

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní obor: Imunologie



Bc. Veronika Somova

Modulační působení kmenových buněk na buňky imunitního systému
zprostředkované mitochondriálním transferem
Mitochondrial transfer-mediated modulatory action of stem cells on immune
cells

Diplomová práce

Vedoucí práce: doc. RNDr. Magdaléna Krulová, Ph.D.

Praha, 2022

Poděkování

Děkuji především své školitelce RNDr. Magdaléně Krulové, Ph.D. a Mgr. Biance Porubské za veškerý čas, který mi věnovaly, trpělivost, vstřícnost, nekonečnou podporu a cenné rady. Zároveň chci poděkovat všem z laboratoře imunoregulací za rady a poznámky, a taky své rodině a kamarádům za morální podporu při psaní 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, 25.4.2022

Podpis:

Abstrakt

Kmenové buňky využívají různých mechanismů mezibuněčné komunikace k modulaci imunitní odpovědi. Jedním z mechanismů je mitochondriální transfer, který indukuje metabolické změny, podporuje přežívání a mění fenotyp imunitních buněk, avšak málo je známo o mechanismech přenosu mitochondrií do různých buněčných populací a osudu mitochondrií v buňce-příjemci. Tato práce měla za cíl popsat mechanismus a modulační působení mitochondriálního transferu. Byly zkoumány faktory, které mohou přenos mitochondrií ovlivňovat: tvorba ROS, apoptóza, funkčnost mitochondrií. Dále byl popsán vliv mitochondriálního transferu na přežívání imunitních buněk a mitofagie. V neposlední řadě se tato práce soustředila na porovnání schopnosti mezenchymálních kmenových buněk a Sertoliho buněk přenášet mitochondrie. Mezenchymální kmenové buňky se ve většině případů ukázaly jako zdatnější v přenosu mitochondrií než Sertoliho buňky. Byly rovněž pozorovány velké rozdíly v přítomnosti mitochondrií z mezenchymálních kmenových buněk nebo Sertoliho buněk v námi zvolených populacích splenocytů. Proto byl podrobněji zkoumán vliv kyslíkových radikálů na přenos mitochondrií, který se jednoznačně nepotvrdil. Je ale potřeba vyzdvihnout roli mitofagie, která se, dle získaných výsledků, zdá být důležitá jak před, tak po přenosu mitochondrií do imunitních buněk.

Klíčová slova: mezenchymální kmenové buňky, Sertoliho buňky, imunitní buňky, metabolismus, mitochondrie, autofagie

Abstract

Stem cells use different mechanisms of intercellular communication to modulate an immune response. Mitochondrial transfer is one of the mechanisms which induce metabolic changes, support cell survival, and change the phenotype of immune cells. Nevertheless, little is known about the mechanism used for transfer of mitochondria between different cell populations and the fate of mitochondria inside the acceptor cell. This thesis aims to describe the mechanism of transfer and the provided modulation. Factors that could affect mitochondrial transfer including reactive oxygen species production, apoptosis and mitochondria function were analyzed. And the impact of mitochondrial transfer on cell survival and mitophagy was described. The next aim was to compare the ability of mesenchymal stem cells (MSC) and Sertoli cells (SC) to transfer mitochondria, with MSC being more productive in the transfer of mitochondria than SC. Significant differences in the presence of mitochondria from donor MSC or SC in individual populations of immune cells were also detected. To explain these findings, the impact of reactive oxygen species on the transfer of mitochondria was analyzed in detail, although it wasn't confirmed. However, it needs to be highlighted that mitophagy plays an important role before and after mitochondrial transfer according to results obtained.

Keywords: mesenchymal stem cells, Sertoli cells, immune cells, metabolism, mitochondria, autophagy

Obsah

Seznam použitých zkratk	1
1. Úvod	1
2. Literární přehled	2
2.1 Imunologický pohled na mezenchymální kmenové buňky	2
2.2 Mezibuněčná komunikace	4
2.2.1 Extracelulární vezikuly	4
2.2.2 Nanotrubičky	5
2.3 Mitochondrie, jejich role a mitochondriální transfer	6
2.3.1 Vliv mitochondriálního transferu na T lymfocyty	7
2.3.2 Vliv mitochondriálního transferu na B lymfocyty	9
2.3.3 Vliv mitochondriálního transferu na makrofágy	9
2.4 Autofagie, mitofagie a transmitofagie	10
2.5 Sertoliho buňky	11
2.5.1 Imunologický pohled na Sertoliho buňky	12
2.5.2 Mechanismy mezibuněčné komunikace	13
2.5.3 Sertoliho buňky – vlastnosti mezenchymální kmenových buněk?	14
2.6 Terapeutický potenciál mitochondriálního transferu	15
3. Cíle diplomové práce	16
4. Materiály a metody	17
4.1 Zvířata	17
4.2 Média a roztoky	17
4.3 Technické vybavení	17
4.4 Software	18
4.5 Izolace splenocytů	18
4.6 Izolace mezenchymálních kmenových buněk a Sertoliho buněk	18
4.7 Barvení mitochondrií	18

4.8	Ko-kultivační <i>in vitro</i> pokusy	19
4.8.1	Analýza závislosti mitochondriálního transferu na přímém kontaktu buněk	19
4.8.2	Poškození mitochondrií	20
4.8.3	Vliv kyslíkových radikálů na mitochondriální transfer	20
4.9	Průtoková cytometrie	20
4.9.1	Analýza apoptózy splenocytů	23
4.9.2	Měření mitofagie na průtokovém cytometru	23
4.9.3	Měření ROS a mitoROS na průtokovém cytometru	24
4.10	Real-time PCR (qPCR)	24
4.10.1	SORT	24
4.10.2	Izolace RNA.....	25
4.10.3	Reverzní transkripce	26
4.10.4	Měření qPCR	26
4.11	Mikroskopie MSC/SC a splenocytů po ko-kultivaci.....	27
4.12	Statistická analýza	27
5.	Výsledky	28
5.1	Přenos mitochondrií do imunitních buněk.....	28
5.2	Závislost mitochondriálního transferu na přímém kontaktu buněk	29
5.3	Vliv mitochondriálního transferu na přežívání splenocytů.....	31
5.4	Mitochondriální transfer a vliv poškození mitochondrií	32
5.4.1	Poškození mitochondrií	34
5.4.2	Apoptóza	35
5.4.3	Tvorba kyslíkových radikálů	36
5.5	Vliv kyslíkových radikálů na mitochondriální transfer	36
5.5.1	Vliv tvorby ROS a mitochondriálních ROS na mitochondriální transfer	38
5.5.2	Mitofagie a její vliv na mitochondriální transfer	40

5.6	Mitochondriální transfer a jeho vliv na mitofagii	41
5.6.1	Průtoková cytometrie – mitofagie.....	41
5.6.2	qPCR – autofagie a mitofagie	43
5.7	Obousměrnost mitochondriálního transferu	44
6.	Diskuze	46
7.	Závěr.....	52
8.	Použité zdroje	53

Seznam použitých zkratek

ALDH1A2	Rodina aldehyd dehydrogenáza 1 člen 2 (aldehyde dehydrogenase 1 family member A2)
BTB	bariéra mezi krví a varletem (blood-testis barrier)
Cx43	connexin 43
EV	extracelulární vezikul
Foxp3	gen aktivní v regulačních T lymfocytech (forkhead box P3)
GDNF	neurotrofní faktor gliových buněk (glial cell line-derived neurotrophic factor)
hWJ-MSC	lidské mezenchymální kmenové buňky izolované z Whartonova rosolu (Human Wharton's jelly mesenchymal stem cells)
IDO	indolamin 2,3-dioxygenáza
IFN-γ	interferon gamma
IGF1	Inzulinu podobný růstový faktor 1 (insulin-like growth factor 1)
LPS	lipopolysacharid
mitoROS	mitochondriální kyslíkové radikály
mitotransfer	mitochondriální transfer
MSC	mezenchymální kmenová buňka (mesenchymal stem cell)
Mϕ	makrofág
NAC	N-acetylcystein
OL	oligomycin
PD-L1	ligand programované buněčné smrti (programmed death-ligand)
RDH10	Retinol dehydrogenáza 10 (retinol dehydrogenase 10)
ROS	reaktivní kyslíkové radikály (reactive oxygen species)
ROT	rotenon

SC	Sertoliho buňka (Sertoli cell)
SPL	splenocyt
SSC	spermatogoniální kmenová buňka (spermatogonial stem cell)
TGF-β1	transformující růstový faktor beta 1 (transforming growth factor beta 1)
TLR	toll-like receptor
TNT	nanotrubička (tunneling nanotube)

1. Úvod

Mezenchymální kmenové buňky (MSC, mesenchymal stem cells) jsou často asociovány s procesem imunoregulace, a to především díky schopnosti ovlivňovat prostředí, ve kterém se nachází. Jejich vliv spočívá hlavně v sekreci velkého množství protizánětlivých, angiogenních a antiapoptotických faktorů, cytokinů a extracelulárních váčků, ale i v přímém kontaktu a propojení buněk, při němž může docházet k přenosu organel.

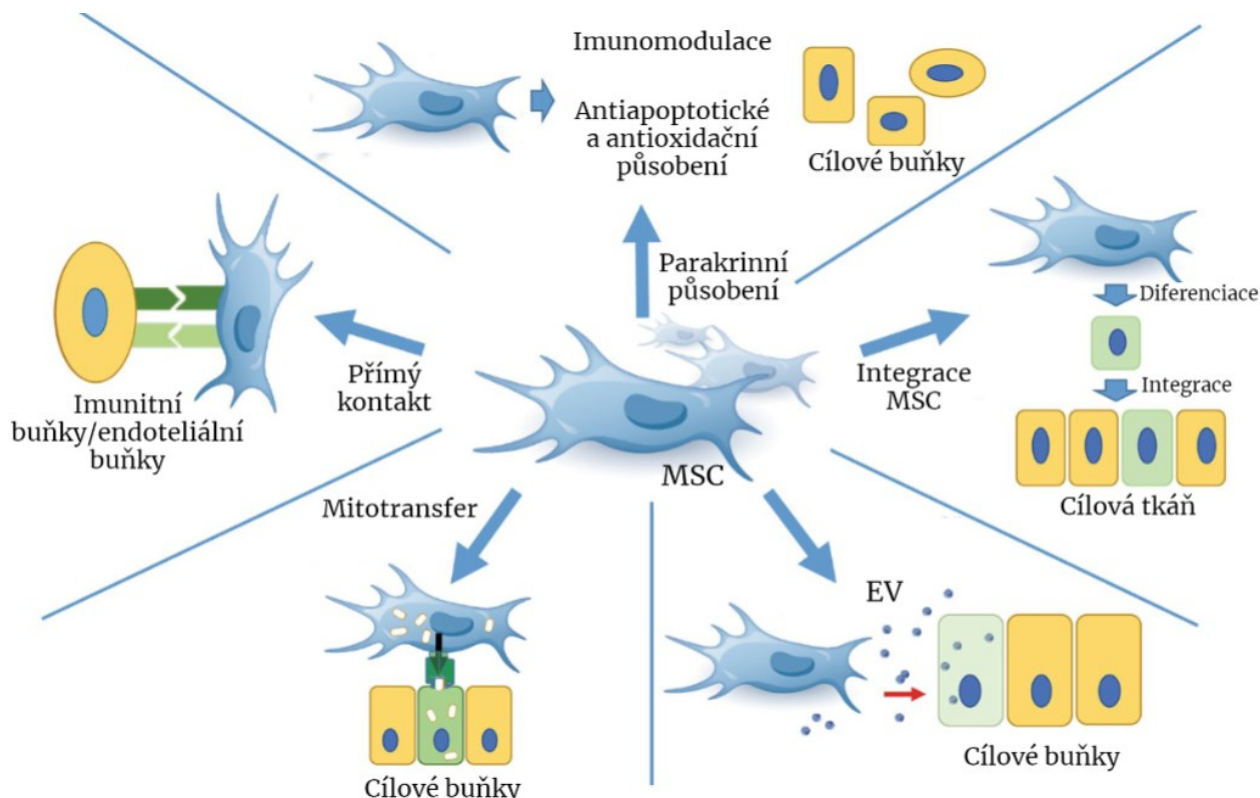
Z hlediska imunitního systému je působení MSC považováno za imunomodulační. Cytokiny a faktory produkované MSC modulují imunitní odpověď, polarizují imunitní buňky ve směru protizánětlivém, tlumí cytotoxicitu již polarizovaných zánětlivých buněk, nebo v nich spouští dráhy vedoucí k apoptóze. MSC mají rovněž vlastnosti regenerační. Jedná se o buňky, které dokážou diferencovat do mnoha dalších buněčných typů, čímž se aktivně podílí na hojení. Všechny popsané vlastnosti slouží k udržení homeostázy ve tkáních a zároveň přitahují velkou pozornost vědecké komunity především kvůli možnosti mnohostranného klinického využití MSC.

Vlastnosti podobné MSC byly v naší laboratoři popsány i u jiného druhu buněk, a to Sertoliho buněk (SC, Sertoli cells). Již dlouhou dobu je známo, že SC v prostředí semenotvorných kanálků udržují homeostázu a protizánětlivý stav imunitního systému velice podobným mechanismem jako MSC, a to produkcí cytokinů a jiných imunosupresivních faktorů. V naší laboratoři jsme ukázali, že SC mají i mnoho morfologických a funkčních podobností s MSC, jako jsou povrchové znaky, schopnost diferenciacce, ale i schopnost přímého kontaktu s imunitními buňkami prostřednictvím tzv. nanotrubiček, při kterém dochází k přenosu organel, konkrétně mitochondrií (Porubská et al., 2021). Porovnání vlastností MSC a SC z hlediska ovlivnění imunitního systému a mitochondriálního transferu (mitotransfer) přinese nové imunoregulační poznatky a nové možnosti klinického využití nejen MSC, ale i SC.

2. Literární přehled

2.1 Imunologický pohled na mezenchymální kmenové buňky

MSC jsou multipotentní buňky schopné diferencovat do mnoha dalších buněčných typů, např. tukových buněk, chondrocytů a osteoblastů. Jedná se o buňky s vysokou mírou sebeobnovy, nízkou imunogenicitou, a zároveň silnými imunomodulačními vlastnostmi (viz. Obr. 1 a 2) (Dominici et al., 2006; Jiang et al., 2020).

