy efektywnej dawki (ang. *half maximal effective concentration*, EC₅₀) (Tab. 18.).

*Tabela 18. Wartości EC*₅₀ wyznaczone na podstawie MTT (<u>https://www.aatbio.com/tools/ec50-calculator</u>, wykorzystano 4-parametryczny model regresji).

EC ₅₀ [µM]	HT-29	HCT116	CCD841 CoN
EVs-VIO	4,60	1,09	1,16
Ex-VIO	1,96	0,81	0,40

wiolaceina zamknieta Pomimo użycia jednakowych stężeń, pecherzykach W zewnątrzkomórkowych wykazuje łagodniejsze działanie na komórki niż wiolaceina zawarta w metanolowym ekstrakcie z biomasy bakteryjnej. Zaobserwowana tendencja nie ma związku z obecnością alkoholu metylowego w hodowli komórkowej. Jego wpływ wykluczono poprzez zastosowanie dodatkowej kontroli negatywnej w postaci komórek hodowanych w obecności jednakowego stężenia MeOH co w badanych wariantach z wiolaceiną. Za to jest zgodna z literaturą, gdzie badano zarówno wolną wiolaceinę jak i enkapsulowaną w nanocząstkach ²³³. Ze względu na różną odpowiedź komórek i szeroki zakres wartości EC₅₀ (od ok. 1 µM dla HCT116 oraz CCD841 CoN do ponad 4 µM dla HT-29) do dalszych testów wybrano stężenie wiolaceiny będące 2-krotnie niższe niż najniższa wartość EC50. EVs-VIO o stężeniu 0,5 µM wiolaceiny, w przeliczeniu na ilość pęcherzyków odpowiadają ilościom bliskim 2.8·10⁴ EVs-VIO/komórka nowotworowa oraz 5,6·10⁴ EVs-VIO/komórka prawidłowa.

Do dalszych badań wybrano $1,0\cdot10^5$ EVs drożdżowych na komórkę, ponieważ zarówno w przypadku EVs-Sb jak i EVs-WUT240 jest to ilość materiału, która zaczyna wpływać na kondycję komórek nowotworowych (pojawiają się istotne statystycznie spadki aktywności metabolicznej) przy jednoczesnym praktycznie neutralnym wpływie na zmiany aktywności metabolicznej komórek prawidłowych. Ponadto objętości próbek zawierających wskazaną ilość pęcherzyków nie przekraczają 5% całkowitej objętości hodowli. Można uznać, że generowane w ten sposób rozcieńczenie medium hodowlanego nie ma znaczącego wpływu na reakcję komórek. Niemniej, aby mieć pewność, że tak jest, kontrolą negatywną do każdego z prowadzonych badań była hodowla, do której dodano jednakową objętość buforu (DPBS), w którym zawieszone były EVs.

Natomiast w przypadku EVs-VIO do dalszych testów wybrano 0,5 μM stężenie wiolaceiny, jest to wartość odpowiadająca około połowie wartości EC₅₀ dla komórek CCD841 CoN oraz HCT116. Jest to także stężenie blisko 9-krotnie niższe niż wartość EC₅₀ dla komórek HT-29. Założono, że wybrane stężenie pozwoli zaobserwować różne reakcje komórek. Aby móc zbadać różnice wpływu między pęcherzykami zawierającymi wiolaceinę a samą wiolaceiną, badania prowadzono równolegle także na ekstrakcie alkoholowym, Ex-VIO o jednakowym stężeniu 0,5 μM.

4.2.3. Indukcja odpowiedzi długotrwałej (ang. LongTerm assay, LTa)

Ze względu na uzyskane wyniki, które wskazywały, że komórki reagują w pewnym stopniu na obecność EVs w ciągu 24 h, wydłużono czas ekspozycji linii na badane czynniki. Przeprowadzono testy długotrwałej odpowiedzi, czyli trwającą 168 h hodowlę komórek ludzkich z EVs pochodzenia mikrobiologicznego. Przez pierwsze 3 dni hodowli nie zaobserwowano różnic w odniesieniu do kontroli bez dodatku EVs do medium, jednak już w 5. dniu różnice w konfluencji prowadzonych hodowli były zauważalne. W ostatnim dniu hodowli, komórki odklejono od powierzchni naczyń i zliczono (Rys. 39.).



Rysunek 39. Liczba komórek w 7. dniu hodowli z pęcherzykami pochodzenia mikrobiologicznego lub ekstraktem zawierającym wiolaceinę, w odniesieniu do liczby komórek w hodowli kontrolnej nietraktowanej (czarna przerywana linia); * istotność statystyczna na poziomie α =5,0% w odniesieniu do hodowli kontrolnej (n=3).

W przypadku pęcherzyków drożdżowych zaobserwowano, wzrost liczby komórek prawidłowych, co świadczy o ich pozytywnym wpływie na linie CCD841 CoN oraz CCD-18Co. Jednocześnie istotnie zmniejszyły one liczebności hodowli komórek nowotworowych, przy czym podczas 7-dniowego testu nie zaobserwowano zmian

morfologicznych komórek, które miałyby świadczyć o niesprzyjających warunkach hodowli. Jednakże od dnia 5. obserwowano zwiększającą się ilość komórek nieprzytwierdzonych do powierzchni hodowlanej, czyli najprawdopodobniej komórek martwych. Mimo ich obecności, wizualnie hodowle nie wyglądały jakby z dnia na dzień zmieniała się ich konfluencja, co sugerowałoby, że EVs mikrobiologiczne mogą powodować spowolnienie tempa podziałów komórek nowotworowych.

W literaturze opisano przypadek 3-dniowej odpowiedzi monocytów THP-1 na pęcherzyki wyizolowane z hodowli wywołującej malarię (*Plasmodium falciparum*). Nie zaobserwowano dużych różnic w uzyskanych przez autorów wynikach ²³⁴, dlatego też jeszcze ciekawsze stają się wyniki uzyskane dla badanych pęcherzyków drożdży probiotycznych. W związku z tym, wykonano przyżyciowe barwienie AO/Pi (Rys. 40.), aby zweryfikować czy spowolnienie w progresji hodowli jest także skorelowane z fazą cyklu komórkowego, czyli czy komórka nie wkracza w fazę apoptozy bądź nekrozy ^{235,236}.



Rysunek 40. Hodowle ludzkich komórek pod wpływem EVs-Sb oraz EVs-WUT240 poddane barwieniu przyżyciowemu z wykorzystaniem oranżu akrydyny oraz jodku propidyny (AO/Pi) zarówno po 24 jak i po 168 h ekspozycji komórek na EVs. Skala 50 µm.

Podczas analizy uzyskanych z barwienia obrazów zaobserwowano, że w komórkach nowotworowych po 7. dniach hodowli z EVs mikrobiologicznymi zaczęło dochodzić do powolnej śmierci. Brak widocznych zmian morfologicznych sugeruje, że komórki weszły na ścieżkę apoptozy. Natomiast, w przypadku komórek prawidłowych nie zaobserwowano wzmożonego wchłaniania jodku propidyny, który świadczyłby o jakichkolwiek skłonnościach hodowli do śmierci.

Zupełnie inny mechanizm zaobserwowano w przypadku hodowli traktowanych EVs-VIO oraz Ex-VIO, w przypadku których zmiany liczebności powiązano ze zmianami morfologicznym. Co więcej dotyczyły one komórek nowotworowych i nie zaobserwowano ich w obrębie komórek prawidłowych (Rys. 41.). Wakuolizacja cytoplazmatyczna, którą zauważono w prowadzonych hodowlach, pojawia się w komórkach ssaczych po narażeniu ich na działanie różnych substancji chemicznych i czynników bioaktywnych ^{237–239}. Wakuolizacja nastąpiła niezależnie czy wykorzystano w badaniach pęcherzyki bakteryjne czy ekstrakt ze związkiem, co podkreśla wpływ samej wiolaceiny. Ponadto zaobserwowano znaczne różnice w obrazach mikroskopowych między badanymi liniami. Komórki linii bardziej metastatycznej (HCT116) miały widoczne drobne, ale za to bardzo liczne wakuole. Natomiast w komórkach drugiej z badanych linii nowotworowych (HT-29) powstało znacznie mniej struktur jednak były one zdecydowanie większe. Ponadto w przypadku bardziej agresywnej linii HCT116 wakuolizacja nastąpiła 48 h szybciej niż w komórkach HT-29. Poczynione obserwacje wymagają dalszych badań nad wpływem wiolaceiny na zmiany zachodzące w komórkach oraz na sam proces wakuolizacji.



Rysunek 41. Wpływ wiolaceiny, o stężeniu 0,5 μM, na morfologię komórek HT-29 oraz HCT116 i porównanie ich do komórek CCD841 CoN. Czerwonymi strzałkami zaznaczono pojawiające się zmiany w obrębie błon komórkowych. Skala 50 μm.

Aby sprawdzić, dlaczego zaistniały takie różnice potraktowano komórki prawidłowe i nowotworowe 10-krotnie wyższym stężeniem wiolaceiny enkapsulowanej w postaci EVs-VIO (5 μM). Czas ekspozycji został skrócony, gdyż celem nie było uśmiercenie komórek, lecz sprawdzenie, gdzie kumuluje się wiolaceina, która wykazuje zieloną fluorescencję (Rys. 42.). Zaobserwowano, że w komórkach prawidłowych związek rozkłada się równomiernie po całej cytoplazmie z wyłączeniem obszaru jądra komórkowego. Natomiast w przypadku komórek nowotworowych następowała centralizacja wiolaceiny i jej kumulacja właśnie w obszarze jądra. Było to jednak badanie pilotażowe i aby wyciągnąć więcej wniosków należałoby to dokładniej sprawdzić.



Rysunek 42. Linie komórkowe CCD841 CoN oraz HT-29 po 90 min inkubacji z 5 μM wiolaceiną przenoszoną przez EVs-VIO_NR. Nile Red – czerwony, Hoechst 33342 – niebieski, wiolaceina – zielony. Żółtymi strzałkami zaznaczono obszary, w których skupiło się najwięcej wiolaceiny. Skala 50 μm.

4.2.4. Długotrwała hodowla mieszana komórek prawidłowych oraz nowotworowych przy ekspozycji na EVs drożdżowe, trwającej 168 h (ang. *Co-culture LongTerm assay*, CcLTa)

Zaobserwowane, podczas długotrwałej hodowli monokultur pod wpływem EVs drożdżowych, różnice w liczebności komórek prawidłowych i nowotworowych sprawdzono także w innym układzie. Przygotowano hodowle mieszane, do których również dodano probiotyczne pęcherzyki zewnątrzkomórkowe w ilości $1,0\cdot10^5$ EVs/komórkę i prowadzono hodowle przez 7 dni (Rys. 43.). Aby ułatwić zaobserwowanie komórek prawidłowych, które ze względu na swoje znaczne rozpłaszczenie na powierzchni naczynia hodowlanego są słabo widoczne w świetle białym, nałożono na zdjęcia kolorowe maski w miejscach obserwacji odpowiednich typów komórek, obraz oryginalny stanowi **Załącznik 4**.



Rysunek 43. Obraz kultur mieszanych, komórek prawidłowych i nowotworowych, po 168-h hodowli w obecności EVs drożdżowych w odniesieniu do kontroli nietraktowanych pęcherzykami zewnątrzkomórkowymi. Skala 100 µm

Zaobserwowano znaczące zahamowanie rozwoju komórek nowotworowych, przy jednoczesnym wzroście liczby komórek prawidłowych w obecności EVs drożdżowych. Ze względu na brak odpowiednich markerów powierzchniowych, a także brak dostępu do

cytometru, nie było możliwe ilościowe oznaczenie zaobserwowanych mikroskopowo różnic. W związku z tym, aby potwierdzić zróżnicowany wpływ EVs na testowane typy komórek wykonano barwienie AO/Pi/H (Rys. 44. oraz Rys. 45.).

Zaobserwowano, że komórki nowotworowe pod wpływem EVs zakumulowały więcej jodku propidyny i mniej Hoechst33342, niż w hodowli kontrolnej, co oznacza, że weszły one na ścieżkę śmierci (tak jak miało to miejsce w przypadku hodowli monokultur). Komórki prawidłowe ze względu na ich znaczne rozpłaszczenie znacznie trudniej było zobrazować w obecności komórek nowotworowych, od których sygnały fluorescencji były zdecydowanie silniejsze. Pomimo to w przypadku komórek CCD841 CoN oraz CCD-18Co nie zaobserwowano tak silnej reakcji jak u komórek HT-29 czy też HCT116.



Rysunek 44. Kultury mieszane (CCD-18Co wraz z komórkami HT-29) po 168-h hodowli pod wpływem EVs drożdżowych poddane barwieniu przyżyciowemu z wykorzystaniem oranżu akrydyny oraz jodku propidyny (AO/Pi) i Hoechst33342. Skala 50 µm.



Rysunek 45. Kultury mieszane (CCD-18Co wraz z komórkami HCT116) po 168-h hodowli pod wpływem EVs drożdżowych poddane barwieniu przyżyciowemu z wykorzystaniem oranżu akrydyny oraz jodku propidyny (AO/Pi) i Hoechst33342 do wybarwienia jąder komórkowych. Skala 50 µm.

4.2.5. Wpływ pęcherzyków na potencjał nowotworowy komórek HT-29 oraz HCT116

Wybrane do badań komórki nowotworowe, HT-29 oraz HCT116, różnią się swoim potencjałem metastatycznym. Zgodnie z literaturą w przeciwieństwie do linii HT-29, komórki HCT116 są bardzo agresywne i praktycznie nie posiadają zdolności do różnicowania ²⁴⁰. Wiedza na temat udziału metaloproteinaz w procesie metastazy jest dosyć dobrze ugruntowana. Metaloproteinazy, zwłaszcza MMP-2 oraz MMP-9, są wskazywane jako istotne czynniki biorące udział w progresji nowotworów ^{241–244}. W związku z tym, aby zbadać potencjał EVs mikrobiologicznych do hamowania rozwoju nowotworów sprawdzono jaki wpływ mają one na aktywność metaloproteinaz, co zobrazowano poprzez wykonanie zymografii (Rys. 46.).



Rysunek 46. Wyniki zymografii przedstawiające zmiany aktywności metaloproteinaz (**a**. MMP-2; **b**. MMP-9) produkowanych przez hodowle stymulowane EVs w stosunku do hodowli kontrolnych; * istotność statystyczna na poziomie α =5,0%. Czarną przerywaną linią oznaczono poziom aktywności metaloproteinaz w hodowlach kontrolnych (n=3).

Obawiano się, że proteolityczna zawartość EVs-VIO (wykazana wcześniej – Rys. 28. b.) mogłaby zaburzać wyniki uzyskiwane podczas zymografii. Aby to wykluczyć porównano wpływ jaki mają na wynik EVs-VIO o 1 μ M stężeniu VIO przygotowane tuż przed elektroforezą oraz supernatant po hodowli komórek HCT116 w obecności takiego samego stężenia VIO w EVs (Rys. 47.). Uzyskane wyniki potwierdziły, że proteazy z EVs-VIO nawet w 2-krotnie wyższym stężeniu (niż używane w badaniach 0,5 μ M) nie będą pokrywały się z prążkami (po rozdziale w żelu poliakrylamidowym) metaloproteinaz produkowanych przez komórki. Bowiem najaktywniejsze z proteaz w EVs-VIO zdolne do rozkładu żelatyny są najwidoczniej białkami o dużej masie cząsteczkowej i lokalizują się wysoko na żelu (>100 kDa), natomiast poszukiwane metaloproteinazy mają masy w zakresie 62 – 92 kDa ²⁴².


Rysunek 47. Przykładowe wyniki zymografii przedstawiające a. wpływ EVs-VIO oraz Ex-VIO na komórki HCT116 oraz b. świeżo przygotowane 1 µM rozcieńczenie EVs-VIO.

Na podstawie wyników zymografii nie zaobserwowano żadnego trendu zmian w aktywności metaloproteinaz. Mimo to zauważono pewne inhibicje (MMP-2 w HT-29 oraz MMP-9 w HCT116 pod wpływem EVs-VIO) oraz nadaktywności (MMP-9 w komórkach HT-29 pod wpływem EVs-WUT240 oraz MMP-9 w HT-29 i CCD841 CoN pod wpływem EVs-VIO). Dodatkowo, sprawdzono także ekspresję genów *MMP2* oraz *MMP9*, a także ich inhibitorów *TIMP1-3* (ang. *tissue inhibitors of metalloproteinases*). Przeprowadzono hodowle, które stymulowano obecnością EVs mikrobiologicznych i po 24 h ekstrahowano z nich RNA. Na uzyskanym z reakcji odwrotnej transkrypcji cDNA przeprowadzono qPCR z wykorzystaniem starterów selektywnych dla: *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1*, *TIMP2*, *TIMP3* oraz *GAPDH* jako genu referencyjnego (Rys. 48.).

Decyzję o rozszerzeniu badań o inhibitory metaloproteinaz podjęto ze względu na ich złożony wpływ na badane MMP-2 oraz MMP-9. Tak naprawdę nie można wskazać tylko jednego inhibitora mającego wpływ specyficznie tylko na jedną metaloproteinazę. TIMP-1 wpływa na aktywność różnych MMP (zwłaszcza MMP-1, MMP-3, MMP-7 a także MMP-9) znacznie wydajniej niż TIMP-2, z wyjątkiem MMP-2, na które ten inhibitor nie działa. TIMP-2 hamuje aktywność MMP-2 znacznie wydajniej niż inne TIMP, ale nie wpływa na MMP-9 ^{245,246}. Można więc przyjąć, że TIMP-1 wpływa na aktywność MMP-9, natomiast TIMP-2 na MMP-2. Jednak nie są to jedyne inhibitory mające wpływ na badane metaloproteinazy, gdyż TIMP-3 może

hamować zarówno MMP-2 jak i MMP-9 ²⁴⁶. Co więcej TIMP-3 wpływa nie tylko na metaloproteinazy, ale także na uwalnianie TNF α i IL-6 ^{247,248}.



Rysunek 48. Wyniki qPCR przedstawiające zmiany w ekspresji genów MMP2, MMP9, TIMP1, TIMP2 oraz TIMP3 w odniesieniu do ekspresji genu referencyjnego GAPDH po 24-h inkubacji komórek z **a.** 1,0·10⁵ EVs-Sb/komórkę; **b.** 1,0·10⁵ EVs-WUT240/komórkę oraz **c.** 0,5 μ M wiolaceiny w EVs-VIO; * istotność statystyczna na poziomie α =5,0% (n=4).

Na podstawie uzyskanych wyników można zaobserwować, że EVs-Sb w komórkach HT-29 powoduje zahamowanie ekspresji badanych *MMP* oraz *TIMP2* i *TIMP3*, a w komórkach prawidłowych wzrost ekspresji *MMP2* oraz *TIMP2*. Natomiast wpływ EVs-WUT240 był przeciwny, gdyż w badanych komórkach nowotworowych wykryto nadekspresję *MMP2*, *MMP9* oraz *TIMP3*, a w przypadku HCT116 także genów pozostałych dwóch inhibitorów MMP. W obecności EVs-VIO komórki wykazały zmiany w ekspresji genów i były one bardziej zróżnicowane, gdyż zaobserwowano wzrost ekspresji *MMP2*, *TIMP2* oraz *TIMP3* w komórkach CCD841 CoN i znaczny wzrost *TIMP3* w komórkach HCT116. Ponadto odnotowano spadek ekspresji *MMP2* w komórkach obu linii nowotworowych, a także spadek *MMP9* i *TIMP2* w HCT116 oraz spadek ekspresji badanych *TIMP* w HT-29.

W przypadku badań nowotworów analizowany jest poziom metaloproteinaz i ich inhibitorów, który określa się głównie na podstawie barwień preparatów histopatologicznych oraz analiz ekspresji ich genów na podstawie RNA-Seq i wyznaczanego parametru log₂(FPKM+1) (ang. *Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads*). Najczęściej można spotkać analizę *MMP2* wraz z *TIMP2* oraz *MMP9* z *TIMP1*^{249–252}.

Ze względu na charakter przeprowadzonego badania, ekspresję genów wyznaczono na podstawie - $\Delta\Delta C_t$. W związku z tym nie możliwe było wyznaczenie analogicznych, co log₂(FPKM+1), zależności. Na podstawie uzyskanych z qPCR wartości C_t wyznaczono dla *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1* oraz *TIMP2* wartości C_{t-znormalizowane} = C_t^{GAPDH}-C_t^{badane}, a następnie wyliczono współczynniki $\Delta_{MMP2/TIMP2}$ =C_{t-znorm.}^{*MMP2*}-C_{t-znorm.}^{*TIMP2*} oraz $\Delta_{MMP9/TIMP1}$ =C_{t-znorm.}^{*MMP9*}-C_{t-znorm.}^{*TIMP1*}.

Zgodnie z zasadą, na której oparty jest PCR, z każdym cyklem termicznym ilość matrycy zostaje podwojona. W związku z tym, gdy liczba 2 zostanie podniesiona do potęgi Δ , to uzyskane wartości będą odzwierciedlały ilu-krotnie różni się ilość namnożonego materiału specyficznie dla *MMP2* lub *MMP9* oraz *TIMP2* lub *TIMP1*. Wartości uzyskane dla hodowli traktowanych odniesiono do tych otrzymanych dla kontroli nietraktowanych (Tab. 12.).

analizowany współczynnik	pęcherzyki dodane do hodowli	HT-29	HCT116	CCD841 CoN
	EVs-Sb	(78,2±9,6) % *	(110,6±14,5)%	(91,2±16,1) %
$\Delta_{MMP2/TIMP2}$	EVs-WUT240	(71,7±17,5) % *	(51,2±9,4) % *	(90,8±17,9) %
	EVs-VIO	(45,3±8,0) % *	(117,2±17,7) %	(51,0±11,4) % *
$\Delta_{MMP9/TIMP1}$	EVs-Sb	(102,2±14,0) %	(93,2±12,6) %	(97,5±4,9) %
	EVs-WUT240	(92,8±14,1) %	(87,3±15,1) %	(106,9±7,9)%
	EVs-VIO	(109,2±23,7) %	(88,8±14,8) %	(95,0±6,7) %

Tabela 19. Zestawienie wartości współczynników MMP2/TIMP2 oraz MMP9/TIMP1, wyznaczonych dla hodowli traktowanych w odniesieniu do hodowli kontrolnych; * istotność statystyczna na poziomie α =5% (n=4).

Wartości współczynników *MMP9/TIMP1* nie różniły się znacznie w odniesieniu do kontroli, natomiast w przypadku *MMP2/TIMP2* zaobserwowano istotne statystycznie zmiany. W przypadku linii HT-29 wszystkie badane pęcherzyki wywołały obniżenie wartości analizowanego współczynnika. Natomiast w przypadku linii HCT116 podobną sytuację zaobserwowano tylko w przypadku, gdy do komórek dodano EVs-WUT240.

We wspomnianych wcześniej publikacjach ^{249–252} bazujących na próbkach klinicznych nie był badany poziom *TIMP3*. Jednak na podstawie przeprowadzonych qPCR zaobserwowano zmiany w ekspresji tego genu, które są zróżnicowane w zależności od wykorzystanych EVs oraz dotyczą jedynie komórek nowotworowych. Ponadto TIMP3 wpływa zarówno na MMP-2 jak i MMP-9. W związku z tym zasadne jest włączenie tego genu do kolejnych badań nad ekspresją *MMP* oraz *TIMP* pod wpływem EVs mikrobiologicznych.

