

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory  
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Barbora Heřmánková**

Vliv Toll-like receptorů na imunomodulační funkce mezenchymálních  
kmenových buněk

The influence of Toll-like receptors on immunomodulatory  
properties of mesenchymal stem cells

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Školitel: RNDr. Magdaléna Krulová, Ph.D.

Praha, 2012

**Poděkování:**

Poděkování patří mé školitelce RNDr. Magdaléně Krulové, Ph.D. za věnovaný čas, trpělivost a odborné vedení při zpracování mé bakalářské práce. Ráda bych také poděkovala své rodině za podporu při psaní této práce.

**Prohlášení:**

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

V Praze dne 9. 5. 2012

.....

## **Abstrakt**

Mezenchymální kmenové buňky (mesenchymal stem cells, MSCs) mají díky svým imunomodulačním vlastnostem velký potenciál v buněčné regenerativní léčbě a imunoterapii. MSCs exprimují řadu Toll-like receptorů (TLRs) rozpoznávajících typické molekulární struktury patogenů (patogen-associated molecular patterns, PAMPs), které se mohou nacházet v organismu, kam jsou MSCs terapeuticky aplikovány, a ovlivnit tak jejich chování. Navázání ligandů na TLRs může pozměnit proliferaci, diferenciaci, imunosupresivní vlastnosti, migraci, polarizaci a produkci cytokinů MSCs. Tato práce se proto zabývá vlivem TLRs na imunomodulační vlastnosti MSCs, jelikož v současné době není na základě rozdílných výsledků různých experimentů zcela jasné, jakým způsobem dokáže aktivace TLRs MSCs ovlivnit.

## **Klíčová slova**

imunomodulace, mezenchymální kmenové buňky, Toll-like receptory, buněčná imunoterapie

## **Abstract**

Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells (MSCs) offer potential tools for cell-based regenerative therapy and immunotherapy. MSCs express a large number of Toll-like receptors (TLRs) recognizing multiple pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), which could be found in patients microenvironment and modulate activity of MSCs. TLR ligands could lead to modulation of proliferation, differentiation, immunosuppression, migration, polarization and production of cytokine. This work discusses the effect of TLRs on immunomodulatory properties of MSCs, because there are lots of contrasts in the results about their effect.

## **Key words**

immunomodulation, mesenchymal stem cells, Toll-like receptors, cell-based immunotherapy

## Obsah

<b>Seznam použitých zkratk</b> .....	5
<b>1. Úvod</b> .....	7
<b>2. Mezenchymální kmenové buňky</b> .....	7
2.1. Imunomodulační vlastnosti MSCs.....	8
<b>3. Toll-like receptory</b> .....	10
3.1. Signalizace TLRs.....	12
<b>4. Exprese TLRs MSCs</b> .....	14
4.1. Vliv TLRs na proliferaci MSC.....	14
4.2. Vliv TLRs na diferenciaci MSCs.....	14
4.3. Vliv TLRs na imunosupresivitu MSCs.....	15
4.4. Vliv TLRs na migraci MSCs.....	17
4.5. Vliv TLRs na polarizaci MSCs.....	19
4.6. Vliv TLRs a zánětlivého prostředí na produkci cytokinů MSCs.....	21
<b>5. Vliv TLRs na terapeutické využití MSCs</b> .....	22
<b>6. Závěr</b> .....	24
<b>Seznam použité literatury</b> .....	25

## Seznam použitých zkratek

AD-MSCs	adipose derived-mesenchymal stem cells, MSCs izolované z tukové tkáně
bFGF	basic fibroblast growth factor, základní růstový faktor fibroblastů
BM-MSCs	bone marrow-mesenchymal stem cells, MSCs izolované z kostní dřeně
CCL5	chemokine C-C motif ligand 5, chemokinový ligand 5 s C-C motivem
CD	cluster of differentiation, diferenciační antigen
CXCR4	C-X-C chemokine receptor type 4, C-X-C chemokinový receptor 4
dsRNA	double-stranded RNA, dvouvláknová RNA
GVHD	graft-versus-host disease, reakce štěpu proti hostiteli
HSP	heat-shock protein, protein teplotního šoku
IDO	indoleamine 2,3-dioxygenase, indolamin 2,3-dioxygenáza
IFN- $\beta$	interferon $\beta$
Ig M	immunoglobulin M, imunoglobulin M
IGF-1	inzulin-like growth factor 1, růstový faktor podobný inzulinu
IL-10	interleukin 10
INF- $\gamma$	interferon $\gamma$
IRF-3	interferon regulatory factor, regulační faktor pro interferon
LPS	lipopolysaccharide, lipopolysacharid
Mal	MyD88 adaptor like protein
MD-2	myeloid differentiation protein 2, myeloidní diferenciační protein 2
MDC	macrophage-derived chemokine, chemokin odvozený od makrofágů
MHC I	major histocompatibility complex class I, hlavní histokompatibilní komplex I. třídy
MLR	mixed lymphocyte reaction, směsná lymfocytární reakce
MMP-2	matrix metalloproteinase 2, matrixová metaloproteináza 2
mRNA	messenger RNA, mediátorová RNA
MSCs	mesenchymal stem cells, mezenchymální kmenové buňky
MyD88	Myeloid differentiation primery response protein 88
PAMPs	patogen-associated molecular patterns, typické molekulární struktury patogenů
PDGF	platelet derived growth factor, růstový faktor z krevních destiček
PGE2	prostaglandin E2
PGN	peptidoglycan, peptidoglykan
poly (I:C)	polyinosinic:polycytidylic acid, polyinosinová:polycytidylová kyselina

SARM	sterile $\alpha$ and Heat-armadillo motifs
SDF-1	stromal-derived factor-1, chemokín odvozený od stromálních buněk
SMAD3	mothers against decapentaplegic homolog 3
STAT1	signal transducer and activator of transcription type 1
TDO2	tryptophan 2,3-dioxygenase, tryptofan 2,3-dioxygenáza
TGF- $\beta$	transforming growth factor, transformující růstový faktor $\beta$
T <sub>H</sub>	T helper cells, pomocné T buňky
TIR	Toll/interleukin-1 receptor
TIRAP	Toll/interleukin-1 domain-containing adaptor protein
TLRs	Toll-like receptors, Toll-like receptory
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor $\alpha$ , tumor nekrotizující faktor $\alpha$
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing ligand
TRAM	TRIF-related adaptor molecule
T <sub>Reg</sub>	T regulatory cells, regulační T buňky
TRIF	TIR domain-containing adaptor protein inducing IFN- $\beta$
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1, adhezní molekula 1 vaskulárních buněk

## 1. Úvod

Mezenchymální kmenové buňky (mesenchymal stem cells, MSCs) byly poprvé izolovány z kostní dřeně Friedensteinem a kol., od té doby bylo publikováno mnoho experimentů zabývajících se jejich vlastnostmi a chováním.

MSCs byly popsány jako multipotentní kmenové buňky, které se mohou diferencovat na řadu buněčných typů a dají se izolovat z tkání mezodermálního původu, například z tukové tkáně nebo kostní dřeně. Později byla potvrzena i jejich imunologická privilegovanost, jelikož exprimují málo molekul MHC I a žádné MHC II. Jednou z důležitých schopností, která je stále studována, je schopnost imunomodulace, MSCs dokáží inhibovat proliferaci, aktivaci nebo i chemotaxi buněk přirozené i adaptivní imunity. Další výhodou u MSCs je jejich snadná kultivace *in vitro*. Na základě uvedených vlastností jsou MSCs považovány za vhodného kandidáta nejen pro regenerativní terapii ale i léčbu autoimunitních onemocnění. Před jejich finálním uplatněním v léčbě musí být nejdříve důkladně prostudováno prostředí, do kterého budou MSCs aplikovány. V těle pacienta trpícího chronickým zánětem nebo jiným onemocněním se nachází řada faktorů, které mohou zásadně ovlivnit chování MSCs. Z tohoto důvodu se začala pozornost věnovat Toll-like receptorům (TLRs), které jsou exprimovány jak na povrchu, tak v cytoplazmě MSCs a jsou schopné rozpoznat molekulární struktury typické pro různé patogeny (patogen-associated molecular patterns, PAMPs).

Moje práce se zabývá vlivem TLRs na imunomodulační vlastnosti MSCs s přesahem do využití v klinické praxi. První kapitola se věnuje obecně vlastnostem MSCs a zaměřuje se více na jejich schopnost imunomodulace, druhá kapitola popisuje strukturu TLRs, jejich signalizaci a typické ligandy pro jednotlivé receptory. Expresí TLRs MSCs se zabývá kapitola třetí, kde je prostor věnován ovlivnění proliferace, diferenciaci, imunosupresivity, migrace, polarizace a produkce cytokinů MSCs v důsledku kultivace s ligandy TLRs. Závěrečná pátá kapitola ukazuje, jak TLRs dokáží ovlivnit využití MSCs v klinické praxi.

## 2. Mezenchymální kmenové buňky

MSCs jsou multipotentní kmenové buňky, které se nachází v mnoha tkáních mezodermálního původu – například v kostní dřeni, tukové tkáni nebo pupečnickové krvi. Největší množství MSCs se nachází i přes malé procentuální zastoupení (0,1 – 0,001 %) v kostní dřeni (Glennie et al. 2005; Spaggiari et al. 2006), kde produkcí cytokinů a růstových faktorů působí na hematopoetické kmenové buňky a následně i na hematopoézu (Wang et al. 2012). Z kostní dřeně nebo jiných míst výskytu mohou MSCs migrovat do poškozených tkání

a nahradit tam zasažené buňky (Ponte et al. 2007). MSCs jsou schopné se diferencovat na mnoho buněčných typů – například na chondrocyty, adipocyty, osteoblasty nebo kardiomyocyty (Dominici et al. 2006; Toma et al. 2002).

Pro MSCs zatím nebyl nalezen žádný typický povrchový marker, proto jsou stanovovány hlavně podle definice Mezinárodní společnosti pro buněčnou terapii. Podle této definice jsou MSCs určovány třemi kritérii, prvním kritériem je adhezivnost k plastu za standardních kultivačních podmínek. Druhé kritérium se vztahuje k expresi povrchových membránových molekul (cluster of differentiation, CD). MSCs musí exprimovat CD105, CD73 a CD90, naopak by u nich nemělo docházet k expresi markerů typických pro hematopoetické kmenové buňky – CD34 nebo CD11b, CD79 $\alpha$  nebo CD19. Poslední, třetí podmínkou je schopnost diferenciaci na osteoblasty, adipocyty a chondrocyty (Dominici et al. 2006).