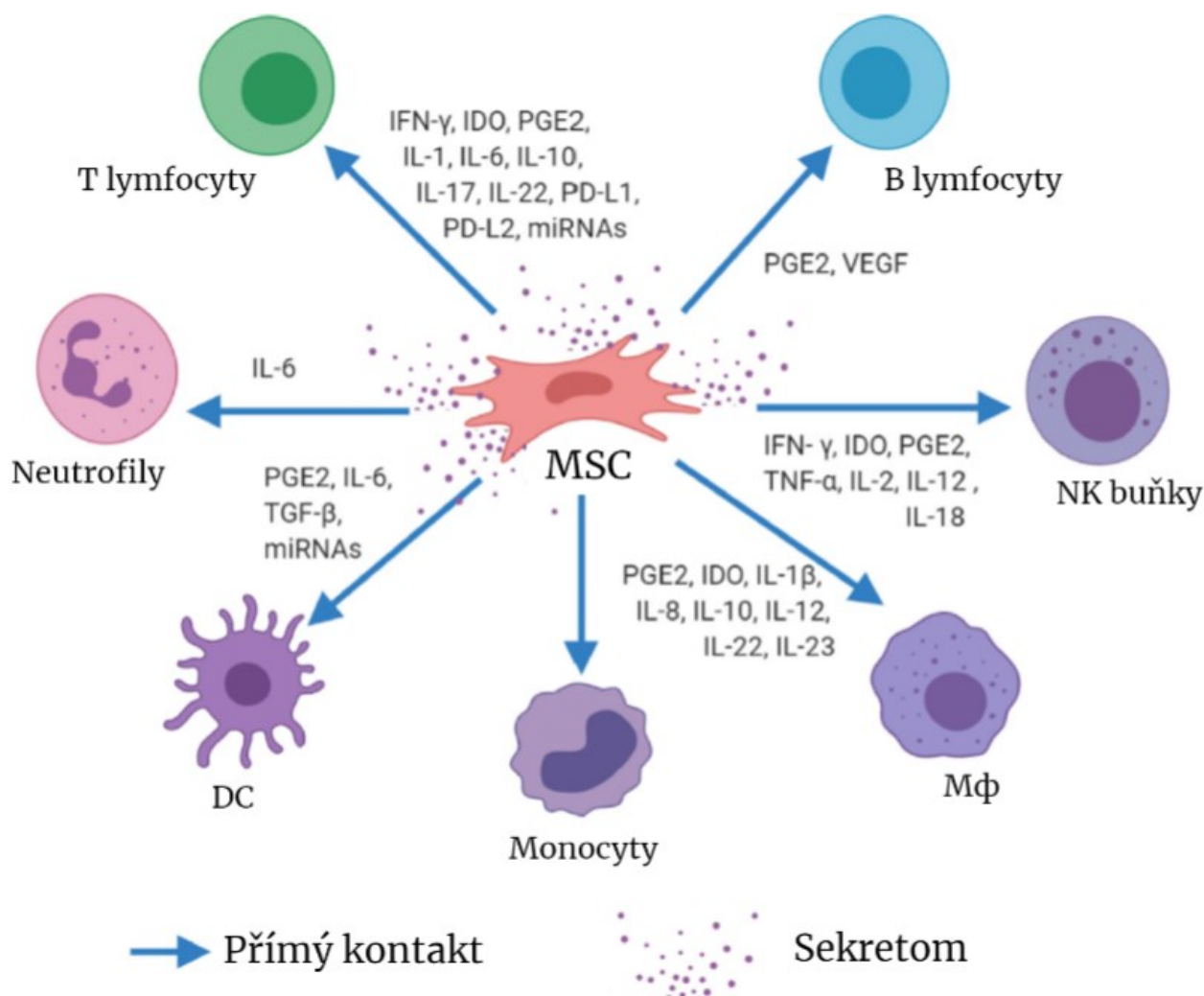


Obrázek 1. Vlastnosti mezenchymálních kmenových buněk – mezibuněčná komunikace a imunomodulace. EV – extracelulární vezikuly, MSC – mezenchymální kmenová buňka (mesenchymal stem cell). Převzato a upraveno: (Fan et al., 2020)

Imunomodulace zprostředkovaná MSC je dobře popsána (viz. Obr. 2). Většina studií zdůrazňuje imunosupresi, avšak působení MSC není ve všech případech jednoznačně protizánětlivé. Záleží totiž na tom, jak dlouho zánět probíhá a taky na mikroprostředí, ve kterém se MSC nachází (Aggarwal et al., 2005; Jiang et al., 2020). Je nutno zdůraznit, že MSC zajišťují a udržují bilanci mezi prozánětlivou a protizánětlivou imunitní odpovědí. To znamená, že přílišné naklonění váhy ve směru prozánětlivém indukuje imunosupresivní vlastnosti MSC. Spektrum mechanismů, které jsou MSC využívány k imunosupresi, je velice široké. Obecně se jedná jak o parakrinní působení

zprostředkované protizánětlivými cytokiny, exosomy aj., tak přímý kontakt, ať už skrz inhibiční receptory, nebo dokonce propojení buněk, při kterém dochází k přenosu cytoplazmatického obsahu, včetně organel (viz. Obr. 1) (Mishra et al., 2020).

Indukci imunosupresivního působení MSC zajišťuje především IFN γ (interferon gamma), produkovaný převážně aktivovanými T lymfocyty a NK buňkami v pozdější fázi zánětu. Ovlivnění MSC pomocí IFN γ např. stimuluje expresi inhibitorů imunitních buněk PD-L1 (programmed cell death ligand) a PD-L2, produkciIDO (indolamin 2,3-dioxygenáza) a značně zvyšuje jejich celkovou terapeutickou kapacitu (Kanai et al., 2021; Kim et al., 2018).



Obrázek 2. Imunomodulace zprostředkovaná mezenchymálními kmenovými buňkami. DC – dendritická buňka (dendritic cell), EV – extracelulární vezikuly, MSC – mezenchymální kmenová buňka (mesenchymal stem cell), Mφ – makrofág. Převzato a upraveno: (Song et al., 2020)

Terapeutické vlastnosti MSC jsou dány mimo jiné jejich schopností migrovat do poškozených tkání, kde se podílí na regeneraci a mírní zánět. Díky nízké imunogenicitě je

možné MSC transplantovat, ať už alogenně, nebo autologně (Burnham et al., 2020). Detailní mechanismus migrace MSC ale zatím není dostatečně prozkoumán. Některé studie dokonce ukazují, že transplantované syngenní MSC již první den spustily dráhy vedoucí k apoptóze a měly tak poměrně krátkou životnost a omezenou migrační kapacitu po intravenózním podání (Preda et al., 2021). To znamená, že mechanismus, kterým transplantované MSC modulují imunitní systém v zánětlivém prostředí může spočívat právě ve fagocytóze apoptotických MSC zprostředkované monocyty. Tyto monocyty pak polarizují do neklasického fenotypu produkujícíhoIDO, IL-10 a PD-L1, zatímco produkce TNF- α je potlačena (Galleu et al., 2017; Weiss et al., 2020; de Witte et al., 2018). Nicméně způsobů interakce MSC s okolím je více, a není tedy omezená pouze na parakrinní produkci.

2.2 Mezibuněčná komunikace

Komunikace je nepostradatelná vlastnost kmenových buněk, jejichž úkolem v rámci příslušných orgánů je zprostředkovávat podporu a koordinaci parenchymálních progenitorových buněk. Schopnost efektivní mezibuněčné komunikace je klíčová pro udržení homeostázy v mikroprostředí vytvářeném MSC. Za nejčastější prostředky komunikace se v případě MSC považují rozpustné faktory, extracelulární vezikuly (EV, extracellular vesicles), konkrétně mikrovezikuly/exosomy, a přímý kontakt pomocí tzv. nanotrubiček (TNT, tunnelling nanotubes) a gap junctions.

2.2.1 Extracelulární vezikuly

Při popisování EV se využívá hrubého rozdělení do tří skupin. Největšími váčky jsou 1-5 μm velká apoptotická tělíška, která vznikají v důsledku apoptózy. Za mikrovezikuly považujeme 0,1-1 μm velké váčky produkované v důsledku metabolických změn, či stresových podmínek. Nejmenšími jsou exosomy, 30-150 nm velké váčky, kontinuálně sekretované buňkami nezávisle na podmínkách (Kowal et al., 2016). Definování EV pouze na základě velikosti je ale zavádějící, jelikož se typy a funkce často překrývají. Z tohoto důvodu se pro identifikaci homogenní populace EV doporučuje využití většího množství vhodných parametrů a markerů (Bazzan et al., 2021).

Bylo prokázáno, že exosomy derivované z MSC měly vlastnosti, které podpořily hojení kožního poranění, syntézu kolagenu a vaskularizaci v místě poranění. To znovu poukazuje na schopnost MSC nepřímo ovlivňovat prostředí (Zhang et al., 2015). V zásadě se jedná o parakrinní způsob komunikace, který nevyžaduje přímou přítomnost MSC

v místě poranění, a tedy nabízí možnost využití pouze izolovaných exosomů, nebo kondiciovaného média, u kterého byly rovněž prokázány protizánětlivé vlastnosti (Ke et al., 2016; Melief et al., 2013).

Terapeutický potenciál exosomů byl ukázán na mnoha modelech zánětlivých stavů. V modelu perinatálního mozkového poškození byly exosomy schopny přímou interakcí s membránovým komplexem TLR4 (Toll-like receptor 4)/CD14 inhibovat prozánětlivou signalizaci v mikroglíích (Thomi et al., 2019). V modelech diabetu I. typu a autoimunitní uveitidy potlačily aktivaci antigen-prezentujících buněk a vývoj Th1 a Th17 buněk (Shigemoto-Kuroda et al., 2017). Nejaktuálnějším příkladem terapeutických vlastností EV je využití u pacientů s COVID-19. V případě časného podání EV vykazaly schopnost zmírňovat cytokinovou bouři (Sengupta et al., 2020). Existuje mnoho dalších příkladů protizánětlivého působení EV derivovaných z MSC (Harrell et al., 2019). Jedná se totiž o dobře prozkoumaný mechanismus mezibuněčné komunikace. V posledních letech se ale objevují zmínky o tom, že paralelně s komunikací zprostředkované EV probíhá další – prostřednictvím takzvaných nanotrubiček (TNT, tunneling nanotubes) (viz. Obr. 3). Zatím není úplně jasné, do jaké míry tyto dva způsoby předávání informací a materiálů mezi buňkami spolu souvisí.

2.2.2 Nanotrubičky

TNT jsou cytoplazmatické výběžky, které mezi buňkami tvoří kanály o délce 50-200 nm. Ty jsou využity k obousměrnému přenosu biomolekul, organel, ale i patogenních struktur a molekul. Podobně jako u EV existuje několik morfologicky odlišných subtypů TNT. K propojení buněk většinou dochází v důsledku polymerizace aktinu (Keller et al., 2020; Zhang et al., 2018), avšak signální dráhy zprostředkující vznik TNT zatím nejsou dobře prozkoumány.

Na rozdíl od drobného nákladu typu lipidů, proteinů a nukleových kyselin, které jsou většinou přepravovány pomocí EV, TNT slouží převážně k přepravě lysozomů (Abounit et al., 2016), váčků Golgiho aparátu a endoplazmatického retikula (Kadiu et al., 2011), mitochondrií (Jackson et al., 2016; Wang et al., 2015), ale i intracelulárních signalizačních molekul, např. Ca^{2+} (Lock et al., 2016).

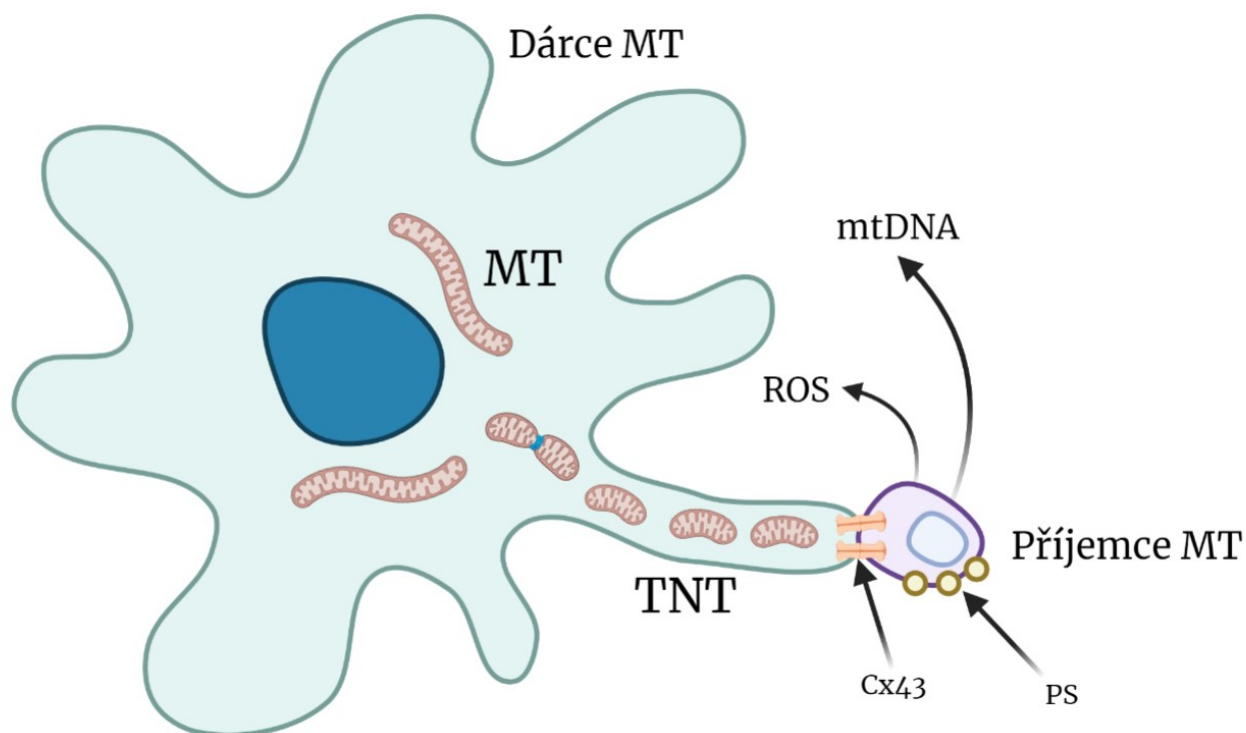
Ke vzniku TNT dochází za fyziologických podmínek, avšak je známo, že za stresových podmínek je jejich vznik frekventovanější. Prostřednictvím TNT jsou MSC schopny reagovat na oxidativní stres a apoptotické signály ve svém okolí, kyslíkové

radikály (ROS, reactive oxygen species) a mitochondriální dysfunkci buněk (Burt et al., 2019; Michaeloudes et al., 2021). Transportem zdravých mitochondrií ovlivňují celkovou životnost a metabolismus příjemců, a v případě imunitních buněk také jejich polarizaci (Court et al., 2020; Yuan et al., 2021). Jelikož je vznik TNT do jisté míry důsledkem oxidativního stresu, mluví se o ROS a mitochondriálních Rho GTPázách jako o induktorech jejich tvorby a následného transferu mitochondrií (Chuang et al., 2017; Mistry et al., 2019). Jiná studie zdůrazňuje roli fosfatidylserinu na povrchu apoptotických buněk, který rovněž dokázal indukovat tvorbu TNT (Liu et al., 2014). S tvorbou TNT a mitochondriálním transferem jsou často spojovány i proteiny gap junctions – connexiny 43 (Cx43) (viz. Obr. 3) (Li et al., 2019; Yao et al., 2018). Ovlivnění buněk specifickým inhibítorem Cx43 Gap26 a inhibítorem polymerace aktinu cytochalasinem D významně potlačilo protektivní schopnosti MSC (Yao et al., 2018).