4.2.6. Produkcja interleukin indukowana obecnością EVs pochodzenia mikrobiologicznego

Komórki nabłonka wyściełają jelito tworząc pierwszą barierę między organizmem a środowiskiem zewnętrznym. Biorą one udział w modulacji układu odpornościowego jelit. Komunikacja między nimi a komórkami odpornościowymi jest kluczowa dla utrzymania homeostazy i prawidłowego funkcjonowania organizmu. Przekazywanie odpowiedzi immunologicznej może odbywać się poprzez bezpośredni kontakt komórka-komórka lub poprzez uwalnianie i rozpoznawanie różnych cząsteczek zapalnych, takich jak IL-6, IL-8 czy TNF- $\alpha^{228,253}$.

W związku z powyższym, kolejnym zadaniem, było sprawdzenie odpowiedzi komórek na obecność EVs poprzez produkcję cytokin prozapalnych IL-6, IL-8 i TNFα oraz przeciwzapalnej IL-4. Zgodnie z opisaną metodyką wykonano testy Western blot oraz Slot blot zarówno na medium po 24-h hodowli komórek z EVs mikrobiologicznymi jak i na białkach wyizolowanych z tych komórek. Niestety ani w jednym ani w drugim przypadku (pomimo czułej techniki detekcji jaką jest chemiluminescencja), nie udało się uzyskać odczytów dla badanych interleukin. Dlatego też użyto znacznie czulszą multipleksową metodę cytometryczną, która polega na związaniu interleukin na selektywnych kulkach cytometrycznych oraz ich analizie. Wybrana metodyka pozwoliła na analizę interleukin w zakresie stężeń 274 – 200000 fg/mL.

Do badań zostały użyte dwie linie jelitowe komórek prawidłowych, dwie jelitowe komórek nowotworowych i dodatkowo komórki LUVA, czyli mastocyty, które znane są ze swojego udziału w reakcjach układu odpornościowego. Badane komórki wykazywały różnice w poziomie produkcji badanych cytokin (Rys. 49.).



*Rysunek 49. Zestawienie ilościowego oznaczania interleukin (a. IL-6; b. TNFa; c. IL-8) w medium hodowlanym po 24-h inkubacji komórek z mikrobiologicznymi EVs; * istotność statystyczna na poziomie \alpha=5,0% (<i>n*=3).

Wszystkie badane komórki niezależnie czy poddane działaniu EVs czy też nie, nie wykazywały produkcji IL-4 w zakresie detekcji zestawu. W przypadku komórek LUVA dodatek EVs mikrobiologicznych zaindukował silny wzrost stężenia TNFα. Ta prozapalna cytokina

uwalniana jest przez mastocyty po degranulacji ²⁵⁴. Jest to niezwykle ciekawe i warte przeprowadzenia kolejnych badań, gdyż w literaturze można znaleźć doniesienia, że bakterie probiotyczne, na przykładzie *L. rhamnosus*, osłabiają ten proces ^{255,256}.

Komórki prawidłowe zostały zastymulowane przez EVs drożdżowe do intensywnej produkcji IL-6 oraz IL-8. Obydwie te interleukiny wspomagają rozwój i ekspansję nowotworów jelita grubego ²⁵⁷, a w przypadku cytokiny 8 także ich przerzuty ²⁵⁸. Jest to zupełnie inny obraz niż układ, którego spodziewano się po zachowaniu komórek po 24 oraz 168 h inkubacji z EVs mikrobiologicznymi. Zarówno w prowadzonych monokulturach (LTa, Rys. 39.) jak i ko-kulturach (CcLTa, Rys. 43.) obserwowano zahamowanie wzrostu komórek nowotworowych i ekspansję komórek prawidłowych. Zaobserwowane rozbieżności są godne uwagi i dalszych badań nad wpływem EVs drożdżowych na czynnik transkrypcyjny NF-κB.

4.3. EVs jako nośniki leków – egzogenne ładowanie związków do EVs oraz testowanie ich jako nośników do stworzenia DDS-EVs (ang. *EVs-based drug delivery system*)

4.3.1. Ładowanie EVs związkiem bioaktywnym:

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe swoją budową przypominają syntetycznie otrzymywane liposomy, które wykorzystywane są jako systemy dostarczania leków, dlatego postanowiono wykonać także testy ładowania egzogennego EVs. Z racji tej, że EVs-VIO są już wypełnione wiolaceiną, do badań wybrano tylko pęcherzyki drożdżowe. Jako modelowy związek wytypowano doksorubicynę – obecnie wykorzystywany w chemioterapiach cytostatyk, wykazujący czerwoną fluorescencję. Aby móc ocenić wydajność ładowania doksorubicyny do EVs, konieczne było przygotowanie krzywej wzorcowej intensywności fluorescencji (IFU) od stężenia związku w roztworze (Rys. 50.).



Rysunek 50. Krzywa standardowa intensywności fluorescencji od stężenia doksorubicyny, opracowana w celu wyznaczenia wydajności ladowania EVs tym związkiem. Jako wzorzec wykorzystano komercyjny roztwór doksorubicyny w stężeniu 2 mg/mL firmy EBEWE (Doxorubicin - Ebewe 2 mg/mL, EAN: 5909990429028, EBEWE Pharma GmbH).

Po przeprowadzeniu ładowania wskazanymi poniżej (Tab. 20.) metodami dokonano pomiaru fluorescencji w oczyszczonych EVs i przeliczono ją na załadowaną ilość związku, którą następnie odniesiono do stężenia doksorubicyny zmieszanej z pęcherzykami. Jednocześnie wykorzystując NTA sprawdzono, ile EVs odzyskano po ładowaniu i oczyszczaniu ich ze związku pozostającego w postaci wolnej w roztworze.

	EVs-Sb_DOX		EVs-WUT240_DOX	
metoda	odzysk EVs	wydajność ładowania	odzysk EVs	wydajność ładowania
1 mg/mL DOX/ ON, 4°C	71%	0,23%	50%	0,27%
1 mg/mL DOX + 200 mM sacharoza/ ON, 4°C	12%	0,32%	16%	0,34%
0,5 mg/mL DOX + 200 mM sacharoza/ ON, 4°C	14%	0,28%	12%	0,30%
0,125 mg/mL DOX (w tym 68,75% próbki to H ₂ O) + impuls (250V; 0,8 ms) / ON, 4°C	12%	1,00%	5%	1,07%

Tabela 20. Zestawienie wydajności ładowania EVs drożdżowych doksorubicyną z wykorzystaniem różnych metod (n=1).

Każdy testowany wariant ładowania wykonywany był wraz z kontrolą negatywną, czyli zamiast zawiesiny EVs używany był czysty DPBS, do którego dodawano roztwór doksorubicyny i poddawano jednakowym inkubacjom oraz oczyszczaniu.

Spośród testowanych metod najlepszą okazało się ładowanie bierne poprzez inkubację EVs w roztworze doksorubicyny przez noc w warunkach chłodniczych. Następnie porównano badane EVs pod kątem wydajności przyjmowania doksorubicyny. Zaobserwowano, że EVs drożdżowe wykazują podobne wydajności i uzyskane stężenia związku (Tab. 21.).

Tabela 21. Porównanie wydajności biernego ładowania doksorubicyny do badanych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych pochodzenia mikrobiologicznego (n=6).

	EVs-Sb_DOX	EVs-WUT240_DOX
stężenie doksorubicyny w EVs [µg/mL]	2,07±0,26	2,76±0,59
wydajność ładowania EVs doksorubicyną [%]	0,23±0,03	$0,28{\pm}0,06$

Pomimo, że nie testowano metod, które mogłyby zagwarantować dużo wyższe wydajności ładowania, takie jak np. sonikacja ²⁵⁹ to stężenia i jakość pęcherzyków po ładowaniu były wystarczające do przeprowadzenia do dalszych badań. Ponadto załadowanie doksorubicyny do EVs ukierunkowuje związek do komórek, co zaobserwowano po inkubacji komórek z EVs-Sb_DOX (stężenie doksorubicyny ok. 0,2 µg/mL) oraz wolną doksorubicyną o stężeniu ok. 10-krotnie wyższym niż zastosowane w EVs (Rys. 51.).



Rysunek 51. Porównanie wydajności wchlaniania doksorubicyny z EVs-Sb_DOX w ilości 2,0·10⁵ EVs/komórkę oraz z roztworu o stężeniu związku 2,0 μ g/mL. Kontrola negatywna ładowania – DPBS_DOX. Skala 10 μ m.

4.3.2. Wykorzystanie EVs pochodzenia mikrobiologicznego jako nośników leków

W celu potwierdzenia, że EVs mikrobiologiczne mają potencjał, aby zostać zastosowane jako system dostarczania leków należy zweryfikować czy związek testowy transportowany w ten sposób pozostaje aktywny. W tym celu egzogennie załadowano badane pęcherzyki drożdżowe doksorubicyną (końcowe stężenie doksorubicyny ok. 0,22 µg/mL) i inkubowano z nimi ludzkie komórki przez 24 h. Po czym zbadano ich aktywność metaboliczną (Rys. 52.). Aktywność

doksorubicyny po załadowaniu do EVs drożdżowych, jest niewiele niższa niż cytostatyku w roztworze. Co więcej wpływ doksorubicyny, dla obydwu badanych linii komórek nowotworowych, nie różni się między wykorzystanymi pęcherzykami (EVs-Sb_DOX oraz EVs-WUT240_DOX). W związku z tym można upatrywać w EVs cech uniwersalnego nośnika i dlatego też w kolejnych testach skoncentrowano się na jednym z nich, czyli EVs-WUT240.



Rysunek 52. Aktywność metaboliczna komórek (na podstawie testu MTT) po 24-h inkubacji z mikrobiologicznymi EVs natywnymi oraz załadowanymi doksorubicyną (EVs_DOX) i wolną doksorubicyną w stężeniu 0,25 µg/mL. Czarną przerywaną linią oznaczono poziom aktywności metabolicznej hodowli kontrolnej; * istotność statystyczna na poziomie α =5,0% wpływu EVs oraz EVs_DOX w stosunku do kontroli; ** istotność statystyczna na poziomie α =5,0% wpływu EVs_DOX w stosunku do EVs natywnych (n=3).

Na przykładzie wiolaceiny zaobserwowano wcześniej (Rys. 38. oraz Tab. 18.), że wpływ związku może różnić się w zależności od formy w jakiej został on dodany do komórek – w postaci ekstraktu czy też zamkniętego w pęcherzykach. Dlatego też dokonano porównania wpływu doksorubicyny w postaci wolnej (w roztworze o stężeniu 0,25 μg/mL) oraz załadowanej do pęcherzyków z zastosowaniem EVs-WUT240_DOX (stężenie doksorubicyny ok. 0,22 μg/mL) (Rys. 53.).



Rysunek 53. Porównanie wpływu doksorubicyny w roztworze oraz załadowanej do EVs, na przykładzie EVs-WUT240_DOX na **a**. intensywność proliferacji komórek (na podstawie testu BrdU), **b**. liczbę komórek (na podstawie testu CV wykonanego na tej samej płytce co BrdU). Czarną przerywaną linią oznaczono poziom aktywności metabolicznej lub liczby komórek w hodowli kontrolnej; * istotność statystyczna na poziomie α =5,0% w odniesieniu do hodowli kontrolnej (n=3).

W przypadku doksorubicyny w roztworze, zaobserwowano zarówno spadek intensywności proliferacji, jak również spadek konfluencji komórek nowotworowych. Jednak w przypadku EVs_DOX pomimo porównywalnego spadku liczebności hodowli zaobserwowano wyższą niż w przypadku zastosowania doksorubicyny w roztworze, intensywność proliferacji. Uzyskany wynik mógł być jedynie nie w pełni wyrażoną odpowiedzią komórek na obecność związku w hodowli.

4.3.3. Badanie odpowiedzi długoterminowej komórek na obecność doksorubicyny (ang. *LongTermDOX*, LTD)

W związku z wcześniejszym testem (Rys. 52.) przeprowadzono również badanie odpowiedzi długoterminowej, czyli hodowle poddano trwającej 168 h ekspozycji komórek na EVs pochodzenia mikrobiologicznego, które zostały załadowane doksorubicyną (Rys. 54.). W eksperymencie jako układ modelowy zastosowano EVs-WUT240_DOX (stężenie doksorubicyny ok. 0,22 µg/mL) oraz wolną doksorubicynę (0,25 µg/mL).



Rysunek 54. Porównanie wpływu doksorubicyny w roztworze oraz załadowanej do EVs, na przykładzie EVs-WUT240_DOX (po 168 h inkubacji) na: **a.** aktywność metaboliczną komórek; **b.** liczbę komórek; **c.** udział żywych komórek; **d.** udział martwych komórek. Czarną przerywaną linią oznaczono poziom rejestrowane w hodowli kontrolnej; * istotność statystyczna na poziomie α =5,0% w odniesieniu do hodowli kontrolnej (n=3).

Zaobserwowano znaczące różnice w odpowiedzi pomiędzy komórkami nowotworowymi a prawidłowymi, a także pewne rozbieżności w działaniu doksorubicyny załadowanej do EVs oraz w postaci wolnej co pokrywa się z literaturą, gdzie wykorzystano komórki HEPG2, które inkubowano z EVs wyizolowanymi z mleka i załadowanymi doksorubicyną ²⁵⁹. Jednak silniejszy wpływ cytostatyku w roztworze jest zauważalny także w przypadku komórek prawidłowych. W związku z tym, można przyjąć, że ładowanie doksorubicyny do drożdżowych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych jest obarczone nieznaczną różnicą we wpływie tego związku na komórki, zwłaszcza w przypadku bardziej agresywnej linii nowotworowej HCT116. Jednak to obecność EVs wpływa w sposób korzystny na kondycję komórek prawidłowych. Warto byłoby także przeprowadzić analogiczne badania (MTT, CV, FDA, Pi a także dodatkowo ROS) na linii opornej na doksorubicynę i sprawdzić na nich wpływ drożdżowych EVs_DOX.

4.3.4. Monitorowanie tempa interakcji EVs z komórkami przy wykorzystaniu oranżu akrydyny oraz Nile Red

W celu zbadania tempa interakcji EVs z komórkami zdecydowano się na załadowanie do EVs związku wykazującego zieloną fluorescencję, oranżu akrydyny (AO). Zastosowano analogiczny schemat postępowania jak w przypadku doksorubicyny, czyli ładowano związek do EVs metodą pasywną. Aby ocenić wydajność załadunku AO do EVs, konieczne było przygotowanie krzywej wzorcowej intensywności fluorescencji (IFU) w zależności od stężenia związku w roztworze (Rys. 55.).



Rysunek 55. Krzywa standardowa intensywności fluorescencji od stężenia oranżu akrydyny, opracowana w celu wyznaczenia wydajności ładowania EVs tym związkiem chemicznym (n=3).

Do barwienia komórek wykorzystuje się oranż akrydyny w stężeniu 2 µg/mL. Natomiast do ładowania wykorzystano roztwór AO o stężeniu 125 µg/mL i rozcieńczono go poprzez dodanie równej objętości zawiesiny EVs. Dzięki temu stężenie AO w trakcie ładowania wyniosło 62,5 µg/mL. Okazało się, że ładowanie tego barwnika zachodzi wydajniej niż w przypadku doksorubicyny i w przypadku EVs-WUT240 załadowano je z wydajnością (0,53±0,11) %, uzyskując stężenie (0,33±0,07) µg/mL. Istnieje prawdopodobieństwo, że jest to skorelowane z wielkością i/lub strukturą ładowanych związków. Doksorubicyna (CAS: 23214-92-8), ma bowiem masę 543,5 g/mol [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Doxorubicin; dostęp: 09.01.2025], natomiast oranż akrydyny (CAS: 494-38-2) jest 2-krotnie mniejszy i ma masę 265,35 g/mol [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Acridine-orange; dostęp: 09.01.2025].

W celu zbadania tempa w jakim dochodzi do interakcji EVs z komórkami, wykorzystano automatyczny system obrazowania komórek z modułem fluorescencyjnym Celloger Nano,

firmy CURIOSIS, który wypożyczono od firmy SANLAB. Do komórek dodano 5-krotnie więcej EVs_AO niż używano w poprzednich doświadczeniach (zamiast $1,0.10^5$ użyto $5,0.10^5$ EVs/komórkę) i umieszczono na 90 min w inkubatorze (37°C). Zastosowany nadmiar miał na celu jedynie skrócenie czasu, który jest potrzebny na zakumulowanie dawki, AO (Rys. 56.), która będzie możliwa do zaobserwowania.



Rysunek 56. Zdjęcia komórek w trakcie inkubacji z EVs-WUT240_AO, w ilości 5,0·10⁵ EVs/komórkę, przez 90 min w 37°C. Urządzenie: Celloger Nano (CURIOSIS). Skala 200 \mum.

Urządzenie wykonywało zdjęcia co 15 min, pozwoliło to na zauważenie, że powyżej 60 min inkubacji, intensywność fluorescencji praktycznie nie ulega już zmianie. Dodatkowo analogiczny eksperyment przeprowadzono z użyciem urządzenia ZOE (Bio-Rad), które pozwalało na uzyskanie lepszej jakości obrazu zarówno w świetle białym, a także zielonej i czerwonej fluorescencji. Zaraz po dodaniu pęcherzyków do komórek, inkubację prowadzono w temperaturze pokojowej (Rys. 57.). Zauważono, że zastosowany 5-krotny nadmiar pęcherzyków pozwolił na pojawienie się stabilnego sygnału fluorescencyjnego, tak naprawdę już w ciągu 5 min.



Rysunek 57. Komórki CCD841 CoN inkubowane w RT z EVs-WUT240_AO w ilości 5,0·10⁵ EVs/komórkę. Urządzenie: ZOE (Bio-Rad). Skala 100 µm.

Na przykładzie oranżu akrydyny zaobserwowano, że pęcherzyki bardzo szybko wchodzą w interakcję z komórkami. Aby potwierdzić, że nie jest to zależne od mikroorganizmu produkującego dane pęcherzyki przeprowadzono jednakową inkubację z wykorzystaniem EVs-VIO_NR (Rys. 58.). Zastosowano 100-krotnie wyższe stężenie wiolaceiny (50 µM), niż

wykorzystywane do indukcji odpowiedzi komórek m.in. przy testach MTT czy też LTa, ze względu jej słabą zieloną fluorescencję uwidocznioną pod mikroskopem.



Rysunek 58. Komórki CCD841 CoN inkubowane w RT z EVs-VIO_NR o 50 µM stężeniu wiolaceiny. Skala 100 µm.

Zaobserwowano, że już po 2 min zaczęły się pojawiać oba sygnały, czerwony od NR oraz zielony od wiolaceiny w obrębie komórki. Intensywności fluorescencji wzrastały z czasem, jednak powyżej 5 min nie obserwowano już ich zmian. Można więc uznać, że mechanizmy pobierania EVs ze środowiska i ich wielotorowość, zapewniają bardzo szybkie i wydajne dostarczenie ładunku do komórki. Jest to zgodne z literaturą, gdzie inkubowano EVs z *Plasmodium falciparum* przez 5 min z komórkami THP-1. Po tym czasie odpłukano komórki i monitorowano je przez kolejne 72 h ²³⁴. Samo pobieranie EVs ze środowiska zachodziło bardzo szybko, bo nawet w trakcie zaledwie 150 sek. Jednak istnieją badania potwierdzające, że szybkość i wydajność tych procesów jest ściśle związana z temperaturą. Przy zmianie z 37°C na 4°C można zaobserwować gwałtowny spadek wydajności pobierania EVs ze środowiska, gdyż ze 100% spada ona poniżej 20% ²⁶⁰.

5. Podsumowanie i perspektywy przyszłych badań

Ostatnie 15 lat było okresem bardzo intensywnego badania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (EVs) pod kątem wykorzystania ich do badań diagnostycznych, a także jako potencjalne nośniki leków. Zdecydowanie największą wiedzę o EVs zdobyto poprzez badanie struktur produkowanych przez komórki ssacze, zwłaszcza ludzkie. Celem badań prowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej było scharakteryzowanie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wytwarzanych przez mikroorganizmy niepatogenne (bakterie Janthinobacterium lividum, a także drożdże probiotyczne Saccharomyces boulardii oraz Kluyveromyces marxianus). Spośród przetestowanych metod, do izolacji EVs wybrano ultrafiltracje, natomiast stężenie i wielkości pęcherzyków w próbkach po izolacji mierzono z wykorzystaniem NTA. Pozwoliły one na określenie ilości pęcherzyków przypadających na każdą z komórek w hodowli. Przy wykorzystaniu mikroskopii fluorescencyjnej potwierdzono, że pęcherzyki zewnątrzkomórkowe pochodzenia mikrobiologicznego wchodzą w interakcję z komórkami z jelita grubego człowieka. Na przykładzie EVs-VIO potwierdzono, że przenoszą one do komórek docelowych swój natywny ładunek - wiolaceinę. Wykonane pomiary potencjału błonowego zarówno samych EVs jak i komórek przed oraz po inkubacji z pęcherzykami, potwierdziły złożoność mechanizmów pobierania tych nanostruktur ze środowiska. Aby lepiej przyjrzeć się drodze, na jakiej komórki pobierają EVs należałoby w przyszłości wykorzystać mikroskopię konfokalną. Podczas prowadzonych prac zbadano skład białkowy pęcherzyków, jednak poszerzenie tych badań o analizę kwasów nukleinowych i lipidów mogłoby pomóc w określeniu szlaku biogenezy tych EVs. W przypadku EVs-VIO zweryfikowanie obecności LPS mogłoby też pozwolić na określenie czy mogłyby one być kiedyś wykorzystywane w terapiach jako nośniki wiolaceiny, czy też indukowały by odpowiedź zapalną komórek.

Testy wpływu natywnych pęcherzyków na komórki przeprowadzono w 2 wariantach czasowych, czyli po 24- oraz 168-h inkubacji. Uzyskane z testów MTT, CV oraz ROS, wyniki nie pokazały ani pozytywnego ani też negatywnego wpływu EVs na komórki w 1 dobie. Jednakże obserwacja komórek po 1-razowej stymulacji pęcherzykami, wydłużona do 7 dni pozwoliła na zaobserwowanie różnic w odpowiedzi komórek nowotworowych i prawidłowych. Te znaczące rozbieżności potwierdzono mikroskopowo zarówno w monokulturach jak i hodowlach mieszanych komórek prawidłowych oraz nowotworowych. Niezmiernie cenne byłoby wykorzystanie w przyszłości cytometrii przepływowej, aby określić liczebność i kondycję każdej z populacji. Możliwe byłoby także potwierdzenie ścieżki śmierci komórek.

Wiele informacji dostarczyłoby również zbadanie starzenia komórkowego oraz poziomu ekspresji NF-κB.

W celu potwierdzenia, że badane EVs można wykorzystać do przetransportowania konkretnego, celowego ładunku, prowadzono egzogenne ładowanie doksorubicyną. Wybrane pasywne ładowanie w obecności związku, było wystarczające do przeprowadzenia testów. Jednak w przyszłości opracowanie protokołu o większej wydajności ładowania egzogennego EVs, przy jednoczesnym nieznacznym niszczeniu nanostruktur, może przynieść wiele dodatkowych informacji. Ważnym aspektem przyszłych badań może się także okazać przygotowanie struktur hybrydowych naturalnych (EVs drożdżowe – EVs-VIO) lub naturalno-syntetycznych (EVs drożdżowe – liposomy). Naturalny ładunek EVs probiotycznych sam w sobie ma duży wpływ na komórki co może w przyszłości znacząco wpłynąć na rozwój potencjalnych terapii opartych na pęcherzykach zewnątrzkomórkowych.