MSCs exprimují za normálních podmínek na svém povrchu málo molekul hlavního histokompatibilního komplexu I. třídy (major histocompatibility complex class I, MHC I) a žádné glykoproteiny MHC II. třídy. Na jejich povrchu také nenalezneme kostimulační molekuly CD40, CD80 a CD86. Pokud jsou stimulovány interferonem  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), dochází ke zvýšení produkce obou MHC molekul, ale exprese kostimulačních receptorů zůstává stále nulová (Le Blanc et al. 2003). Tento fakt umožňuje MSCs využít v alogenních transplantacích bez nutnosti imunoprese, jelikož nedochází k aktivaci autoreaktivních T buněk (Aggarwal and Pittenger 2005).

Regulace rovnováhy mezi proliferací MSCs a jejich schopností se diferencovat na různé buněčné typy je důležitým faktorem pro jejich správnou funkci. Porušení regulace tohoto poměru může způsobit nadměrnou diferenciaci a následné vyčerpání MSCs nebo přílišnou proliferaci, která může vést k mutagenezi, případně vzniku tumoru. Pochopení mechanismu regulace obou dějů je proto důležité pro terapeutické využití MSCs (Pevsner-Fischer et al. 2007).

## **2.1. Imunomodulační vlastnosti MSCs**

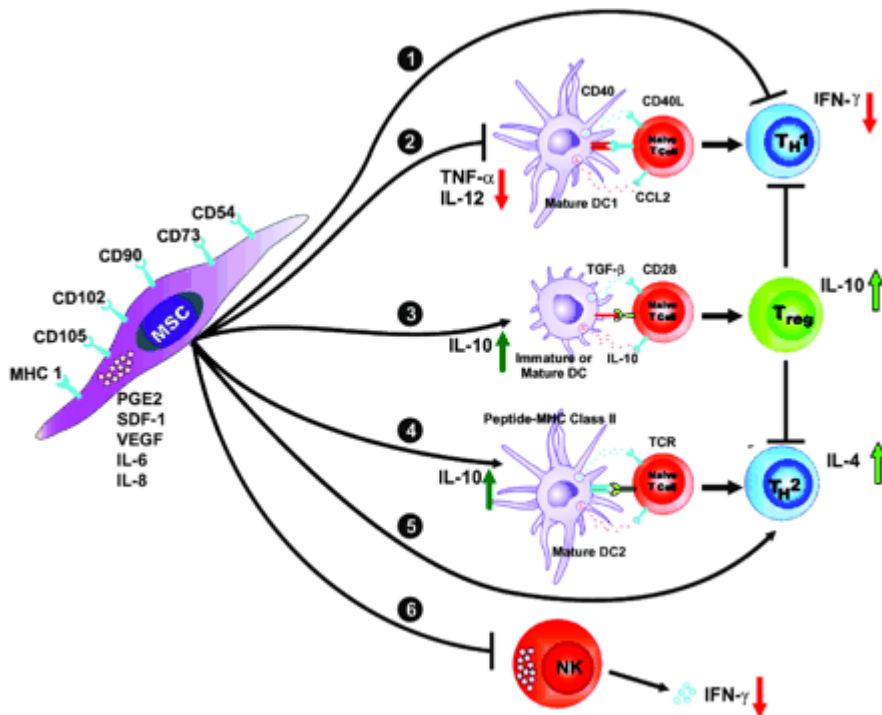
MSCs ovlivňují buňky imunitního systému, blokují aktivaci, proliferaci a funkci T buněk, B buněk, přirozených zabíječů (natural killers, NK) a dendritických buněk (dendritic cells, DC). Inhibice T lymfocytů může být zprostředkována mezibuněčnou interakcí i uvolněním solubilních faktorů jako jsou transformující růstový faktor  $\beta$  (transforming growth factor, TGF- $\beta$ ), prostaglandin E2 (PGE2) nebo katabolity vzniklé aktivitou enzymu indolamin 2,3-dioxygenáza (IDO) (Augello et al. 2005). Podle Glennie a kol. /2005/ je

inhibice T lymfocytů způsobena zablokováním jejich buněčného cyklu. T buňky jsou v přítomnosti MSCs zadrženy v časně G1 fázi, což je způsobeno zablokováním cyklinu D2 a naopak zvýšenou produkcí p27Kip1, jehož inhibice je nezbytná pro přechod do S fáze buněčného cyklu. Jelikož cyklin D2 také kontroluje počet B buněčných progenitorů, MSCs mají vliv i na B buňky a potlačují u nich proliferaci.

Vlivem MSCs dochází ke snížení exprese receptorů pro chemokiny (CXCR4, CXCR5 a CCR7), což následně vede k potlačení proliferace a diferenciaci B buněk na buňky produkující imunoglobulin M (IgM), IgG a IgA. Receptory pro chemokiny jsou důležité pro migraci B buněk do sekundárních lymfatických orgánů, a tedy i pro následnou diferenciaci na buňky produkující protilátky (Corcione et al. 2006).

MSCs inhibují také vývoj a maturaci myeloidních DC, ale na druhé straně podporují vznik protizánětlivých plazmacytoïdních DC. U myeloidních DC dochází v přítomnosti MSCs ke snížení sekrece tumor nekrotizujícího faktoru  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) a u plazmacytoïdních DC je zvýšena produkce interleukinu 10 (IL-10). Kromě toho MSCs blokují vývoj prozánětlivých NK buněk a pomocných T buněk (T helper cells 1, T<sub>H1</sub>) a naopak podporují vznik T<sub>H2</sub> buněk a regulačních T buněk (T<sub>Reg</sub>), které jsou důležité v protizánětlivé odpovědi (Aggarwal and Pittenger 2005) (viz obrázek 1).

Na potlačení proliferace, sekrece cytokinů a cytotoxicity u NK buněk se také podílejí MSCs, a to jak prostřednictvím solubilních faktorů, tak i na základě mezibuněčného kontaktu. Po přímé interakci mezi NK buňkami a MSCs dochází ke snížení exprese povrchových receptorů na NK buňkách. Interakce s TGF- $\beta$  nebo PGE2 má inhibiční účinek na proliferaci NK buněk, stimulace pomocí PGE2 navíc redukuje i jejich cytotoxicitu. Zatímco aktivita enzymu IDO na vývoj NK buněk nemá vliv, protože nedochází k aktivaci produkce enzymu MSCs díky nízké hladině IFN- $\gamma$ . Na druhé straně bylo zjištěno, že neaktivované NK buňky mohou díky nepřítomnosti MHC I také lyzovat mezenchymální kmenové buňky (Sotiropoulou et al. 2006).



**obrázek 1**

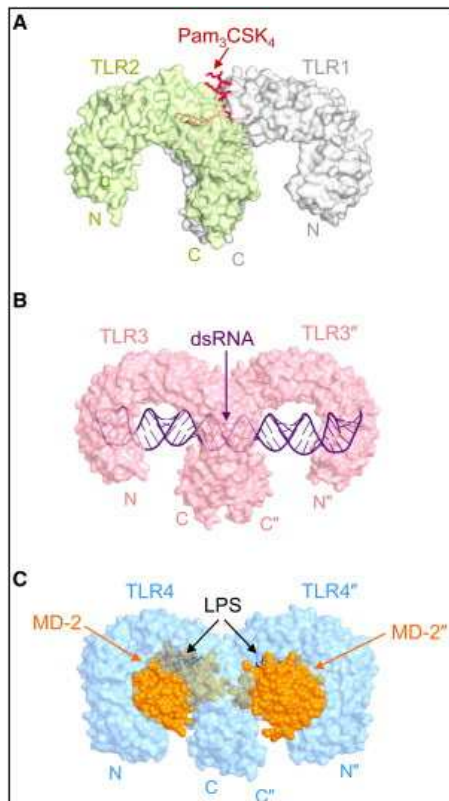
MSCs ovlivňují solubilními faktory (2, 3 a 4) i mezibuněčným kontaktem (1, 5 a 6) jak buňky přirozené imunity (DC a NK buňky - 2, 3, 4 a 6), tak adaptivní imunitní buňky (B lymfocyty a T lymfocyty - 1 a 5), inhibují jejich aktivaci, proliferaci a funkci. U myeloidních DC (DC1) dochází vlivem MSCs k menší produkci TNF- $\alpha$  a IL-12, na druhé straně u plazmacytoidních DC (DC2) a nezralých DC je produkce IL-10 zvýšena. Působením nezralých DC dojde ke zvýšení počtu T<sub>Reg</sub>. V zánětlivém prostředí MSCs snižují sekreci IFN- $\gamma$  T<sub>H1</sub> a NK buňkami, naopak zvýší produkci IL-4 T<sub>H2</sub> buňkami (převzato z Aggarwal and Pittenger 2005).

### 3. Toll-like receptory

TLRs se nachází na řadě buněčných typů a patří mezi neadaptivní receptory rozpoznávající PAMPs. *Toll* byl nejdříve identifikován v *Drosophile* jako gen zodpovědný za dorzo-ventrální uspořádání během embryogeneze (Hashimoto et al. 1988). Později se zjistilo, že signalizace pomocí *Toll* u *Drosophily* má vliv i na antimikrobiální odpověď a je podobná savčí dráze pro IL-1. To vedlo k objevu *Toll* homologů u savců, které byly nazvány Toll-like receptory (Rock et al. 1998). Zatím bylo nalezeno dvanáct TLRs u myší a deset lidských TLRs, které jsou exprimovány uvnitř buněk i na povrchu plazmatické membrány (Jin and Lee 2008).