Mitotransfer zprostředkovaný TNT má prokázané protektivní a imunomodulační vlastnosti. Detailnější pochopení mechanismu komunikace MSC a imunitních buněk prostřednictvím přenosu mitochondrií má značný terapeutický potenciál.

2.3 Mitochondrie, jejich role a mitochondriální transfer

Společnou vlastností všech metabolických schémat je centrální postavení mitochondrií. Jedná se o organelu, hrající dominantní roli v klíčových biologických procesech, např. oxidativní fosforylaci, aerobním metabolismu a dráhách vedoucích k buněčné smrti. Přenos mitochondrií mezi buňkami byl pozorován v poškozených tkáních, kde měl protektivní a obnovovací efekt na buňky příjemce. V *in vitro* modelu ischemického poškození endoteliálních buněk byly provedeny ko-kultivační pokusy s MSC. Liu *et al.* (2014) potvrdili přenos funkčních mitochondrií prostřednictvím TNT a jeho protektivní efekt na HUVEC buňky (human umbilical vein endothelial cells). Přičemž převládal přenos zdravých mitochondrií ve směru od MSC do endoteliálních buněk (Liu et al., 2014). Obousměrnost transferu byla pozorována při ko-kultivaci MSC a buněk vaskulárního hladkého svalstva, kdy byla propojením buněk pomocí TNT a přenosem mitochondrií indukována proliferace MSC (Vallabhaneni et al., 2012).



Obrázek 3. Schéma znázorňující mitochondriální transfer. *Cx43* – connexin 43, *MT* – mitochondrie, *mtDNA* – mitochondriální DNA, *PS* – fosfatidylserin (phosphatidylserine), *ROS* – reaktivní kyslíkové radikály (reactive oxygen species), *TNT* – nanotrubička (tunneling nanotube). Vlastní tvorba: BioRender.com

Mitochondrie a s nimi související metabolismus hrají důležitou roli i v polarizaci imunitního systému. Aktivace imunitních buněk je asociována s přechodem na glykolýzu jako rychlý zdroj energie a redukováných koenzymů nezbytných pro jejich rychlý růst (Jiang et al., 2019; Tannahill et al., 2013). Na druhou stranu Krebsův cyklus je v aktivovaném stavu neobvyklý. Dochází k jeho přerušení ve dvou místech, které vede ke hromadění citrátu a sukcinátu. Citrát je buňkou následně využit k syntéze mastných kyselin a výstavbě membrán. Sukcinát se účastní produkce zánětlivých cytokinů (Jha et al., 2015). V případě protizánětlivého, nebo regulačního stavu imunitních buněk převládá oxidativní fosforylace, zcela vázaná na zdravé a funkční mitochondrie (Angelin et al., 2017; Chou et al., 2021). Z výše zmíněného vyplývá, že mitotransfer může přímo ovlivnit metabolický stav imunitních buněk a polarizovat je ve směru protizánětlivém.

2.3.1 Vliv mitochondriálního transferu na T lymfocyty

Již dříve bylo prokázáno, že imunopresivní působení MSC může být závislé na přímém kontaktu buněk. Při ko-kultivaci MSC s T lymfocyty, vykazujícími prozánětlivou polarizaci (Th1 a Th17), docházelo ke zvýšené expresi PD-L1 na povrchu MSC a

selektivní imunosupresi. Překvapivě, oddělení buněk v kultivační destičce s pomocí transwell separační bariéry vedlo k potlačení diferenciaci naivních T lymfocytů do Th1 a Th17, ale ne ke snížené tvorbě cytokinu IL-17 již maturovanými T lymfocyty. To znamená, že i přes silnou imunosupresivní kapacitu solubilních faktorů, je stále potřeba přímého kontaktu mezi buňkami (Luz-Crawford et al., 2012). Podobný efekt byl pozorován i v modelu autoimunitních onemocnění. Systémově podávané MSC indukovaly apoptózu T lymfocytů mimo jiné prostřednictvím interakce Fas a Fas-L, což vedlo ke zlepšení klinického fenotypu onemocnění (Akiyama et al., 2012).

Mitotransfer je rovněž asociován se změnou polarizace T lymfocytů ve směru protizánětlivém. Ko-kultivace primárních lymfocytů s MSC ukázala, že množství mitochondrií přijatých $CD4^+$ T lymfocyty je procentuálně nejvyšší ve srovnání s ostatními populacemi buněk ($CD8^+$ T a $CD19^+$ B lymfocyty). V této skupině dále převládají paměťové ($CD45RO^+$) a zároveň $CCR6^+$ T lymfocyty, neboli paměťové Th17. Buňky z této populace, které mitochondrie obdržely, měly nižší produkci IL-17 a vyšší OCR (oxygen consumption rate) ve srovnání s negativní populací, což svědčí o upřednostnění oxidativní fosforylace těmito buňkami a imunosupresi (Luz-Crawford et al., 2019). Obecný vliv mitochondriálního transferu na celkovou populaci $CD3^+$ T lymfocytů tedy spočívá v podpoře exprese genů asociovaných s polarizací T lymfocytů do Treg (regulačního fenotypu), např. *FOXP3* (forkhead box P3), *IL2RA* (interleukin-2 receptor alpha chain), *CTLA4* (cytotoxic T lymphocyte antigen 4), and *TGFB1* (transforming growth factor beta 1). Což znamená, že mitotransfer podporuje $CD127^{low}CD25^+FoxP3^+$ Treg fenotyp (Court et al., 2020) a zároveň potlačuje prozánětlivý Th17 (Luz-Crawford et al., 2019). Čerstvé studie navíc ukazují, že MSC zlepšují imunosupresivní schopnosti Treg prostřednictvím přímého kontaktu a transferu mitochondrií. Buňky, které mitochondrie obdržely, měly taky výrazně stabilnější expresi *FOXP3*, což je klíčový gen vývojových a funkčních drah Treg (Do et al., 2021; Piekarska et al., 2022).

Za zmínku stojí i nepříznivé vlivy mitochondriálního transferu. Nádorové buňky tvoří mikroprostředí charakteristické těsnou komunikací i přímým přenosem mitochondrií, a to nejen mezi nádorovými buňkami navzájem (Lou et al., 2018), ale i s ostatními buňkami včetně imunitních (Saha et al., 2022) a MSC (Wang et al., 2018). Podpora oxidativní fosforylace, jak již bylo zmíněno, je spojována s diferenciací a proliferací buněk, a tedy není v kontextu nádorového mikroprostředí příznivá. Nemusí to ale být jediným důvodem, proč k mitochondriálnímu transferu v nádorech dochází. Jako zajímavý

příklad lze uvést přenos mitochondrií mezi MSC a buňkami akutní lymfoblastické T-buněčné leukemie (T-ALL). Zde probíhal transfer převážně ve směru od T-ALL buněk do MSC. V důsledku chemoterapeutické léčby měly buňky mitochondrie poškozené oxidativním stresem, a tak docházelo ke „zbavování se zátěže“ (Wang et al., 2018).

2.3.2 Vliv mitochondriálního transferu na B lymfocyty

Poměrně málo se ví o přenosu mitochondrií mezi MSC a B lymfocyty. Jedna studie okrajově zmiňuje, že po 4hodinové ko-kultivaci docházelo k přenosu mitochondrií do CD19⁺ buněk, a to v mnohem menší míře, než do T lymfocytů (Luz-Crawford et al., 2019). Je ale známo, že převážně maturované B lymfocyty využívají TNT k spontánní tvorbě velkých mezibuněčných sítí. Tento proces je asociován s přímým kontaktem buněk a interakcí integrinů s dalšími povrchovými proteiny. B lymfocyty si prostřednictvím TNT předávají nejen lysozomy, váčky a povrchové molekuly (např. MHC-II a B7-2), ale i mitochondrie (Osteikoetxea-Molnár et al., 2016; Tóth et al., 2017). B-buněčné sítě zahrnují i jiné buňky imunitního systému. Byl pozorován např. transfer H-Ras, malé GTPázy, z B do T buněk s využitím TNT (Rainy et al., 2013). TNT kanály byly taky využity jako úniková strategie HIV-1, kdy docházelo k přenosu proteinu Nef (negative factor, imunosupresivní protein HIV-1) mezi infikovanými makrofágy a B lymfocyty (Hashimoto et al., 2016; Xu et al., 2009).

Tyto a mnoho dalších příkladů poukazují na to, že B lymfocyty tvoří a využívají TNT kanály k přímému mezibuněčnému kontaktu a transferu proteinů, váček a organel včetně mitochondrií. Podrobnější mechanismus vyplývající ze získaných výsledků a možné důvody, proč nedochází ke stejně produktivnímu transferu mitochondrií mezi MSC/SC a B lymfocyty, budou diskutovány v kapitole *Diskuze*.

2.3.3 Vliv mitochondriálního transferu na makrofágy

Makrofágy jsou buňky přirozeného imunitního systému, které hrají důležitou roli nejen z hlediska fagocytózy patogenů, ale i tkáňové regenerace a vytváření zánětlivého stavu v obézní tukové tkáni. Právě snížená míra mitotransferu mezi tukovými buňkami a makrofágy je asociována se začátkem zánětu v tukové tkáni, který je indukován prozánětlivým působením IFN- γ a M1 polarizací makrofágů (Brestoff et al., 2021). Mitotransfer v případě makrofágů tedy znovu působí protizánětlivě, na což poukazuje hned několik *in vitro* a *in vivo* studií zaměřených především na komunikaci makrofágů s MSC. Ve všech případech vedl mitotransfer k podpoře oxidativní fosforylace v buňkách a

následné selektivní diferenciaci makrofágů do protizánětlivého M2 fenotypu. Došlo rovněž ke zlepšení fagocytické kapacity, s tím spojeného antimikrobiálního působení a celkového energetického stavu, které je důsledkem přenosu zdravých mitochondrií do buněk (Jackson et al., 2016; Morrison et al., 2017; Yuan et al., 2021). Je nutno podotknout, že mitotransfer v tomto případě probíhal jak skrz TNT (Jackson et al., 2016; Yuan et al., 2021), tak parakrinním způsobem, konkrétně prostřednictvím EV (Morrison et al., 2017).

Osud mitochondrií v makrofázích se ale zdá být mnohem komplexnější a závisí mj. na celkovém stavu MSC závislém na kultivačních podmínkách a autofagii v donorech i příjemcích mitochondrií (viz. kapitola 2.4).

2.4 Autofagie, mitofagie a transmitofagie

Autofagie je proces, při kterém dochází k degradaci poškozených a nefunkčních organel, ribozomů a proteinových agregátů. Obecně se autofagie považuje za mechanismus přežívání, jehož cílem je udržení homeostázy v buňce a získání energie pro biogenezi nových funkčních organel (Dikic et al., 2018).

Mitofagie je selektivní degradace mitochondrií. V návaznosti na makrofágy je nutno zmínit i tzv. transmitofagii, kterou využívají MSC za standardních kultivačních podmínek, tedy 21 % O₂, což je 4x vyšší než v podmínkách fyziologických. Za těchto podmínek docházelo v MSC k oxidativnímu stresu a mitofagii, která překvapivě neprobíhala uvnitř těchto buněk, ale v makrofázích. MSC produkovaly EV, obsahující částečně depolarizované mitochondrie odsouzené k mitofagii. Tyto váčky byly následně fagocytovány makrofágy. Mitochondrie byly poté recyklovány fúzí se zdravými mitochondriemi makrofágů, což vedlo k celkovému zlepšení jejich energetického stavu (Phinney et al., 2015).

Ukazuje se, že MSC poměrně běžně interferují s autofagií v imunitních buňkách. Mohou inhibovat signalizaci přes mTOR (mammalian target of rapamycin) v aktivovaných T lymfocytech, čímž aktivují autofagii. Podle výsledků Böttcher *et al.* (2016) indukují MSC tímto způsobem metabolicky klidový fenotyp v T lymfocytech, který je charakteristický právě zvýšenou autofagií (Böttcher et al., 2016). MAIT (mucosal-associated invariant T cells), byly naopak aktivovány IL-15, produkovaným MSC, který vedl ke zvýšení autofagie v tomto nekonvenčním typu T lymfocytů (Ye et al., 2021).

Bylo také pozorováno, že MSC, u kterých byla navozena autofagie pomocí rapamycinu, inhibitoru mTOR, měly vyšší imunosupresivní kapacitu ve srovnání

s kontrolní skupinou (Gao et al., 2016b; Kim et al., 2015). V rozporu s tím je starší studie, která naopak zdůrazňuje, že inhibice autofagie v MSC vedla ke zlepšení terapeutických vlastností MSC po transplantaci *in vivo*. Tento efekt spočíval především v potlačení aktivace a proliferace CD4⁺ T lymfocytů (Dang et al., 2014). Autofagie je tedy důležitá jak na straně MSC, tak imunitních buněk. Výsledky získané Gao *et al.* (2016b) zdůrazňují roli zvýšené produkce TGF-β1 u MSC ovlivněných rapamycinem (Gao et al., 2016b), je ale dost možné, že zároveň docházelo k transmitofagii podobně, jako je tomu u makrofágů, což rovněž přispívalo k imunosupresi zprostředkované MSC.

2.5 Sertoliho buňky

Sertoliho buňky (SC, Sertoli cells) jsou unikátní populací nedělících se buněk, které nasedají na bazální membránu semenotvorných kanálků a jsou aktivní po dobu reprodukčního života jedince. Prostřednictvím komplexů mezibuněčných spojů, konkrétně gap junctions a těsných spojů, vytváří polopropustnou BTB (bariéra mezi krví a varletem, blood-testis barrier) a udržují se v těsném kontaktu mezi sebou navzájem a samčími zárodečnými buňkami po celou dobu jejich vývoje (França et al., 2016).