6. Bibliografia

- 1. Chargaff, E. & West, R. The biological significance of the thromboplastic protein of blood. *Journal of Biological Chemistry* **166**, 189–197 (1946).
- Rai, A., Claridge, B., Lozano, J. & Greening, D. W. The Discovery of Extracellular Vesicles and Their Emergence as a Next-Generation Therapy. *Circ Res* 135, 198–221 (2024).
- 3. Couch, Y. *et al.* A brief history of nearly EV-erything The rise and rise of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles* **10**, e12144 (2021).
- Johnstone, R. M. Revisiting the road to the discovery of exosomes. *Blood Cells Mol Dis* 34, 214–219 (2005).
- 5. Harding, C. V, Heuser, J. E. & Stahl, P. D. Exosomes: Looking back three decades and into the future. *Journal of Cell Biology* **200**, 367–371 (2013).
- Rodrigues, T. C. *et al.* Liposome-based dry powder vaccine immunization targeting the lungs induces broad protection against pneumococcus. *Journal of Controlled Release* 368, 184–198 (2024).
- 7. Ghanam, J. *et al.* DNA in extracellular vesicles: from evolution to its current application in health and disease. *Cell Biosci* **12**, 37 (2022).
- 8. Mahmoudi, F., Hanachi, P. & Montaseri, A. Extracellular vesicles of immune cells; immunomodulatory impacts and therapeutic potentials. *Clinical Immunology* **248**, 109237 (2023).
- 9. Oves, M. *et al.* Exosomes: A Paradigm in Drug Development against Cancer and Infectious Diseases. *J Nanomater* **2018**, 6895464 (2018).
- 10. da Costa, V. R. *et al.* Exosomes in the Tumor Microenvironment: From Biology to Clinical Applications. *Cells* **10**, (2021).
- 11. Kumar, M. A. *et al.* Extracellular vesicles as tools and targets in therapy for diseases. *Signal Transduct Target Ther* **9**, 27 (2024).
- 12. Stawarska, A. *et al.* Extracellular Vesicles as Next-Generation Diagnostics and Advanced Therapy Medicinal Products. *Int J Mol Sci* **25**, (2024).
- 13. Andre, M. *et al.* Diagnostic potential of exosomal extracellular vesicles in oncology. *BMC Cancer* **24**, 322 (2024).
- 14. Strum, S., Evdokimova, V., Radvanyi, L. & Spreafico, A. Extracellular Vesicles and Their Applications in Tumor Diagnostics and Immunotherapy. *Cells* **13**, (2024).
- Shetty, A. K. & Upadhya, R. Extracellular vesicles in health and disease. *Aging and Disease* vol. 12 1358–1362 Preprint at https://doi.org/10.14336/AD.2021.0827 (2021).

- 16. Kodam, S. P. & Ullah, M. Diagnostic and Therapeutic Potential of Extracellular Vesicles. *Technol Cancer Res Treat* **20**, (2021).
- Higuchi, A. *et al.* Functional Characterization of Extracellular Vesicles from Baker's Yeast *Saccharomyces Cerevisiae* as a Novel Vaccine Material for Immune Cell Maturation. *J Pharm Sci* 112, 525–534 (2023).
- 18. Nenciarini, S. *et al.* Yeast strains isolated from fermented beverage produce extracellular vesicles with anti-inflammatory effects. *Sci Rep* **14**, 730 (2024).
- 19. Rodovalho, V. de R. *et al.* Different culture media and purification methods unveil the core proteome of *Propionibacterium freudenreichii*-derived extracellular vesicles. *microLife* **4**, (2023).
- 20. Kulig, K. *et al.* Isolation and Characteristics of Extracellular Vesicles Produced by Probiotics: Yeast *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 and Bacterium Streptococcus salivarius K12. *Probiotics Antimicrob Proteins* **16**, 936–948 (2024).
- Mierzejewska, J. *et al.* Exploring Extracellular Vesicles of Probiotic Yeast as Carriers of Biologically Active Molecules Transferred to Human Intestinal Cells. *Int J Mol Sci* 24, (2023).
- 22. Kanada, M., Bachmann, M. H. & Contag, C. H. Signaling by Extracellular Vesicles Advances Cancer Hallmarks. *Trends Cancer* **2**, 84–94 (2016).
- 23. da Costa, V. R. *et al.* Exosomes in the Tumor Microenvironment: From Biology to Clinical Applications. *Cells* **10**, (2021).
- 24. Yu, J. *et al.* Biogenesis and delivery of extracellular vesicles: harnessing the power of EVs for diagnostics and therapeutics. *Frontiers in Molecular Biosciences* **10**, (2023).
- 25. Liu, S. *et al.* Extracellular vesicles: Emerging tools as therapeutic agent carriers. *Acta Pharm Sin B* **12**, 3822–3842 (2022).
- Jaiswal, R. & Sedger, L. M. Intercellular Vesicular Transfer by Exosomes, Microparticles and Oncosomes - Implications for Cancer Biology and Treatments. *Front Oncol* 9, (2019).
- Minciacchi, V. R., Freeman, M. R. & Di Vizio, D. Extracellular Vesicles in Cancer: Exosomes, Microvesicles and the Emerging Role of Large Oncosomes. *Semin Cell Dev Biol* 40, 41–51 (2015).
- 28. Wu, D. *et al.* Pairing of integrins with ECM proteins determines migrasome formation. *Cell Res* **27**, 1397–1400 (2017).
- 29. Huang, Y. *et al.* Migrasome formation is mediated by assembly of micron-scale tetraspanin macrodomains. *Nat Cell Biol* **21**, 991–1002 (2019).
- 30. Costa Verdera, H., Gitz-Francois, J. J., Schiffelers, R. M. & Vader, P. Cellular uptake of extracellular vesicles is mediated by clathrin-independent endocytosis and macropinocytosis. *Journal of Controlled Release* **266**, 100–108 (2017).

- 31. Kaksonen, M. & Roux, A. Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **19**, 313–326 (2018).
- 32. Kwok, Z. H., Wang, C. & Jin, Y. Extracellular Vesicle Transportation and Uptake by Recipient Cells: A Critical Process to Regulate Human Diseases. *Processes* 9, (2021).
- 33. Parton, R. G., McMahon, K.-A. & Wu, Y. Caveolae: Formation, dynamics, and function. *Curr Opin Cell Biol* **65**, 8–16 (2020).
- 34. Feng, D. *et al.* Cellular Internalization of Exosomes Occurs Through Phagocytosis. *Traffic* **11**, 675–687 (2010).
- 35. Gordon, S. Phagocytosis: An Immunobiologic Process. Immunity 44, 463–475 (2016).
- 36. Mulcahy, L. A., Pink, R. C. & Carter, D. R. F. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell Vesicles* **3**, 24641 (2014).
- 37. Kerr, M. C. & Teasdale, R. D. Defining Macropinocytosis. *Traffic* 10, 364–371 (2009).
- 38. Bloomfield, G. & Kay, R. R. Uses and abuses of macropinocytosis. *J Cell Sci* **129**, 2697–2705 (2016).
- 39. Wang, X. *et al.* Study of the uptake mechanism of two small extracellular vesicle subtypes by granulosa cells. *Anim Reprod Sci* **270**, 107576 (2024).
- 40. Parolini, I. *et al.* Microenvironmental pH Is a Key Factor for Exosome Traffic in Tumor Cells*. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 34211–34222 (2009).
- 41. Chernomordik, L. V & Kozlov, M. M. Mechanics of membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol* **15**, 675–683 (2008).
- 42. Sezgin, E., Levental, I., Mayor, S. & Eggeling, C. The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nat Rev Mol Cell Biol* **18**, 361–374 (2017).
- Lajoie, P. & Nabi, I. R. Chapter 3 Lipid Rafts, Caveolae, and Their Endocytosis. in International Review of Cell and Molecular Biology (ed. Jeon, K. W.) vol. 282 135–163 (Academic Press, 2010).
- 44. Xiong, J., Ashraf, U., Ye, J. & Cao, S. Extracellular Vesicles in Pathogenic Infection, Transmission, and Immunity. *Engineering* **43**, 228–240 (2024).
- 45. Onódi, Z. *et al.* Isolation of High-Purity Extracellular Vesicles by the Combination of Iodixanol Density Gradient Ultracentrifugation and Bind-Elute Chromatography From Blood Plasma. *Front Physiol* **9**, (2018).
- 46. Brennan, K. *et al.* A comparison of methods for the isolation and separation of extracellular vesicles from protein and lipid particles in human serum. *Sci Rep* **10**, 1039 (2020).

- 47. Arab, T. *et al.* Proteomic characterisation of leech microglia extracellular vesicles (EVs): comparison between differential ultracentrifugation and OptiprepTM density gradient isolation. *J Extracell Vesicles* **8**, 1603048 (2019).
- 48. Clos-Sansalvador, M., Monguió-Tortajada, M., Roura, S., Franquesa, M. & Borràs, F. E. Commonly used methods for extracellular vesicles' enrichment: Implications in downstream analyses and use. *Eur J Cell Biol* **101**, 151227 (2022).
- 49. Heinemann, M. L. *et al.* Benchtop isolation and characterization of functional exosomes by sequential filtration. *J Chromatogr A* **1371**, 125–135 (2014).
- 50. Enderle, D. *et al.* Characterization of RNA from Exosomes and Other Extracellular Vesicles Isolated by a Novel Spin Column-Based Method. *PLoS One* **10**, e0136133 (2015).
- 51. Rider, M. A., Hurwitz, S. N. & Meckes, D. G. ExtraPEG: A Polyethylene Glycol-Based Method for Enrichment of Extracellular Vesicles. *Sci Rep* **6**, 23978 (2016).
- 52. Zhao, Z., Wijerathne, H., Godwin, A. K. & Soper, S. A. Isolation and analysis methods of extracellular vesicles (EVs). *Extracell Vesicles Circ Nucl Acids* **2**, (2021).
- Ayala-Mar, S., Donoso-Quezada, J., Gallo-Villanueva, R. C., Perez-Gonzalez, V. H. & González-Valdez, J. Recent advances and challenges in the recovery and purification of cellular exosomes. *Electrophoresis* 40, 3036–3049 (2019).
- 54. De Sousa, K. P. *et al.* Isolation and characterization of extracellular vesicles and future directions in diagnosis and therapy. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology* **15**, e1835 (2023).
- 55. Dragovic, R. A. *et al.* Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Nanomedicine* **7**, 780–788 (2011).
- Kowal, E. J. K., Ter-Ovanesyan, D., Regev, A. & Church, G. M. Extracellular Vesicle Isolation and Analysis by Western Blotting. in *Extracellular Vesicles: Methods and Protocols* (eds. Kuo, W. P. & Jia, S.) 143–152 (Springer New York, New York, NY, 2017). doi:10.1007/978-1-4939-7253-1_12.
- Davidson, S. M. *et al.* Methods for the identification and characterization of extracellular vesicles in cardiovascular studies: from exosomes to microvesicles. *Cardiovasc Res* 119, 45–63 (2023).
- 58. Midekessa, G. *et al.* Zeta Potential of Extracellular Vesicles: Toward Understanding the Attributes that Determine Colloidal Stability. *ACS Omega* **5**, 16701–16710 (2020).
- 59. Mendivil-Alvarado, H. *et al.* Extracellular Vesicles and Their Zeta Potential as Future Markers Associated with Nutrition and Molecular Biomarkers in Breast Cancer. *Int J Mol Sci* **24**, (2023).
- 60. Chernyshev, V. S. & Skliar, M. Quantification of Desiccated Extracellular Vesicles by Quartz Crystal Microbalance. *Biosensors (Basel)* **12**, (2022).

- Suthar, J. *et al.* Amplified EQCM-D detection of extracellular vesicles using 2D gold nanostructured arrays fabricated by block copolymer self-assembly. *Nanoscale Horiz* 8, 460–472 (2023).
- 62. Parisse, P. *et al.* Atomic force microscopy analysis of extracellular vesicles. *European Biophysics Journal* **46**, 813–820 (2017).
- Paul, D., Saroj, S., Agrawal, T., Zaffar, S. & Rakshit, T. AFM-Based Mechanobiology of Extracellular Vesicles. in *Extracellular Vesicles as Matrix Messengers* (ed. Rilla, K.) 227–242 (Springer Nature Switzerland, Cham, 2024).
- 64. Gazze, S. A. *et al.* High content, quantitative AFM analysis of the scalable biomechanical properties of extracellular vesicles. *Nanoscale* **13**, 6129–6141 (2021).
- Dellar, E. R., Hill, C., Melling, G. E., Carter, D. R. F. & Baena-Lopez, L. A. Unpacking extracellular vesicles: RNA cargo loading and function. *Journal of Extracellular Biology* 1, e40 (2022).
- 66. Jabalee, J., Towle, R. & Garnis, C. The Role of Extracellular Vesicles in Cancer: Cargo, Function, and Therapeutic Implications. *Cells* **7**, (2018).
- 67. Maas, S. L. N., Breakefield, X. O. & Weaver, A. M. Extracellular Vesicles: Unique Intercellular Delivery Vehicles. *Trends Cell Biol* 27, 172–188 (2017).
- 68. Yoon, Y. J. & Gho, O. Y. K. & amp; Y. S. Extracellular vesicles as emerging intercellular communicasomes. *BMB Rep* **47**, 531–539 (2014).
- Zaborowski, M. P., Balaj, L., Breakefield, X. O. & Lai, C. P. Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. *Bioscience* 65, 783–797 (2015).
- 70. Raghav, A. *et al.* Extracellular vesicles in neurodegenerative diseases: A systematic review. *Front Mol Neurosci* **15**, (2022).
- 71. Xie, J., Haesebrouck, F., Van Hoecke, L. & Vandenbroucke, R. E. Bacterial extracellular vesicles: an emerging avenue to tackle diseases. *Trends Microbiol* **31**, 1206–1224 (2023).
- 72. Kim, Y.-Y., Joh, J. S. & Lee, J. Y. Importance of microbial extracellular vesicle in the pathogenesis of asthma and chronic obstructive pulmonary disease and its diagnostic potential. *Asia Pac Allergy* **10**, (2020).
- 73. Stanton, B. A. Extracellular Vesicles and Host–Pathogen Interactions: A Review of Inter-Kingdom Signaling by Small Noncoding RNA. *Genes (Basel)* **12**, (2021).
- Jnana, A., Sadiya, S. S., Satyamoorthy, K. & Murali, T. S. Extracellular vesicles in bacterial and fungal diseases – Pathogenesis to diagnostic biomarkers. *Virulence* 14, 2180934 (2023).
- 75. Peregrino, E. S. *et al.* The Role of Bacterial Extracellular Vesicles in the Immune Response to Pathogens, and Therapeutic Opportunities. *Int J Mol Sci* **25**, (2024).

- 76. Toyofuku, M. *et al.* Membrane vesicle-mediated bacterial communication. *ISME J* **11**, 1504–1509 (2017).
- 77. Jeong, G.-J., Khan, F., Tabassum, N., Cho, K.-J. & Kim, Y.-M. Bacterial extracellular vesicles: Modulation of biofilm and virulence properties. *Acta Biomater* **178**, 13–23 (2024).
- De Maio, A. Extracellular heat shock proteins, cellular export vesicles, and the Stress Observation System: A form of communication during injury, infection, and cell damage. *Cell Stress Chaperones* 16, 235–249 (2011).
- 79. Hosseini-Giv, N. *et al.* Bacterial extracellular vesicles and their novel therapeutic applications in health and cancer. *Front Cell Infect Microbiol* **12**, (2022).
- 80. Joffe, L. S., Nimrichter, L., Rodrigues, M. L. & Del Poeta, M. Potential Roles of Fungal Extracellular Vesicles during Infection. *mSphere* **1**, e00099-16 (2016).
- 81. Freitas, M. S. *et al.* Fungal Extracellular Vesicles as Potential Targets for Immune. *mSphere* **4**, 1–9 (2019).
- Oliveira, D. L. *et al.* Characterization of yeast extracellular vesicles: Evidence for the participation of different pathways of cellular traffic in vesicle biogenesis. *PLoS One* 5, 1–13 (2010).
- Kowalczyk, A. *et al.* Parallel SPR and QCM-D Quantitative Analysis of CD9, CD63, and CD81 Tetraspanins: A Simple and Sensitive Way to Determine the Concentration of Extracellular Vesicles Isolated from Human Lung Cancer Cells. *Anal Chem* 95, 9520–9530 (2023).
- 84. Sojka, D. R. *et al.* Heat shock protein A2 is a novel extracellular vesicle-associated protein. *Sci Rep* **13**, 4734 (2023).
- Zaborowska, M. *et al.* Extracellular Vesicles Influence the Growth and Adhesion of Staphylococcus epidermidis Under Antimicrobial Selective Pressure. *Front Microbiol* 11, (2020).
- 86. Uddin, M. J. *et al.* The Role of Bacterial Membrane Vesicles in the Dissemination of Antibiotic Resistance and as Promising Carriers for Therapeutic Agent Delivery. *Microorganisms* **8**, (2020).
- Yang, J., Jia, F., Qiao, Y., Hai, Z. & Zhou, X. Correlation between bacterial extracellular vesicles and antibiotics: A potentially antibacterial strategy. *Microb Pathog* 181, 106167 (2023).
- Lee, J. *et al.* Staphylococcus aureus Extracellular Vesicles Carry Biologically Active β-Lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 57, 2589–2595 (2013).
- 89. Karpievitch, Y. V, Polpitiya, A. D., Anderson, G. A., Smith, R. D. & Dabney, A. R. Liquid chromatography mass spectrometry-based proteomics: Biological and technological aspects. *Ann Appl Stat* **4**, 1797–1823 (2010).

- 90. Cross, J., Rai, A., Fang, H., Claridge, B. & Greening, D. W. Rapid and in-depth proteomic profiling of small extracellular vesicles for ultralow samples. *Proteomics* **24**, 2300211 (2024).
- 91. Carulli, S., Calvano, C. D., Palmisano, F. & Pischetsrieder, M. MALDI-TOF MS Characterization of Glycation Products of Whey Proteins in a Glucose/Galactose Model System and Lactose-free Milk. *J Agric Food Chem* **59**, 1793–1803 (2011).
- 92. Aresta, A. M., De Vietro, N. & Zambonin, C. Analysis and Characterization of the Extracellular Vesicles Released in Non-Cancer Diseases Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization/Mass Spectrometry. *Int J Mol Sci* **25**, (2024).
- 93. Shah, S. & Friedman, S. H. An ESI-MS method for characterization of native and modified oligonucleotides used for RNA interference and other biological applications. *Nat Protoc* **3**, 351–356 (2008).
- 94. Wolff, P. & Ennifar, E. Native Electrospray Ionization Mass Spectrometry of NA-Ligand Complexes. in *RNA Spectroscopy: Methods and Protocols* (eds. Arluison, V. & Wien, F.) 111–118 (Springer US, New York, NY, 2020).
- 95. Lechner, A., Wolff, P., Leize-Wagner, E. & François, Y.-N. Characterization of Post-Transcriptional RNA Modifications by Sheathless Capillary Electrophoresis–High Resolution Mass Spectrometry. *Anal Chem* **92**, 7363–7370 (2020).
- 96. Domínguez-Vega, E., Haselberg, R. & Somsen, G. W. Capillary Zone Electrophoresis– Mass Spectrometry of Intact Proteins. in *Capillary Electrophoresis of Proteins and Peptides: Methods and Protocols* (eds. Tran, N. T. & Taverna, M.) 25–41 (Springer New York, New York, NY, 2016).
- 97. Miceli, R. T. *et al.* Extracellular vesicles, RNA sequencing, and bioinformatic analyses: Challenges, solutions, and recommendations. *J Extracell Vesicles* **13**, e70005 (2024).
- 98. He, R., Zhu, J., Ji, P. & Zhao, F. SEVtras delineates small extracellular vesicles at droplet resolution from single-cell transcriptomes. *Nat Methods* **21**, 259–266 (2024).
- O'Brien, K., Breyne, K., Ughetto, S., Laurent, L. C. & Breakefield, X. O. RNA delivery by extracellular vesicles in mammalian cells and its applications. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21, 585–606 (2020).
- 100. Momen-Heravi, F. *et al.* Current methods for the isolation of extracellular vesicles. *Biol Chem* **394**, 1253–1262 (2013).
- 101. Ghadami, S. & Dellinger, K. The lipid composition of extracellular vesicles: applications in diagnostics and therapeutic delivery. *Front Mol Biosci* **10**, (2023).
- Record, M., Silvente-Poirot, S., Poirot, M. & Wakelam, MichaelJ. O. Extracellular vesicles: lipids as key components of their biogenesis and functions. *J Lipid Res* 59, 1316–1324 (2018).

- Bryson, A. *et al.* Extracellular vesicles are conduits for *E. coli* heat-labile enterotoxin (LT) and the B-subunits of LT and cholera toxin in immune cell-to-cell communication. *Microb Pathog* 177, 106038 (2023).
- Choi, S. Y. *et al. Chromobacterium violaceum* delivers violacein, a hydrophobic antibiotic, to other microbes in membrane vesicles. *Environ Microbiol* 22, 705–713 (2020).
- 105. Kowalska, P. *et al.* Extracellular vesicles of Janthinobacterium lividum as violacein carriers in melanoma cell treatment. *Appl Microbiol Biotechnol* **108**, 529 (2024).
- 106. Smith, Z. J. *et al.* Single exosome study reveals subpopulations distributed among cell lines with variability related to membrane content. *J Extracell Vesicles* **4**, 28533 (2015).
- 107. Joshi, B. S., Ortiz, D. & Zuhorn, I. S. Converting extracellular vesicles into nanomedicine: loading and unloading of cargo. *Mater Today Nano* **16**, 100148 (2021).
- 108. Dang, X. T. T., Kavishka, J. M., Zhang, D. X., Pirisinu, M. & Le, M. T. N. Extracellular Vesicles as an Efficient and Versatile System for Drug Delivery. *Cells* **9**, (2020).
- 109. Lamichhane, T. N. & Jay, S. M. Production of Extracellular Vesicles Loaded with Therapeutic Cargo. in *Targeted Drug Delivery: Methods and Protocols* (eds. Sirianni, R. W. & Behkam, B.) 37–47 (Springer US, New York, NY, 2018).
- Colja, S., Jovčevska, I., Šamec, N., Romih, R. & Zottel, A. Sonication is a suitable method for loading nanobody into glioblastoma small extracellular vesicles. *Heliyon* 9, (2023).
- 111. Nizamudeen, Z. A. *et al.* Low-Power Sonication Can Alter Extracellular Vesicle Size and Properties. *Cells* **10**, (2021).
- Patras, L. *et al.* Trojan horse treatment based on PEG-coated extracellular vesicles to deliver doxorubicin to melanoma in vitro and in vivo. *Cancer Biol Ther* 23, 1–16 (2022).
- 113. Kooijmans, S. A. A. *et al.* PEGylated and targeted extracellular vesicles display enhanced cell specificity and circulation time. *Journal of Controlled Release* **224**, 77–85 (2016).
- 114. Pham, T. C. *et al.* Covalent conjugation of extracellular vesicles with peptides and nanobodies for targeted therapeutic delivery. *J Extracell Vesicles* **10**, e12057 (2021).
- 115. Chen, C. *et al.* Phospholipid-Anchored Ligand Conjugation on Extracellular Vesicles for Enhanced Cancer Targeting. *Small* **20**, 2310712 (2024).
- 116. Picciotto, S. *et al.* Chapter Four Post-translational lipidation in extracellular vesicles: chemical mechanisms, biological functions and applications. in *Advances in Biomembranes and Lipid Self-Assembly* (eds. Bongiovanni, A., Pocsfalvi, G., Manno, M. & Kralj-Iglič, V.) vol. 32 83–111 (Academic Press, 2020).