TLRs nemusí být ovšem aktivovány pouze patogeny, ke spuštění signalizační dráhy může dojít i působením endogenních molekul, například proteinů teplotního šoku (heat-shock protein, HSP) (Cohen-Sfady et al. 2005). TLRs dokáží rozpoznat struktury od bakteriálních

lipopolysacharidů (LPS) či flagelinu až po virovou dvouvláknovou RNA (dsRNA). Receptory mohou také vytvářet komplexy, například TLR2 s TLR6 nebo s TLR1. TLR2 rozeznává peptidoglykany (PGN) a lipoproteiny z buněčné stěny mikroorganismů, v kombinaci s TLR1 vytváří komplex TLR1/TLR2 (viz obrázek 2A), který umí rozlišit triacylové bakteriální lipopeptidy na rozdíl od komplexu TLR2/TLR6, který rozpoznává diacylové mykoplasmatické lipopeptidy (Takeda et al. 2002) (shrnutí viz obrázek 3).



**obrázek 2**

Struktura TLRs: (A) komplex TLR1/TLR2 rozlišuje triacylové bakteriální lipopeptidy, (B) návazání ligandu dsRNA způsobí dimerizaci TLR3, (C) komplex TLR4 s navázaným myeloidním diferenačním proteinem 2 (MD-2) a LPS (převzato z Jin and Lee 2008).

TLRs obsahují extracelulární doménu bohatou na leucin a intracelulární Toll/IL-1 receptor (TIR) doménu. Ligand se naváže na extracelulární doménu a vyvolá oligomerizaci molekul TLRs (Rock et al. 1998; Saitoh et al. 2004) (viz obrázek 2B). TLRs nemusí být ovlivňovány jen ligandy navázanými na extracelulární doméně ale také pomocnými molekulami. LPS je vázán vazebným proteinem a pomocnou molekulou CD14 a až tento komplex je schopný interagovat s TLR4 a myeloidním diferenačním proteinem 2 (Saitoh et al. 2004; Shimazu et al. 1999) (viz obrázek 2C). Po navázání ligandu na TLRs dojde k aktivaci signální dráhy, která aktivuje transkripční faktory jako jaderný faktor kappa B (nuclear factor kappa B, NF-κB) a expresi genů důležitých pro imunitní odpověď (Miguel et al. 2007).

TLR	Subcellular localization	Physiological ligands	Synthetic ligands
TLR1–TLR2	Plasma membrane	Triacylated lipopeptides	Pam <sub>3</sub> CSK <sub>4</sub>
TLR2	Plasma membrane	Peptidoglycan, phospholipomannan, tGPI-mucins, haemagglutinin, porins, lipoarabinomannan, glucuronoxylomannan, HMGB1	ND
TLR2–TLR6	Plasma membrane	Diacylated lipopeptides, LTA, zymosan	FSL1, MALP2, Pam <sub>2</sub> CSK <sub>4</sub>
TLR3	Endosome	dsRNA	PolyI:C
TLR4	Plasma membrane	LPS, VSV glycoprotein G, RSV fusion protein, MMTV envelope protein, mannan, glucuronoxylomannan, glycosylinositolphospholipids, HSP60, HSP70, fibrinogen, nickel, HMGB1	ND
TLR4–TLR6	Plasma membrane	OxLDL, amyloid-β fibrils	ND
TLR5	Plasma membrane	Flagellin	ND
TLR7	Endosome	ssRNA	Imidazoquinoline compounds: imiquimod, resiquimod, loxoribine
TLR8	Endosome	ssRNA	Resiquimod
TLR9	Endosome	DNA, haemozoin	CpG-A, CpG-B and CpG-C ODNs
TLR11 (mouse)	Plasma membrane	Profilin	ND

dsRNA, double-stranded RNA; FSL1, S-(2,3-bisphalmitoyloxypropyl)-CGDPKHSPKSF; HMGB1, high-mobility group box 1 protein; HSP, heat-shock protein; LPS, lipopolysaccharide; LTA, lipoteichoic acid; MALP2, macrophage-activating lipopeptide of 2 kDa; MMTV, mouse mammary tumour virus; ND, not determined; ODN, oligodeoxynucleotide; oxLDL, oxidized low-density lipoprotein; polyI:C, polyinosinic–polycytidylic acid; RSV, respiratory syncytial virus; ssRNA, single-stranded RNA; tGPI-mucin, *Trypanosoma cruzi* glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoprotein; TLR, Toll-like receptor; VSV, vesicular stomatitis virus.

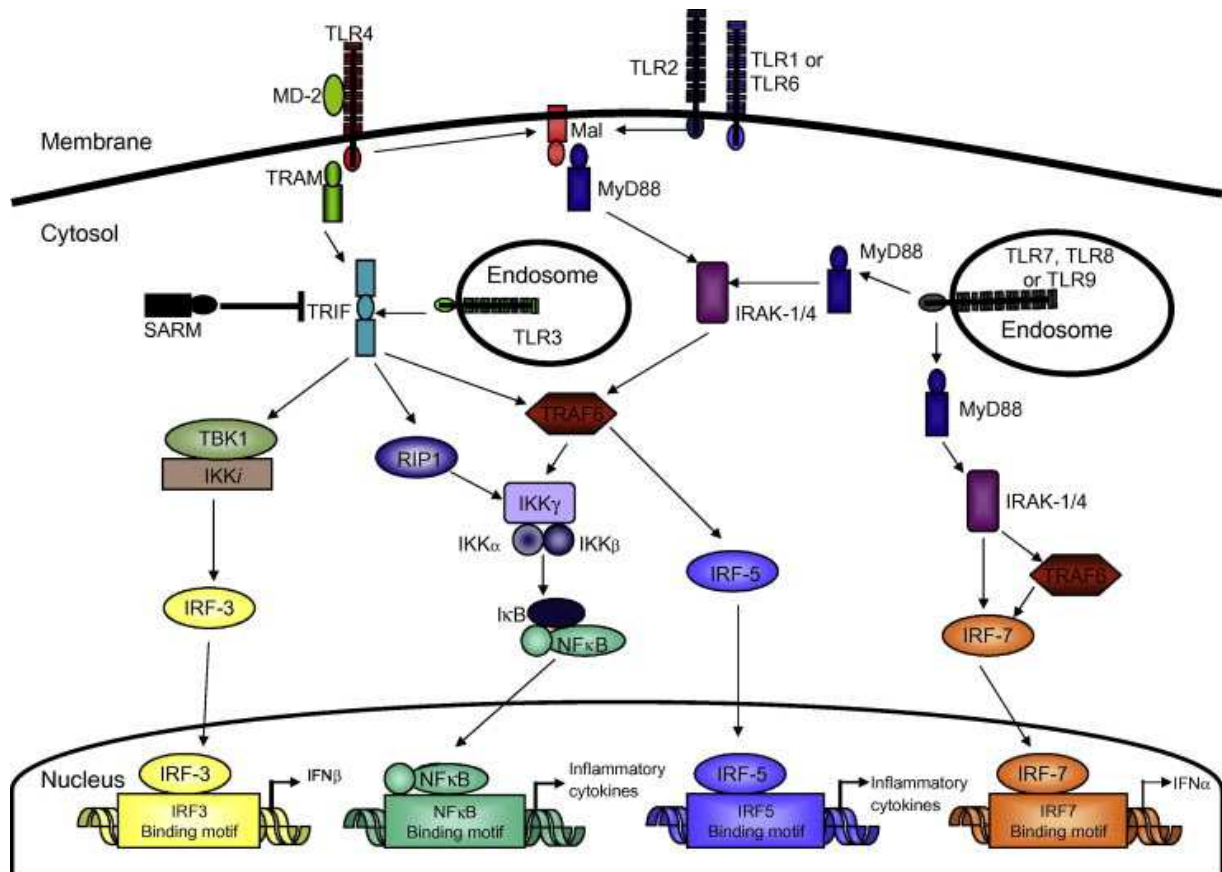
### obrázek 3

TLRs rozpoznávají řadu PAMPs, v tabulce jsou ukázány lokalizace v buňce, fyziologické a syntetické ligandy jednotlivých TLRs, případně jejich heterodimerů (převzato z Lee et al. 2012).

### 3.1. Signalizace TLRs

Signalizace TLRs zahrnuje pět adaptorových molekul obsahujících TIR doménu – MyD88 (Myeloid differentiation primary response protein 88), TIRAP (Toll/interleukin-1 domain-containing adaptor protein) někdy také nazývaný Mal (MyD88 adaptor like protein), TRIF (TIR domain-containing adaptor protein inducing IFNβ), TRAM (TRIF-related adaptor molecule) a SARM (sterile α and Heat-armorillo motifs). Byly popsány dvě cesty signalizačních drah – MyD88-závislá (Kawai et al. 1999) a MyD88-nezávislá (Yamamoto et al. 2002). Většina TLRs jako například TLR4 dokáže aktivovat obě dráhy, naopak MyD88-nezávislá dráha je spuštěna pouze signalizací pomocí TLR3 (Yamamoto et al. 2002). MyD88-závislá dráha je tvořena adaptorovými molekulami MyD88 a Mal. Mal je vázaný na plazmatické membráně a slouží jako pomocný adaptorový protein pro signalizaci TLR4 a TLR2 (Miguel et al. 2007). MyD88 pak aktivuje transkripční faktor NF-κB a produkci například prozánětlivých cytokinů TNF-α a IL-12 (Kawai et al. 1999; Miguel et al. 2007). Na druhé straně TRIF a TRAM spouští MyD88-nezávislou dráhu, kde TRAM funguje jako

pomocný adaptorový protein pro dráhu TLR4 a TRIF pak stimuluje tvorbu regulačního faktoru pro interferon (interferon regulatory factor, IRF-3), který indukuje expresi interferonu  $\beta$  (IFN- $\beta$ ) (Miguel et al. 2007; Yamamoto et al. 2002). Posledním objeveným adaptorovým proteinem je SARM negativně regulující TRIF-závislou (MyD88-nezávislou) signalizaci TLRs (Belinda et al. 2008) (viz obrázek 4).