SC se říká „nurse-cells” a to proto, že vytváří mikroprostředí pro vývoj, diferenciaci a celkovou homeostázu SSC (spermatogoniální kmenové buňky, spermatogonial stem cells). Pro podporu funkce sebeobnovy SSC je SC produkován GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor). Exprese genu pro GDNF probíhá cyklicky během spermatogeneze a je závislá na jednotlivých fázích vývoje spermie (Sharma et al., 2018). Poslední studie rovněž zdůrazňuje roli testosteronu, který má zesilující efekt na expresi genu *Gdnf* (Zaker et al., 2022). Dále dochází k transferu železa Fe⁺³ vázaného na transferin skrz BTB. To je následně zárodečnými buňkami zpracováno a využito k meiotickému a mitotickému dělení, a k biogenezi mitochondrií (Leichtmann-Bardoogo et al., 2012; Sylvester et al., 1994). Je nutno zmínit, že SC železo nejen poskytují, ale i odklízí, čímž zabraňují jeho akumulaci a zajišťují tak detoxifikaci varlat (Leichtmann-Bardoogo et al., 2012; Yan, 2015). Do svého mikroprostředí dále produkují velké množství laktátu, který je zárodečnými buňkami využit jako energetický substrát, ale i jako regulátor genové exprese, signálních drah a ROS (Galardo et al., 2014; Mateus et al., 2018; Schrade et al., 2016). V důsledku defektu produkce laktátu, způsobeného např. varikokélou, může docházet i k neplodnosti mužů (Guo et al., 2020).

Prostřednictvím BTB komunikují SC nejen se samčími zárodečnými buňkami, ale i s vnějším prostředím semenotvorných kanálků, včetně imunitního systému. To, že jsou

varlata považována za imunoprivilegované místo je zásluha především SC a jejich imunosupresivních vlastností.

2.5.1 Imunologický pohled na Sertoliho buňky

Samčí zárodečné buňky, konkrétně meiotické a post-meiotické, se objevují poprvé během dospívání a jsou imunitním systémem vnímány z pohledu „nových a neznámých“ antigenů. Jak již bylo zmíněno, v semenotvorných kanálcích SC vytváří mikroprostředí, které podporuje zrání a proliferaci zárodečných buněk. BTB rovněž zprostředkuje ochranu před imunitním systémem. Dochází totiž k fyzickému oddělení prostředí, kde se zárodečné buňky nachází, a k zabránění rozpoznání auto-antigenů, což by jinak vedlo k autoimunitní odpovědi (Mita et al., 2011). Imunosupresivní vlastnosti BTB jsou ale mnohem širší. SC produkují řadu růstových faktorů a protizánětlivých cytokinů, které vytváří tolerogenní imunitní prostředí, bránící potenciálnímu zánětu (Dutta et al., 2021).

SC komunikují jak s adaptivní, tak přirozenou imunitou v prostředí semenotvorných kanálků. Jsou známy tím, že udržují dendritické buňky v nezralém stavu a potlačují v nich expresi povrchových molekul, např. kostimulačních CD80/CD86 a chemokinového receptoru CCR7, který je nezbytný k migraci dendritických buněk do lymfatických uzlin. Dendritické buňky, ko-kultivované se SC, prokazovaly tolerogenní fenotyp – neprodukovaly zánětlivé cytokiny, inhibovaly T-buněčnou proliferaci a polarizovaly je směrem k regulačnímu Foxp3⁺ fenotypu (Gao et al., 2016a).

V některých případech, např. pod vlivem IFN- γ , vykazovaly samy SC vlastnosti neprofesionálních tolerogenních antigen-prezentujících buněk. Docházelo k expresi negativního kostimulačního ligandu PD-L1, ale taky MHC II. třídy (Dal Secco et al., 2008; Wang et al., 2019). Ko-kultivační pokusy ukázaly zvýšení podílu Treg buněk ve smíšené kultuře T lymfocytů a přímou inhibici CD8⁺ T lymfocytů prostřednictvím PD-L1 (Dal Secco et al., 2008). Naopak pacienti s poruchou spermatogeneze měli abnormální počty makrofágů, T a B lymfocytů v testikulárním prostředí a všechny známky aktivace imunitního systému, nejspíš v důsledku porušení BTB (Hussein et al., 2005).

Kritické pro imunoprotekci v prostředí semenotvorných kanálků je udržení většiny populace makrofágů v protizánětlivém M2 stavu. U zdravých jedinců je takto polarizovaných 80 % makrofágů. Tento fenotyp je pravděpodobně udržován SC prostřednictvím cytokinů TGF- β , IL-10 a aktivinu-A (Wang et al., 2017). Je zajímavé, že populace tzv. peritubulárních makrofágů lokalizována na povrchu semenotvorných

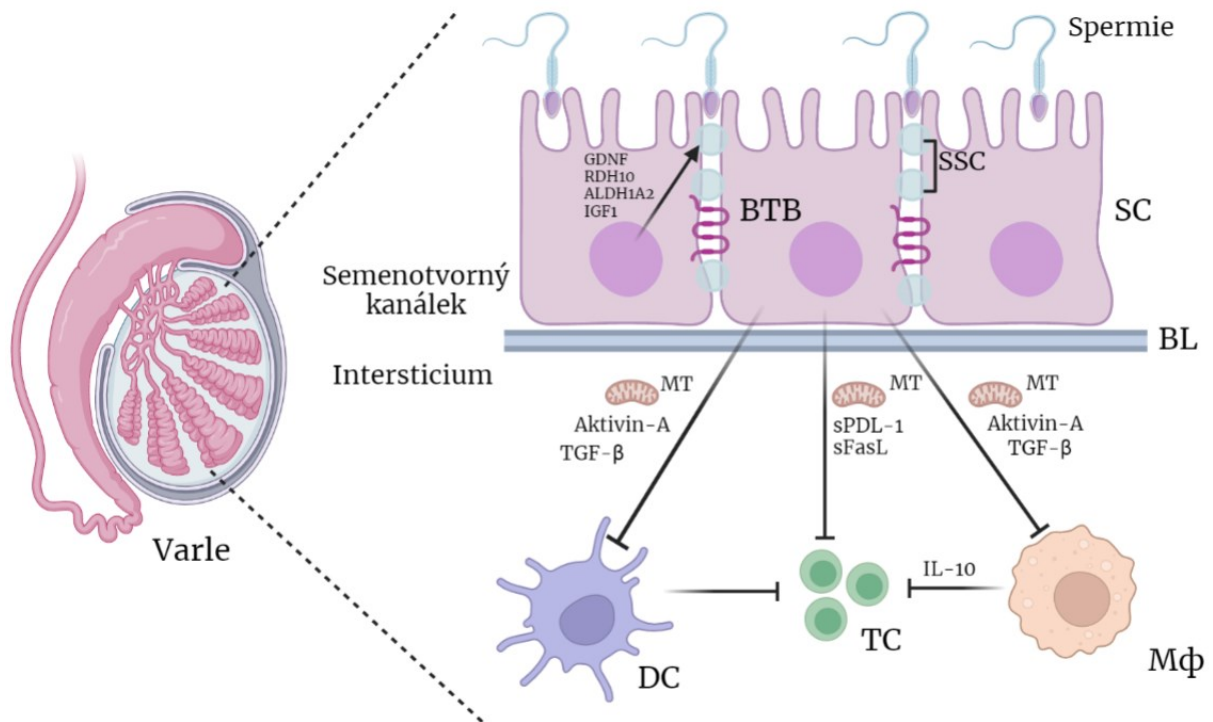
kanálků rovněž produkuje esenciální biosyntetické enzymy RDH10 (retinol dehydrogenase 10), ALDH1A2 (aldehyde dehydrogenase 1 family member A2), IGF1 (insulin-like growth factor 1) aj., jejichž exprese je kritická pro spermatogenezi. Stejně enzymy jsou produkovány i SC, což znamená, že daná populace makrofágů může sloužit jako kompenzační zdroj v případě poškození SC (DeFalco et al., 2015; Yamauchi et al., 2022).

Z výše zmíněného vyplývá, že SC komunikují se svým prostředím různými způsoby podobně jako MSC a jsou schopny modulace imunitního systému ve směru protizánětlivém.

2.5.2 Mechanismy mezibuněčné komunikace

Komunikace SC se zárodečnými buňkami a imunitním systémem je velmi dobře popsána (viz. Obr. 4). Dochází jak k produkci již zmíněných proteinů esenciálních pro spermatogenezi, tak k sekreci protizánětlivých cytokinů a interakci s imunitními buňkami prostřednictvím solubilních inhibičních receptorů PD-L1 a FasL (Sun et al., 2017; Wang et al., 2019).

V rámci varlat je mezibuněčná komunikace uspořádána tak, aby docházelo k rychlému a efektivnímu přenosu signálů mezi buňkami, což je spojováno s podporou proliferace, migrace, diferenciací zárodečných buněk a apoptózy buněk nefunkčních. Tuto komunikaci zajišťují jak adhezivní molekuly, tak proteiny těsných spojů a gap junctions (Hong et al., 2012; Xiao et al., 2012). Klíčovým proteinem je Cx43, již zmiňovaný v kontextu MSC a mitotransferu. V maturovaných varlatech se Cx43 nachází převážně v rámci BTB a umožňuje synchronizaci funkčního i metabolického stavu SC během jednotlivých fází spermatogeneze. Prostřednictvím Cx43 komunikují SC nejen mezi sebou navzájem, ale i se zárodečnými buňkami. Převážně se jedná o buněčnou signalizaci, ovlivnění metabolismu a podporu proliferace (Gilleron et al., 2009; Hilbold et al., 2020). V kontextu MSC byl Cx43 zmíněn proto, že hraje důležitou roli v přenosu mitochondrií mezi buňkami. Mitotransfer u SC byl poprvé popsán v naší laboratoři. V rámci provedených experimentů bylo potvrzeno, že SC mají mnoho vlastností podobných MSC, včetně schopnosti přenášet mitochondrie do buněk imunitních, s čímž byla asociována i jejich polarizace ve směru protizánětlivém (Porubská et al., 2021).



Obrázek 4. Schéma znázorňující umístění Sertoliho buněk a jejich imunomodulační vlastnosti. *BL* – bazální lamina (basal lamina), *BTB* – bariéra mezi krví a varletem (blood-testis barrier), *DC* – dendritická buňka (dendritic cell), *Mφ* – makrofág, *MT* – mitochondrie, *SC* – Sertoliho buňka (Sertoli cell), *SSC* – spermatogoniální kmenové buňky (spermatogonial stem cells), *TC* – T lymfocyt (T cell). *RDH10* – retinol dehydrogenase 10, *ALDH1A2* – aldehyde dehydrogenase 1 family member A2, *IGF1* – insulin-like growth factor 1. Vlastní tvorba: BioRender.com

2.5.3 Sertoliho buňky – vlastnosti mezenchymální kmenových buněk?

Již na začátku tisíciletí se objevily zmínky o tom, že populace SC navzdory dogmatům není tak stabilní a neměnná a buňky v ní mohou změnit diferenciační status i v průběhu celého života především vlivem hormonálního působení např. FSH (folikulostimulační hormon) (Tarulli et al., 2006, 2012). Kromě již dříve zmíněné schopnosti přenášet mitochondrie, nízké imunogenicity a schopnosti nasměrovat imunitní systém ve směru protizánětlivém, mají SC i jiné znaky MSC. Jsou adherentní k plastu a exprimují povrchové znaky, které se běžně využívají jako markery pro identifikaci MSC, např. CD73 a CD44, a jsou zároveň negativní na CD45 a CD11b. Dále, podobně jako MSC, exprimují SC cytokiny, které jsou asociovány s hematopoézou (Gong et al., 2017; Porubska et al., 2021; Sadeghian-Nodoushan et al., 2016). Dalším klíčovým znakem je potvrzena multipotence, tedy schopnost SC diferencovat do adipocytů, osteocytů a chondrocytů (Gong et al., 2017; Porubska et al., 2021).

Z výše popsaného vyplývá, že SC mají obrovský potenciál z hlediska všestranného terapeutického využití, kterému se, bohužel, nevěnuje tolik pozornosti, jako v případě MSC.

2.6 Terapeutický potenciál mitochondriálního transferu

Správné fungování mitochondrií je z hlediska buněčné homeostázy klíčové. Abnormality mitochondriálních procesů jsou často asociovány se zánětlivými stavy. Nefunkčnost mitochondrií v modelu ischemicko-reperfuzního poškození vedla k aktivaci NLRP3 inflamazómu v mikroglíích a následnému poškození (Gong et al., 2018). V případě, že byly mitochondrie ochráněny, např. prostřednictvím UCP2 (uncoupling protein 2) na vnitřní mitochondriální membráně, nedocházelo k oxidativnímu stresu indukovanému ischemií (Chen et al., 2017). Podobně produktivní je i transfer zdravých mitochondrií do mikroglíí. Mitotransfer nejen obnovuje jejich celkovou funkčnost, ale i indukuje změnu fenotypu ve směru protizánětlivém, tedy upřednostňujícím fagocytózu a reparace (Jung et al., 2020). Je také potvrzeno, že neurony a astrocyty spolu navzájem běžně komunikují, a to i prostřednictvím mitotransferu (Hayakawa et al., 2016). Transplantace mitochondrií, včetně alogenních, podporuje přežívání neuronů (Zhao et al., 2021). Terapeutické vlastnosti v ischemii měly i EV, derivované z MSC (Zhao et al., 2019). Z toho vyplývá, že terapeutický efekt MSC na funkčnost neuronů i modifikace imunitní odpovědi mikroglíí a její polarizace ve směru protizánětlivém může být zprostředkován mitochondriemi.

Transfer mitochondrií z MSC měl terapeutický efekt i v mnoha dalších modelech buněčného poškození, ať už indukovaném endotoxiny (Islam et al., 2012), nebo exogenními faktory (cigaretovým kouřem, alergeny) (Ahmad et al., 2014; Li et al., 2014). V modelu exogenního poškození měl mitotransfer reparační i protizánětlivý efekt na epitelální buňky. V neposlední řadě docházelo ke snížení produkce cytokinů indukovaných stresem: TSLP (thymic stromal lymphopoietin), IL-25 a IL-33 (Ahmad et al., 2014).