- 117. N'Diaye, E.-R., Orefice, N. S., Ghezzi, C. & Boumendjel, A. Chemically Modified Extracellular Vesicles and Applications in Radiolabeling and Drug Delivery. *Pharmaceutics* 14, (2022).
- 118. Es-Haghi, M. *et al.* Construction of Fusion Protein for Enhanced Small RNA Loading to Extracellular Vesicles. *Genes (Basel)* **14**, (2023).
- 119. Lee, Y. J., Shin, K. J. & Chae, Y. C. Regulation of cargo selection in exosome biogenesis and its biomedical applications in cancer. *Exp Mol Med* **56**, 877–889 (2024).
- Dixson, A. C., Dawson, T. R., Di Vizio, D. & Weaver, A. M. Context-specific regulation of extracellular vesicle biogenesis and cargo selection. *Nat Rev Mol Cell Biol* 24, 454–476 (2023).
- FAO Experts. Dietary protein quality evaluation in human nutrition. Report of an FAO Expert Consultation, 31 March 2 April 2011, Auckland, New Zealand. FAO 1–66 (2013).
- 122. Binda, S. *et al.* Criteria to Qualify Microorganisms as "Probiotic" in Foods and Dietary Supplements. *Front Microbiol* **11**, (2020).
- 123. Tuomola, E., Crittenden, R., Playne, M., Isolauri, E. & Salminen, S. Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *Am J Clin Nutr* **73**, 393s–398s (2001).
- 124. Silva, D. R. *et al.* Probiotics as an alternative antimicrobial therapy: Current reality and future directions. *J Funct Foods* **73**, 104080 (2020).
- 125. Jiang, B. *et al.* Microbial extracellular vesicles contribute to antimicrobial resistance. *PLoS Pathog* **20**, e1012143- (2024).
- 126. Fijan, S. Microorganisms with Claimed Probiotic Properties: An Overview of Recent Literature. *Int J Environ Res Public Health* **11**, 4745–4767 (2014).
- Stier, H. & Bischoff, S. C. Influence of saccharomyces boulardii CNCM I-745 on the gut-associated immune system. *Clinical and Experimental Gastroenterology* vol. 9 269–279 (2016).
- Gopalan, S. *et al.* Unique Properties of Yeast Probiotic Saccharomyces boulardii CNCM I-745: A Narrative Review. Cureus (2023) doi:10.7759/cureus.46314.
- 129. Hossain, M. N., Afrin, S., Humayun, S., Ahmed, M. M. & Saha, B. K. Identification and Growth Characterization of a Novel Strain of *Saccharomyces boulardii* Isolated From Soya Paste. *Front Nutr* 7, (2020).
- 130. Billoo, A. G. *et al.* Role of a probiotic (*Saccharomyces boulardii*) in management and prevention of diarrhoea. *World J Gastroenterol* **12**, 4557 (2006).
- 131. Salazar-Parra, M. A. G. *et al.* Effectiveness of *Saccharomyces Boulardii* CNCM I-745 probiotic in acute inflammatory viral diarrhoea in adults: results from a single-centre randomized trial. *BMC Gastroenterol* **23**, 229 (2023).

- 132. Tang, S. *et al.* Effects of *Saccharomyces boulardii* on microbiota composition and metabolite levels in the small intestine of constipated mice. *BMC Microbiol* **24**, 493 (2024).
- 133. Everard, A., Matamoros, S., Geurts, L., Delzenne, N. M. & Cani, P. D. Saccharomyces boulardii Administration Changes Gut Microbiota and Reduces Hepatic Steatosis, Low-Grade Inflammation, and Fat Mass in Obese and Type 2 Diabetic db/db Mice. *mBio* 5, 10.1128/mbio.01011-14 (2014).
- 134. Kelesidis, T. & Pothoulakis, C. Efficacy and safety of the probiotic *Saccharomyces boulardii* for the prevention and therapy of gastrointestinal disorders. *Therap Adv Gastroenterol* **5**, 111–125 (2011).
- 135. Tafazzoli, K., Ghavami, M. & Khosravi-Darani, K. Production of iron enriched Saccharomyces boulardii: impact of process variables. *Sci Rep* 14, 4844 (2024).
- Chandrasekar Rajendran, S. C., Chamlagain, B., Kariluoto, S., Piironen, V. & Saris, P. E. J. Biofortification of riboflavin and folate in idli batter, based on fermented cereal and pulse, by *Lactococcus lactis* N8 and *Saccharomyces boulardii* SAA655. *J Appl Microbiol* 122, 1663–1671 (2017).
- 137. Pais, P., Almeida, V., Yılmaz, M. & Teixeira, M. C. *Saccharomyces boulardii*: What Makes It Tick as Successful Probiotic? *Journal of Fungi* **6**, (2020).
- 138. Zhou, J., Liu, X., Jiang, H. & Dong, M. Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis. *Food Microbiol* **26**, 770–775 (2009).
- 139. Bolla, P. A., de los Angeles Serradell, M., de Urraza, P. J. & De Antoni, G. L. Effect of freeze-drying on viability and in vitro probiotic properties of a mixture of lactic acid bacteria and yeasts isolated from kefir. *Journal of Dairy Research* **78**, 15–22 (2011).
- 140. Maccaferri, S., Klinder, A., Brigidi, P., Cavina, P. & Costabile, A. Potential Probiotic *Kluyveromyces marxianus* B0399 Modulates the Immune Response in Caco-2 Cells and Peripheral Blood Mononuclear Cells and Impacts the Human Gut Microbiota in an *In Vitro* Colonic Model System. *Appl Environ Microbiol* 78, 956–964 (2012).
- 141. Ceugniez, A., Drider, D., Jacques, P. & Coucheney, F. Yeast diversity in a traditional French cheese "Tomme d'orchies" reveals infrequent and frequent species with associated benefits. *Food Microbiol* 52, 177–184 (2015).
- Comitini, F., Canonico, L., Agarbati, A. & Ciani, M. Biocontrol and Probiotic Function of Non-Saccharomyces Yeasts: New Insights in Agri-Food Industry. *Microorganisms* 11, (2023).
- 143. Xie, J., Li, Q. & Nie, S. Bacterial extracellular vesicles: An emerging postbiotic. *Trends Food Sci Technol* **143**, 104275 (2024).
- 144. Razim, A. *et al.* Bacterial extracellular vesicles as intranasal postbiotics: Detailed characterization and interaction with airway cells. *J Extracell Vesicles* **13**, e70004 (2024).

- Schmid, A. M. *et al.* Extracellular vesicles of the probiotic bacteria *E. coli* O83 activate innate immunity and prevent allergy in mice. *Cell Communication and Signaling* 21, 297 (2023).
- 146. Salminen, S. *et al.* The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 18, 649–667 (2021).
- 147. Dean, S. N., Leary, D. H., Sullivan, C. J., Oh, E. & Walper, S. A. Isolation and characterization of *Lactobacillus*-derived membrane vesicles. *Sci Rep* 9, 877 (2019).
- 148. Dean, S. N. *et al. Lactobacillus acidophilus* Membrane Vesicles as a Vehicle of Bacteriocin Delivery. *Front Microbiol* **11**, (2020).
- Cui, Y. *et al.* Mining, heterologous expression, purification, antibactericidal mechanism, and application of bacteriocins: A review. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 20, 863–899 (2021).
- 150. Gradisteanu Pircalabioru, G. *et al.* Bacteriocins in the Era of Antibiotic Resistance: Rising to the Challenge. *Pharmaceutics* **13**, (2021).
- 151. Rodrigues, M., Kosaric, N., Bonham, C. A. & Gurtner, G. C. Wound Healing: A Cellular Perspective. *Physiol Rev* **99**, 665–706 (2018).
- 152. Wang, J. *et al. Lactobacillus rhamnosus* GG-derived extracellular vesicles promote wound healing via miR-21-5p-mediated re-epithelization and angiogenesis. *J Nanobiotechnology* **22**, 644 (2024).
- 153. Han, F. *et al.* Extracellular vesicles from *Lactobacillus druckerii* inhibit hypertrophic scar fibrosis. *J Nanobiotechnology* **21**, 113 (2023).
- Yang, Z. *et al.* Lactobacillus plantarum-derived extracellular vesicles protect against ischemic brain injury via the microRNA-101a-3p/c-Fos/TGF-β axis. *Pharmacol Res* 182, 106332 (2022).
- 155. Baricz, A. *et al.* Investigating the potential use of an Antarctic variant of *Janthinobacterium lividum* for tackling antimicrobial resistance in a One Health approach. *Sci Rep* **8**, 15272 (2018).
- 156. INAN BEKTAS, K. *et al. Janthinobacterium kumbetense* sp. nov., a violacein-producing bacterium isolated from spring water in Turkey, and investigation of antimicrobial activity of violacein. *FEMS Microbiol Lett* **370**, fnac119 (2023).
- 157. Chernogor, L., Bakhvalova, K., Belikova, A. & Belikov, S. Isolation and Properties of the Bacterial Strain *Janthinobacterium* sp. SLB01. *Microorganisms* **10**, (2022).
- 158. Wiggins, P. J., Smith, J. M., Harris, R. N. & Minbiole, K. P. C. Gut of Red-backed Salamanders (*Plethodon cinereus*) May Serve as a Reservoir for an Antifungal Cutaneous Bacterium. *J Herpetol* 45, 329–332 (2011).

- 159. Brucker, R. M. *et al.* Amphibian Chemical Defense: Antifungal Metabolites of the Microsymbiont Janthinobacterium lividum on the Salamander *Plethodon cinereus*. *J Chem Ecol* 34, 1422–1429 (2008).
- 160. Pantanella, F. *et al.* Violacein and biofilm production in *Janthinobacterium lividum*. *J Appl Microbiol* **102**, 992–999 (2007).
- 161. Durán, N. *et al.* Violacein and its antifungal activity: comments and potentialities. *Lett Appl Microbiol* **75**, 796–803 (2022).
- 162. Lee, J. *et al.* Violacein-embedded nanofiber filters with antiviral and antibacterial activities. *Chemical Engineering Journal* **444**, 136460 (2022).
- Kanelli, M. *et al.* Microbial production of violacein and process optimization for dyeing polyamide fabrics with acquired antimicrobial properties. *Front Microbiol* 9, 1–13 (2018).
- Kim, Y. J., Yuk, N., Shin, H. J. & Jung, H. J. The Natural Pigment Violacein Potentially Suppresses the Proliferation and Stemness of Hepatocellular Carcinoma Cells In Vitro. *Int J Mol Sci* 22, (2021).
- 165. Dahlem, C. *et al.* Characterization of Anti-Cancer Activities of Violacein: Actions on Tumor Cells and the Tumor Microenvironment. *Front Oncol* **12**, (2022).
- 166. Justo, G. Z. & Durán, N. Action and function of *Chromobacterium violaceum* in health and disease: Violacein as a promising metabolite to counteract gastroenterological diseases. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **31**, 649–656 (2017).
- 167. Choi, S. Y., Yoon, K., Lee, J. Il & Mitchell, R. J. Violacein: Properties and Production of a Versatile Bacterial Pigment. *Biomed Res Int* **2015**, 465056 (2015).
- Rivero Berti, I. *et al.* Potential biocide roles of violacein. *Frontiers in Nanotechnology* 5, (2023).
- Ahmed, A. *et al.* Recent Advances in Synthetic, Industrial and Biological Applications of Violacein and Its Heterologous Production. *J Microbiol Biotechnol* **31**, 1465–1480 (2021).
- 170. Patijanasoontorn, B. *et al.* Hospital acquired Janthinobacterium lividum septicemia in Srinagarind Hospital. *J Med Assoc Thai* **75 Suppl 2**, 6–10 (1992).
- 171. Shinkafi, S. H. *et al.* Isolation of Janthinobacterium lividum from early onset neonatal sepsis patients in Malaysia. *Afr Health Sci* **19**, 2378–2389 (2019).
- Brakhage, A. A., Zimmermann, A.-K., Rivieccio, F., Visser, C. & Blango, M. G. Host-derived extracellular vesicles for antimicrobial defense. *microLife* 2, uqab003 (2021).
- 173. Ziegler, J. N. & Tian, C. Engineered Extracellular Vesicles: Emerging Therapeutic Strategies for Translational Applications. *Int J Mol Sci* **24**, (2023).

- 174. Lin, H. *et al.* Therapeutic potential of extracellular vesicles from diverse sources in cancer treatment. *Eur J Med Res* **29**, 350 (2024).
- EL Andaloussi, S., Mäger, I., Breakefield, X. O. & Wood, M. J. A. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 12, 347–357 (2013).
- 176. Sabanovic, B., Piva, F., Cecati, M. & Giulietti, M. Promising Extracellular Vesicle-Based Vaccines against Viruses, Including SARS-CoV-2. *Biology (Basel)* **10**, (2021).
- 177. Mustajab, T. *et al.* Update on Extracellular Vesicle-Based Vaccines and Therapeutics to Combat COVID-19. *Int J Mol Sci* **23**, (2022).
- 178. Zhang, B., Sim, W. K., Shen, T.-L. & Lim, S. K. Engineered EVs with pathogen proteins: promising vaccine alternatives to LNP-mRNA vaccines. *J Biomed Sci* **31**, 9 (2024).
- 179. Meng, Y. *et al.* Extracellular vesicles-based vaccines: Emerging immunotherapies against cancer. *Journal of Controlled Release* **378**, 438–459 (2025).
- 180. Hao, H. *et al.* Effect of Extracellular Vesicles Derived From Lactobacillus plantarum Q7 on Gut Microbiota and Ulcerative Colitis in Mice. *Front Immunol* **12**, (2021).
- 181. Zarovni, N. et al. Standardization and Commercialization of Extracellular Vesicles. In Extracellular Vesicles: Applications to Regenerative Medicine, Therapeutics and Diagnostics (eds. Chrzanowski, W., Lim, C. T. & Kim, S. Y.) 0 (The Royal Society of Chemistry, 2021). doi:10.1039/9781839164552-00303.
- 182. Royo, F., Théry, C., Falcón-Pérez, J. M., Nieuwland, R. & Witwer, K. W. Methods for Separation and Characterization of Extracellular Vesicles: Results of a Worldwide Survey Performed by the ISEV Rigor and Standardization Subcommittee. *Cells* 9, (2020).
- 183. Wang, C.-K., Tsai, T.-H. & Lee, C.-H. Regulation of exosomes as biologic medicines: Regulatory challenges faced in exosome development and manufacturing processes. *Clin Transl Sci* 17, e13904 (2024).
- 184. Fusco, C. *et al.* Extracellular vesicles as human therapeutics: A scoping review of the literature. *J Extracell Vesicles* **13**, e12433 (2024).
- 185. Du, S. *et al.* Extracellular vesicles: a rising star for therapeutics and drug delivery. *J Nanobiotechnology* **21**, 231 (2023).
- Nieuwland, R., Enciso-Martinez, A. & Bracht, J. W. P. Clinical applications and challenges in the field of extracellular vesicles. *Medizinische Genetik* 35, 251–258 (2023).
- 187. Carnino, J. M., Hao Kwok, Z. & Jin, Y. Extracellular Vesicles: A Novel Opportunity for Precision Medicine in Respiratory Diseases. *Front Med (Lausanne)* **8**, (2021).
- 188. Deng, J., Li, Q. & Wang, F. Novel administration strategies for tissue-specific delivery of extracellular vesicles. *Extracellular Vesicle* **4**, 100057 (2024).

- 189. Wińska, P., Sobiepanek, A., Pawlak, K., Staniszewska, M. & Cieśla, J. Phosphorylation of Thymidylate Synthase and Dihydrofolate Reductase in Cancer Cells and the Effect of CK2α Silencing. *Int J Mol Sci* 24, (2023).
- 190. Lee, H., He, X., Ni, K., Carnino, J. M. & Jin, Y. Low concentration of polyethylene glycol facilitates separation of extracellular vesicles from bronchoalveolar lavage fluid. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 320, L522–L529 (2021).
- 191. Singh, A. D. *et al.* Polyethylene glycol-based isolation of urinary extracellular vesicles, an easily adoptable protocol. *MethodsX* **11**, 102310 (2023).
- 192. Mayerhöfer, T. G., Pahlow, S. & Popp, J. The Bouguer-Beer-Lambert Law: Shining Light on the Obscure. *ChemPhysChem* **21**, 2029–2046 (2020).
- 193. Jehlička, J., Edwards, H. G. M., Němec, I. & Oren, A. Raman spectroscopic study of the Chromobacterium violaceum pigment violacein using multiwavelength excitation and DFT calculations. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **151**, 459–467 (2015).
- Koontz, L. Chapter One TCA Precipitation. in *Methods in Enzymology* (ed. Lorsch, J.) vol. 541 3–10 (Academic Press, 2014).
- 195. Mierzejewska, J. & Chreptowicz, K. Lack of Maf1 enhances pyruvate kinase activity and fermentative metabolism while influencing lipid homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **590**, 93–100 (2016).
- Kanyo, N. *et al.* Glycocalyx regulates the strength and kinetics of cancer cell adhesion revealed by biophysical models based on high resolution label-free optical data. *Sci Rep* 10, 22422 (2020).
- 197. Sobiepanek, A., Milner-Krawczyk, M., Musolf, P., Starecki, T. & Kobiela, T. Anandamide-Modulated Changes in Metabolism, Glycosylation Profile and Migration of Metastatic Melanoma Cells. *Cancers (Basel)* 14, (2022).
- 198. Kusuma, G. D. *et al.* To Protect and to Preserve: Novel Preservation Strategies for Extracellular Vesicles. *Front Pharmacol* 9, (2018).
- 199. Rogers, N. M. K. *et al.* Comparative electrokinetic properties of extracellular vesicles produced by yeast and bacteria. *Colloids Surf B Biointerfaces* **225**, 113249 (2023).
- 200. Rodovalho, V. de R. *et al.* Extracellular Vesicles Produced by the Probiotic *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA 129 Mitigate Inflammation by Modulating the NF-κB Pathway. *Front Microbiol* **11**, (2020).
- 201. Hong, J. *et al.* Analysis of the *Escherichia coli* extracellular vesicle proteome identifies markers of purity and culture conditions. *J Extracell Vesicles* **8**, 1632099 (2019).
- Krzyżek, P., Marinacci, B., Vitale, I. & Grande, R. Extracellular Vesicles of Probiotics: Shedding Light on the Biological Activity and Future Applications. *Pharmaceutics* 15, (2023).

- Ashrafian, F. *et al.* Extracellular vesicles and pasteurized cells derived from *Akkermansia muciniphila* protect against high-fat induced obesity in mice. *Microb Cell Fact* 20, 219 (2021).
- 204. Shahrbanoo, K. A. R. *et al.* The Protective Effects of Live and Pasteurized *Akkermansia muciniphila* and Its Extracellular Vesicles against HFD/CCl4-Induced Liver Injury. *Microbiol Spectr* **9**, e00484-21 (2021).
- 205. Hirayama, S. & Nakao, R. Glycine significantly enhances bacterial membrane vesicle production: a powerful approach for isolation of LPS-reduced membrane vesicles of probiotic *Escherichia coli*. *Microb Biotechnol* **13**, 1162–1178 (2020).
- 206. Ashrafian, F. *et al. Akkermansia muciniphila*-Derived Extracellular Vesicles as a Mucosal Delivery Vector for Amelioration of Obesity in Mice. *Front Microbiol* **10**, (2019).
- 207. Portela, P., Moreno, S. & Rossi, S. Characterization of yeast pyruvate kinase 1 as a protein kinase A substrate, and specificity of the phosphorylation site sequence in the whole protein. *Biochemical Journal* **396**, 117–126 (2006).
- Portela, P., Howell, S., Moreno, S. & Rossi, S. In Vivo and in Vitro Phosphorylation of Two Isoforms of Yeast Pyruvate Kinase by Protein Kinase A. *Journal of Biological Chemistry* 277, 30477–30487 (2002).
- 209. Rawlings, N. D. *et al.* The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Res* **46**, D624–D632 (2018).
- 210. Kelly, T. Evaluation of seprase activity. *Clin Exp Metastasis* 17, 67–72 (1999).
- 211. Ahmad, M. I. *et al.* Collagen and gelatin: Structure, properties, and applications in food industry. *Int J Biol Macromol* **254**, 128037 (2024).
- 212. Rivero Berti, I. *et al.* Enzymatic Active Release of Violacein Present in Nanostructured Lipid Carrier by Lipase Encapsulated in 3D-Bioprinted Chitosan-Hydroxypropyl Methylcellulose Matrix With Anticancer Activity. *Front Chem* **10**, (2022).
- Cortés-Osorio, N., Mayra-Alexandra, C.-C., Vanessa, C.-A., Luis-Daniel, P.-S. & Franco-Correa, M. Influence of Environmental Factors on the Production of Violacein Synthesized By Janthinobacterium lividum. *Int J Eng Sci (Ghaziabad)* 06, 76–83 (2017).
- 214. Aruldass, C. A., Rubiyatno, Venil, C. K. & Ahmad, W. A. Violet pigment production from liquid pineapple waste by *Chromobacterium violaceum* UTM5 and evaluation of its bioactivity. *RSC Adv* 5, 51524–51536 (2015).
- 215. Ahmad, W. A., Yusof, N. Z., Nordin, N., Zakaria, Z. A. & Rezali, M. F. Production and Characterization of Violacein by Locally Isolated *Chromobacterium violaceum* Grown in Agricultural Wastes. *Appl Biochem Biotechnol* 167, 1220–1234 (2012).