**obrázek 4**

Signalizační dráhy TLRs: MyD88-závislá dráha je aktivována všemi TLRs kromě TLR3, ten spouští MyD88-nezávislou dráhu. TLR5, TLR7, TLR8 a TLR9 interagují přímo s MyD88, zatímco TLR4 a TLR2 se nejdříve naváží na pomocný adaptorový protein Mal a přes něj následně aktivují MyD88. MyD88 přes další signalizační faktory způsobí aktivaci kinázy I $\kappa$ B. Fosforylací pomocí kinázy dojde k degradaci inhibitoru NF- $\kappa$ B a následně k jeho translokaci do jádra, kde spustí expresi zánětlivých cytokinů. Tato dráha může také vést přes aktivovaný IRF-5 k expresi prozánětlivých cytokinů nebo přes IRF-7 k sekreci IFN- $\alpha$ . MyD88-nezávislá dráha je spuštěna pouze přes TLR3 a TLR4 pomocí adaptorového proteinu TRIF a u signalizace TLR4 ještě za pomoci TRAM. Signalizace touto dráhou způsobí aktivaci a jadernou translokaci IRF-3, který spustí produkci INF- $\beta$ , případně je možné přes TRIF aktivovat i NF- $\kappa$ B a IRF-5. Signalizace pomocí TRIF může být inhibována interakcí s adaptorovým proteinem SARM (převzato z Jenkins and Mansell 2010).

## 4. Expres TLRs MSCs

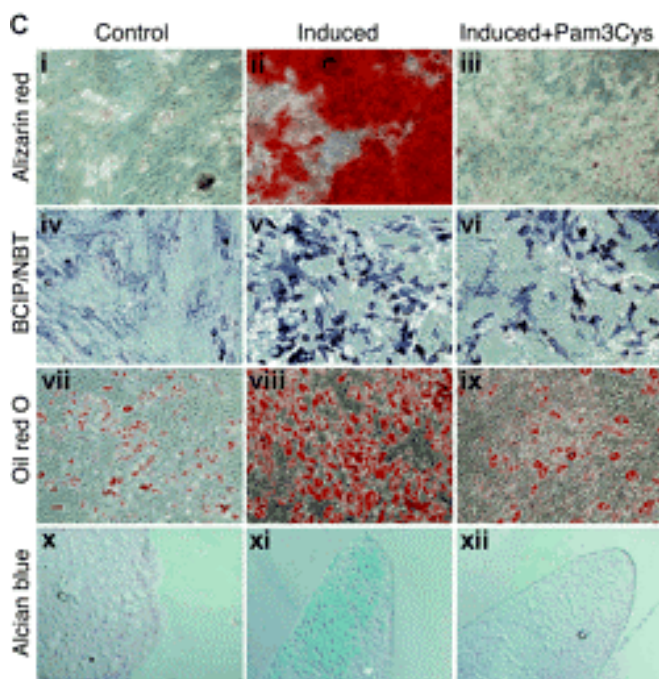
MSCs exprimují na úrovni mediátorové RNA (mRNA) řadu TLRs, to však neznamená, že jsou následně všechny transkribovány na funkční receptory (Pevsner-Fischer et al. 2007). Pomocí průtokové cytometrie bylo zjištěno, že lidské MSCs izolované z kostní dřeně (bone marrow-mesenchymal stem cells, BM-MSCs) mají na úrovni mRNA vysokou expresi TLR3 a TLR4, málo exprimují TLR1, TLR2, TLR5, TLR6 a vůbec u nich nenajdeme TLR7, TLR8, TLR9 a TLR10 (Liotta et al. 2008). U lidských MSCs izolovaných z tukové tkáně (adipose derived-mesenchymal stem cells, AD-MSCs) se kromě TLR1 až TLR6 našel i TLR9 (Cho et al. 2006). Rozdílné výsledky byly získány studiem BM-MSCs u myši, kde se ukázalo, že exprimují mRNA pro TLR1 až TLR8 (Pevsner-Fischer et al. 2007). Odlišnosti v expresi TLRs jsou pravděpodobně způsobeny různým původem MSCs, záleží nejen, zda pocházejí z člověka či myši, ale i z jaké tkáně byly odebrány (Waterman et al. 2010).

### 4.1. Vliv TLRs na proliferaci MSC

U myších MSCs bylo potvrzeno, že stimulace pomocí lipopeptidu Pam3Cys dokáže navýšit jejich proliferaci (Pevsner-Fischer et al. 2007). Ligandy LPS, PGN a kyselina polyinosinová:polycytidylová (poly(I:C)) nemají po interakci s lidskými AD-MSCs vliv na proliferaci (Lombardo et al. 2009), ale kultivace AD-MSCs s ligandem TLR9 jejich proliferaci sníží (Cho et al. 2006). Na základě výsledků, které ukázaly, že LPS a lipoteichová kyselina neovlivní proliferaci BM-MSCs ani po dlouhodobé kultivaci s vysokou koncentrací ligandu, je pravděpodobné, že lidské BM-MSCs jsou schopné fungovat i v prostředí bohatém na bakteriální toxiny (Mo et al. 2008).

### 4.2. Vliv TLRs na diferenciaci MSCs

Pokud se myši MSCs inkubují spolu s Pam3Cys v osteogenním, adipogenním či chondrogenním mediu jejich diferenciací vlastnosti jsou redukovány. V osteogenním mediu dojde k zablokování ukládání vápníku a redukci aktivity alkalické fosfatázy, v chondrogenním mediu je zastavena produkce proteoglykanu do extracelulární matrix. Adipogeneze probíhající v adipogenním mediu je pod vlivem Pam3Cys také redukována avšak jen částečně (viz obrázek 5). Na MSCs z MyD88-deficientní myši bylo zjištěno, že nejsou pomocí LPS, PGN, Pam3Cys či imiquimodu stimulovány k produkci IL-6, jelikož MyD88 nezávislou dráhu je schopný aktivovat jen ligand TLR3 poly(I:C). Diferenciace na adipocyty u těchto MSCs není ovlivněna, narušena je pouze diferenciaci na osteocyty a chondrocyty (Pevsner-Fischer et al. 2007).



**obrázek 5**

Pam3Cys redukuje diferenciaci MSCs na osteocyty (ii-iii, v-vi), adipocyty (viii-ix) a chondrocyty (xi-xii). MSCs byly inkubovány pouze v osteogenním, adipogenním a chondrogenním médiu (ii, v, viii, xi) nebo k nim byl přidán ligand Pam3Cys (iii, vi, ix, xii). Po jednom týdnu u chondrogenního média a po třech týdnech u adipogenního a osteogenního média byly buňky fixovány alizarínovou červení (i-iii), substrátem alkalické fosfatázy (iv-vi), olejovou červení (vii-ix) nebo alcionovou modří (x-xii) (převzato a upraveno z Pevsner-Fischer et al. 2007).

Na druhé straně bylo potvrzeno, že kultivace lidských BM-MSCs s LPS nebo poly(I:C) po dobu pěti dní neovlivní jejich schopnost diferenciaci na adipocyty, chondrocyty či osteoblasty. Tyto odlišné výsledky mohou být způsobeny rozdílností lidského a myšičího modelu (Liotta et al. 2008).

Diferenciací MSCs se zabývaly i další experimenty, ve kterých bylo zjištěno, že ligandy poly(I:C) a LPS zvýší schopnost osteogeneze a naopak neovlivní adipogenezi lidských AD-MSCs (Lombardo et al. 2009). Vliv LPS během osteogeneze BM-MSCs závisí na době kultivace, bylo ukázáno, že při krátkodobé stimulaci nedojde ke změně, a naopak při prodloužené inkubaci je schopnost osteogeneze zvýšena (Mo et al. 2008).

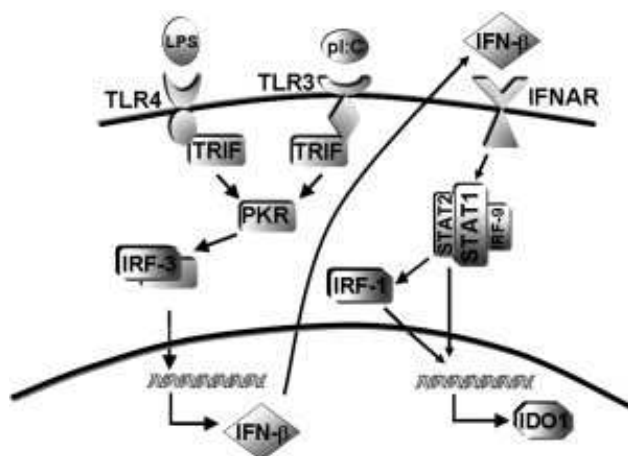
### 4.3. Vliv TLRs na imunosupresivitu MSCs

Imunosupresivní vlastnosti MSCs jsou důležitým faktorem při jejich terapeutickém využití, proto je ovlivnění těchto vlastností v přítomnosti ligandů TLRs častým předmětem

studií. Experimenty na myších MSCs zjistily, že ligand TLR2 Pam3Cys nemá vliv na jejich imunosupresivní aktivitu (Pevsner-Fischer et al. 2007), avšak brzy jim oponovaly jiné výsledky ukazující, že myší MSCs po stimulaci s Pam3Cys snižují schopnost inhibovat proliferaci CD4<sup>+</sup> T lymfocytů (Lei et al. 2011). Podobného výsledku bylo dosaženo u lidských AD-MSCs, kde ligandy TLR2, TLR3 a TLR4 neovlivňují schopnost suprese T lymfocytů (Lombardo et al. 2009). Naproti tomu bylo v řadě experimentů ukázáno, že signalizace TLR2, TLR3 a TLR4 ovlivňuje imunosupresivitu lidských MSCs (Lei et al. 2011; Liotta et al. 2008; Opitz et al. 2009; Raicevic et al. 2010).

Podle Opitze a kol. /2009/ zvyšují ligandy TLR3 a TLR4 imunosupresivní vlastnosti MSCs. Stimulací pomocí poly(I:C) a LPS, ligandů TLR3 a TLR4, dojde v mezenchymálních kmenových buňkách k degradaci tryptofanu na kynurenin, naopak v nestimulovaných MSCs se tryptofan nedegraduje. Nestimulované MSCs exprimují tři metabolické enzymy produkující kynurenin – IDO1, IDO2 a tryptofan 2,3-dioxygenáza (TDO2). Po stimulaci LPS a poly(I:C) dojde ke snížení exprese TDO2 a ke zvýšení exprese IDO1 a IDO2. Použitím stereoizomeru 1-metyl-L-tryptofan k inhibici degradace tryptofanu se zjistilo, že za degradaci tryptofanu je zodpovědný IDO1 (Opitz et al. 2009). Na procesu aktivace IDO1 se podílí protein STAT1 (signal transducer and activator of transcription) patřící do rodiny cytoplazmatických transkripčních faktorů zapojených do cytokinové signalizace mnoha buněk. STAT1 je kultivací MSCs s LPS a poly(I:C) fosforylován a následně vyvolá degradaci tyrosinu na kynurenin. Jeho fosforylace není však aktivována přímo ligandy TLRs, ale apokrinní signalizací IFN- $\beta$  (Chon et al. 1996; Opitz et al. 2009) (viz obrázek 6). Fosforylaci provádí protein kináza R, která je aktivována autofosforylací indukovanou například dsRNA a cytosiny (Williams 1999).