Důležitost správného fungování mitochondrií a oxidativní fosforylace byla prokázána také u samčích zárodečných buněk (Nakada et al., 2006). Pochopení komunikace mezi SC spermatickými buňkami a imunitním systémem z hlediska mitotransferu přinese nové možnosti využití v terapii, zaměřené na mužskou neplodnost.

Využití mitochondrií v terapii je zatím omezeno na tzv. Mitochondrial Augmentation Therapy. Je založena na schopnosti exogenních mitochondrií vstupovat do buněk přímo z média. V tuto chvíli se využívá v klinických studiích zaměřených např. na Pearsonův syndrom a Kearns-Sayreův syndrom. Oba syndromy jsou způsobené rozsáhlým defektem mitochondriální DNA (Almannai et al., 2020).

Detailnější pochopení mechanismů mitotransferu zprostředkovaného MSC a SC a jejich porovnání má potenciál všestranného využití v terapiích zaměřených na mitochondriální defekty jak buněk imunitního systému, tak např. samčích zárodečných buněk, a na alteraci zánětlivých stavů.

3. Cíle diplomové práce

Mitotransfer má prokázaný protizánětlivý vliv na imunitní buňky, avšak málo je známo o mechanismu přenosu mitochondrií, a to jaký vliv bude mít na jednotlivé populace splenocytů (SPL). MSC jsou buňky známé svými imunomodulačními vlastnostmi a schopností přenášet mitochondrie do imunitních buněk. SC mají mnoho vlastností MSC a ke komunikaci se svým okolím využívají gap junctions, včetně proteinu Cx43, který je nezbytný pro tvorbu TNT a přenos mitochondrií. Naším předpokladem tedy bylo, že SC budou v mitotransferu zdatnější než MSC. Projekt využívá ko-kultivačních *in vitro* pokusů ke:

- srovnání MSC a SC z hlediska jejich schopnosti přenášet mitochondrie a vlivu mitotransferu na jednotlivé populace SPL
- popsání mechanismů přenosu mitochondrií do jednotlivých populací SPL

4. Materiály a metody

4.1 Zvířata

Ve všech experimentech byly použity myši inbredního kmene BALB/c získané z Ústavu molekulární genetiky Akademie věd České republiky v Krči (ÚMG AV ČR).

4.2 Média a roztoky

Pro kultivaci MSC a SC po rozmražení bylo použito médium DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium; PAA Laboratories, Pasching, Austria) obohacené o 10% fetální bovinní sérum (fetal bovine serum – FBS; Merck Co., St. Louis, MO, USA), 10 mM HEPES pufr (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; Merck), 100 mg/ml streptomycin (Merck) a 100 U/ml penicilin (Merck).

Pro izolaci a následnou kultivaci imunitních buněk sleziny (splenocytů), příp. ko-kultivaci, bylo použito médium RPMI (Roswell Memorial Park Institute 1640 medium; Merck) obohacené o 10% FBS, 10 mM HEPES pufr (Merck), 5×10^{-5} M 2-merkaptotanol (Merck), 100 mg/ml streptomycin (Merck) a 100 U/ml penicilin (Merck).

Pro analýzu buněk s využitím fluorescenční mikroskopie a průtokové cytometrie byl použit 1x roztok fosfátového pufru (PBS, phosphate buffer solution), nebo 5x Annexin Binding Buffer (Thermo Fisher Scientific™ Invitrogen, Waltham, MA, USA) naředěný 1:10 v TK H₂O pro analýzu apoptózy buněk.

4.3 Technické vybavení

Centrifuga Hettich Universal 32R (DJB Labcare, Buckinghamshire, England)

Centrifuga 5430 (Eppendorf, Hamburg, Germany)

Centrifuga MiniSpin (Eppendorf)

Laminární box CleanAir (Schoeller Instruments s.r.o., Praha, Česká republika)

Laminární box SafeFAST premium (DASITgroup, Cornaredo, Italy)

CO₂ inkubátor (Sanyo, Osaka, Japan)

Fluorescenční a optický mikroskop Leica Dmi8 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)

Průtokový cytometr LSR II (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA)

BD Influx™ cell sorter (Becton, Dickinson and Company)

MyCycler™ Thermal cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

LigthCycler 480 II (Roche, Rotkreuz, Switzerland)

4.4 Software

Ovládání průtokového cytometru LSR II – FACSDiva Software (Becton, Dickinson and Company)

Analýza dat získaných z průtokového cytometru LSR II – GateLogic 400.2A (Invai, Mentone, Australia)

Statistická analýza – GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)

Software pro ovládání a vyhodnocení dat získaných z LightCycler 480 II – LightCycler 480

4.5 Izolace splenocytů

Slezina z myši kmenu BALB/c byla mechanicky homogenizována a přefiltrována přes nylonovou gázu do zkumavky. Získaná suspenze byla následně centrifugována (8 °C, 8 min, 170 g). Po odlití supernatantu byla peleta splenocytů (SPL) resuspendována v RPMI. Poté byly buňky spočítány pomocí Bürkerovy komůrky a naředěny pro následné využití.

4.6 Izolace mezenchymálních kmenových buněk a Sertoliho buněk

MSC i SC byly izolovány z myši kmene BALB/c dle protokolu zavedeného v laboratoři (Porubská et al., 2021). Buňky izolovala a do 3. pasáže kultivovala technická pracovnice.

4.7 Barvení mitochondrií

MSC a SC byly barveny s využitím MitoTracker Red CMXRos (v grafech MitoT; Thermo Fisher Scientific™), což je fluorescenční kationické barvivo, která pasivně difunduje buněčnou membránou do buňky a specificky značí mitochondrie na základě jejich membránového potenciálu.

SPL byly barveny MitoSpy Green, nebo MitoTracker Deep Red. Barvení MitoSpy Green není závislé na membránovém potenciálu mitochondrií a slouží tedy k analýze masy mitochondrií v živých buňkách. MitoTracker Deep Red funguje na stejném principu jako MitoTracker Red.

Buňky byly barveny v kultivačních lahvích (Thermo Scientific™ BioLite) v případě MSC/SC, nebo ve zkumavkách v případě SPL. Zkumavky byly po dobu barvení umístěny do rotujícího stojánu. Barvení probíhalo v 100 nM roztoku MitoTracker Red při 37 °C po dobu 30 minut. Buňky byly poté promyty teplým PBS a v případě adherentních buněk ovlivněny 0,5 ml trypsinu po dobu 5 minut. S využitím škrábky byly buňky sklizeny do média RPMI a centrifugovány (8 °C, 8 min, 170 g). Po odlití supernatantu byla peleta buněk resuspendována v RPMI. Dále byly buňky spočítány pomocí Bürkerovy komůrky a nařaděny pro následné využití.

4.8 Ko-kultivační *in vitro* pokusy

Pro účel analýzy vlivu MSC/SC na imunitní buňky, konkrétně schopnosti MSC a SC přenášet mitochondrie do splenocytů (SPL) a pro zkoumání mechanismů mitotransferu, byly MSC a imunitní buňky ko-kultivovány.

Následující parametry byly zvoleny na základě výsledků předešlých experimentů:

- poměr 1:20 (5×10^4 MSC/SC : 1×10^6 SPL)
- 24jamková kultivační destička (Nunc, Roskilde, Denmark)
- doba ko-kultivace: 3 hodiny
- podmínky: inkubátor s 5% CO₂, 37 °C

Po ko-kultivaci byly analyzovány povrchové znaky a přenos mitochondrií do jednotlivých populací SPL metodou průtokové cytometrie.

4.8.1 Analýza závislosti mitochondriálního transferu na přímém kontaktu buněk

Pro potvrzení, že mitotransfer je závislý na přímém kontaktu buněk, byly MSC/SC a SPL od sebe fyzicky odděleny membránou s póry o velikosti 3 μm (Corning™ Transwell Multiple Well Plate with Permeable Polyester Membrane Inserts; Merck). SPL byly umístěny na dno 24jamkové destičky v objemu 500 μl a koncentraci 2×10^6 buněk/ml a MSC/SC v objemu 500 μl a koncentraci 1×10^5 buněk/ml do inzertů. Po 3hod ko-kultivaci následovala analýza mitotransferu s využitím průtokové cytometrie.

4.8.2 Poškození mitochondrií

Za účelem zjištění, zda poškození mitochondrií u SPL ovlivní mitotransfer, byly SPL kultivovány v koncentraci 5×10^6 buněk/ml v 6jamkové kultivační destičce (Nunc, Roskilde, Denmark), ve 3 ml 10% RPMI a ovlivněny po dobu 2 hod dvěma typy činidel:

- 15 μ M oligomycin (OL; Merck) – inhibitor 5. komplexu elektrontransportního řetězce neboli ATP-syntázy
- 5 μ M rotenon (ROT; Merck) – inhibitor 1. komplexu elektrontransportního řetězce

Koncentrace činidel byly zvoleny na základě předešlých experimentů. Poté následovala ko-kultivace ovlivněných SPL s MSC/SC po dobu 3 hod ve 24jamkové destičce.

4.8.3 Vliv kyslíkových radikálů na mitochondriální transfer

V rámci provedených pokusů byl analyzován vliv kyslíkových radikálů (ROS) na mitotransfer. Z tohoto důvodu byly SPL kultivovány v koncentraci 5×10^6 buněk/ml v 6jamkové kultivační destičce (Nunc), ve 3 ml 10% RPMI a ovlivněny po dobu 24 hod:

- 5 mM antioxidantem NAC (N-acetylcystein; Merck) pro vychytání ROS vytvářených SPL (koncentrace byla zvolena na základě optimalizačních experimentů a schopnosti snížit produkci ROS)
- 5 μ M H_2O_2 (Merck) jako oxidačním činidlem pro indukci tvoření ROS (koncentrace byla zvolena na základě předešlých experimentů, ve kterých se zkoumalo přežívání imunitních buněk)

Poté následovala ko-kultivace ovlivněných SPL s MSC/SC po dobu 3 hod ve 24jamkové destičce.

4.9 Průtoková cytometrie

S využitím průtokové cytometrie (FC, flow cytometry) byly detekovány povrchové znaky pro oddělení čtyř námi zvolených populací SPL ($CD4^+$, $CD8a^+$, $CD19^+$, $CD11b^+$). Dále byly detekovány: přenos mitochondrií, apoptóza, mitofagie, tvorba ROS a mitochondriálních ROS. Pro detekci mitochondrií byly použity vzorky z ko-kultivačních pokusů. Práce byly prováděny podle následujícího protokolu:

- Vzorky připravovat na ledě

- Buňky 3x opláchnout PBS, seškrabat pomocí škrabky a přenést do zkumavek
- Centrifugace při 8 °C, 8 minut, 170 g
- Po odlití supernatantu doplnit potřebné množství PBS, resuspendovat a přenést na 96jamkovou destičku s kulatým dnem (Nunc) v objemu 200 µl
- Destičku centrifugovat při 8 °C, 3 minuty, 170 g
- Rozvolnit peletu a barvit buňky s využitím monoklonálních protilátek (mAb, monoclonal antibodies)
 - Použité fluorochromy: viz. Tabulka 1, na barvení mrtvých buněk byl použit Hoechst 33258 (1:40 000, Merck)
- Přidat mAb naředěné v PBS (dle Tab.1) o celkovém objemu 10 µl
- Inkubovat 30 minut v lednici, ve tmě
- 2x promýt 200 µl PBS, pokaždé centrifugovat při 8 °C, 3 minuty, 170 g
- Přidat 200 µl PBS
- Těsně před měřením přidat 20 µl Hoechst 33258 do všech jamek kromě kontrolní
- Měřit na průtokovém cytometru

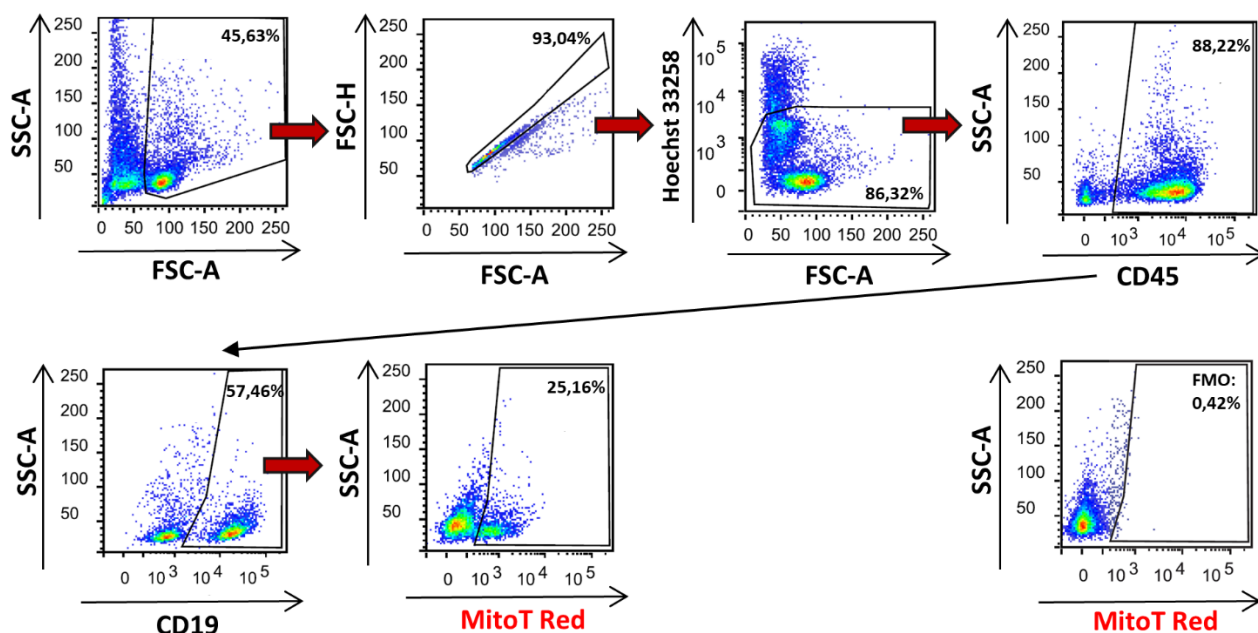
Gatovací strategie je znázorněna v rámci Obrázku 5.