- 216. Milosevic, E. *et al.* Antitumor activity of natural pigment violacein against osteosarcoma and rhabdomyosarcoma cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol* **149**, 10975–10987 (2023).
- Pal, K. & Koner, A. L. Rationally Designed Solvatochromic Fluorescent Indoline Derivatives for Probing Mitochondrial Environment. *Chemistry – A European Journal* 23, 8610–8614 (2017).
- Martínez-Martínez, V., Lim, J., Bañuelos, J., López-Arbeloa, I. & Miljanić, O. Š. Strong intramolecular charge transfer emission in benzobisoxazole cruciforms: solvatochromic dyes as polarity indicators. *Physical Chemistry Chemical Physics* 15, 18023–18029 (2013).
- 219. Jackson Cullison, S. R., Flemming, J. P., Karagoz, K., Wermuth, P. J. & Mahoney, M. G. Mechanisms of extracellular vesicle uptake and implications for the design of cancer therapeutics. *Journal of Extracellular Biology* **3**, e70017 (2024).
- 220. Vargoorani, M. E., Modarressi, M. H., Vaziri, F., Motevaseli, E. & Siadat, S. D. Stimulatory effects of Lactobacillus casei derived extracellular vesicles on toll-like receptor 9 gene expression and cytokine profile in human intestinal epithelial cells. *J Diabetes Metab Disord* 19, 223–231 (2020).
- 221. da Silva, D. R., Gonzalez, C. F. & Lorca, G. Internalization of extracellular vesicles from *Lactobacillus johnsonii* N6.2 elicit an RNA sensory response in human pancreatic cell lines. *Journal of Extracellular Biology* **2**, e101 (2023).
- 222. Alpdundar Bulut, E. *et al.* Human Gut Commensal Membrane Vesicles Modulate Inflammation by Generating M2-like Macrophages and Myeloid-Derived Suppressor Cells. *The Journal of Immunology* **205**, 2707–2718 (2020).
- 223. Sabatke, B., Rossi, I. V., Sana, A., Bonato, L. B. & Ramirez, M. I. Extracellular vesicles biogenesis and uptake concepts: A comprehensive guide to studying host-pathogen communication. *Mol Microbiol* **122**, 613–629 (2024).
- 224. Kozon-Markiewicz, D. *et al.* Membrane lytic activity of antibacterial ionenes, critical role of phosphatidylcholine (PC) and cardiolipin (CL). *Colloids Surf B Biointerfaces* **229**, 113480 (2023).
- 225. Chen, Y., Wu, T., Xie, S., Bai, Y. & Xing, H. Orientation-controlled membrane anchoring of bioorthogonal catalysts on live cells via liposome fusion-based transport. *Sci Adv* **9**, eadg2583 (2025).
- 226. Sekirov, I., Russell, S. L., Antunes, L. C. M. & Finlay, B. B. Gut Microbiota in Health and Disease. *Physiol Rev* **90**, 859–904 (2010).
- 227. Rinninella, E. *et al.* What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms* 7, (2019).
- 228. Shoda, T. *et al.* Recent advances in understanding the roles of vascular endothelial cells in allergic inflammation. *Allergology International* **65**, 21–29 (2016).

- 229. Sender, R., Fuchs, S. & Milo, R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol* 14, e1002533- (2016).
- 230. Kho, Z. Y. & Lal, S. K. The Human Gut Microbiome A Potential Controller of Wellness and Disease. *Front Microbiol* 9, (2018).
- 231. Arnoldini, M., Cremer, J. & Hwa, T. Bacterial growth, flow, and mixing shape human gut microbiota density and composition. *Gut Microbes* **9**, 559–566 (2018).
- Moonsamy, G., Roets-Dlamini, Y., Langa, C. N. & Ramchuran, S. O. Advances in Yeast Probiotic Production and Formulation for Preventative Health. *Microorganisms* 12, (2024).
- Rivero Berti, I. *et al.* Assessment of in vitro cytotoxicity of imidazole ionic liquids and inclusion in targeted drug carriers containing violacein. *RSC Adv* 10, 29336–29346 (2020).
- 234. Ofir-Birin, Y. *et al.* Monitoring Extracellular Vesicle Cargo Active Uptake by Imaging Flow Cytometry. *Front Immunol* **9**, (2018).
- 235. Kari, S. *et al.* Programmed cell death detection methods: a systematic review and a categorical comparison. *Apoptosis* **27**, 482–508 (2022).
- 236. Kavithaa, K., Paulpandi, M., Ponraj, T., Murugan, K. & Sumathi, S. Induction of intrinsic apoptotic pathway in human breast cancer (MCF-7) cells through facile biosynthesized zinc oxide nanorods. *Karbala International Journal of Modern Science* **2**, 46–55 (2016).
- Shubin, A. V., Demidyuk, I. V., Komissarov, A. A., Rafieva, L. M. & Kostrov, S. V. Cytoplasmic vacuolization in cell death and survival. *Oncotarget* 7, 55863–55889 (2016).
- 238. Aki, T., Nara, A. & Uemura, K. Cytoplasmic vacuolization during exposure to drugs and other substances. *Cell Biol Toxicol* **28**, 125–131 (2012).
- 239. Zhang, J.-Q. Antitumor effect of matrine in human hepatoma G2 cells by inducing apoptosis and autophagy. *World J Gastroenterol* **16**, 4281 (2010).
- 240. Yeung, T. M., Gandhi, S. C., Wilding, J. L., Muschel, R. & Bodmer, W. F. Cancer stem cells from colorectal cancer-derived cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 3722–3727 (2010).
- 241. Mustafa, S., Koran, S. & AlOmair, L. Insights Into the Role of Matrix Metalloproteinases in Cancer and its Various Therapeutic Aspects: A Review. *Front Mol Biosci* 9, (2022).
- Roy, R., Yang, J. & Moses, M. A. Matrix Metalloproteinases As Novel Biomarker s and Potential Therapeutic Targets in Human Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 27, 5287–5297 (2009).
- 243. Siddhartha, R. & Garg, M. Molecular and clinical insights of matrix metalloproteinases into cancer spread and potential therapeutic interventions. *Toxicol Appl Pharmacol* **426**, 115593 (2021).
- 244. Gialeli, C., Theocharis, A. D. & Karamanos, N. K. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS J* **278**, 16–27 (2011).
- 245. Nikolov, A., Popovski, N. & Hristova, I. Collagenases MMP-1, MMP-13, and Tissue Inhibitors TIMP-1, TIMP-2: Their Role in Healthy and Complicated Pregnancy and Potential as Preeclampsia Biomarkers—A Brief Review. *Applied Sciences* **10**, (2020).
- 246. Bourboulia, D. & Stetler-Stevenson, W. G. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. *Semin Cancer Biol* **20**, 161–168 (2010).
- 247. Karouzakis, E., Neidhart, M., Gay, R. E. & Gay, S. Molecular and cellular basis of rheumatoid joint destruction. *Immunol Lett* **106**, 8–13 (2006).
- 248. Zhai, H. *et al.* TIMP-3 suppresses the proliferation and migration of SMCs from the aortic neck of atherosclerotic AAA in rabbits, via decreased MMP-2 and MMP-9 activity, and reduced TNF-α expression. *Mol Med Rep* (2018) doi:10.3892/mmr.2018.9224.
- 249. Pietruszewska, W., Bojanowska-Poźniak, K. & Kobos, J. Matrix metalloproteinases MMP1, MMP2, MMP9 and their tissue inhibitors TIMP1, TIMP2, TIMP3 in head and neck cancer: an immunohistochemical study. *Otolaryngologia Polska* **70**, 29–40 (2016).
- 250. Zhou, P. et al. The Imbalance of MMP-2/TIMP-2 and MMP-9/TIMP-1 Contributes to Collagen Deposition Disorder in Diabetic Non-Injured Skin. Front Endocrinol (Lausanne) 12, (2021).
- 251. Wróbel-Roztropiński, A. *et al.* Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitor (TIMP) genes on mRNA and protein levels in oral squamous cell carcinoma. *Nowotwory. Journal of Oncology* **71**, 1–8 (2021).
- 252. Wu, Z.-S. *et al.* Prognostic significance of MMP-9 and TIMP-1 serum and tissue expression in breast cancer. *Int J Cancer* **122**, 2050–2056 (2008).
- 253. Andrews, C., McLean, M. H. & Durum, S. K. Cytokine Tuning of Intestinal Epithelial Function. *Front Immunol* 9, (2018).
- 254. Rijnierse, A., Koster, A. S., Nijkamp, F. P. & Kraneveld, A. D. TNF-α is crucial for the development of mast cell-dependent colitis in mice. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **291**, G969–G976 (2006).
- 255. Forsythe, P., Wang, B., Khambati, I. & Kunze, W. A. Systemic Effects of Ingested *Lactobacillus Rhamnosus*: Inhibition of Mast Cell Membrane Potassium (IKCa) Current and Degranulation. *PLoS One* 7, e41234- (2012).
- 256. Oksaharju, A. *et al.* Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* downregulates FCER1 and HRH4 expression in human mast cells. *World J Gastroenterol* **17**, 750–9 (2011).
- 257. Grivennikov, S. *et al.* IL-6 and Stat3 Are Required for Survival of Intestinal Epithelial Cells and Development of Colitis-Associated Cancer. *Cancer Cell* **15**, 103–113 (2009).

- 258. Lee, Y. S. *et al.* Interleukin-8 and its receptor CXCR2 in the tumour microenvironment promote colon cancer growth, progression and metastasis. *Br J Cancer* **106**, 1833–1841 (2012).
- 259. Chen, C. *et al.* Active cargo loading into extracellular vesicles: Highlights the heterogeneous encapsulation behaviour. *J Extracell Vesicles* **10**, (2021).
- 260. Tian, T. *et al.* Dynamics of exosome internalization and trafficking. *J Cell Physiol* **228**, 1487–1495 (2013).

7. Wykaz skrótów

	rozwinięcie skrótu w języku	polskie tłumaczenie
	angielskim	
5PL	- 5 parameter logistic	- 5-parametryczne logistyczne
AFM	- atomic force microscopy	- mikroskopia sił atomowych
AO	- acridine orange	- oranż akrydyny
APS	- ammonium persulfate	- nadsiarczan amonu
ATCC	- American Type Culture Collection	 Amerykańska Kolekcja Hodowli Komórkowych
AU	- absorbance units	- jednostka absorbancji
BSA	- bovine serum albumin	- albumina z surowicy bydlęcej
BW	- bandwidth	 szerokość pasma, czyli zakres długości fal, w którym skupiona jest większość energii promieniowania
CAR-T	- chimeric antigen receptor T-cell	 zmodyfikowane (chimeryczne) limfocyty T
CcLTa	- co-culture long term assay	 długotrwała hodowla mieszana komórek prawidłowych oraz nowotworowych
CCS	- cell culture supernatant	- medium po hodowli komórek ssaczych
CDE	- caveolin-dependent endocytosis	- endocytoza zależna od kaweoliny
CE-MS	- capillary electrophoresis-mass spectrometry	 elektroforeza kapilarna w połączeniu ze spektrometrią mas
CME	- clathrin-mediated endocytosis	- endocytoza zależna od klatryny
CV	- crystal violet	- fiolet krystaliczny
CWL	- center wavelength	- centralna długość fali promieniowania
cz.d.a.		- czyste do analiz
dcFDA	- 2',7'-dichlorofluorescin diacetate	- dwuoctan 2', 7'-dichlorofluoresceiny
ddH ₂ O	- double deionized water	- woda podwójnie dejonizowana
DDS	- drug delivery systems	- systemach dostarczania leków
DDS- EVs	- drug delivery systems based on EVs	 systemów dostarczania leków opartych na EVs

DEPC	- diethylpyrocarbonate	- pirowęglanu dietylu	
DG	- density gradient centrifugation	- wirowanie w gradiencie gęstości	
DIC	- differential interference contrast	- kontrast interferencyjno-różnicowy	
DiO	- 3,3'-dioctadecyloxacarbocyanine	- nadchloran 3,3'-	
	perchlorate	dioktadecyloksakarbocyjaniny	
DLS	- dynamic light scattering	- dynamiczne rozpraszanie światła	
dNTPs	- deoxynucleotide triphosphates	- trifosforany deoksyrybonukleotydowe	
DOC	- desoxycholic acid sodium salt	- deoksycholanu sodu	
DOX	- doxorubicin	- doksorubicyna	
DPBS	- Dulbecco's phosphate buffered saline	 roztwór soli fizjologicznej buforowanej fosforanami, opracowany przez Dulbecco 	
DTT	- dithiothreitol	- ditiotreitol	
EC ₅₀	- half maximal effective concentration	- połowa dawki efektywnej	
EDTA	- ethylenediaminetetraacetic acid	- kwas wersenowy	
EM	- electron microscopy	- mikroskopia elektronowa	
ESCRT	- endosomal sorting complex required for transport	 endosomalny kompleks sortujący niezbędny do transportu 	
ESI-MS	- electrospray ionization mass spectrometry	 spektrometria mas sprzężona z jonizacją elektrosprejową 	
EtBr	- ethidium bromide	- bromek etydyny	
EVs	- extracellular vesicles	- pęcherzyki zewnątrzkomórkowe	
FA	- formic acid	- kwas mrówkowy	
FBS	- fetal bovine serum	- płodowa surowica bydlęca	
FC	- flow cytometry	- cytometria przepływowa	
FDA	- fluorescein diacetate	- dwuoctanu fluoresceiny	
FPKM	- fragments per kilobase of transcript per million mapped reads	 fragmentów na kilobazę transkryptu na milion zmapowanych odczytów 	
FTLA	- finite track length adjustment	- uwzględnienie skończonej długości toru	
GAPDH	- glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	 dehydrogenaza aldehydu 3- fosfoglicerynowego 	

GPI	- glycosylphosphatidylinositol	- glikozylofosfatydyloinozytol		
GSH	- glutathion	- glutation		
HPLC	- high-performance liquid chromatography	 wysokosprawna chromatografia cieczowa 		
HRP	- horseradish peroxidase	- peroksydaza chrzanowa		
HSP	- heat shock proteins	- białka szoku cieplnego		
IFU	- intensity of fluorescence unit	- jednostka intensywności fluorescencji		
IFN-γ	- interferon-gamma	- interferon-gamma		
IgA	- immunoglobulin A	- immunoglobulina A		
IMDM- Iscove's modified Dulbecco's medium- zmodyfikowane prze do hodowli Dulbecc		 zmodyfikowane przez Iscove'a medium do hodowli Dulbecco 		
ISAPP	- International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics	 Międzynarodowe Stowarzyszenie Naukowe Probiotyków i Prebiotyków 		
LC- MS/MS	- liquid chromatography-tandem mass spectrometry	 chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas 		
LPS	- lipopolysaccharide	- lipopolisacharyd		
LTa	- long-term assay	 indukcja odpowiedzi długotrwałej, test bazujący na 7-dniowej hodowli komórek 		
MALDI- TOF/MS	- matrix-assisted laser desorption ionization–time-of-flight/mass spectrometry	 spektrometrii mas z użyciem desorpcji/jonizacji laserowej wspomaganej matrycą z analizatorem czasu przelotu 		
MEM	- minimum essential medium	- medium minimalne do wzrostu komórek		
MFI	- mean fluorescence intensity	- średnia intensywność fluorescencji		
MMP	- metalloproteinase	- metaloproteinaza		
MS	- mass spectrometry	- spektrometria mas		
MTT	- 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazolium bromide	 bromek 3-(4,5-dimetylo-2-tiazolilo)-2,5- difenylo-2H-tetrazoliowy 		
MVBs	- miltivesicular bodies	- ciałka wielopęcherzykowe		
NF-κB	- nuclear factor kappa-light-chain- enhancer of activated B cells	- jądrowy czynnik transkrypcyjny NF kappa B		
NK	- natural killer cells	 komórki układu odpornościowego, tzw. naturalni zabójcy 		

NP-40	- Nonidet P-40	- Nonidet P-40	
NR	- Nile Red	- czerwień nilu	
NTA	- nanoparticle tracking analysis	- analiza śledzenia nanocząstek	
OD600	- optical density at 600 nm	 gęstość optyczna przy długości fali 600 nm 	
PCM	- Polish Collection of Microorganisms	- Polska Kolekcja Mikroorganizmów	
PCR	- polymerase chain reaction	- reakcja łańcuchowa polimerazy	
PEG	- poly-ethylene glycol	- polietylenoglikol	
PES	- polyethersulfone	- polieterosulfon	
PFA	- paraformaldehyde	- paraformaldehyd	
Pi	- propidium iodide	- jodek propidyny	
PP	- polimer precipitation	 precypitacja z wykorzystaniem polimerów 	
PVDF	- polyvinylidene difluoride	- polifluorek winylidenu	
QCM-D	- quartz crystal microbalance with dissipation monitoring	 mikrowaga kwarcowa z monitorowaniem rozpraszania 	
qPCR	- quantitative polymerase chain reaction	 ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy 	
Rf	- retention factor	- współczynnik retencji	
RIPA	- radioimmunoprecipitation assay buffer	 bufor do lizy komórek i rozpuszczania białek 	
ROS	- reactive oxygen species	- reaktywne formy tlenu	
rpm	- revolutions per minute	- obroty na minutę	
RT	- room temperature	- temperatura pokojowa	
Rv	- reverse primer	- starter odwrotny	
Sb	- Saccharomyces boulardii CNCM I-745	- Saccharomyces boulardii CNCM I-745	
SDS	- sodium dodecyl sulfate	- dodecylosiarczan sodu	
SDS- PAGE	- sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis	 elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących z wykorzystaniem dodecylosiarczanu sodu 	

SEC	- size-exclusion chromatography,	 chromatografia wykluczania na sitach molekularnych 	
SEM	- scanning electron microscopy	- skaningowa mikroskopia elektronowa	
STEM	- scanning transmission electron microscopy	- skaningowo-transmisyjna mikroskopia elektronowa	
t-BHP	- tert-butyl hydroperoxide	- wodoronadtlenk tert-butylu	
TCA	- trichloroacetic acid	- kwas trichlorooctowy	
TEAB	- triethylammonium bicarbonate	- wodorowęglan trietyloamoniowy	
TEM	- tetraspanin-enriched microdomain	 mikrodomena wzbogacona w tetraspaniny 	
TEM	- transmission electron microscopy	- transmisyjna mikroskopia elektronowa	
TEMA	- tetraspanin-enriched macrodomain	 makrodomena wzbogacona w tetraspaniny 	
TEMED	- N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine	- N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina	
TFF	- tangential flow filtration	- filtracja o przepływie stycznym	
TIMPs	- tissue inhibitors of metalloproteinases	- tkankowe inhibitory metaloproteinaz	
TLC	- thin layer chromatography	 cienkowarstwowa chromatografia cieczowa 	
TMB	- tetramethylbenzidine	- czterometylobenzydyna	
TNFα	- tumor necrosis factor alpha	- czynnik α martwicy nowotworów	
TSPAN	- tetraspanins	- tetraspaniny	
Fw	- forward primer	- starter przedni	
UC	- ultracentrifugation	- ultrawirowanie	
UF	- ultrafiltration	- ultrafiltracja	
VIO	- Janthinobacterium lividum PCM3520	- Janthinobacterium lividum PCM3520	
WUT240) - Kluyveromyces marxianus WUT240	- Kluyveromyces marxianus WUT240	
YPD	- yeast peptone dextrose medium	 podłoże mkikrobiologiczne do wzrostu drożdży zawierające ekstrakt drożdżowy, pepton bakteriologiczny i dekstrozę 	
ZP	- zeta potential	- potencjał błonowy	

8. Spis rysunków

Rysunek 1, Wyniki przeszukiwania bazy artykułów PubMed pod kątem publikacji dotyczących oraz EVs. produkowanych przez
kontratav rodzaj komóraly, novostvorovnych haltervinych lub drożdżowych
Dana dastenna na dzieć 26.12.2024
Dane dostępne na dzień 20.12.2024.
Rysunek 2. Schemat biogenezy pęcherzykow zewnątrzkomorkowych, opracowany na podstawie ^{22–25}
Rysunek 3. Schemat powstawania migrasomów, na podstawie ²⁹ 19
Rysunek 4. Schemat przedstawiający mechanizmy pobierania EVs ze środowiska wykorzystywane przez komórki ssacze, na podstawie ³⁶
Rysunek 5. Podstawowe metody wykorzystywane do izolacji pęcherzyków zewnatrzkomórkowych, na podstawie ⁴⁴
Rysunek 6 Schemat przedstawiający zróżnicowanie natywnego ładunku biologicznego
pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w zależności od produkujących je komórek mikroorganizmów, na podstawie ⁶⁵
Rysunek 7. Zdjęcie mikroskopowe preparatu drożdży <i>S. boulardii</i> CNCM I-745, po wybarwieniu ciałek lipidowych (ang. lipid droplets) z wykorzystaniem barwnika
Oil Red O (badania własne). Skala 10 µm
Rysunek 8. Zdjęcie mikroskopowe preparatu drożdży Kluyveromyces marxianus WUT240, po
wybarwieniu ciałek lipidowych (ang. lipid droplets) z wykorzystaniem barwnika
Oil Red O (badania własne). Skala 10 µm
Rysunek 9. Zdjęcie mikroskopowe preparatu bakterii Janthinobacterium lividum PCM 3520,
po barwieniu metodą Grama (badania własne). Skala 10 µm
Rysunek 10. Zdjęcie mikroskopowe hodowli komórek HT-29 (badania własne). Skala 100 μm.
Rysunek 11. Zdjęcie mikroskopowe hodowli komórek HCT116 (badania własne). Skala 100 um
Rysunek 12. Zdjęcie mikroskopowe hodowli komórek CCD841 CoN (badania własne). Skala
100 μm
Rysunek 13. Zdjęcie mikroskopowe hodowli komórek CCD-18Co (badania własne). Skala 100 um
Rysunek 14. Zdjęcie mikroskopowe hodowli komórek LUVA (badania własne). Skala 100 μm.
Rysunek 15. Schemat przedstawiający sposób w uproszczony pracę z hodowlą drożdżową
(procedura w punkcie 3.3.5. – hodowla drożdży) a także izolację EVs-Sb oraz
EVs-WUT240 (procedura w punkcie 3.3.6. – zewnatrzkomórkowe pecherzyki
drożdżowe). Grafikę przygotowano wykorzystując https://www.biorender.com/.
Rysunek 16. Schemat przedstawiający w uproszczony sposób pracę z hodowlą bakteryjną
(procedura w punkcie 3.3.1. – hodowla bakterii), izolację EVs-VIO (procedura w
punkcie 3.3.6. – zewnatrzkomórkowe pecherzyki baktervine) oraz izolacie Ex-
VIO (procedura w punkcie 3.3.9.). Grafikę przygotowano wykorzystując
nups://www.otorender.com/