Na druhé straně jiné experimenty potvrzují, že LPS a poly(I:C) inhibují schopnost lidských BM-MSCs potlačovat tvorbu T lymfocytů, tedy podporují jejich proliferaci (Liotta et al. 2008; Raicevic et al. 2010). Součástí suprese T lymfocytů mezenchymálními kmenovými buňkami je signalizace pomocí Notch (Liotta et al. 2008), která závisí na intracelulární doméně Notch receptoru a translokaci do jádra. Ligand Notch receptoru Jagged-1 inhibuje proliferaci T buněk i jejich produkci cytokinů (Rutz et al. 2005). Stimulací MSCs pomocí poly(I:C) nebo LPS dojde k redukci Jagged-1 a obnovení schopnosti CD4<sup>+</sup> T buněk proliferovat. Po přidání LPS a poly(I:C) ke kultivaci nedojde ke změně množství kynureninu v médiu, z tohoto vyplývá, že stimulace TLR3 a TLR4 nemá vliv na aktivitu IDO (Liotta et al. 2008).



**obrázek 6**

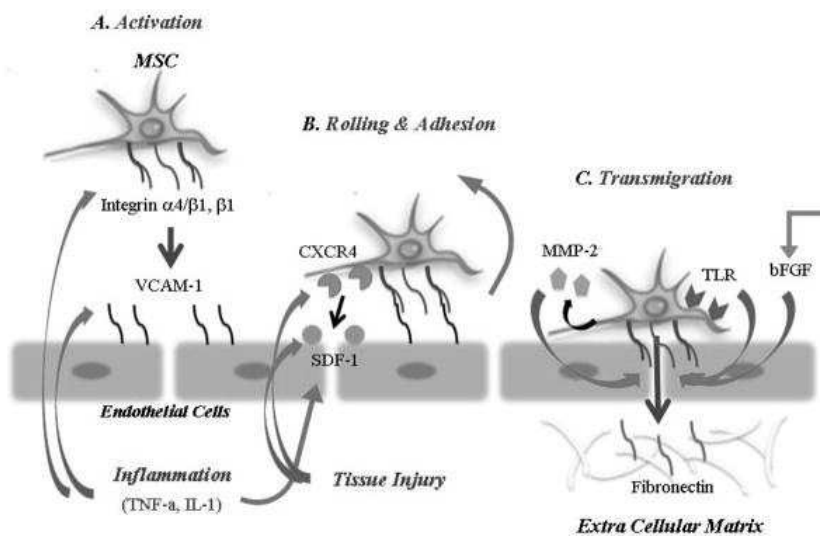
Signalizační dráha TLR3 a TLR4 vedoucí k aktivaci enzymu IDO. LPS a poly(I:C) aktivují přes TLR3 a TLR4 adaptorový protein TRIF a protein kinázu R, která způsobí aktivaci a translokaci IRF-3 do jádra, kde spustí expresi IFN-β. IFN-β se naváže na svůj receptor na povrchu buňky a přes fosforylovaný STAT1 a následně přes IRF-1 aktivuje transkripci enzymu IDO (převzato z Opitz et al. 2009).

Rozdíly mezi výsledky jsou vysvětlovány na základě odlišné kultivace. Liotta a kol. /2008/ nechali všechny buňky inkubovat s ligandy TLRs po dobu pěti dní před experimentem, což mohlo ovlivnit výsledky působení TLRs. Naproti tomu Opitz a kol. /2009/ indukovali MSCs s ligandy TLRs pouze 24 hodin, poté je omyli a dál pokračovali v experimentu. Kromě toho bylo ukázáno, že odlišnosti ve výsledcích jednotlivých experimentů mohou být způsobeny použitím rozdílných buněk ve směsné lymfocytární reakci (mixed lymphocyte reaction, MLR). V MLR byly použity jako reaktivní buňky mononukleární buňky z periferní krve (Opitz et al. 2009), CD4<sup>+</sup> T buňky (Liotta et al. 2008), splenocyty (Lei et al. 2011) nebo CD3<sup>+</sup> T buňky (Raicevic et al. 2010).

#### 4.4. Vliv TLRs na migraci MSCs

Migrace MSCs je ovlivněna velkým množstvím chemotaktických faktorů (růstových faktorů a chemokinů), největší vliv má růstový faktor z krevních destiček (platelet derived growth factor, PDGF) a růstový faktor podobný inzulinu (inzulin-like growth factor 1, IGF-1), mezi chemokiny ovlivňující migraci patří RANTES a chemokiny odvozené od makrofágů (macrophage-derived chemokine, MDC) a stromálních buněk (stroma-derived factor-1, SDF-1). MSCs exprimují na svém povrchu pro tyto faktory příslušné receptory, například receptory pro MDC – CCR2, CCR3, CCR4. Bylo zjištěno, že většina chemokinů je více efektivní po stimulaci MSCs pomocí zánětlivého cytokinu TNF-α. Preinkubace MSCs

s TNF- $\alpha$  po 24 hodin má za následek nejen zvýšení migrace ale také větší expresi receptorů CCR2, CCR3, CCR4 (Ponte et al. 2007). Nárůst koncentrace zánětlivých chemokinů v místě poranění je důležitým faktorem k migraci, MSCs nejdříve prostoupí skrz cévy do cirkulace a pak dál do poškozené části tkáně, kde uplatní svou schopnost regenerovat buňky (viz obrázek 7). Schopnost MSCs migrovat je tedy dána i rozsáhlostí zánětu ve tkáni i celém systému (Ponte et al. 2007; Tomchuck et al. 2008).



**obrázek 7**

Po stimulaci zánětlivými cytokiny jako TNF- $\alpha$  nebo IL-1 MSCs exprimují integriny a buňky endotelu adhezní molekuly (VCAM-1), které MSCs rozpoznávají a váží se na ně. Zánětlivé prostředí také zvýší expresi chemokinů SDF-1 a MSCs se díky CXCR4 naváží na povrch endoteliálních buněk. Nakonec MSCs migrují do extracelulární matrix za využití růstového faktoru fibroblastů (bFGF), TLRs nebo matrixové metaloproteinázy (MMP-2), které reagují s fibronektinem a integriny (převzato z Yagi et al. 2010).

Na myším modelu bylo zjištěno, že na migraci MSCs má vliv i aktivace TLRs. V migračním testu se MSCs ovlivněné pomocí Pam3Cys pohybovaly méně než MSCs nestimulované. Stimulace pomocí Pam3Cys tedy inhibuje pohyblivost myších MSCs (Pevsner-Fischer et al. 2007). Toto bylo potvrzeno dalšími experimenty, které navíc ukázaly, že LPS nemá žádný vliv na chemotaxi myších MSCs (Lei et al. 2011).

Na modelu lidských BM-MSCs bylo prokázáno, že po přidání poly(I:C) do média s MSCs se jejich migrace zvýšila, na druhé straně po ovlivnění pomocí LPS nebo flagelinu se utlumila. Stimulace ligandem TLR3 poly(I:C) vede k největšímu zvýšení pohyblivosti buněk v porovnání s ostatními a má velkou roli ve stresové odpovědi MSCs na nebezpečné signály (Tomchuck et al. 2008). Později přišli s odlišnými výsledky Waterman a kol. /2010/, kteří

zjistili, že délka expozice MSCs s ligandem TLRs může odlišně ovlivnit jejich migraci. MSCs byly inkubovány s ligandy TLRs (LPS a poly(I:C)), chemokinovým ligandem 5 s C-C motivem (CCL5) a TNF $\alpha$  po dobu 1 nebo 24 hodin. Stimulace s LPS nebo poly(I:C) po 24 hodin snížila migraci a invazi MSCs do tkáně, naopak při působení ligandů TLRs jen po 1 hodinu byla schopnost migrace u MSCs zachována. Po stimulaci MSCs pomocí CCL5 a TNF $\alpha$  je tomu naopak, migraci zvyšuje dlouhodobé působení těchto cytokinů (Waterman et al. 2010).

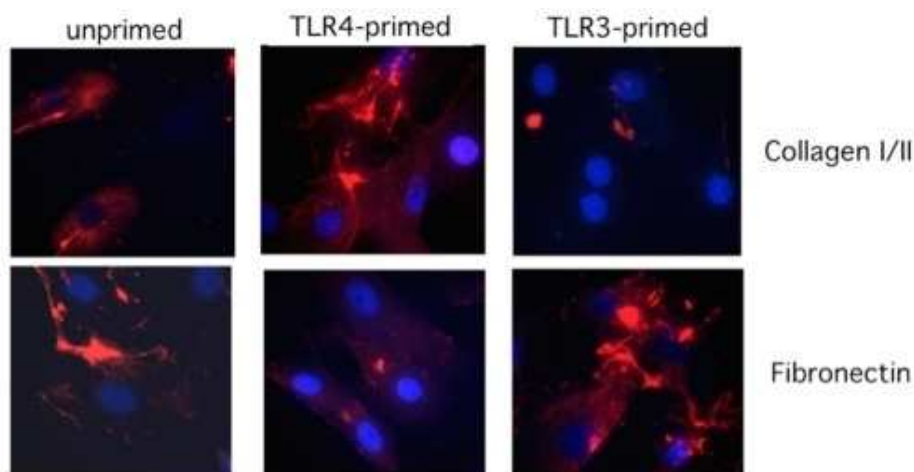
#### **4.5. Vliv TLRs na polarizaci MSCs**

Waterman a kol. /2010/ přišli s novým pojetím biologie MSCs, inspirovali se u monocytů a jejich polarizace na dva fenotypy. Je známo, že monocyty jsou po stimulaci cytokiny nebo ligandy TLRs (interferonem- $\gamma$  nebo endotoxiny) polarizovány na klasický prozánětlivý fenotyp M1. Naopak po ovlivnění monocytů pomocí IL-4 dojde k polarizaci na druhý typ fenotypu M2, který je spojený s protizánětlivou odpovědí (Verreck et al. 2006).