Tabulka 1: seznam použitých monoklonálních protilátek

Znak	Fluorochrom	Ředění	Klon	Výrobce	Značení
CD45	A700	1:200	30-F11	BioLegend	Povrch
CD4	FITC	1:160	GK1.5	BioLegend	Povrch
CD4	APC	1:160	GK1.5	BioLegend	Povrch
CD8a	FITC	1:160	53-6.7	BioLegend	Povrch
CD8a	APC	1:160	53-6.7	Exbio	Povrch
CD19	FITC	1:90	6D5	BioLegend	Povrch
CD19	APC	1:90	6D5	BioLegend	Povrch
CD11b	FITC	1:100	M1/70	BioLegend	Povrch
CD11b	APC	1:100	M1/70	BioLegend	Povrch

Tabulka 2: seznam použitých markerů

Marker	Ex/em spektrum (nm)	Koncentrace	Výrobce	Značení
MitoTracker Red CMXRos	581/644	100 nM	Invitrogen	mitochondrie (potenciál)
MitoTracker Deep Red	644/665	100 nM	Invitrogen	Mitochondrie (potenciál)
MitoSpy Green	490/516	100 nM	BioLegend	mitochondrie (masa)
Mitophagy Dye	530/700	100 nM	Dojindo	mitofagie
MitoSOX	510/580	2,5 μ M	Invitrogen	mit. ROS
Annexin V Dyomics 647	633	2,5 μ l/50 μ l	Exbio	fosfatidylserin
DCF (Dichlorodihydrofluorescein)	492/527	150 μ M	Invitrogen	ROS



Obrázek 5. Gatovací strategie mitotransferu. Ukázka gatovací strategie mitotransferu na CD19⁺ B lymfocytech (CD19 z CD45) po ko-kultivaci s MSC/SC a přenosu mitochondrií značených mitoT Red (mitoT Red z CD19). Buňky byly určeny na základě parametrů side a forward scatter (SSC-A, FSC-A), singlety na základě forward scatter (FSC-H, FCS-A). Živé buňky byly určeny na základě značení Hoechst 33258 a forward scatter (FSC-A), z nich pak byly vybrány CD45⁺ buňky. Gatovací strategie byla pro všechny populace stejná. **MitoT Red** – MitoTracker Red.

4.9.1 Analýza apoptózy splenocytů

Pro analýzu apoptózy SPL po poškození mitochondrií OL/ROT, nebo po kultivaci a přenosu mitochondrií byl využit marker fosfatidylserinu na povrchu apoptotických buněk – Annexin V. Buňky byly připraveny dle standardního protokolu pro průtokovou cytometrii.

- Po 2x promytí PBS přidat 50 μ l roztoku Annexinu V v Annexin Binding Buffer (1:20)
- Inkubovat ve tmě při pokojové teplotě 15 min
- Centrifugovat při 8 °C, 3 minuty, 170 g
- Přidat 200 μ l Annexin Binding Buffer
- Těsně před měřením přidat 20 μ l Hoechst 33258 do všech jamek kromě kontrolní
- Měřit na průtokovém cytometru

4.9.2 Měření mitofagie na průtokovém cytometru

Pro měření mitofagie s využitím průtokové cytometrie byl použit speciální Mitophagy Detection Kit (Dojindo Molecular Technologies, Kumamoto, Japonsko). Součástí tohoto kitu je detekční činidlo MitophagyDye, které se akumuluje v nepoškozených mitochondriích a vykazuje nízkou míru fluorescence. Poté, co dojde k fúzi mitochondrie s autofagozomem a lysozomem a k okyselení pH uvnitř autofagolysozomu, dojde k zesílení fluorescenční intenzity MitophagyDye, což umožní následnou analýzu mitofagie s využitím jak průtokového cytometru, tak fluorescenční mikroskopie.

Příprava buněk probíhala dle protokolu poskytnutého výrobcem:

- Nasazení nefixovaných buněk na destičku
- 2x Promytí 0% RPMI
- Přidání dostatečného množství 100 nM roztoku Mitophagy Dye a inkubace po dobu 30 minut při 37 °C
- Odstranění supernatantu a 2x promytí 0% RPMI
- Kultivace buněk v podmínkách indukujících mitofagii v 10% RPMI při 37 °C
- Promytí buněk 0% RPMI, barvení povrchových znaků a analýza na průtokovém cytometru/fluorescenčním mikroskopu

4.9.3 Měření ROS a mitoROS na průtokovém cytometru

Pro měření ROS bylo použito barvivo DCFDA, které difunduje do buněk, kde je nejdříve deacetylováno buněčnými esterázami, a pak oxidováno ROS do vysoce fluorescenční podoby DCF (viz. Tabulka 2).

- Buňky v kultivační destičce centrifugovat při 8 °C, 6 min, 170 g
- Pipetou opatrně odebrat supernatant
- Přidat dostatečné (na pokrytí dna) množství 150 μ M roztoku DCF v 10% RPMI
- Inkubovat při 37 °C 30 min
- Promýt PBS

Pro měření mitochondriálních ROS bylo použito detekční činidlo MitoSOX Red (viz. Tabulka 2), které se specificky váže na mitochondrie v živých buňkách a je oxidováno pouze mitochondriálními superoxidy.

- Buňky v kultivační destičce centrifugovat při 8 °C, 6 min, 170 g
- Pipetou opatrně odebrat supernatant
- Přidat dostatečné (na pokrytí dna) množství 2,5 μ M roztoku MitoSOX Red v bezfenolovém médiu
- Inkubovat při 37 °C 10 min
- Promýt teplým bezfenolovým médiem

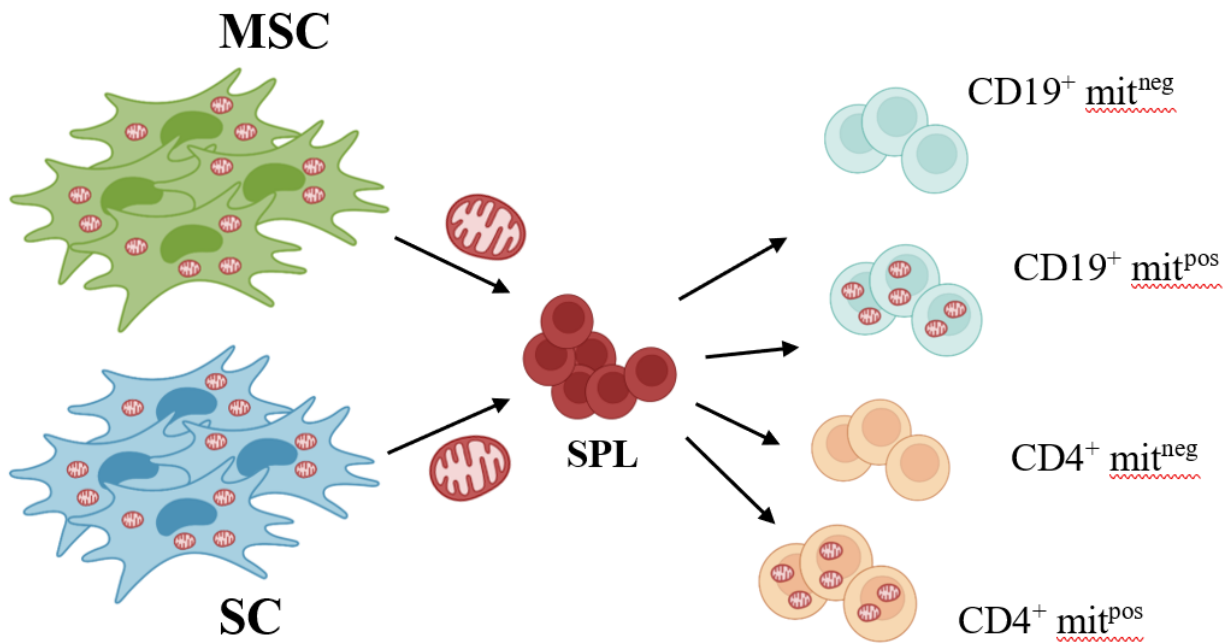
4.10 Real-time PCR (qPCR)

Ke stanovení exprese vybraných proteinů byla použita kvantitativní polymerázová řetězová reakce (real-time polymerase chain reaction – qPCR).

4.10.1 SORT

Pomocí FACS (SORT) byly izolovány vždy 4 populace SPL z každého vzorku po ko-kultivaci s MSC/SC (viz. Obrázek), čistota 97%:

- CD4⁺ T lymfocyty FITC^{pos}, MitoTracker^{pos}
- CD4⁺ T lymfocyty FITC^{pos}, MitoTracker^{neg}
- CD19⁺ B lymfocyty APC^{pos}, MitoTracker^{pos}
- CD19⁺ B lymfocyty APC^{pos}, MitoTracker^{neg}



Obrázek 6. Schéma sortování splenocytů po ko-kultivaci s MSC/SC. SPL – splenocyty, SC – Sertolihovo buňky, MSC – mezenchymální kmenové buňky, *mit^{neg}* – SPL, které po ko-kultivaci nedostaly mitochondrie, *mit^{pos}* – SPL, které po ko-kultivaci dostaly mitochondrie. Vlastní tvorba: BioRender.com

4.10.2 Izolace RNA

Z vysortovaných buněk byla následně izolována RNA dle protokolu:

- Buňky centrifugovat při 8 °C, 8 minut, 170 g
- Odebrat supernatant
- Přidat 500 µl TRI reagent® (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH, USA)
- Pipetou přenést TRI reagent® s buňkami do RNase/DNase-Free mikrozkušavky
- Přidat 100 µl chloroformu
- Třepat, nechat stát 2 minuty při pokojové teplotě
- Centrifugace v chladu (8 °C, 15 minut, 14000 g)
- Odebrat 200 µl horní fáze do RNase/DNase-Free mikrozkušavky
- Přidat 250 µl isopropanolu
- Protřepat, nechat 5 minut stát při pokojové teplotě
- Centrifugace v chladu (8 °C, 8 minut, 14000 g)

- Odlít roztok z mikroskopické kumavky
- Přidat 20 µl 70% ethanolu
- Odsát ethanol a vzorky nechat vyschnout od zbytků ethanolu v termobločku při 40 °C
- Po vysušení přidat 20 µl RNase-free H₂O
- Nechat rozpustit peletu v H₂O při 65 °C, 5 min

Kvalita získané RNA byla kontrolována pomocí spektrofotometru Nanodrop. Následoval přepis pomocí reverzní transkripce.

4.10.3 Reverzní transkripce

Reverzní transkripce ze získané RNA byla provedena s využitím kitu SuperScript IV RT (Invitrogen™, Praha, ČR) dle pokynů výrobce:

- K 1 µg RNA přidat 1 µl náhodných 32 hexamerů primerů (Thermo Scientific™) a 1 µl deoxynukleotidů (Thermo Scientific™)
- Doplnit na objem 13 µl RNase-free H₂O
- Směs zahřát v thermocycleru na 65°C po dobu 5 minut a přemístit na led
- Do reakce přidat: 4 µl 5X First-Strand buffer, 1 µl 0,1 M DTT, 1 µl RNase inhibitoru (Invitrogen™) a 1 µl SuperScript IV RT
- Směs vložit do thermocycleru (5 min 25°C, 60 min 50°C, 15 min 75°C) a poté ochladit na 4 °C
- Vzniklou cDNA použít pro qPCR.

4.10.4 Měření qPCR

Detekce relativní exprese genů byla prováděna pomocí qPCR na LightCycler 480 II v 384jamkové destičce v triplicátech. Jako kontrola byly použity dva housekeeping geny – *GAPDH* a *AKTIN*. Pro všechna měření byl použit 5x HOT FIFEPol EvaGreen (Solid Biotec, Tartu, Estonia). Pro reakci byl užit následující postup:

- Každý vzorek smíchat z 1 µl cDNA, 4 µl SYBR, 1 µl primerů F (forward) + R (reverse) (100 µM), 4 µl RNase-free H₂O
- Preinkubace 10 minut 95 °C
- 50 cyklů s profilem: 10 sek 95 °C; 30 sek 60 °C; 1 sek 72 °C
- Zchladit na 40 °C

4.11 Mikroskopie MSC/SC a splenocytů po ko-kultivaci

V 35 mm Petriho misky se skleněným dnem (Nunc, Roskilde, Denmark) byly MSC/SC ko-kultivovány se SPL v poměru 1:20 v 1 ml 10% RPMI po dobu 3 hodin. Počet MSC/SC nepřesahoval 10×10^4 pro lepší přehlednost. Po uplynutí 3 hodin byly buňky opláchnuty PBS a obarveny dle protokolu:

- Fixace v 500 μ l 4% paraformaldehydu po dobu 30 minut
- Po fixaci opláchnout buňky PBS
- 3x 10 minut v 500 μ l roztoku 0,2% Triton X-100 (Merck) v PBS + 5% BSA
- 1 hodina barvení Phalloidin Green (Alexa Fluor 488; Merck) 1:100 a primární rat anti-mouse mAb CD45 (1:200; BioLegend, San Diego, CA, USA) v roztoku Triton X-100 – pokojová teplota, přikryt parafilmem a alobalem
- 2x promýt PBS
- 1 hodina barvení sekundární goat anti-rat mAb 1:500 – pokojová teplota, přikryt parafilmem a alobalem
- 3x promýt PBS, odsát, osušit
- Přidat cca 30 μ l Mowiolu (Calbiochem, Billerica, MA, USA) s DAPI 1 μ g/ml (4,6-diamidino-2-phenylindole; Vectashield, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)
- Mikroskopie s využitím fluorescenčního mikroskopu Leica Dmi8

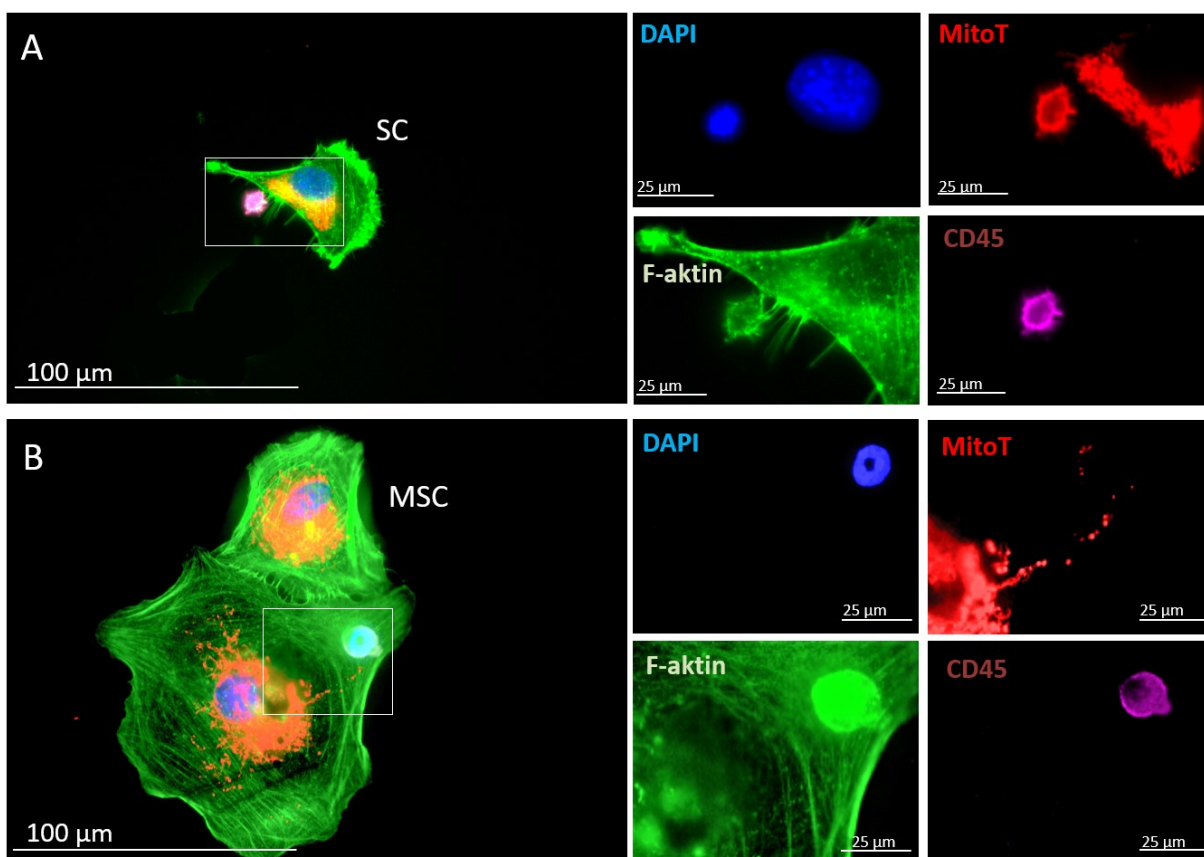
4.12 Statistická analýza

Získané výsledky byly statisticky vyhodnoceny s využitím programu GraphPad Prism 8. Byl použit test ANOVA (Analysis of variance, jednosměrná analýza rozptylu) a Dunnettův test, nebo dvouvýběrový (nepárový) t-test. Hodnoty statistické odchylky $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$, $***p \leq 0,001$, $****p \leq 0,0001$ byly považovány za signifikantní.