Rysunek	17.	Schemat	przedstawiający	ExoDISC-20.	Źródło:
	https://ww	w.exodiscovery	.com/exodisc		60
Rysunek	18. Rozkład y	wielkości badar	nych interleukin (IL-4	, IL-6, IL-8 oraz TNI	Fα) i białka
	kontrolneg	go (aktyna) w c	odniesieniu do używan	ego markera mas bia	łek (26616,
	Thermo Se	cientific)			
Rysunek	19. Schem	at przedstawia	ający wykonanie te	stu z wykorzystan	iem kulek
	cytometry	cznych a. etap	przygotowania stand	lardów stężeń, b. eta	p wiązania
	interleukir	n na kulkach or	raz ich detekcji. Grafi	kę przygotowano wy	korzystując
	https://ww	w.biorender.com	m/		
Rysunek	20. Schemat	przedstawiając	y podział pracy bada	wczej na kolejne etaj	py. Grafikę
	przygotow	ano wykorzyst	ując https://www.biore	nder.com/	
Rysunek	21. Tempo wz	rostu bakterii J.	lividum PCM 3520 w	temperaturze 20°C i v	vytrząsaniu
	110 rpm. C	Ciemnofioletow	e punkty (powyżej 40 ł	n) oznaczają pojawieni	ie się barwy
	fioletowej	w medium, św	iadczącej o produkcji v	wiolaceiny (n=8)	111
Rysunek	22. Przykład	dowe wykresy	zależności intensywi	ności światła rozpra	szanego w
	zależności	od wielkości	cząstek, wygenerowa	ane przez DLS podcz	zas analizy
	pęcherzyk	ów: a. EVs-Sb	(3 powtórzenia techni	czne pomiaru), b. EV	s-WUT240
	(3 powtór	zenia technicz	ne pomiaru), c. EVs-	VIO (4 powtórzenia	techniczne
	pomiaru) o	oraz d. wykres	przedstawiający estym	ację ilości cząstek w s	stosunku do
	ich wielk	ości, wygenero	wany przez DLS z t	tej samej analizy co	wykres c.
	Kolorami	zaznaczono pos	szczególne powtórzenia	a techniczne	112
Rysunek	23. Wykresy p	orzedstawiające	zależności stężenia EV	Vs od ich średnicy dla	a. EVs-Sb,
	b. EVs-W	UT240 oraz c	EVs-VIO. Dopasowa	anie, 10 pomiarów te	chnicznych
	każdej z	próbek, zgo	dnie z modelem dy	ystrybucji FTLA	$(n_{EVsSb}=33,$
	$n_{\rm EVsWUT240}$	$=28, n_{\rm EVsVIO}=22$	2)		
Rysunek	24. Rozkład v	vielkości EVs-	VIO w próbce niebarw	vionej oraz próbkach l	oarwionych
	barwnikan	ni fluorescency	jnymi przy detekcji, p	orzykładowy wykres z	z jednego z
	pomiarów	: a. w świetle b	piałym; b. we fluoresco	encji. Wynik dla każd	ej z próbek
	składa się	z automatyczne	ej analizy 10 niezależny	ych filmików zgodnie	z modelem
	dystrybucj	i RAW (n=1)			
Rysunek	25. Zdjęcia re	eprezentatywne	badanych EVs mikro	biologicznych wykon	anych przy
	użyciu ST	EM			
Rysunek	26. Zestawie	nie przykładov	vych zdjęć z transmis	syjnej mikroskopii el	ektronowej
	(TEM), uz	cyskanych przy	120000-krotnym powi	ększeniu	
Rysunek	27. a. Ukła	d prążków na	żelach poliakrylami	dowych uzyskanych	w wyniku
	elektrofor	ezy (SDS-PAG	E) białek wyizolow	anych z EVs drożdz	żowych; b.
	Wizualiza	cja membrany	PVDF uzyskanej w v	wyniku wykrywania	drożdżowej
	kinazy pir	ogronianowej	(Pykl, ok. 56 kDa) w	v pęcherzykach drożdz	żowych, za
	pomocą m	etody Western	blot		
Rysunek	28. a. Ukła	d prążków na	żelach poliakrylamie	dowych uzyskanych	w wyniku
	elektrotor	ezy białek w	yızolowanych z EV	/-VIO.; b. Wynik	zymografii
	przeprowa	idzonej na pęcl	nerzykach EVs-VIO, j	potwierdzający obecn	osc w tych
	strukturac	h aktywnych pr	oteınaz zdolnych do hy	ydrolizy żelatyny	121

- Rysunek 31. Widma (a.) absorbancji oraz (b.) transmitancji zebrane dla wiolaceiny zamkniętej w pęcherzykach (EVs-VIO), izolowanej z biomasy bakteryjnej (Ex-VIO)..... 123

- Rysunek 36. Wyniki testów (**a.** MTT, **b.** ROS, **c.** CV) przeprowadzonych po 24-h inkubacji z różną ilością EVs-Sb przypadających na pojedynczą komórkę. Czarną, przerywaną linią oznaczono poziomy odpowiedzi hodowli kontrolnej; * istotność statystyczna na poziomie α=5,0% w odniesieniu do hodowli kontrolnej (n=4).
- Rysunek 37. Wyniki testów (**a.** MTT, **b.** ROS, **c.** CV) przeprowadzonych po 24-h inkubacji z różną ilością EVs-WUT240 przypadających na pojedynczą komórkę. Czarną, przerywaną linią oznaczono poziomy odpowiedzi hodowli kontrolnej; * istotność statystyczna na poziomie α=5,0% w odniesieniu do hodowli kontrolnej (n=4).
- Rysunek 38. Wyniki testów (a. MTT, b. ROS, c. CV) przeprowadzonych po 24-h inkubacji z różnymi stężeniami wiolaceiny zawartej w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych (EVs-VIO) oraz wyizolowanej z biomasy bakteryjnej (Ex-VIO) zastosowanej jako odniesienie dla działania samego związku. Czarną, przerywaną linią oznaczono poziomy odpowiedzi hodowli kontrolnej; * istotność statystyczna na poziomie α=5,0% w odniesieniu do hodowli kontrolnej (n=4)......132
- Rysunek 39. Liczba komórek w 7. dniu hodowli z pęcherzykami pochodzenia mikrobiologicznego lub ekstraktem zawierającym wiolaceinę, w odniesieniu do liczby komórek w hodowli kontrolnej nietraktowanej (czarna przerywana linia); *

- Rysunek 48. Wyniki qPCR przedstawiające zmiany w ekspresji genów MMP2, MMP9, TIMP1, TIMP2 oraz TIMP3 w odniesieniu do ekspresji genu referencyjnego GAPDH po 24-h inkubacji komórek z a. 1,0·10⁵ EVs-Sb/komórkę; b. 1,0·10⁵ EVs-WUT240/komórkę oraz c. 0,5 μM wiolaceiny w EVs-VIO; * istotność statystyczna na poziomie α=5,0% (n=4).
- Rysunek 50. Krzywa standardowa intensywności fluorescencji od stężenia doksorubicyny, opracowana w celu wyznaczenia wydajności ładowania EVs tym związkiem. Jako wzorzec wykorzystano komercyjny roztwór doksorubicyny w stężeniu 2 mg/mL

	firmy EBEWE (Doxorubicin - Ebewe 2 mg/mL, EAN: 5909990429028, EBEWE Pharma GmbH)
Rysunek 51.	. Porównanie wydajności wchłaniania doksorubicyny z EVs-Sb_DOX w ilości 2,0·10 ⁵ EVs/komórkę oraz z roztworu o stężeniu związku 2,0 μg/mL. Kontrola negatywna ładowania – DPBS DOX. Skala 10 μm
Rysunek 52.	Aktywność metaboliczna komórek (na podstawie testu MTT) po 24-h inkubacji z mikrobiologicznymi EVs natywnymi oraz załadowanymi doksorubicyną (EVs_DOX) i wolną doksorubicyną w stężeniu 0,25 µg/mL. Czarną przerywaną linią oznaczono poziom aktywności metabolicznej hodowli kontrolnej; * istotność statystyczna na poziomie α =5,0% wpływu EVs oraz EVs_DOX w stosunku do kontroli; ** istotność statystyczna na poziomie α =5,0% wpływu EVs oraz EVs_DOX w stosunku do kontroli; ** istotność statystyczna na poziomie α =5,0% mpływu EVs oraz EVs_DOX w stosunku do EVs natywnych (n=3)
Rysunek 53.	Porównanie wpływu doksorubicyny w roztworze oraz załadowanej do EVs, na przykładzie EVs-WUT240_DOX na a. intensywność proliferacji komórek (na podstawie testu BrdU), b. liczbę komórek (na podstawie testu CV wykonanego na tej samej płytce co BrdU). Czarną przerywaną linią oznaczono poziom aktywności metabolicznej lub liczby komórek w hodowli kontrolnej; * istotność statystyczna na poziomie α =5,0% w odniesieniu do hodowli kontrolnej (n=3)
Rysunek 54.	Porównanie wpływu doksorubicyny w roztworze oraz załadowanej do EVs, na przykładzie EVs-WUT240_DOX (po 168 h inkubacji) na: a. aktywność metaboliczną komórek; b. liczbę komórek; c. udział żywych komórek; d. udział martwych komórek. Czarną przerywaną linią oznaczono poziom rejestrowane w hodowli kontrolnej; * istotność statystyczna na poziomie α =5,0% w odniesieniu do hodowli kontrolnej (n=3)
Rysunek 55.	Krzywa standardowa intensywności fluorescencji od stężenia oranżu akrydyny, opracowana w celu wyznaczenia wydajności ładowania EVs tym związkiem chemicznym (n=3)
Rysunek 56	. Zdjęcia komórek w trakcie inkubacji z EVs-WUT240_AO, w ilości 5,0·10 ⁵ EVs/komórkę, przez 90 min w 37°C. Urządzenie: Celloger Nano (CURIOSIS). Skala 200 μm
Rysunek 57.	Komórki CCD841 CoN inkubowane w RT z EVs-WUT240_AO w ilości $5,0.10^5$ EVs/komórkę. Urządzenie: ZOE (Bio-Rad). Skala 100 µm
Rysunek 58.	Komórki CCD841 CoN inkubowane w RT z EVs-VIO_NR o 50 µM stężeniu wiolaceiny. Skala 100 µm

9. Spis tabel

Tabela 1. Skład i warunki przechowywania buforów, roztworów oraz podłóż hodowlanych
wykorzystywanych w metodach badawczych
Tabela 2. Zestawienie informacji dotyczących starterów wykorzystywanych w trakcie badań,
w przypadku, gdy para starterów została wybrana z bazy PrimerBank w nawiasie,
pod nazwą celu molekularnego, wpisano numer indentyfikacyjny z bazy 49
Tabela 3. W poniższej tabeli zestawiono objętości próbek oraz czynników precypitacyjnych
(20% PEG6000 – PEG oraz odczynnik precypitujący B z zestawu ExoPRISM
firmy LabSpinner – "B")
Tabela 4. Wykorzystany program gradientowego wzrostu stężenia alkoholu metylowego
podczas rozdziału i analizy na HPLC65
Tabela 5. Skład mieszanin reakcyjnych 1 (MIX1) oraz 2 (MIX2) wykorzystywanych do reakcji
odwrotnej transkrypcji, a także skład mieszaniny reakcyjnej 3 (MIX3)
wykorzystywanej do przeprowadzenia qPCR, wraz z ilościami poszczególnych
komponentów przypadających na pojedynczą próbkę91
Tabela 6. Program termiczny qPCR dla celów molekularnych: GAPDH, MMP2, MMP9,
TIMP1, TIMP2 oraz TIMP392
Tabela 7. Zestawienie informacji katalogowych o wykorzystanych do badania zestawach kulek
wychwytujących97
Tabela 8. Zestawienie wydajności izolacji EVs z hodowli płynnych trzech mikroorganizmów -
S. boulardii (Sb), K. marxianus (WUT240) i J. lividum (VIO) z wykorzystaniem
różnych metod (n=1) 105
Tabela 9. Zestawienie zalet i wad testowanych metod izolacji EVs z płynnych hodowli bakterii
i drożdży106
Tabela 10. Zestawienie stężeń EVs drożdżowych w próbkach przechowywanych przez 30
miesięcy w postaci zamrożonej z oraz bez dodatków krio-protekcyjnych.
Przedstawione wyniki uzyskano w oparciu o pomiary NTA (n=1) 108
Tabela 11. Zestawienie stężenia EVs w próbkach przechowywanych przez 24 h w różnych
rozcieńczeniach oraz w 3 wybranych temperaturach. Przedstawione wyniki
uzyskano w oparciu o pomiary NTA (n=1)109
Tabela 12. Zestawienie danych zebranych o każdym z badanych mikroorganizmów jako
producencie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (n=3) 110
Tabela 13. Zestawienie średnicy EVs na podstawie DLS ($n_{EVs-Sb}=10$, $n_{EVs-WUT240}=11$,
$n_{EVs-VIO}=12$)
Tabela 14. Zestawienie wielkości EVs na podstawie NTA oraz wyznaczenie średniego stężenia
wiolaceiny przypadającego na pojedynczy pęcherzyk (n _{EVs-Sb} =33, n _{EVs-WUT240} =28,
$n_{EVs-VIO}=22$)
Tabela 15. Zestawienie wyników pomiarów otrzymanych 2 metodami detekcji: (1) światło białe
oraz (2) fluorescencja przy wzbudzeniu 488 nm i emisji 500 nm. Wyniki
przykładowe uzyskane dla jednego z powtórzeń biologicznych (n=1) 117
Tabela 16. Zestawienie ilości wiolaceiny otrzymanej z pęcherzyków (EVs-VIO) oraz z biomasy
bakteryjnej (Ex-VIO) (n=3)124

Tabela 17. Wyniki pomiaru potencjału zeta mikrobiologicznych pęcherzyków
zewnątrzkomórkowych w tym stężeniu, które było dodawane do komórek
ludzkich (n=3)
Tabela 18. Wartości EC50 wyznaczone na podstawie MTT (https://www.aatbio.com/tools/ec50-
calculator, wykorzystano 4-parametryczny model regresji)133
Tabela 19. Zestawienie wartości współczynników MMP2/TIMP2 oraz MMP9/TIMP1,
wyznaczonych dla hodowli traktowanych w odniesieniu do hodowli kontrolnych;
* istotność statystyczna na poziomie α=5% (n=4)148
Tabela 20. Zestawienie wydajności ładowania EVs drożdżowych doksorubicyną z
wykorzystaniem różnych metod (n=1)153
Tabela 21. Porównanie wydajności biernego ładowania doksorubicyny do badanych
pęcherzyków zewnątrzkomórkowych pochodzenia mikrobiologicznego (n=6).

10. Spis załączników

Załącznik 1. Poziom produkcji ROS, badanych linii komórek jelitowych, po 24-h inkubacji
z kontrolą pozytywną (100 uM t-BHP) oraz negatywną (5 mM GSH). Czarną,
przerywaną linią oznaczono poziomy odpowiedzi hodowli kontrolnej; * istotność
statystyczna na poziomie α=5, w odniesieniu do hodowli kontrolnej (n=10) 196
Załącznik 2. Białka wspólne dla pęcherzyków EVs-WUT240, wyizolowane z 3 niezależnych
hodowli tego szczepu, łącznie 397 białek 197
Załącznik 3. Proteazy EVs-VIO, znalezione wśród 932 białek wspólnych, 3 niezależnych
hodowli tego szczepu, łącznie 77 proteaz
Załącznik 4. Obraz kultur mieszanych, komórek prawidłowych i nowotworowych, po 168-h
hodowli w obecności EVs drożdżowych w odniesieniu do kontroli
nietraktowanych pęcherzykami zewnątrzkomórkowymi. Skala 100 µm. Obraz

11. Załączniki

Załącznik 1. Poziom produkcji ROS, badanych linii komórek jelitowych, po 24-h inkubacji z kontrolą pozytywną (100 uM t-BHP) oraz negatywną (5 mM GSH). Czarną, przerywaną linią oznaczono poziomy odpowiedzi hodowli kontrolnej; * istotność statystyczna na poziomie α =5, w odniesieniu do hodowli kontrolnej (n=10).



Załącznik 2. Białka wspólne dla pęcherzyków EVs-WUT240, wyizolowane z 3 niezależnych hodowli tego szczepu, łącznie 397 białek.

Numer	
identyfikacyjny	Nazwa białka
białka w NCBI	
4TMB_A	struktura krystaliczna starego żółtego enzymu z Candida macedoniensis
	AKU4588 [Kluyveromyces marxianus]
AAD27873.1	prekursor inulinazy [Kluyveromyces marxianus]
AAS18310.1	beta-D-galaktozydaza [Kluyveromyces marxianus]
ACS83689.1	dekarboksylaza orotydyno-5-fosforanu [Kluyveromyces marxianus]
ADH1_YEAST	>sp ADH1_DROŻDŻE
ANT3_HUMAN	>sp ANT3_CZŁOWIEK
AQY75503.1	dehydrogenaza ksylitolu [Kluyveromyces marxianus]
BAF43529.1	dehydrogenaza alkoholowa IV [Kluyveromyces marxianus]
BAP69369.1	syntaza argininobursztynianowa [Kluyveromyces marxianus]
BAP69370.1	prawdopodobna dipeptydylopeptydaza 3 [Kluyveromyces marxianus]
BAP69552.1	białko syntezy ściany komórkowej KRE9 [Kluyveromyces marxianus]
BAP69645.1	czynnik replikacji białka A 1 [Kluyveromyces marxianus]
BAP69922.1	dehydrogenaza aldehydu aktywowana magnezem [Kluyveromyces]
	marxianus]
BAP70186.1	dekarboksylaza uroporfirynogenu [Kluyveromyces marxianus]
BAP70261.1	aminotransferaza aromatycznych aminokwasów 1 [Kluyveromyces
	marxianus]
BAP70396.1	superrodzina rybosomalna L18e [Kluyveromyces marxianus]
BAP70602.1	hipotetyczne białko KLMA_20625 [Kluyveromyces marxianus]
BAP70643.1	endoplazmatyczna oksydoreduktyna-1 [Kluyveromyces marxianus]
BAP70668.1	78 kDa homolog białka regulowanego glukozą [Kluyveromyces marxianus]
BAP70942.1	dehydrogenaza izocytrynianowa [NADP] cytoplazmatyczna
	[Kluyveromyces marxianus]
BAP70991.1	rybonukleozydodifosforanowa reduktaza mały łańcuch 1 [Kluyveromyces
	marxianus]
BAP70996.1	skwalenowa monooksygenaza [Kluyveromyces marxianus]
BAP71092.1	akonitanohydrataza [Kluyveromyces marxianus]
BAP71182.1	aminopeptydaza 2 [Kluyveromyces marxianus]
BAP71190.1	niezidentyfikowane białko YMR152W [Kluyveromyces marxianus]
BAP71597.1	aminotransferaza asparaginianowa [Kluyveromyces marxianus]
BAP71609.1	białko rybosomalne 40S S13 [Kluyveromyces marxianus]
BAP71665.1	przypuszczalna dehydrogenaza aryloalkoholowa YPL088W
	[Kluyveromyces marxianus]
BAP71978.1	enzym odgałęziający glikogen [Kluyveromyces marxianus]
BAP72063.1	białko rybosomalne 60S L10a [Kluyveromyces marxianus]
BAP72169.1	helikaza RNA zależna od ATP DED1 [Kluyveromyces marxianus]
BAP72196.1	hipotetyczne białko KMAR_50063 [Kluyveromyces marxianus]
BAP72231.1	syntetaza alanyl-tRNA [Kluyveromyces marxianus]
BAP72253.1	czynnik inicjacji translacji eIF-2B podjednostka epsilon [Kluyveromyces
	[marxianus]

BAP72598.1	inozytolo-3-fosforanowa syntaza [Kluyveromyces marxianus]	
BAP72695.1	białko szoku cieplnego SSB [Kluyveromyces marxianus]	
BAP72929.1	białko szoku cieplnego 70 homolog LHS1 [<i>Kluvveromyces marxianus</i>]	
BAP73311.1	fosfomannomutaza [Kluyveromyces marxianus]	
BAP73343.1	morfologia wakuoli i białko dziedziczne 14 [Kluyveromyces marxianus]	
BAP73422.1	białko rybosomalne 60S L23 [Kluyveromyces marxianus]	
BAP73894.1	beta-1,3-glukanozylotransferaza [Kluyveromyces marxianus]	
CAA03900.1	endopoliglakturonaza, częściowa [Kluyveromyces marxianus]	
CAO02396.1	dysmutaza ponadtlenkowa Cu/Zn [Kluyveromyces marxianus]	
CAS1_BOVIN	>sp CAS1_BOVIN	
CCA89273.1	oksydoreduktaza tlenku azotu [Kluyveromyces marxianus]	
K1C10_HUMAN	>sp K1C10_HUMAN	
K1C9_HUMAN	>sp K1C9_HUMAN	
K22E_HUMAN	>sp K22E_HUMAN	
K2C1_HUMAN	>sp K2C1_HUMAN	
KAG0668490.1	NADPH-zależna aldo-keto reduktaza [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0668540.1	prekursor białka syntezy ściany komórkowej kre9 [Kluyveromyces	
	marxianus]	
KAG0669056.1	izoforma 2 syntazy glikogenu [skrobi], częściowa [Kluyveromyces	
	marxianus]	
KAG0669331.1	białko wzrostu osmotycznego 1 [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0669412.1	NAD(P)H-zależna reduktaza D-ksylozy (XR) [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0669487.1	białko mmf1, mitochondrialne [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0669492.1	kwaśna fosfataza pho5 [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0669816.1	mitochondrialna aminotransferaza aminokwasów rozgałęzionych (BCAA)	
	[Kluyveromyces marxianus]	
KAG0670022.1	hipotetyczne białko C6P43_003286 [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0670384.1	białko rybosomalne 60S L7 [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0670417.1	hipotetyczne białko C6P43_003047 [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0670691.1	kinaza eIF2 alfa Hri1 [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0670714.1	hipotetyczne białko C6P43_002901 [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0670749.1	czynnik elongacji translacji EF-1 alfa [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0670826.1	białko rybosomalne P0 (A0) (L10E) [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0670940.1	chaperonina [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0671258.1	hipotetyczne białko C6P43_002582 [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0671286.1	synteza dolicholu-P-mannozy [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0671294.1	cystationina gamma-liaza cys3 [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0671295.1	60S rybosomalne białko P2-alfa, częściowe [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0671314.1	40S rybosomalne białko S9 [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0671395.1	białko kontrolujące podział komórek [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0672131.1	deoksyhypusyna syntaza [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0672155.1	nieistotna fosforylaza glikogenu [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0672312.1	czynnik inicjacji translacji eIF-2 podjednostka beta [Kluyveromyces	
	marxianus]	
KAG0672527.1	asparagina-ligaza tRNA [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0672544.1	NAD-zależna dehydrogenaza izocytrynianowa [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0672567.1	hipotetyczne białko C6P43_002047 [Kluyveromyces marxianus]	

KAG0672690.1	podjednostka alfa koatomeru [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0672842.1	70-kilodaltonowe białko szoku cieplnego [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0672926.1	hipotetyczne białko C6P43 001808 [<i>Kluyveromyces marxianus</i>]	
KAG0672961.1	podjednostka B syntazy ATP wakuolarnej [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0673033.1	podjednostka A ATPazy sektora V1 transportującej H(+) [Kluyveromyce	
	marxianus]	
KAG0673058.1	eukariotyczny czynnik inicjacji translacji 5A [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0673086.1	1,3-beta-D-glukan syntaza [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0673138.1	hipotetyczne białko C6P43_001564 [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0673203.1	białko obrotu mRNA i składania rybosomu [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0673278.1	60S białko rybosomalne L18A [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0673352.1	NADH-cytochrom b5 reduktaza [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0673446.1	białko podobne do koroniny crn1 [Kluyveromyces marxi	
KAG0673461.1	białko podjednostki rybosomalnej 40S S11A [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0673465.1	syntetaza cytozolowa serylo-tRNA [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0673547.1	białko rybosomalne 60S L13 [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0673622.1	hipotetyczne białko C6P43_001191 [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0673688.1	3-epimeraza fosforanu RYBULOZY [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0673753.1	ATPaza typu Obg [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0673763.1	ligaza asparaginianowo-tRNA dps1 [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0673798.1	hydrolaza glikozydowa, 17 [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0673863.1	składnik kompleksu TOM (translokaza błony zewnętrznej) [Kluyveromyces	
	marxianus]	
KAG0673970.1	3-deoksy-7-fosfoheptulonian syntazy [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0674006.1	40S rybosomalne białko S22 [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0674020.1	hipotetyczne białko C6P43_000865 [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0674044.1	hipotetyczne białko C6P43_000856 [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0674045.1	hipotetyczne białko C6P43_000857 [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0674048.1	hipotetyczne białko C6P43_000860 [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0674088.1	hipotetyczne białko C6P43_000829 [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0674153.1	hipotetyczne białko C6P43_000767 [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0674288.1	białko rybosomalne 60S L43 [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0674302.1	hipotetyczne białko C6P43_000667, częściowe [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0674398.1	dehydrogenaza alkoholowa [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0674448.1	hipotetyczne białko C6P43_000564 [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0674570.1	dehydrogenaza pirogronianowa E1, podjednostka beta [Kluyveromyces	
	marxianus]	
KAG0674579.1	hipotetyczne białko C6P43_000508 [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0674765.1	białko rybosomalne 60S L38 [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0674776.1	czynnik elongacji translacji 1 beta [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0674831.1	zmienione dziedziczenie białka mitochondrialnego 36, mitochondrialnego	
	[Kluyveromyces marxianus]	
KAG0674875.1	hipotetyczne białko C6P43_000256 [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0674918.1	białko biosyntezy puryn dwufunkcyjnych ade1 [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0674965.1	guanozynodifosfataza [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0674968.1	izo-1-cytochrom c [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0675070.1	białko rybosomalne S24A [Kluyveromyces marxianus]	