Během experimentů byla použita krátkodobá inkubace lidských MSCs s nízkou koncentrací ligandů TLR3 a TLR4, aby došlo k omezení případných nepřesností, které by mohly vzniknout dlouhodobou inkubací s ligandy TLRs nebo vysokou hladinou ligandů v médiu. Po pozorování odlišností v chování MSCs během jednotlivých inkubací bylo zjištěno, že MSCs jsou po stimulaci TLRs stejně jako monocyty polarizovány na dva fenotypy – MSC1 a MSC2. Oba fenotypy jsou odlišné ve svých imunomodulačních vlastnostech.

Při navození diferenciačních podmínek u MSCs se ukázalo, že přítomnost ligandu TLR4 způsobí inhibici adipogeneze, podporuje tvorbu osteoblastů a na chondrogenезi nemá žádný vliv. Naopak stimulace MSCs pomocí ligandu TLR3 potlačí všechny tři procesy diferenciace (Waterman et al. 2010).

Vedle diferenciace mají ligandy pro TLR3 a TLR4 odlišný vliv i na ukládání látek do extracelulární matrix MSCs. Pod vlivem ligandu TLR4 ukládají MSCs v extracelulární matrix více kolagenu, s tímto procesem koreluje zvýšení exprese TGF $\beta$ . TGF $\beta$  reguluje buněčnou diferenciaci a jeho transkripce je zajištěna aktivací intracelulárního proteinu SMAD3, který je produkován také pod vlivem inkubace MSCs s ligandem TLR4 (Waterman et al. 2010; Zewel et al. 1998). Na druhé straně se v extracelulární matrix MSCs po ovlivnění ligandem TLR3 zvýší množství uloženého fibronektinu a dojde k poklesu hladiny TGF- $\beta$  v médiu, což je způsobeno zvýšením produkce inhibitoru TGF- $\beta$  SMAD7 (Hayashi et al. 1997; Waterman et al. 2010) (viz obrázek 8).



**obrázek 8**

MSCs stimulované ligandem TLR4 LPS ukládají do extracelulární matrix asi dvakrát více kolagenu I/II a polovinu fibronektinu než MSCs inkubované s ligandem TLR3 poly(I:C) (převzato a upraveno z Waterman et al. 2010).

TGF- $\beta$  se spolu se členy rodiny Notch 1 podílí na regulaci transkripčního faktoru Foxp3 a zvyšuje tak expresi T<sub>Reg</sub>. Aktivace TLR2 na povrchu T<sub>Reg</sub> dočasně ruší jejich supresivní chování, a tím zvyšuje imunitní odpověď (Liu et al. 2006; Waterman et al. 2010). Lei a kol. zjistili, že v přítomnosti myších MSCs stimulovaných Pam3Cys dochází k zablokování vzniku a expanze T<sub>Reg</sub> buněk v MLR. (Lei et al. 2011).

Bylo ukázáno, že MSCs stimulované ligandem TLR4 zvyšují sekreci prozánětlivých molekul IL-6, IL-8 a TGF- $\beta$ . Naopak potlačují expresi proteinu Jagged-1, čímž podporují proliferaci T lymfocytů. Znovu se odlišují od MSCs pod vlivem ligandu TLR3, které stimulují tvorbu Jagged-1, inhibují aktivaci T lymfocytů a produkují IL-10,IDO a PGE2 (Liotta et al. 2008; Waterman et al. 2010).

Na základě všech odlišností byla stanovena existence dvou rozdílných fenotypů MSC1 a MSC2. Ke vzniku fenotypu MSC1 dochází po krátkodobé expozici MSCs s nízkou koncentrací ligandu TLR4, tato populace hraje důležitou úlohu v časně odpovědi na poškození tkání. Naproti tomu polarizace na fenotyp MSC2 je dána krátkým působením nízké koncentrace ligandu TLR3 na MSCs. MSC2 má velký vliv na pozdní protizánětlivou reakci a pomáhá při regeneraci poškozené tkáně. Tyto vlastnosti byly ověřeny na zánětu plic u myši, kdy po ošetření tkáně pomocí MSC1 došlo ke zhoršení zánětlivého onemocnění, naopak po podání MSC2 se stav tkáně zlepšil (Waterman et al. 2010).

#### 4.6. Vliv TLRs a zánětlivého prostředí na produkci cytokinů MSCs

Stimulace pomocí TLR4 není pravděpodobně jediným a optimálním způsobem pro změnu fenotypu MSCs. Fenotyp MSC1 může být indukován kombinací dalších faktorů, jako jsou interferony nebo kontakt s prozánětlivými buňkami a jejich mikroprostředím.

Bylo potvrzeno, že MSCs stále tvoří mRNA pro IL-6, IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ , podjednotku IL-27 (EBI-3) a podjednotku IL-23 (IL-12p35). Po stimulaci všemi ligandy TLRs dojde k nárůstu hladiny TGF- $\beta$ . Exprese mRNA pro IL-1 $\beta$ , IL-6 a IL-12p35 je zvýšena po ovlivnění MSCs pomocí poly(I:C) a LPS v/bez zánětlivého prostředí. IL-1 $\beta$  na proteinové úrovni je produkován MSCs pouze v zánětlivém prostředí, přestože IL-1 $\beta$  mRNA je stále exprimována. Podjednotka IL-27 (IL-27p28) je také produkována pouze v zánětlivém prostředí a její exprese se může ještě zvýšit stimulací MSCs s ligandy TLR3 nebo TLR4. IL-27 dokáže snížit imunosupresivní schopnosti MSCs, a také potlačit prozánětlivé vlastnosti IL-23, které jsou důležité v zánětlivé reakci na infekci (Raicevic et al. 2010). Na základě jiných experimentů se ukázalo, že MSCs po stimulaci s TLR3 a TLR4 produkují prozánětlivé faktory jako IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, CCL5. Pokud jsou MSCs po stimulaci ligandy TLR3 a TLR4 vystaveny působení IFN- $\alpha$  a IFN- $\gamma$  dojde ke zvýšení sekrece uvedených zánětlivých faktorů spolu s expresí IFN- $\beta$ , syntázy oxidu dusného a TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand), tím se zvýší zánětlivá odpověď MSCs a ochrana proti patogenům (Romieu-Mourez et al. 2009).

Aktivace lidských MSCs pomocí poly(I:C) a LPS zvyšuje expresi TNF- $\alpha$ , CCL5, IFN- $\beta$  a TRAIL. Ošetření MSCs IFN- $\alpha$  a poly(I:C) zvýší produkci IL-12A, TNF- $\alpha$ , CCL5, IFN- $\beta$  a indukovatelné syntézy oxidu dusného (inducible nitric oxid synthase – iNOS). Po přidání LPS nebo poly(I:C) k MSCs, které byly nejdříve ošetřené IFN- $\alpha$ , dojde k větší sekreci pouze u CCL5, TRAIL a iNOS. Po stimulaci IFN- $\gamma$  a LPS je u MSCs vidět větší sekrece IL-6 a IL-8, také dojde k nárůstu transkripce CXCL1, CXCL2, CCL2, CCL5, CCL7, CCL8 a CCL9 mRNA a větší infiltraci granulocytů a NK buněk. Samotná stimulace pomocí IFN- $\gamma$  zvýší produkci IL-12A v MSCs (Romieu-Mourez et al. 2009). MSCs izolované z myši po ovlivnění LPS produkují více CXCL10 ale méně iNOS mRNA ve srovnání s MSCs stimulovanými pomocí Pam3Cys. Odlišná sekrece CXCL10 po ovlivnění jednotlivými ligandy TLRs může hrát důležitou roli v odlišných efektech TLR2 a TLR4 na vlastnosti MSCs (Lei et al. 2011).

Přítomnost zánětlivých cytokinů TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$  a IFN- $\gamma$  ovlivňuje také expresi TLRs v MSCs. Na větší produkci TLR2 má vliv TNF- $\alpha$  a IFN- $\alpha$ , exprese TLR3 je zvýšena

v přítomnosti IFN- $\alpha$  a IFN- $\gamma$  a množství TLR7 zvyšuje pouze TNF- $\alpha$  (Romieu-Mourez et al. 2009).

MSCs izolované z myši vylučují po aktivaci ligandy TLR2, TLR3 a TLR4 IL-6, naopak ligandy pro TLR5, TLR7/8, TLR7 a TLR9 u MSCs produkci IL-6 nevyvolají. Zablokováním sekrece IL-6 pomocí neutralizační protilátky k TLR2 lze ověřit, že sekrece IL-6 byla aktivována ligandem TLR2 (Pevsner-Fischer et al. 2007). IL-6 je důležitý v regulaci zánětlivé reakce a jeho zvýšená produkce je spojena například s Crohnovou nemocí (León et al. 2009).

## 5. Vliv TLR na terapeutické využití MSCs

MSCs jsou atraktivními kandidáty pro imunoterapii a buněčnou regenerativní léčbu. Jejich velký potenciál je ve schopnosti imunomodulovat buňky imunitního systému, migrovat do místa poškození, diferencovat se na buňky poškozené tkáně, snížit zánětlivou reakci a zabránit apoptóze (Wannemuehler et al. 2012). Výhodou je jejich snadná izolace z kostní dřeně a dalších tkání, poté je možné je zamrazit a následně kultivací namnožit *in vitro* během několika týdnů (DiGirolamo et al. 1999). MSCs mohou být injekčně aplikovány přímo do místa patologie nebo krevního oběhu (Kuo et al. 2008).