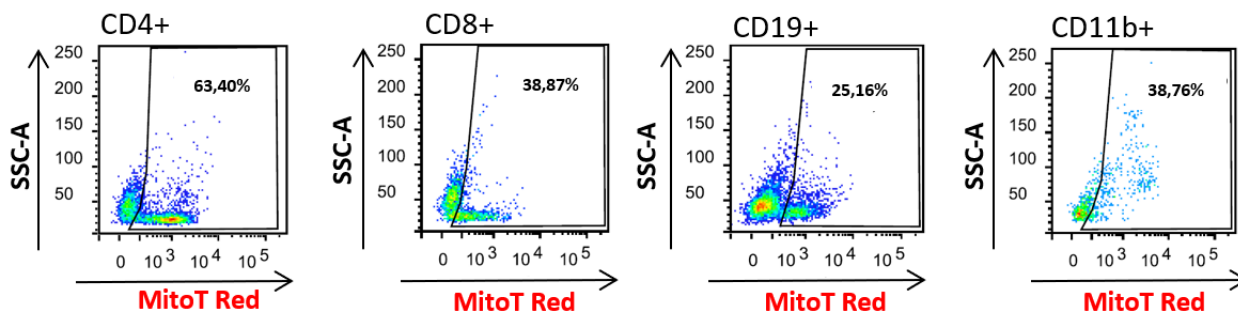
5. Výsledky

5.1 Přenos mitochondrií do imunitních buněk

Nejprve jsme chtěli ukázat a potvrdit, že dochází k přenosu mitochondrií z MSC a SC do všech námi zvolených populací SPL. Mitotransfer byl pozorován jak s využitím fluorescenční mikroskopie (viz. Obr. 7), tak průtokové cytometrie (viz. Obr. 8). Průtoková cytometrie ukázala, že CD19⁺ B lymfocyty mají mitotransfer ze všech námi zvolených populací nejnižší, jak je znázorněno na obrázku 8 a 11, nebo nižší v porovnání s CD4⁺ (viz. Obr. 9 a 16)



Obrázek 7. Fluorescenční mikroskopie přenosu mitochondrií z MSC/SC do SPL (CD45). A – mitotransfer ze SC do SPL (CD45 – fialová). B – mitotransfer z MSC do SPL (CD45). Cytoskelet barven pomocí phalloidinu (F-aktin – zelená), jádra pomocí DAPI – modrá, mitochondrie pomocí MitoTracker Red – červená. Zvětšeno A: 400x, B: 630x. MSC – mezenchymální kmenové buňky, SC – Sertoliho buňky, MitoT – MitoTracker Red.

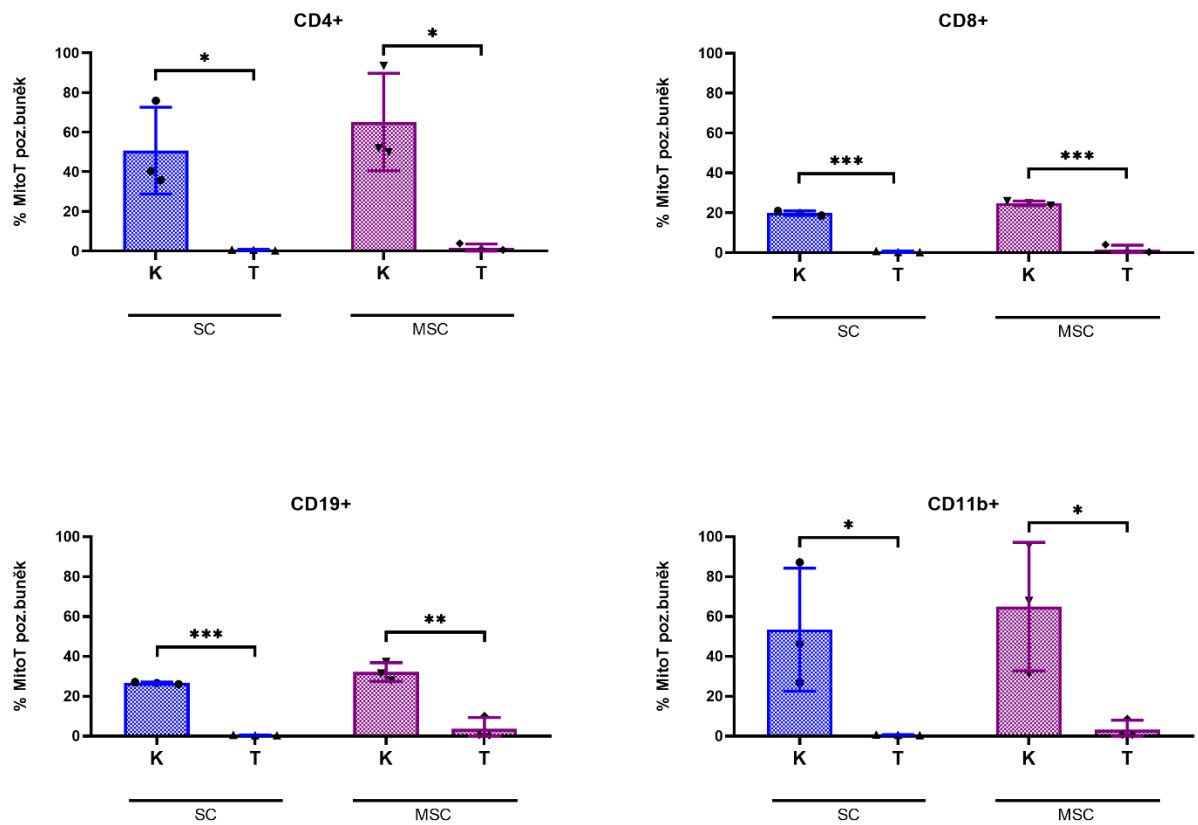


Obrázek 8. Ukázka dotplotů znázorňujících přenos mitochondrií ze SC do SPL. Mitochondrie SC byly obarveny MitoTracker Red. Gatovací strategie mitotransferu viz. Obr. 5. **MitoT** – MitoTracker Red.

5.2 Závislost mitochondriálního transferu na přímém kontaktu buněk

Poté jsme potřebovali zjistit, zda a do jaké míry je mitotransfer závislý na přímém kontaktu buněk. Z tohoto důvodu byly SPL ko-kultivovány spolu s MSC nebo SC s využitím speciální transwell kultivační destičky s inzertem, který odděloval dvě buněčné suspenze membránou. Před ko-kultivací byly MSC a SC obarveny mitochondrie s využitím MitoTracker Red (v grafech MitoT), což umožnilo následné sledování jejich přenosu do jednotlivých populací SPL (CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺, CD11b⁺).

Z dosažených výsledků vyplývá, že je mitotransfer závislý na přímém kontaktu buněk (viz. Obr. 9). Membrána zamezila přenosu mitochondrií mezi MSC/SC a SPL.



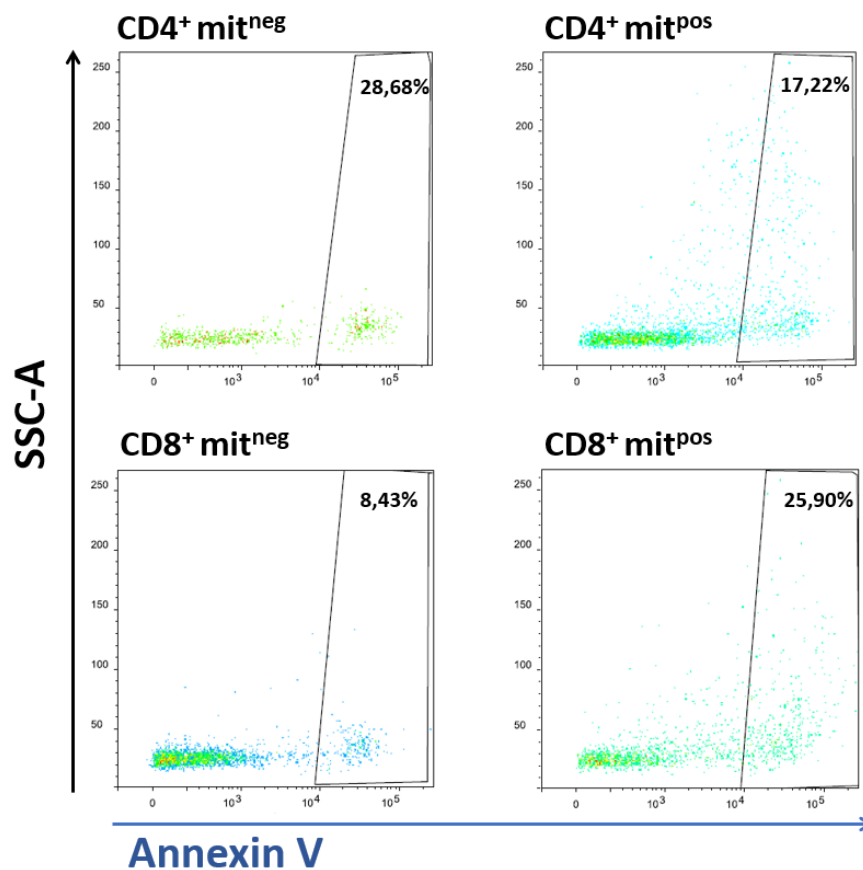
Obrázek 9. Závislost mitotransferu na přímém kontaktu buněk. Procentuální zastoupení mitoT pozitivních buněk, tedy buněk, které dostaly mitochondrie od MSC/SC. Měřeno ze 3 nezávislých pokusů. **SC** – ko-kultivace se Sertoliho buňkami, **MSC** – ko-kultivace s mezenchymálními kmenovými buňkami, **K** – mitotransfer po ko-kultivaci v přímém kontaktu, **T** – mitotransfer po ko-kultivaci s využitím transwell kultivační destičky, **MitoT** – MitoTracker Red. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ představuje statisticky významnou odchylku.

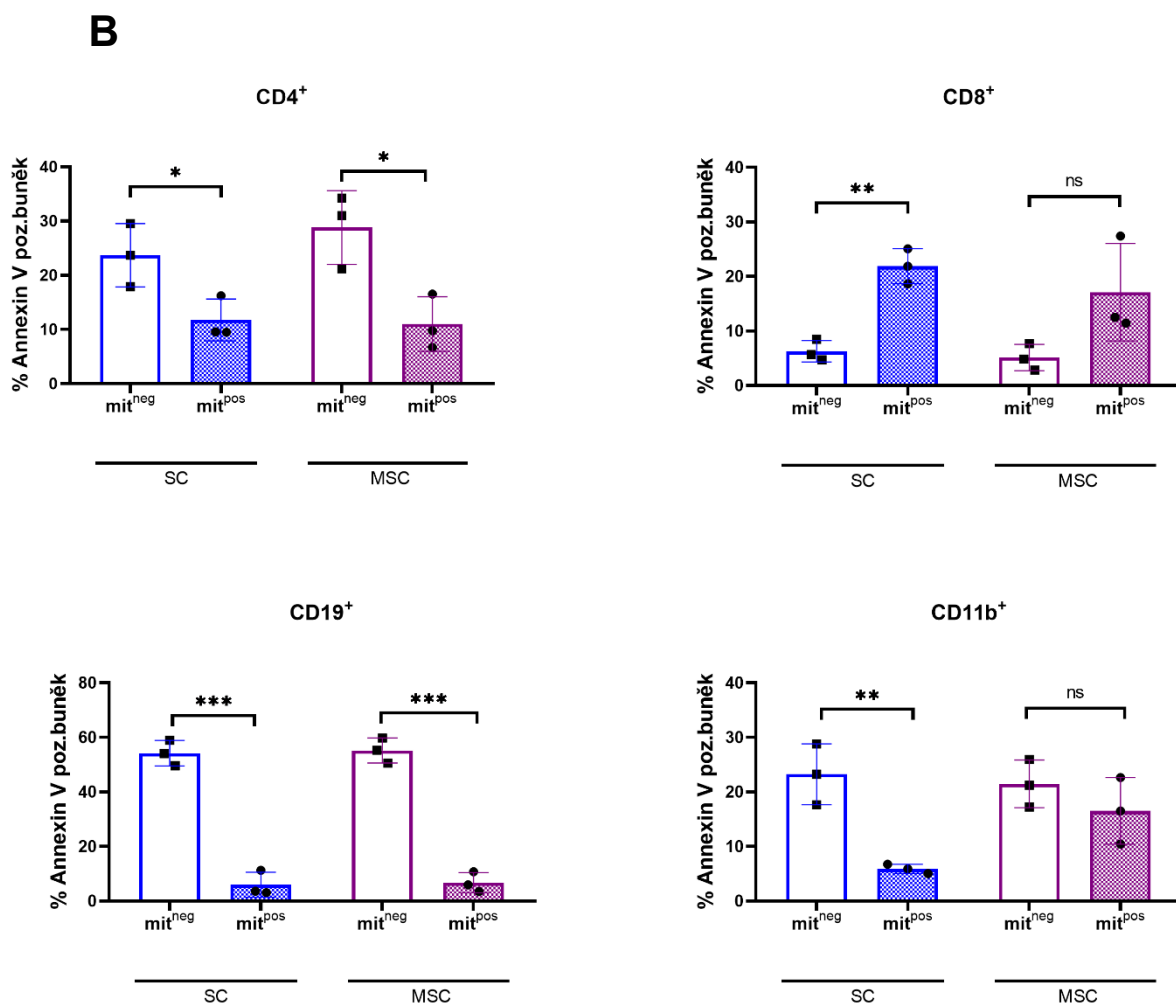
5.3 Vliv mitochondriálního transferu na přežívání splenocytů

Dále jsme sledovali, jak ko-kultivace a přenos mitochondrií ovlivní přežívání SPL. Po 3hod ko-kultivaci s MSC/SC byly SPL obarveny Annexinem V, který je markerem fosfatidylserinu na povrchu apoptotických buněk.