KAG0675071.1	dehydrogenaza aldehydowa (NAD(P)(+)) ald5 [<i>Kluyveromyces marxianus</i>]		
KAG0675119.1	syntaza 2-izopropylomalanu (alfa-izopropylomalan syntaza) (syntetaza		
	alfa-IPM) [Kluyveromyces marxianus]		
KAG0675125.1	kinaza pirogronianowa [Kluyveromyces marxianus]		
KAG0675265.1	mitochondrialne białko nośnikowe fosforanu [Kluyveromyces marxianus]		
KAG0675343.1	kinaza guanylanowa [Kluyveromyces marxianus]		
KAG0675382.1	cel Sbf [Kluyveromyces marxianus]		
KAG0675425.1	prekursor białkowej disulfidowej izomerazy [Kluyveromyces marxianus]		
KAG0675466.1	dehydrogenaza sacharopiny (NADP+, tworząca L-glutaminian)		
	[Kluyveromyces marxianus]		
KAG0675585.1	białko rybosomalne 60S L30 [Kluyveromyces marxianus]		
KAG0675616.1	hipotetyczne białko C6P43_004791 [Kluyveromyces marxianus]		
KAG0675638.1	hipotetyczne białko C6P43_004769 [Kluyveromyces marxianus]		
KAG0675648.1	izoleucyna-ligaza tRNA [Kluyveromyces marxianus]		
KAG0675676.1	białko hydrolazy glikozydowej 3 [Kluyveromyces marxianus]		
KAG0675729.1	alfa-1,2-mannozylotransferaza ktr1 [Kluyveromyces marxianus]		
KAG0675776.1	leucyna aminopeptydaza 1 [Kluyveromyces marxianus]		
KAG0675901.1	adenylosukcynaza ade13 [Kluyveromyces marxianus]		
KAG0675905.1	białko sortujące wakuolarne 1 [Kluyveromyces marxianus]		
KAG0675928.1	czynnik elongacji EF-1 podjednostka gamma [Kluyveromyces marxianus]		
KAG0675950.1	podjednostka cytochromu b dehydrogenaza bursztynianowa, Sdh3p		
	[Kluyveromyces marxianus]		
KAG0676016.1	syntetaza pirofosforanu farnezylu [Kluyveromyces marxianus]		
KAG0676050.1	hipotetyczne białko C6P43_004524 [Kluyveromyces marxianus]		
KAG0676110.1	podjednostka regulacyjna fosfatazy białkowej PP2A B [Kluyveromyces]		
	marxianus]		
KAG0676138.1	składnik dehydrogenazy 2-oksoglutaranu E1 [Kluyveromyces marxianus]		
KAG0676140.1	przypuszczalna wydzielana beta-glukozydaza sim1 [Kluyveromyces]		
	marxianus]		
KAG0676169.1	bifunkcyjna fosforybozyloaminoimidazolokarboksyamidowa		
	formylotransferaza/ cyklohydrolaza IMP [Kluyveromyces marxianus]		
KAG0676170.1	białko rybosomalne 60S L15 [Kluyveromyces marxianus]		
KAG0676249.1	dehydrogenaza alkoholowa adh4 [Kluyveromyces marxianus]		
KAG0676399.1	czynnik elongacji translacyjnej EF-1 alfa [Kluyveromyces marxianus]		
KAG0676521.1	hipotetyczne białko C6P43_004145 [Kluyveromyces marxianus]		
KAG0676523.1	podjednostka białka zamykającego aktynę F beta [Kluyveromyces]		
	marxianus]		
KAG0676769.1	egzonukleaza RNA 3 [Kluyveromyces marxianus]		
KAG0676844.1	syntetaza treonylo-tRNA [Kluyveromyces marxianus]		
KAG0676943.1	syntaza GMP (hydrolizująca glutaminę) [Kluyveromyces marxianus]		
KAG0677007.1	hipotetyczne białko C6P43_003651 [Kluyveromyces marxianus]		
KAG0677009.1	fosforybozylotransferaza hipoksantynowo-guaninowa [Kluyveromyces]		
	marxianus]		
KAG0677068.1	heksokinaza A [Kluyveromyces marxianus]		
KAG0677174.1	podjednostka a ATPazy sektora transportującego H(+) V0 [Kluyveromyces		
	marxianus]		
KAG0677294.1	hipotetyczne białko C6P43_003262 [<i>Kluyveromyces marxianus</i>]		
KAG0677352.1	3-deoksy-7-fosfoheptulonianowa syntaza [<i>Kluyveromyces marxianus</i>]		

KAG0677400.1	białko rybosomalne 60S L25 [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0677548.1	białko rybosomalne 60S L22A [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0677633.1	hipotetyczne białko C6P43 002778 [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0677677.1	kinaza białkowa C-podobna 1 [<i>Kluyveromyces marxianus</i>]	
KAG0677680.1	mitochondrialna dehydrogenaza glicerolu-3-fosforanu [Kluvveromvces	
	[marxianus]	
KAG0677682.1	domniemana podjednostka syntazy pirydoksalu 5'-fosforanu snz3	
	[Kluyveromyces marxianus]	
KAG0677859.1	czynnik elongacji 2 [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0677865.1	60S kwaśne białko rybosomalne P2 [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0677871.1	hipotetyczne białko C6P43_002365 [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0677917.1	atp2, podjednostka beta sektora F1 mitochondrialnej syntazy ATP F1F0	
	[Kluyveromyces marxianus]	
KAG0677930.1	hipotetyczne białko C6P43_002285	
KAG0678151.1	hipotetyczne białko C6P43_001845 [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0678223.1	40S rybosomalne białko S4 [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0678411.1	glukozo-6-fosforan 1-dehydrogenaza [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0678467.1	hipotetyczne białko C6P43_001221 [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0678540.1	wakuolarna proteaza A [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0678636.1	hipotetyczne białko C6P43_000948 [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0678682.1	białko wiążące GTP Rho1 [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0678692.1	syntetaza asparaginy [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0679049.1	kofilina [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0679099.1	hipotetyczne białko C6P43_004705 [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0679115.1	peptydylo-prolilowa cis-trans izomeraza fpr2 [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0679253.1	hipotetyczne białko C6P43_004224 [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0679266.1	hipotetyczne białko C6P43_004237 [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0679336.1	galaktokinaza [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0679337.1	UDP-glukoza-4-epimeraza [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0679348.1	60S rybosomalne białko L20 [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0679417.1	mediator podjednostki transkrypcyjnej 6 polimerazy RNA II [<i>Kluyveromyces marxianus</i>]	
KAG0679515.1	hipotetyczne białko C6P43 002598 [Kluvveromyces marxianus]	
KAG0679519.1	hipotetyczne białko C6P43 002602 [Kluvveromvces marxianus]	
KAG0679521.1	hipotetyczne białko C6P43 002604 [<i>Kluvveromyces marxianus</i>]	
KAG0679596.1	Cys-Gly metalodipeptydaza [Kluvveromvces marxianus]	
KAG0679691.1	arginaza, katabolizuje arginine do ornityny i mocznika [Kluvveromvces]	
	[marxianus]	
KAG0679734.1	hipotetyczne białko C6P43 000062 [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0679902.1	40S rybosomalne białko S25 [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0683577.1	dehydrogenaza alkoholowa [Kluyveromyces marxianus]	
KAG0685004.1	hipotetyczne białko C6P41_001146 [Kluyveromyces marxianus]	
LALBA_BOVIN	>sp LALBA_BOVIN	
NP_009564.1	histon H3 [Saccharomyces cerevisiae S288C]	
P07337.1	RecName: Full=Beta-glukozydaza; AltName: Full=Beta-D-glukozyd	
	glukohydrolaza; AltName: Full=Cellobiaza; AltName: Full=Gentiobiaza;	
	Flagi: Prekursor [Kluyveromyces marxianus]	

P84998.1	RecName: Full=Gliceraldehydo-3-fosforan dehydrogenaza 1; Short=GAPDH 1 [Kluwyeromyces marrianus]			
001077.2	RecName: Full=Gliceraldehydo-3-fosforan dehydrogenaza 2:			
2010/7.2	Short=GAPDH 2 [<i>Kluyveromyces marxianus</i>]			
O07288.1	RecName: Full=Dehvdrogenaza alkoholowa 1 [Kluvveromyces marxianus]			
OGN13365.1	YII 171C [Kluvveromvces marxianus]			
OGN13371.1	represywna kwaśna fosfataza [Kluyveromyces marxianus]			
OGN13376.1	białko CWP1 [Kluvveromyces marxianus]			
OGN13380.1	białko CWP1 [Kluvveromyces marxianus]			
OGN13391.1	białko podobne do białka szoku cieplnego SSE1 [Kluvveromvces			
	marxianus]			
QGN13416.1	40S rybosomalne białko S6 [Kluyveromyces marxianus]			
QGN13463.1	przypuszczalna mannozylotransferaza KTR3 [Kluyveromyces marxianus]			
QGN13490.1	białko szoku cieplnego SSC1 [<i>Kluyveromyces marxianus</i>]			
QGN13679.1	40S rybosomalne białko S11 [Kluyveromyces marxianus]			
QGN13715.1	metionylo-tRNA syntetaza [Kluyveromyces marxianus]			
QGN13809.1	peroksyredoksyna tiolowa AHP1 [Kluyveromyces marxianus]			
QGN13820.1	białko RKM4 [Kluyveromyces marxianus]			
QGN13849.1	UPF0508 białko KLLA0A06237g [Kluyveromyces marxianus]			
QGN13899.1	przypuszczalna 1-3-beta-glukanozylotransferaza GAS3 [Kluyveromyces]			
	marxianus]			
QGN13955.1	lizofosfolipaza [Kluyveromyces marxianus]			
QGN13961.1	karboksylaza pirogronianowa 2 [Kluyveromyces marxianus]			
QGN13996.1	endochitynaza [Kluyveromyces marxianus]			
QGN14029.1	dehydrogenaza glicerolu-3-fosforanu [Kluyveromyces marxianus]			
QGN14126.1	S-adenozylometioninowa syntetaza 2 [Kluyveromyces marxianus]			
QGN14138.1	superrodzina SCP [Kluyveromyces marxianus]			
QGN14148.1	hipotetyczne białko FIM1_801 [Kluyveromyces marxianus]			
QGN14161.1	mannoproteina ściany komórkowej PST1 [Kluyveromyces marxianus]			
QGN14245.1	przypuszczalna rodzina 17 glukozydazy SCW11 [Kluyveromyces marxianus]			
QGN14352.1	aminopeptydaza wakuolarna 1 [Kluyveromyces marxianus]			
QGN14381.1	endo-1-3-beta-glukanaza [Kluyveromyces marxianus]			
QGN14439.1	białko wiążące nukleiny GU4 1 [Kluyveromyces marxianus]			
QGN14445.1	ogólny korepresor transkrypcyjny TUP1 [Kluvveromyces marxianus]			
QGN14460.1	łańcuch ciężki klatryny [Kluyveromyces marxianus]			
QGN14549.1	czynnik wymiany nukleotydów SIL1 [Kluyveromyces marxianus]			
QGN14601.1	peroksyredoksyna HYR1 [Kluyveromyces marxianus]			
QGN14661.1	domniemana permeaza zależna od ATP [Kluyveromyces marxianus]			
QGN14723.1	proteinaza asparaginowa 3 [Kluyveromyces marxianus]			
QGN14739.1	lanosteryno-14-alfa demetylaza [<i>Kluyveromyces marxianus</i>]			
QGN14741.1	dysmutaza ponadtlenkowa [Kluyveromyces marxianus]			
QGN14979.1	białko rybosomalne 60S L5 [Kluyveromyces marxianus]			
QGN15105.1	ligaza 1 długołańcuchowych kwasów tłuszczowych-CoA [Kluyveromyces			
	marxianus]			
QGN15116.1	fosfoglukomutaza-2 [Kluyveromyces marxianus]			
QGN15139.1	szaperon transportera wakuolarnego 2 [Kluyveromyces marxianus]			
QGN15150.1	tRNA (cytozyna-5-)-metylotransferaza NCL1 [Kluyveromyces marxianus]			

QGN15164.1	białko SSP120 [Kluyveromyces marxianus]		
QGN15180.1	karbamoilotransferaza ornityny [Kluyveromyces marxianus]		
QGN15396.1	białko AXL2 [Kluyveromyces marxianus]		
QGN15617.1	przypuszczalna glukozydaza SCW10 z rodziny 17 [Kluyveromyces		
	[marxianus]		
QGN15635.1	eukariotyczny czynnik inicjacji translacji 2A [Kluyveromyces marxianus]		
QGN15799.1	białko oporne na toksyny MRAKII hansenula [Kluyveromyces marxianus]		
QGN15852.1	przypuszczalna aminopeptydaza Xaa-Pro [Kluyveromyces marxianus]		
QGN15883.1	izomeraza triozofosforanu [Kluyveromyces marxianus]		
QGN15954.1	syntetaza glutaminyl-tRNA [Kluyveromyces marxianus]		
QGN16042.1	chaperon transportera wakuolarnego 4 [Kluyveromyces marxianus]		
QGN16044.1	przypuszczalna glikozydaza CRH1 [Kluyveromyces marxianus]		
QGN16130.1	białko OM45 [Kluyveromyces marxianus]		
QGN16196.1	białko rybosomalne 60S L6-B [Kluyveromyces marxianus]		
QGN16280.1	podjednostka beta syntazy kwasów tłuszczowych [Kluyveromvces		
	marxianus]		
QGN16333.1	białko rybosomalne 40S S18 [Kluyveromyces marxianus]		
QGN16397.1	(2R-3R)-2-3-dehydrogenaza butanodiolu [Kluyveromyces marxianus]		
QGN16470.1	białko podobne do białka sec sixty one [Kluyveromyces marxianus]		
QGN16516.1	białko wiążące GTP GSP2 [Kluyveromyces marxianus]		
QGN16556.1	aminotransferaza ornityny [Kluyveromyces marxianus]		
QGN16589.1	białko ściany komórkowej CWP1 [Kluyveromyces marxianus]		
QGN16626.1	mannoproteina ściany komórkowej HSP150 [Kluyveromyces marxianus]		
QGN16662.1	białko RPS10A [Kluyveromyces marxianus]		
QGN16686.1	białko jąderkowe 56 [Kluyveromyces marxianus]		
QGN16716.1	zależny od ATP chaperon cząsteczkowy HSC82 [Kluvveromvces]		
	[marxianus]		
QGN16738.1	czynnik przeżycia 1 [Kluyveromyces marxianus]		
QGN16757.1	izomeraza mannozo-6-fosforanu [Kluyveromyces marxianus]		
QGN16775.1	syntaza 2-izopropylomalanu [Kluyveromyces marxianus]		
QGN16790.1	katalaza T [Kluyveromyces marxianus]		
QGN16799.1	syntetaza valyl-tRNA [Kluyveromyces marxianus]		
QGN16816.1	białko montażowe v0 1 [Kluyveromyces marxianus]		
QGN16901.1	syntetaza acetylo-koenzymu A 2 [Kluyveromyces marxianus]		
QGN17030.1	składnik acetylotransferazy dihydrolipoyllysyny-reszty kompleksu		
	dehydrogenazy pirogronianowej [Kluyveromyces marxianus]		
QGN17069.1	białko kontrolujące podział komórek 48 [Kluyveromyces marxianus]		
QGN17071.1	zależna od NADPH alfa-ketoamidowa reduktaza [Kluyveromyces		
	marxianus]		
QGN17084.1	karboksylaza acetylo-CoA [Kluyveromyces marxianus]		
QGN17091.1	liaza laktoiloglutationowa [Kluyveromyces marxianus]		
QGN17093.1	podjednostka beta 6-fosfofruktokinazy [Kluyveromyces marxianus]		
QGN17106.1	białko syntezy ściany komórkowej KNH1 [Kluyveromyces marxianus]		
QGN17126.1	kinaza adenozyny [Kluyveromyces marxianus]		
QGN17179.1	acetylo-CoA acetylotransferaza [Kluyveromyces marxianus]		
QGN17296.1	YNL134C [Kluyveromyces marxianus]		
QGN17426.1	alfa-1-2-mannozylotransferaza MNN2 [Kluyveromyces marxianus]		

QUN1/400.1	tioredoksyna-2 [Kluyveromyces marxianus]		
QGN17490.1	dekarboksylaza pirogronianowa [<i>Kluyveromyces marxianus</i>]		
QGN17495.1	białko palca cynkowego ZPR1 [Kluyveromyces marxianus]		
QGN17550.1	białko UTH1 [Kluyveromyces marxianus]		
QGN17579.1	białko flokulacji FLO9 [Kluyveromyces marxianus]		
QGN17626.1	homocysteina S-metylotransferaza 2 [Kluvveromvces marxianus]		
QGN17723.1	leukotrienowa hydrolaza A-4 [<i>Kluvveromyces marxianus</i>]		
QGN17756.1	zuotyna [<i>Kluyveromyces marxianus</i>]		
QGN17888.1	syntetaza glicylo-tRNA 1 [<i>Kluvveromvces marxianus</i>]		
QGN17938.1	40S rybosomalne białko S8 [<i>Kluyveromyces marxianus</i>]		
QGN17972.1	26S proteaza regulacyjna podjednostka 6A [<i>Kluyveromyces marxianus</i>]		
QGN18007.1	syntetaza leucylo-tRNA [Kluyveromyces marxianus]		
QGN18161.1	liaza izocytrynianowa [Kluyveromyces marxianus]		
QGN18423.1	przypuszczalna 2-metylocytrynianowa dehydrataza [Kluyveromyces		
	[marxianus]		
QGN18424.1	syntaza cytrynianowa 3 [Kluyveromyces marxianus]		
RS27A_HUMAN	>sp RS27A_HUMAN		
TRYP_PIG	>sp TRYP_PIG		
XP_002999409.1	niezidentyfikowane białko KLLA0_E17601g [Kluyveromyces lactis]		
XP_022673677.1	eukariotyczny czynnik inicjacji translacji eIF-1 [Kluyveromyces marxianus]		
	DMKU3-1042]		
XP_022673764.1	glukan 1,3-beta-glukozydaza [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022673897.1	rybosomalne białko podjednostki 60S L17 [Kluyveromyces marxianus DMK113-1042]		
XP 022673980.1	enolaza [Kluweromyces marrianus DMKU3-1042]		
XP_022673986.1	dehvdrogenaza 6-fosfoglukonianowa [Kluvveromyces marxianus		
	DMKU3-1042		
XP_022674053.1	binkU3-1042] kinaza fosfoglicerynianowa [<i>Kluyveromyces marxianus</i> DMKU3-1042]		
XP_022674053.1 XP_022674100.1	DMKU3-1042]kinaza fosfoglicerynianowa [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]orotanfosforybozylotransferaza[Kluyveromycesmarxianus		
XP_022674053.1 XP_022674100.1	DMKU3-1042]kinaza fosfoglicerynianowa [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]orotan fosforybozylotransferaza [Kluyveromyces marxianusDMKU3-1042]		
XP_022674053.1 XP_022674100.1 XP_022674125.1	DMKU3-1042]kinaza fosfoglicerynianowa [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]orotan fosforybozylotransferaza [Kluyveromyces marxianusDMKU3-1042]białko PRY1 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022674053.1 XP_022674100.1 XP_022674125.1 XP_022674149.1	DMKU3-1042]kinaza fosfoglicerynianowa [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]orotan fosforybozylotransferaza [Kluyveromyces marxianusDMKU3-1042]białko PRY1 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]podjednostka B kalcyneuryny [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022674053.1 XP_022674100.1 XP_022674125.1 XP_022674149.1 XP_022674175.1	DMKU3-1042]kinaza fosfoglicerynianowa [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]orotan fosforybozylotransferaza [Kluyveromyces marxianusDMKU3-1042]białko PRY1 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]podjednostka B kalcyneuryny [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]kinaza difosforanu nukleozydu [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022674053.1 XP_022674100.1 XP_022674125.1 XP_022674149.1 XP_022674175.1 XP_022674394.1	DMKU3-1042]kinaza fosfoglicerynianowa [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]orotan fosforybozylotransferaza [Kluyveromyces marxianusDMKU3-1042]białko PRY1 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]podjednostka B kalcyneuryny [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]kinaza difosforanu nukleozydu [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko rybosomalne 60S L24 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022674053.1 XP_022674100.1 XP_022674125.1 XP_022674149.1 XP_022674175.1 XP_022674394.1 XP_022674430.1	DMKU3-1042]kinaza fosfoglicerynianowa [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]orotan fosforybozylotransferaza [Kluyveromyces marxianusDMKU3-1042]białko PRY1 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]podjednostka B kalcyneuryny [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]kinaza difosforanu nukleozydu [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko rybosomalne 60S L24 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko rybosomalne S27 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022674053.1 XP_022674100.1 XP_022674125.1 XP_022674149.1 XP_022674175.1 XP_022674394.1 XP_022674430.1 XP_022674470.1	DMKU3-1042]kinaza fosfoglicerynianowa [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]orotan fosforybozylotransferaza [Kluyveromyces marxianusDMKU3-1042]białko PRY1 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]podjednostka B kalcyneuryny [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]kinaza difosforanu nukleozydu [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko rybosomalne 60S L24 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko rybosomalne S27 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko BMH2 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022674053.1 XP_022674100.1 XP_022674125.1 XP_022674149.1 XP_022674175.1 XP_022674394.1 XP_022674430.1 XP_022674470.1 XP_022674470.1	DMKU3-1042]kinaza fosfoglicerynianowa [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]orotan fosforybozylotransferaza [Kluyveromyces marxianusDMKU3-1042]białko PRY1 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]podjednostka B kalcyneuryny [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]kinaza difosforanu nukleozydu [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko rybosomalne 60S L24 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko rybosomalne S27 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko BMH2 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]adenylan kinaza 1 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022674053.1 XP_022674100.1 XP_022674125.1 XP_022674149.1 XP_022674175.1 XP_022674394.1 XP_022674430.1 XP_022674470.1 XP_022674501.1 XP_022674501.1	DMKU3-1042]kinaza fosfoglicerynianowa [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]orotan fosforybozylotransferaza [Kluyveromyces marxianusDMKU3-1042]białko PRY1 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]podjednostka B kalcyneuryny [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]kinaza difosforanu nukleozydu [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko rybosomalne 60S L24 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko rybosomalne S27 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko BMH2 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko BMH2 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko BMH2 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko BMH2 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022674053.1 XP_022674100.1 XP_022674125.1 XP_022674149.1 XP_022674175.1 XP_022674394.1 XP_022674430.1 XP_022674470.1 XP_022674470.1 XP_022674501.1 XP_022674504.1 XP_022674573.1	DMKU3-1042]kinaza fosfoglicerynianowa [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]orotan fosforybozylotransferaza [Kluyveromyces marxianusDMKU3-1042]białko PRY1 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]podjednostka B kalcyneuryny [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]kinaza difosforanu nukleozydu [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko rybosomalne 60S L24 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko rybosomalne S27 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko BMH2 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko BMH2 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko BMH2 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko H2B.1 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]łańcuch lekki miozyny 1 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022674053.1 XP_022674100.1 XP_022674125.1 XP_022674149.1 XP_022674175.1 XP_022674394.1 XP_022674394.1 XP_022674430.1 XP_022674470.1 XP_022674501.1 XP_022674504.1 XP_022674573.1 XP_022674598.1	DMKU3-1042]kinaza fosfoglicerynianowa [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]orotan fosforybozylotransferaza [Kluyveromyces marxianusDMKU3-1042]białko PRY1 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]podjednostka B kalcyneuryny [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]kinaza difosforanu nukleozydu [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko rybosomalne 60S L24 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko rybosomalne 827 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko BMH2 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko BMH2 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko BMH2 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko rybosomalne 827 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko BMH2 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko BMH2 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko rybosomalne 827 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko BMH2 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko rybosomalne 827 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko rybosomalne 827 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko rybosomalne 827 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022674053.1 XP_022674100.1 XP_022674125.1 XP_022674149.1 XP_022674175.1 XP_022674394.1 XP_022674394.1 XP_022674470.1 XP_022674470.1 XP_022674501.1 XP_022674504.1 XP_022674598.1 XP_022674618.1	DMKU3-1042]kinaza fosfoglicerynianowa [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]orotan fosforybozylotransferaza [Kluyveromyces marxianusDMKU3-1042]białko PRY1 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]podjednostka B kalcyneuryny [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]kinaza difosforanu nukleozydu [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko rybosomalne 60S L24 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko rybosomalne S27 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko BMH2 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko BMH2 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]histon H2B.1 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko rybosomalne 40S S2 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko rybosomalne 40S S2 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022674053.1 XP_022674100.1 XP_022674125.1 XP_022674149.1 XP_022674175.1 XP_022674394.1 XP_022674394.1 XP_022674430.1 XP_022674470.1 XP_022674501.1 XP_022674504.1 XP_022674573.1 XP_022674598.1 XP_022674618.1 XP_022674635.1	DMKU3-1042]kinaza fosfoglicerynianowa [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]orotan fosforybozylotransferaza [Kluyveromyces marxianusDMKU3-1042]białko PRY1 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]podjednostka B kalcyneuryny [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]kinaza difosforanu nukleozydu [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko rybosomalne 60S L24 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko rybosomalne 527 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko BMH2 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko rybosomalne S27 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]histon H2B.1 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko rybosomalne 40S S2 [Kluyveromyc		
XP_022674053.1 XP_022674100.1 XP_022674125.1 XP_022674149.1 XP_022674175.1 XP_022674394.1 XP_022674394.1 XP_022674430.1 XP_022674470.1 XP_022674501.1 XP_022674504.1 XP_022674598.1 XP_022674598.1 XP_022674618.1 XP_022674635.1	DMRU3-1042]kinaza fosfoglicerynianowa [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]orotan fosforybozylotransferaza [Kluyveromyces marxianusDMKU3-1042]białko PRY1 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]podjednostka B kalcyneuryny [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]kinaza difosforanu nukleozydu [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko rybosomalne 60S L24 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko rybosomalne 527 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko BMH2 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko rybosomalne S27 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]histon H2B.1 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko rybosomalne 40S S2 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko rybosomalne 405 S2 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko rybosomalne 405 S2 [Kluyveromyc		
XP_022674053.1 XP_022674100.1 XP_022674125.1 XP_022674149.1 XP_022674175.1 XP_022674394.1 XP_022674394.1 XP_022674430.1 XP_022674470.1 XP_022674501.1 XP_022674504.1 XP_022674598.1 XP_022674618.1 XP_022674635.1 XP_022674667.1	DMKU3-1042]kinaza fosfoglicerynianowa [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]orotan fosforybozylotransferaza [Kluyveromyces marxianusDMKU3-1042]białko PRY1 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]podjednostka B kalcyneuryny [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]kinaza difosforanu nukleozydu [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko rybosomalne 60S L24 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko rybosomalne 827 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko rybosomalne S27 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko rybosomalne 40S S2 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko rybosomalne 40S S2 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko rybosomalne 60S L11 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko rybosomalne 60S L11 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022674053.1 XP_022674100.1 XP_022674125.1 XP_022674149.1 XP_022674175.1 XP_022674394.1 XP_022674394.1 XP_022674430.1 XP_022674470.1 XP_022674501.1 XP_022674504.1 XP_022674573.1 XP_022674618.1 XP_022674618.1 XP_022674667.1 XP_022674667.1	DMKU3-1042]kinaza fosfoglicerynianowa [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]orotan fosforybozylotransferaza [Kluyveromyces marxianusDMKU3-1042]białko PRY1 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]podjednostka B kalcyneuryny [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]kinaza difosforanu nukleozydu [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko rybosomalne 60S L24 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko rybosomalne 527 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko rybosomalne S27 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko rybosomalne 40S S2 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko rybosomalne 40S S2 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko rybosomalne 60S L11 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022674053.1 XP_022674100.1 XP_022674125.1 XP_022674149.1 XP_022674175.1 XP_022674394.1 XP_022674394.1 XP_022674430.1 XP_022674470.1 XP_022674501.1 XP_022674504.1 XP_022674598.1 XP_022674635.1 XP_022674667.1 XP_022674667.1	DMKU3-1042]kinaza fosfoglicerynianowa [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]orotan fosforybozylotransferaza [Kluyveromyces marxianusDMKU3-1042]białko PRY1 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]podjednostka B kalcyneuryny [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]kinaza difosforanu nukleozydu [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko rybosomalne 60S L24 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko rybosomalne 827 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko BMH2 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko rybosomalne S27 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko BMH2 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko rybosomalne 827 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko BMH2 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko rybosomalne 827 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko rybosomalne 827 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko rybosomalne 828 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko rybosomalne 408 S2 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko rybosomalne 60S L11 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022674053.1 XP_022674100.1 XP_022674125.1 XP_022674149.1 XP_022674175.1 XP_022674394.1 XP_022674394.1 XP_022674430.1 XP_022674470.1 XP_022674501.1 XP_022674504.1 XP_022674573.1 XP_022674573.1 XP_022674618.1 XP_022674635.1 XP_022674667.1 XP_022674671.1 XP_022674815.1	DMKU3-1042]kinaza fosfoglicerynianowa [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]orotan fosforybozylotransferaza [Kluyveromyces marxianusDMKU3-1042]białko PRY1 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]podjednostka B kalcyneuryny [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]kinaza difosforanu nukleozydu [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko rybosomalne 60S L24 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko rybosomalne 527 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko BMH2 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko rybosomalne S27 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko rybosomalne S27 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko BMH2 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko rybosomalne S27 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko rybosomalne S27 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko rybosomalne S27 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko rybosomalne 60S L11 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko rybosomalne 60S S26-A [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]białko rybosomalne 40S S26-A [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		