Jejich využití v různých onemocněních bylo nejdříve studováno na zvířecích modelech, ale v současné době probíhá řada klinických testů léčby. Terapie MSCs má úspěšné výsledky, například v léčbě reakce štěpu proti hostiteli (graft-versus-host disease, GVHD) (Ringden et al. 2006), Crohnovy nemoci (Duijvestein et al. 2010), při akutním poškození plic (Xu et al. 2007) nebo srdce (Ohnishi et al. 2007) či jako prevence po transplantaci (Casiraghi et al. 2008). Bylo potvrzeno, že MSCs nejsou u pacientů s autoimunitním onemocněním zasaženy, a může být u nich tedy použita i autologní transplantace (Bernardo et al. 2009). Jednou z dalších výhod MSCs je jejich imunologická privilegovanost, proto při transplantaci mohou být využity jak alogenní, tak autologní buňky (Aggarwal and Pittenger 2005). MSCs jsou aplikovány i při kotranplantací jiných parenchymálních buněk, například hepatocytů, aby byla posílena imunoprotekce a nedošlo k odmítnutí hepatocytů imunitním systémem pacienta (Kuo et al. 2008). U šesti z osmi pacientů s GVHD rezistentní ke steroidům došlo po infuzi MSCs k vymizení akutní fáze nemoci (Ringden et al. 2006). V jiném experimentu byly po alogenní transplantaci hematopoetických kmenových buněk na supresi jaterní GVHD úspěšně použity AD-MSCs (Fang et al. 2007).

Bylo potvrzeno, že MSCs mají schopnost redukovat septický šok způsobený zánětem v organismu, který může vést k poškození orgánů. Zablokování zánětlivé odpovědi je záchranou pro pacienta (Wannemuehler et al. 2012). Bylo ukázáno, že intravenózně aplikované MSCs po přidání LPS do krevního oběhu myši, migrují s velkou afinitou do plic. Chrání plíce před poškozením a potlačují systémový zánět (Xu et al. 2007). Schopnost MSCs migrovat do řady poškozených tkání je dobře využitelná v terapii mnoha orgánů i léčbě sepse. Lokální prostředí kofaktorů, imunitních buněk a ostatních mediátorů může určit chování MSCs během sepse. Produkce cytokinů v časně fázi sepse redukuje zánět i poškození orgánů bakteriemi a buňkami přirozené imunity, zatímco v pozdní fázi přílišná suprese aktivity B buněk a T buněk může být škodlivá. Načasování aplikace MSCs a lokální faktory jsou proto důležité pro správnou léčbu (Wannemuehler et al. 2012).

Síť faktorů, které dokáží ovlivnit aktivitu MSCs, je zatím neznámá. Stimulace TLRs může ovlivnit imunomodulační vlastnosti MSCs. Schopnosti suprese imunitních buněk se ztrácí po setkání s ligandy TLR2, TLR3, TLR4 a TLR6 (Cho et al. 2006; Liotta et al. 2008). To může být zásadní problém v jejich klinickém využití. Aktivace TLRs je zahrnuta ale i v mnoha zánětlivých nemocech, kde mohou podpořit vznik chronického zánětu. Po aplikaci vakcíny obsahující MSCs, které byly aktivovány ligandy TLR3 a TLR4, bylo pozorováno navýšení jejich antigen prezentujících funkcí díky vlivu zánětlivého prostředí, a došlo k jejich zvýšené migraci do místa zánětu (Romieu-Mourez et al. 2009).

MSCs mohou být během transplantace vystaveny pro ně nevhodným podmínkám jako hypoxie nebo zánět. BM-MSCs po stimulaci LPS dokáží přežít i oxidativní stres a uniknout apoptóze (Wang et al. 2009). Kromě toho se ukázalo, že na expresi TLRs mají vliv i hypoxické podmínky, stimulací AD-MSCs po dobu tří dnů v tomto prostředí se zvýšila exprese TLR1, TLR2, TLR5, TLR9 a TLR10 (Cho et al. 2006).

Zánětlivé prostředí je schopné chování MSCs zcela převrátit. Je důležité si uvědomit, že stejný ligand TLRs nebo cytokin, který dokáže změnit vlastnosti MSCs, může být produkován v organismu při některé z autoimunitních chorob, proto je potřeba nejdříve opravdu důkladně identifikovat prostředí v těle pacienta. Při terapii MSCs záleží, zda v těle pacienta probíhá akutní nebo chronická fáze zánětu, jelikož chronické autoimunitní nemoci jsou spojené s fibrotickými změnami tkání, které mohou znesnadňovat regeneraci MSCs v místě poškození (Dazzi and Krampera 2011). Zánětlivé prostředí redukuje imunosupresivní schopnosti MSCs důležité v boji s patogenem nebo při kontrole alogenní reakce, a tento efekt ještě umocní stimulace pomocí ligandů LPS a poly(I:C). To by mohlo způsobit problém při terapeutickém využití MSCs, které by mohly v přítomnosti zánětu změnit své chování.

Na druhé straně se naskýtá možnost ovlivnit imunomodulační vlastnosti MSCs úpravou exprese některých TLRs a maximalizovat tak jejich imunosupresivní efekt (Raicevic et al. 2010).

## **6. Závěr**

MSCs mají díky svým imunosupresivním vlastnostem velký potenciál pro terapeutické využití, například v autoimunitních onemocněních, proto je potřeba důkladně prostudovat všechny faktory, které mohou jejich vlastnosti ovlivnit. Mezi tyto faktory jsou řazeny i TLRs a působení jejich ligandů. V současné době není na základě rozdílných výsledků různých experimentů zcela jasné, jakým způsobem dokáže aktivace TLRs ovlivnit imunomodulační vlastnosti MSCs. Často kontrastní výsledky mohou být způsobeny několika faktory. Záleží na délce a způsobu inkubace, koncentraci ligandů TLRs v médiu ale i na původu mezenchymálních kmenových buněk (lidské, myší) či na tkáni odkud jsou MSCs izolovány (kostní dřeň, tuková tkáň atd.). Všechny uvedené faktory hrají v experimentech důležitou roli a jejich odlišné použití přináší často zcela protichůdné výsledky. Před terapeutickým použitím MSCs je proto nutné podrobně prostudovat výskyt ligandů TLRs v organismu pacienta a jejich vliv na chování a imunosupresivní vlastnosti MSCs.

## Seznam použité literatury

- Aggarwal, S., Pittenger, M.F., 2005.** Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 105, 1815-1822.
- Augello, A., Tasso, R., Negrini, S.M., Amateis, A., Indiveri, F., Cancedda, R., Pennesi, G., 2005.** Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *European Journal of Immunology* 35, 1482-1490.
- Belinda, L.W.C., Wei, W.X., Hanh, B.T.H., Lei, L.X., Bow, H., Ling, D.J., 2008.** SARM: a novel Toll-like receptor adaptor, is functionally conserved from arthropod to human. *Molecular Immunology* 45, 1732-1742.
- Bernardo, M.E., Avanzini, M.A., Ciccocioppo, R., Perotti, C., Cometa, A.M., Moretta, A., Marconi, M., Valli, M., Novara, F., Bonetti, F., Zuffardi, O., Maccario, R., Corazza, G.R., Locatelli, F., 2009.** Phenotypical/functional characterization of in vitro-expanded mesenchymal stromal cells from patients with Crohn's disease. *Cytotherapy* 11, 825-836.
- Casiraghi, F., Azzollini, N., Cassis, P., Imberti, B., Morigi, M., Cugini, D., Cavinato, R.A., Todeschini, M., Solini, S., Sonzogni, A., Perico, N., Remuzzi, G., Noris, M., 2008.** Pretransplant infusion of mesenchymal stem cells prolongs the survival of a semiallogeneic heart transplant through the generation of regulatory T cells. *Journal of Immunology* 181, 3933-3946.
- Cho, H.H., Bae, Y.C., Jung, J.S., 2006.** Role of toll-like receptors on human adipose-derived stromal cells. *Stem Cells* 24, 2744-2752.
- Chon, S.Y., Hassanain, H.H., Gupta, S.L., 1996.** Cooperative role of interferon regulatory factor 1 and p91 (STAT1) response elements in interferon-gamma-inducible expression of human indoleamine 2,3-dioxygenase gene. *Journal of Biological Chemistry* 271, 17247-17252.
- Cohen-Sfady, M., Nussbaum, G., Pevsner-Fischer, M., Mor, F., Carmi, P., Zanin-Zhorov, A., Lider, O., Cohen, I.R., 2005.** Heat shock protein 60 activates B cells via the TLR4-MyD88 pathway. *Journal of Immunology* 175, 3594-3602.
- Corcione, A., Benvenuto, F., Ferretti, E., Giunti, D., Cappiello, V., Cazzanti, F., Risso, M., Gualandi, F., Mancardi, G.L., Pistoia, V., Uccelli, A., 2006.** Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* 107, 367-372.
- Dazzi, F., Krampera, M., 2011.** Mesenchymal stem cells and autoimmune diseases. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 24, 49-57.
- DiGirolamo, C.M., Stokes, D., Colter, D., Phinney, D.G., Class, R., Prockop, D.J., 1999.** Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *British Journal of Haematology* 107, 275-281.

**Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Krause, D.S., Deans, R.J., Keating, A., Prockop, D.J., Horwitz, E.M., 2006.** Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315-317.

**Duijvestein, M., Vos, A.C.W., Roelofs, H., Wildenberg, M.E., Wendrich, B.B., Verspaget, H.W., Kooy-Winkelaar, E.M.C., Koning, F., Zwaginga, J.J., Fidder, H.H., Verhaar, A.P., Fibbe, W.E., van den Brink, G.R., Hommes, D.W., 2010.** Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment for refractory luminal Crohn's disease: results of a phase I study. *Gut* 59, 1662-1669.

**Fang, B., Song, Y., Zhao, R.C., Han, Q., Lin, Q., 2007.** Using human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as salvage therapy for hepatic graft-versus-host disease resembling acute hepatitis. *Transplantation Proceedings* 39, 1710-1713.

**Glennie, S., Soeiro, I., Dyson, P.J., Lam, E.W.F., Dazzi, F., 2005.** Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood* 105, 2821-2827.

**Hashimoto, C., Hudson, K.L., Anderson, K.V., 1988.** The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 52, 269-279.

**Hayashi, H., Abdollah, S., Qiu, Y.B., Cai, J.X., Xu, Y.Y., Grinnell, B.W., Richardson, M.A., Topper, J.N., Gimbrone, M.A., Wrana, J.L., Falb, D., 1997.** The MAD-related protein Smad7 associates with the TGF beta receptor and functions as an antagonist of TGF beta signaling. *Cell* 89, 1165-1173.