XP_022675056.1	białko rybosomalne 40S S3 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022675214.1	białko rybosomalne 60S L14-B [<i>Kluyveromyces marxianus</i> DMKU3-1042]		
XP_022675261.1	białko wiążące nukleotydy guaniny podjednostka beta-podobne białko		
	[Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022675419.1	prawdopodobna glikozydaza CRH2 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022675757.1	ketol-kwas reduktoizomeraza [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022675760.1	transaldolaza [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022675790.1	białko rybosomalne 60S L12 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022675813.1	adenozylohomocysteinaza [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022675950.1	białko szoku cieplnego 104 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022675953.1	dehydrogenaza alkoholowa 1 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022675966.1	oksydaza koproporfirynogenu III [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022675973.1	syntetaza lizyl-tRNA [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022675979.1	białko szoku cieplnego 26 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022676039.1	białko rybosomalne 40S S28 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022676183.1	fosforybozylotransferaza ATP [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022676233.1	aldolaza fruktozo-bisfosforanowa [<i>Kluyveromyces marxianus</i> DMKU3-1042]		
XP_022676401.1	mała powłoka COPII GTPaza SAR1 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022676419.1	peroksyredoksyna TSA1 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022676469.1	dehydrogenaza alkoholowa [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022676483.1	białko rybosomalne 40S S12 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022676639.1	40S białko rybosomalne S1 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022676663.1	60S białko rybosomalne L26-B [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022676687.1	czynnik cytozolowy SEC14 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022676836.1	czynnik transportu jądrowego 2 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022676918.1	deoksyurydyno-5'-trifosforan nukleotydohydrolaza [<i>Kluyveromyces</i> marxianus DMKU3-1042]		
XP_022676932.1	60S białko rybosomalne L2 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022676959.1	peptydylo-prolilowa cis-trans izomeraza [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022676961.1	asparaginian-semialdehyd dehydrogenaza [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022677010.1	ubikwityna-40S rybosomalne białko S27a [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022677107.1	białko PET10 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022677154.1	40S rybosomalne białko S0 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022677215.1	nieorganiczna pirofosfataza [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022677235.1	podjednostka d syntazy ATP [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022677251.1	dehydrogenaza jabłczanowa [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022677308.1	cytochrom b5 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022677375.1	łańcuch alfa syntetazy fenyloalanylo-tRNA [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022677387.1	białko rybosomalne 40S S20 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		

XP_022677492.1	dehydrogenaza dihydrolipoylowa [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022677496.1	niezidentyfikowane białko KLMA_60424 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022677509.1	białko rybosomalne 40S S5 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022677513.1	podjednostka gamma czynnika inicjacji translacji eukariotycznej 2		
	[Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022677574.1	czynnik rybozylacji ADP [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022677598.1	białko rybosomalne 60S L16-A [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022677606.1	białko rybosomalne 60S L9-B [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022677614.1	białko wydzielane protoplastu 2 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022677657.1	białko rybosomalne 60S L10 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022677674.1	łańcuch beta tubuliny [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022677699.1	guanylotransferaza mannozo-1-fosforanu [<i>Kluyveromyces marxianus</i> DMKU3-1042]		
XP_022677729.1	eukariotyczny czynnik inicjacji translacji 5 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022677754.1	podjednostka alfa syntazy ATP [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022677762.1	białko rybosomalne 60S L32 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022677796.1	(DL)-glicerol-3-fosfataza 1 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022677840.1	niezidentyfikowane białko KLMA_70227 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022677905.1	białko rybosomalne 40S S23 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022677940.1	białko chromosomalne niehistonowe 6 [Kluyveromyces marxianus DMK113-1042]		
XP_022677941.1	antygen jądrowy proliferujących komórek [Kluyveromyces marxianus		
VD 022677061 1	DMKU3-1042] higher mhasamalna 605 L 10 [Klunnanamusas marnianus DMKU2 1042]		
AP_022077901.1	białko rydosomalne bus L19 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
AF_022078048.1	[<i>Kluyveromyces marxianus</i> DMKU3-1042]		
XP_022678110.1	białko wiążące FK506 1 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022678116.1	dehydrogenaza gliceraldehydu-3-fosforanu 3 [<i>Kluyveromyces marxianus</i> DMKU3-1042]		
XP_022678193.1	podjednostka dehydrogenazy izocytrynianowej [NAD] 1 [Kluyveromyces		
	marxianus DMKU3-1042]		
XP_022678217.1	białko błony zewnętrznej mitochondrialnej poryna 1 [Kluyveromyces]		
	marxianus DMKU3-1042]		
XP_022678274.1	białko rybosomalne 40S S7-A [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022678340.1	kalmodulina [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022678343.1	syntaza spermidyny [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022678358.1	czynnik elongacji 1-alfa [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022678383.1	deaminaza cytozyny [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022678396.1	metylotransferaza 5-metylotetrahydropteroyltriglutaminianowej homocysteiny [<i>Kluyveromyces marxianus</i> DMKU3-1042]		
XP_022678414.1	białko szoku cieplnego SSA3 [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]		
XP_022678452.1	dehydrogenaza bursztynianowa [ubichinon] podjednostka		
VD 022679457 1	zerazowo-siarkowa [<i>Kiuyveromyces marxianus</i> DMKU3-1042]		
AF_0220/843/.1	Utarko rybosomanie obs Lo-B [Kiuyveromyces marxianus DMKU3-1042]		

XP_451869.1	białko rybosomalne 40S S14 [Kluyveromyces lactis]
XP_454176.1	białko rybosomalne 40S S29 [Kluyveromyces lactis]

Załącznik 3. Proteazy EVs-VIO, znalezione wśród 932 białek wspólnych, 3 niezależnych hodowli tego szczepu, łącznie 77 proteaz.

Numer identyfikacyjny białka w	Nazwa białka
NCBI	unalina aligourante dana highta na dainna unante dana
EZP35445.1; WP_200875071.1	profina ofigopeptydaza białko rodzinne; peptydaza
EZD29021 1. TNC74560 1.	Touzilly 39
EZF 58051.1; TNC /4500.1;	redziny M2
WP_070237802.1; WP_072437409.1;	
WP_128140921.1, WP_225279057.1, WD_221058558 1: WD_225104260 1:	
WD 240043640 1	
EZP30241 1: OEZ64323 1:	pentudaza M23B: aktywator hydrolazy mureiny
SFX10051 1: STR26656 1:	NlpD prekursor: białko lipoporowe NlpD:
WP_034752046_1: WP_034789067_1:	aktywator hydrolazy mureiny NlnD prekursor.
WP_070254075_1: WP_070346494_1:	hiałko rodziny pentydoglikanowej DD-metallo-
WP_071076271_1: WP_072452597_1:	amidonentydazy
WP 128143293 1: WP 139090092 1:	unidopoptyduży
WP 166449196.1; WP 176386276.1	
EZP41083.1; KHA75948.1;	hipotetyczne białko BW37 01032 / NC77 26160 /
OFJ47186.1; QKY06044.1;	BA896_022390 / G3257_15595 / FHI69_00500;
TNC79081.1; WP_070254466.1;	peptydaza rodziny S1
WP_072453666.1; WP_092604864.1;	
WP_128089305.1; WP_128141616.1;	
WP_166448680.1; WP_223278700.1;	
WP_231958252.1; WP_235194181.1;	
WP_240317731.1; WP_244965215.1	
EZP42030.1; SFY05987.1;	oligopeptydaza A; oligopeptydaza A;
STR26152.1; TNC76157.1	metalopeptydaza rodziny M3
KHA76869.1; OHV95206.1;	peptydaza M19; dipeptydaza
WP_115057416.1; WP_128140498.1;	
WP_139090111.1; WP_139174753.1;	
WP_139248353.1; WP_152546496.1;	
WP_152615293.1; WP_166449606.1;	
WP_176381936.1; WP_211551605.1	
KHA79982.1; OHV97357.1;	peptydaza serynowa; serynowa endoproteaza
WP_051991010.1; WP_052139952.1;	rodziny DegQ
WP_070255333.1; WP_072452887.1;	
WP_081344519.1; WP_128142575.1;	
WP_139089826.1; WP_166448067.1	

KHA80430.1; OHV98805.1;	peptydaza rodziny S9; dipeptydylo
QKY06292.1; SFY30746.1;	aminopeptydaza/acylaminoacyl peptydaza;
STR25432.1; TNC77168.1;	prekursora peptydazy tri-prolinowej; białko
WP_070254893.1; WP_072457377.1;	hipotetyczne
WP_128143201.1; WP_176386333.1;	
WP_222838423.1; WP_223278857.1;	
WP_231958624.1; WP_235194137.1;	
WP_240317568.1; WP_240943453.1;	
WP_242428244.1; WP_244965331.1	
OHV95259.1; WP_071079046.1	peptydaza M13; metalopeptydaza rodziny M13
OHV96828.1; QKY06033.1;	prolina endopeptydaza; peptydaza rodziny S9;
WP_115057479.1; WP_128139395.1;	serynowa peptydaza rodziny proliny
WP_139091809.1; WP_139248278.1;	oligopeptydazy
WP_152546435.1; WP_152615171.1;	
WP_170840491.1; WP_205711460.1;	
WP_211549394.1	
OHV98876.1; WP_071075763.1	dipeptydylo aminopeptydaza/acylaminoacyl-
	peptydaza; peptydaza rodziny S9
OHV99167.1; WP_081344375.1	proteaza 2; peptydaza rodziny S9
QKY01582.1	serynowa peptydaza rodziny S8
QKY05800.1; WP_070258533.1;	serynowa endopeptydaza rodziny Do
WP_072455825.1; WP_176374496.1	
QKY06248.1; WP_205412510.1;	metaloproteaza cynkowa
WP_211548215.1; WP_217495237.1	
SFX18540.1; STR27330.1;	prolina oligopeptydaza; prolina endopeptydaza;
WP_175560445.1; WP_181878062.1	serynowa peptydaza rodziny proliny
	oligopeptydazy
SFX93284.1; TNC77056.1;	hipotetyczne białko SAMN03097694_3819; białko
WP_072455007.1; WP_223278879.1	rodziny desukcynylaze/glutaminowe
	desuccinylaze/karboksylopeptydaza
	ASPARTOAselaza; metalopeptydaza rodziny M14
STQ92967.1; WP_181877929.1	białko translokacyjne TolB; peptydaza rodziny S9
STQ93570.1; TNC77710.1;	obojętna endopeptydaza; metalopeptydaza rodziny
WP_223278829.1	M13
STQ93990.1; WP_034753865.1;	prekursora peptydazy tri-Prolinowej; peptydaza
WP_034780920.1; WP_070257798.1;	rodziny S9; serynowa peptydaza rodziny proliny
WP_071075008.1; WP_072457422.1;	oligopeptydazy
WP_139092021.1; WP_166448579.1;	
WP_176374378.1; WP_176381325.1;	
WP_211552185.1	
STR18323.1; WP_034783521.1;	peptydaza przetwarzająca C-terminus; peptydaza
WP_051991357.1; WP_070258587.1;	rodziny S41
WP_072455787.1; WP_139091427.1;	

WP_166445961.1; WP_176374508.1;	
WP_176381574.1; WP_211548952.1	
STR18644.1; WP_128141401.1;	przewidywana proteaza z domeną PDZ na końcu
WP_240943690.1	C-terminalnym; metalopeptydaza rodziny M61
STR25721.1; TNC77195.1;	przypuszczalna serynowa proteaza HtrA; serynowa
WP_128143225.1; WP_223278875.1	proteaza; proteaza serynowa rodziny S1C
STR26079.1; WP_034747230.1;	aminopeptydaza N; metalopeptydaza rodziny M1
WP_071075703.1	
STR27488.1	aminopeptydaza argininowa
TNC72565.1; WP_189396722.1	peptydaza rodziny S9
TNC77202.1; WP_223278880.1	metaloproteaza cynkowa
WP_010393154.1; WP_034749404.1;	metalopeptydaza rodziny M48
WP_034784685.1; WP_070254356.1;	
WP_071079539.1; WP_166448131.1;	
WP_176381779.1	
WP_010401483.1; WP_035822333.1	cytozolowa karboksylopeptydaza typu M14
WP_010401848.1; WP_034745584.1;	peptydaza rodziny S46
WP_034778896.1; WP_070254752.1;	
WP_128141667.1; WP_166446559.1;	
WP_176385816.1	
WP_029496285.1	peptydaza rodziny S9
WP_034748503.1; WP_071077442.1;	metalopeptydaza rodziny M13
WP_072453712.1; WP_205711463.1	
WP_034751007.1; WP_034787304.1	endopeptydaza La
WP_034751540.1; WP_034782204.1;	aminopeptydaza leucynowa
WP_072454512.1	
WP_034751575.1	podjednostka ATP-zależnej proteazy ClpA
WP_034752897.1; WP_034783717.1;	prolina aminopeptydaza
WP_070258411.1; WP_070346021.1;	
WP_071079927.1; WP_072455924.1;	
WP_128140939.1; WP_139091347.1;	
WP_166446047.1	
WP_034753065.1; WP_034783551.1	podjednostka HslV ATP-zależnej proteazy
WP_034753163.1; WP_034783265.1;	metalopeptydaza rodziny M1;
WP_070259943.1; WP_070345922.1;	aminopeptydaza/hydrolaza rodziny M1
WP_072457716.1; WP_211552320.1	
WP_034754313.1; WP_071075112.1	karboksylopeptydaza D-alanylo-D-alanylow
WP_034757284.1; WP_034782876.1;	peptydaza sygnałowa I
WP_035817675.1; WP_070259080.1;	
WP_070346953.1; WP_071077989.1;	
WP_166447773.1; WP_176375297.1;	
WP_176382949.1; WP_211547409.1	

WP_034779135.1	serynowa peptydaza rodziny proliny
	oligopeptydazy
WP_034783705.1; WP_070258425.1;	peptydaza rodziny M13
WP_070279981.1; WP_176374466.1	
WP_034783771.1; WP_070258375.1;	białko rodziny aminopeptydazy P
WP_139091329.1; WP_176374450.1;	
WP_176381478.1	
WP_034785509.1; WP_070260283.1;	peptydaza rodziny S9
WP_176376239.1; WP_176385128.1;	
WP_211550940.1	
WP_034789119.1; WP_139089978.1;	cytozolowa karboksylopeptydaza typu M14
WP_166449173.1; WP_176376222.1	
WP_051990851.1	peptydaza rodziny S9
WP_051991359.1	metalopeptydaza rodziny M14
WP_070254569.1; WP_071075445.1;	białko rodziny peptydazy Xaa-Pro
WP_211548250.1	
WP_070254756.1	peptydaza rodziny M14
WP_070254820.1	metalopeptydaza rodziny M20
WP_070258958.1	metalopeptydaza rodziny M56
WP_070259875.1	serynowa peptydaza rodziny S8
WP_070346386.1	peptydaza rodziny S9
WP_071075155.1	metalopeptydaza rodziny M20
WP_071079808.1	metalopeptydaza rodziny M14
WP_071079917.1	peptydaza rodziny M13
WP_072455499.1	peptydaza rodziny S9
WP_072457298.1	peptydaza rodziny M14
WP_128140592.1; WP_139092017.1	metalopeptydaza rodziny M3
WP_128142051.1	aminopeptydaza N
WP_128142136.1	peptydaza rodziny S9
WP_128142160.1	peptydaza rodziny S41
WP_139089785.1	serynowa peptydaza rodziny proliny
	oligopeptydazy
WP_139091038.1	peptydaza rodziny S9
WP_166446345.1	metalopeptydaza rodziny M4
WP_166448559.1	peptydaza rodziny S9
WP_166448574.1	metalopeptydaza rodziny M3
WP_166448930.1	peptydaza rodziny S9
WP_166449361.1	aminopeptydaza N
WP_175560535.1; WP_181878025.1;	metalopeptydaza rodziny M3
WP_189396608.1; WP_200872980.1;	
WP_205711586.1; WP_211547888.1	
WP_176374374.1	metalopeptydaza rodziny M3
WP_176376642.1	peptydaza rodziny M14

WP_176381739.1	serynowa peptydaza rodziny S8
WP_176385307.1	peptydaza rodziny S41
WP_211550600.1	serynowa peptydaza rodziny proliny
	oligopeptydazy
WP_217653672.1	metaloproteaza cynkowa
WP_219887357.1	serynowa peptydaza rodziny S8

Załącznik 4. Obraz kultur mieszanych, komórek prawidłowych i nowotworowych, po 168-h hodowli w obecności EVs drożdżowych w odniesieniu do kontroli nietraktowanych pęcherzykami zewnątrzkomórkowymi. Skala 100 µm. Obraz oryginalny (bez kolorowych podświetleń) w stosunku do Rys. 43.