**Jenkins, K.A., Mansell, A., 2010.** TIR-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Cytokine* 49, 237-244.

**Jin, M.S., Lee, J.O., 2008.** Structures of the toll-like receptor family and its ligand complexes. *Immunity* 29, 182-191.

**Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K., Akira, S., 1999.** Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 11, 115-122.

**Kuo, T.K., Hung, S.P., Chuang, C.H., Chen, C.T., Shih, Y.R.V., Fang, S.C.Y., Yang, V.W., Lee, O.K., 2008.** Stem cell therapy for liver disease: Parameters governing the success of using bone marrow mesenchymal stem cells. *Gastroenterology* 134, 2111-2121.

**Le Blanc, K., Tammik, C., Rosendahl, K., Zetterberg, E., Ringden, O., 2003.** HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Experimental Hematology* 31, 890-896.

**Lee, C.C., Avalos, A.M., Ploegh, H.L., 2012.** Accessory molecules for Toll-like receptors and their function. *Nature Reviews Immunology* 12, 168-179.

**Lei, J.X., Wang, Z., Hui, D.Y., Yu, W.H., Zhou, D.H., Xia, W.J., Chen, C., Zhang, Q.Z., Wang, Z.C., Zhang, Q., Xiang, A.D.P., 2011.** Ligation of TLR2 and TLR4 on murine bone

marrow-derived mesenchymal stem cells triggers differential effects on their immunosuppressive activity. *Cellular Immunology* 271, 147-156.

**Liotta, F., Angeli, R., Cosmi, L., Fili, L., Manuelli, C., Frosali, F., Mazzinghi, B., Maggi, L., Pasini, A., Lisi, V., Santarlasci, V., Consoloni, L., Angelotti, M.L., Romagnani, P., Parronchi, P., Krampera, M., Maggi, E., Romagnani, S., Annunziato, F., 2008.** Toll-like receptors 3 and 4 are expressed by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and can inhibit their T-cell modulatory activity by impairing notch signaling. *Stem Cells* 26, 279-289.

**Liu, H.Y., Komai-Koma, M., Xu, D., Liew, F.Y., 2006.** Toll-like receptor 2 signaling modulates the functions of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 7048-7053.

**Lombardo, E., DelaRosa, O., Mancheno-Corvo, P., Menta, R., Ramirez, C., Buscher, D., 2009.** Toll-like Receptor-Mediated Signaling in Human Adipose-Derived Stem Cells: Implications for Immunogenicity and Immunosuppressive Potential. *Tissue Engineering Part A* 15, 1579-1589.

**Miguel, R.N., Wong, J., Westoll, J.F., Brooks, H.J., O'Neill, L.A.J., Gay, N.J., Bryant, C.E., Monie, T.P., 2007.** A Dimer of the Toll-Like Receptor 4 Cytoplasmic Domain Provides a Specific Scaffold for the Recruitment of Signalling Adaptor Proteins. *Plos One* 2.

**Mo, I.F.Y., Yip, K.H.K., Chan, W.K., Law, H.K.W., Lau, Y.L., Chan, G.C.F., 2008.** Prolonged exposure to bacterial toxins downregulated expression of toll-like receptors in mesenchymal stromal cell-derived osteoprogenitors. *Bmc Cell Biology* 9.

**Ohnishi, S., Yanagawa, B., Tanaka, K., Miyahara, Y., Obata, H., Kataoka, M., Kodama, M., Ishibashi-Ueda, H., Kangawa, K., Kitamura, S., Nagaya, N., 2007.** Transplantation of mesenchymal stem cells attenuates myocardial injury and dysfunction in a rat model of acute myocarditis. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 42, 88-97.

**Opitz, C.A., Litzemberger, U.M., Lutz, C., Lanz, T.V., Tritschler, I., Koppel, A., Tolosa, E., Hoberg, M., Anderl, J., Aicher, W.K., Weller, M., Wick, W., Platten, M., 2009.** Toll-Like Receptor Engagement Enhances the Immunosuppressive Properties of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells by Inducing Indoleamine-2,3-dioxygenase-1 via Interferon-beta and Protein Kinase R. *Stem Cells* 27, 909-919.

**Pevsner-Fischer, M., Morad, V., Cohen-Sfady, M., Rousso-Noori, L., Zanin-Zhorov, A., Cohen, S., Cohen, I.R., Zipori, D., 2007.** Toll-like receptors and their ligands control mesenchymal stem cell functions. *Blood* 109, 1422-1432.

**Ponte, A.L., Marais, E., Gallay, N., Langonne, A., Delorme, B., Herault, O., Charbord, P., Domenech, J., 2007.** The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: Comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities. *Stem Cells* 25, 1737-1745.

**Raicevic, G., Rouas, R., Najar, M., Stordeur, P., Boufker, H.I., Bron, D., Martiat, P., Goldman, M., Nevejsnysky, M.T., Lagneaux, L., 2010.** Inflammation modifies the pattern

and the function of Toll-like receptors expressed by human mesenchymal stromal cells. *Human Immunology* 71, 235-244.

**Ringden, O., Uzunel, M., Rasmusson, I., Remberger, M., Sundberg, B., Lonnie, H., Marschall, H.U., Dlugosz, A., Szakos, A., Hassan, Z., Omazic, B., Aschan, J., Barkholt, L., Le Blanc, K., 2006.** Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation* 81, 1390-1397.

**Rock, F.L., Hardiman, G., Timans, J.C., Kastelein, R.A., Bazan, J.F., 1998.** A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 588-593.

**Romieu-Mourez, R., Francois, M., Boivin, M.N., Bouchentouf, M., Spaner, D.E., Galipeau, J., 2009.** Cytokine Modulation of TLR Expression and Activation in Mesenchymal Stromal Cells Leads to a Proinflammatory Phenotype. *Journal of Immunology* 182, 7963-7973.

**Rutz, S., Mordmuller, B., Sakano, S., Scheffold, A., 2005.** Notch ligands Delta-like1, Delta-like4 and Jagged1 differentially regulate activation of peripheral T helper cells. *European Journal of Immunology* 35, 2443-2451.

**Saitoh, S., Akashi, S., Yamada, T., Tanimura, N., Kobayashi, M., Konno, K., Matsumoto, F., Fukase, K., Kusumoto, S., Nagai, Y., Kusumoto, Y., Kosugi, A., Miyake, K., 2004.** Lipid A antagonist, lipid IVa, is distinct from lipid A in interaction with Toll-like receptor 4 (TLR4)-MD-2 and ligand-induced TLR4 oligomerization. *International Immunology* 16, 961-969.

**Shimazu, R., Akashi, S., Ogata, H., Nagai, Y., Fukudome, K., Miyake, K., Kimoto, M., 1999.** MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *Journal of Experimental Medicine* 189, 1777-1782.

**Sotiropoulou, P.A., Perez, S.A., Gritzapis, A.D., Baxevanis, C.N., Papamichail, M., 2006.** Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells* 24, 74-85.

**Spaggiari, G.M., Capobianco, A., Becchetti, S., Mingari, M.C., Moretta, L., 2006.** Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood* 107, 1484-1490.

**Takeda, K., Takeuchi, O., Akira, S., 2002.** Recognition of lipopeptides by Toll-like receptors. *Journal of Endotoxin Research* 8, 459-463.

**Toma, C., Pittenger, M.F., Cahill, K.S., Byrne, B.J., Kessler, P.D., 2002.** Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 105, 93-98.

**Tomchuck, S.L., Zwezdaryk, K.J., Coffelt, S.B., Waterman, R.S., Danka, E.S., Scandurro, A.B., 2008.** Toll-like receptors on human mesenchymal stem cells drive their migration and immunomodulating responses. *Stem Cells* 26, 99-107.

**Verreck, F.A.W., de Boer, T., Langenberg, D.M.L., van der Zanden, L., Ottenhoff, T.H.M., 2006.** Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN-gamma and CD40L-mediated costimulation. *Journal of Leukocyte Biology* 79, 285-293.

**Wang, X.B., Cheng, Q.S., Li, L.L., Wang, J., Xia, L., Xu, X.C., Sun, Z.M., 2012.** Toll-like receptors 2 and 4 mediate the capacity of mesenchymal stromal cells to support the proliferation and differentiation of CD34(+) cells. *Experimental Cell Research* 318, 196-206.

**Wang, Z.J., Zhang, F.M., Wang, L.S., Yao, Y.W., Zhao, Q., Gao, X., 2009.** Lipopolysaccharides can protect mesenchymal stem cells (MSCs) from oxidative stress-induced apoptosis and enhance proliferation of MSCs via Toll-like receptor(TLR)-4 and PI3K/Akt. *Cell Biology International* 33, 665-674.

**Wannemuehler, T.J., Manukyan, M.C., Brewster, B.D., Rouch, J., Poynter, J.A., Wang, Y., Meldrum, D.R., 2012.** Advances in Mesenchymal Stem Cell Research in Sepsis. *Journal of Surgical Research* 173, 113-126.

**Waterman, R.S., Tomchuck, S.L., Henkle, S.L., Betancourt, A.M., 2010.** A New Mesenchymal Stem Cell (MSC) Paradigm: Polarization into a Pro-Inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 Phenotype. *Plos One* 5.

**Williams, B.R.G., 1999.** PKR; a sentinel kinase for cellular stress. *Oncogene* 18, 6112-6120.

**Xu, J.G., Woods, C.R., Mora, A.L., Joodi, R., Brigham, K.L., Iyer, S., Rojas, M., 2007.** Prevention of endotoxin-induced systemic response by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in mice. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 293, L131-L141.

**Yagi, H., Soto-Gutierrez, A., Parekkadan, B., Kitagawa, Y., Tompkins, R.G., Kobayashi, N., Yarmush, M.L., 2010.** Mesenchymal Stem Cells: Mechanisms of Immunomodulation and Homing. *Cell Transplantation* 19, 667-679.

**Yamamoto, M., Sato, S., Mori, K., Hoshino, K., Takeuchi, O., Takeda, K., Akira, S., 2002.** Cutting edge: A novel toll/IL-1 receptor Domain containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the toll-like receptor signaling. *Journal of Immunology* 169, 6668-6672.

**Zawel, L., Dai, J.L., Buckhaults, P., Zhou, S.B., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Kern, S.E., 1998.** Human Smad3 and Smad4 are sequence-specific transcription activators. *Molecular Cell* 1, 611-617.