Je vidět, že v porovnání s buňkami, které mitochondrie nedostaly (mit^{neg}), přežívá většina mit^{pos} populací výrazně lépe, a to nezávisle na tom, zda mitochondrie dostaly od MSC, nebo SC. Jedinou odlišností je populace CD8^+ , u které vedl přímý kontakt a přenos mitochondrií ke zvýšení podílu buněk v apoptóze (viz. Obr. 10A,B).

A





Obrázek 10. Srovnání vlivu přijatých mitochondrií na apoptózu jednotlivých populací SPL. A. Ukázka dotplotů. Buňky pozitivní na Annexin V: CD4⁺ mit^{neg} a mit^{pos}, CD8⁺ mit^{neg} a mit^{pos}. B. Procentuální zastoupení apoptotických buněk v jednotlivých populacích SPL. Měřeno ze 3 nezávislých pokusů. SC – ko-kultivace se Sertoliho buňkami, MSC – ko-kultivace s mezenchymálními kmenovými buňkami, mit^{neg} – splenocyty, které po ko-kultivaci nedostaly mitochondrie, mit^{pos} – splenocyty, které po ko-kultivaci dostaly mitochondrie. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$ představuje statisticky významnou odchylku.**

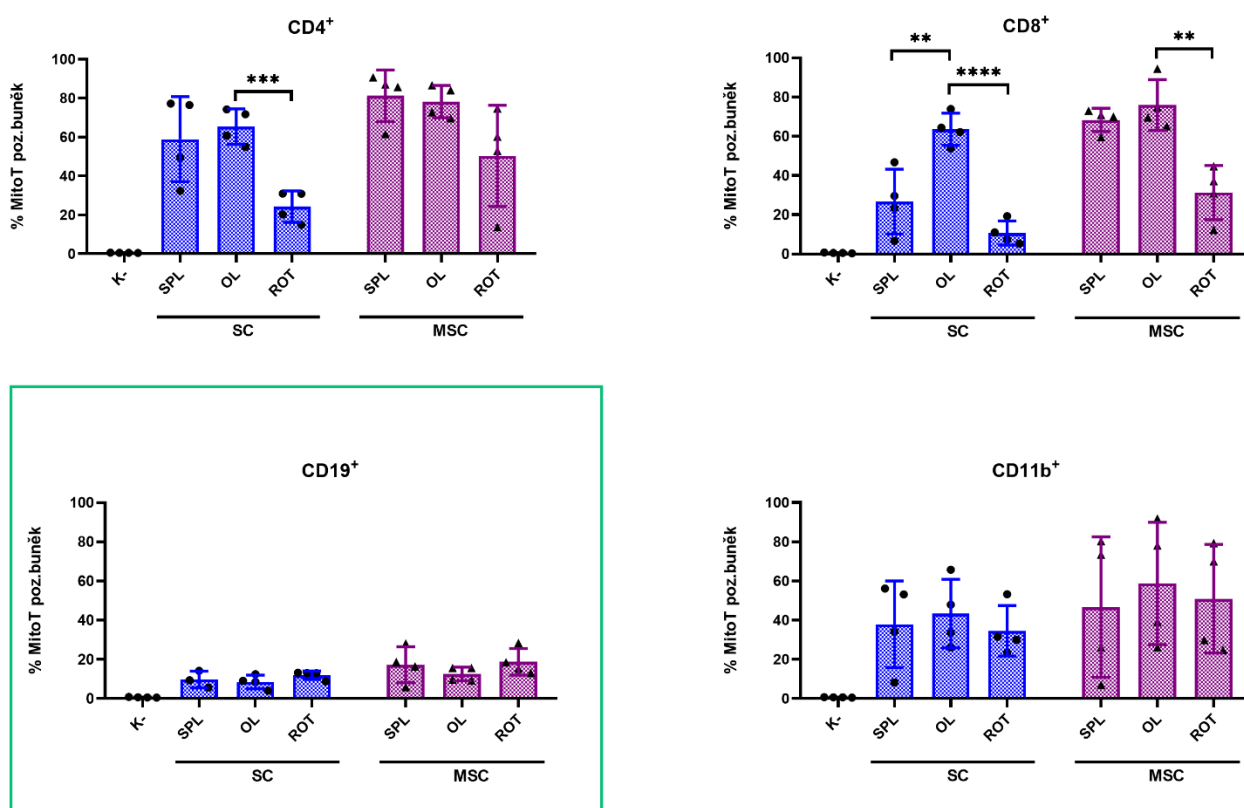
5.4 Mitochondriální transfer a vliv poškození mitochondrií

V následujícím kroku jsme se chtěli zaměřit víc na porovnání schopnosti MSC a SC přenášet mitochondrie a zjistit, zda poškození mitochondrií u SPL povede k většímu přenosu mitochondrií z MSC/SC. Před ko-kultivací byly SPL ovlivněny po dobu 2 hod 15 μM OL, nebo 5 μM ROT.

Ze získaných výsledků jsme nepozorovali vyšší přenos mitochondrií ze SC. Mitotransfer z MSC byl ve většině případů vyšší, nebo stejný.

Z hlediska poškození mitochondrií, až na CD8⁺ buňky poškozené OL, se nám daná hypotéza nepotvrdila. Poškození SPL pomocí ROT dokonce vedlo ke zjevnému snížení přenosu mitochondrií. Zároveň s tím byl znovu ukázán nejnižší přenos mitochondrií do

CD19⁺ B lymfocytů ve srovnání s ostatními populacemi SPL, a to nezávisle na poškození mitochondrií (viz. Obr. 11).

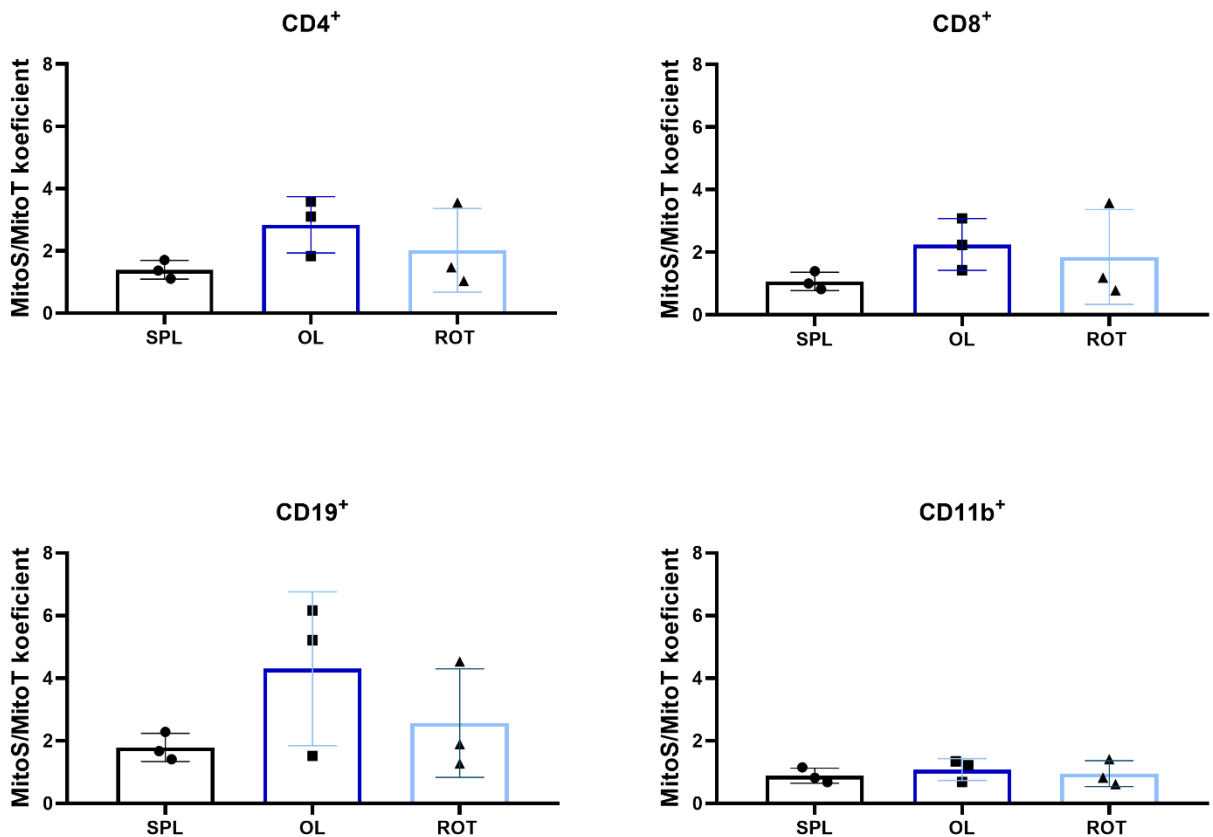


Obrázek 11. Vliv poškození mitochondrií SPL na mitotransfer. Procentuální zastoupení MitoTracker Red pozitivních buněk. Měřeno ze 4 nezávislých pokusů. **SC** – ko-kultivace se Sertoliho buňkami, **MSC** – ko-kultivace s mezenchymálními kmenovými buňkami, **SPL** – neovlivněné splenocyty, **OL** – splenocyty ovlivněné oligomycinem, **ROT** – splenocyty ovlivněné rotenonem. **MitoT** – buňky pozitivní na MitoTracker Red. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ představuje statisticky významnou odchylku.

Pro pochopení, čím je tak rozdílný mitotransfer způsoben, byl zkoumán vliv OL a ROT na samotné SPL před ko-kultivací. SPL byly ovlivněny OL nebo ROT po dobu 2 hod. Následně byla sledována míra poškození mitochondrií jako podíl jejich masy a potenciálu, celkové přežívání buněk a tvorbu kyslíkových radikálů (ROS) (viz. Obr. 12, 13, 14).

5.4.1 Poškození mitochondrií

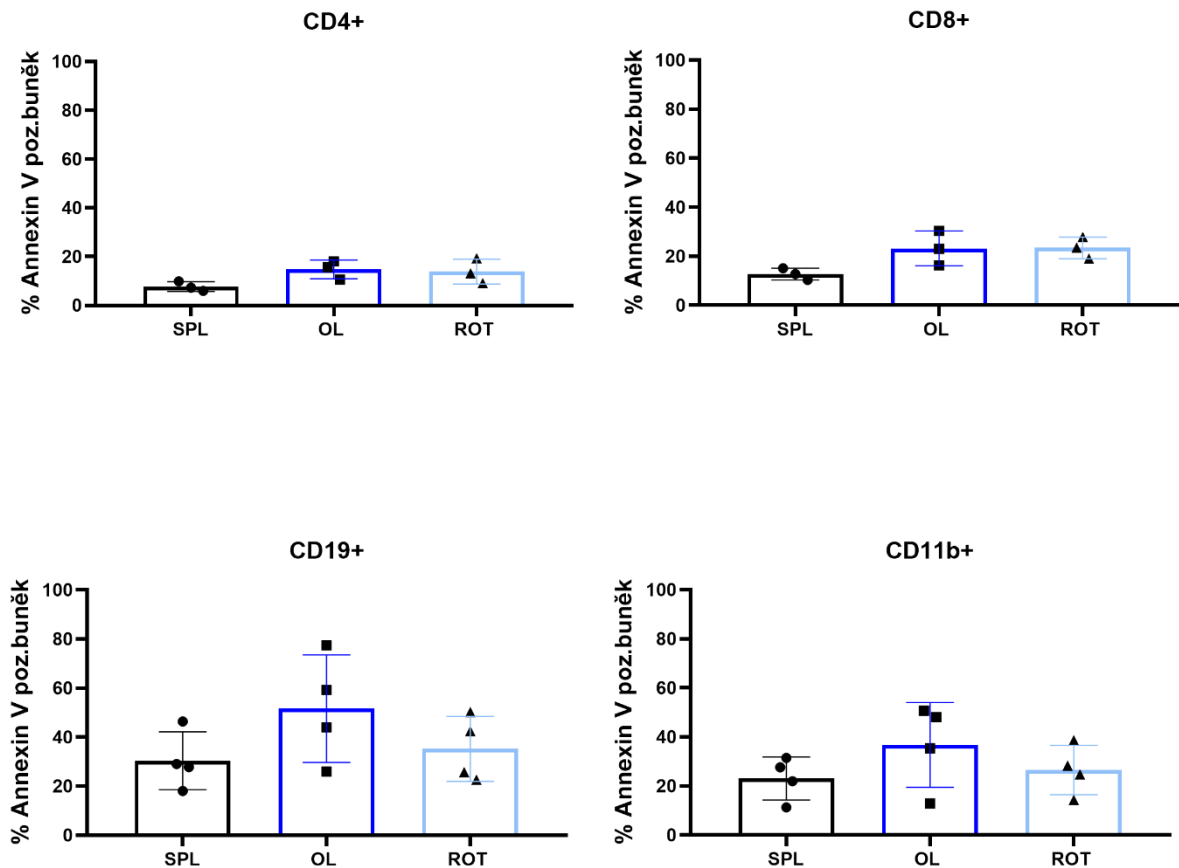
Pro pochopení celkového stavu mitochondrií byl získán koeficient, založený na podílu MitoSpy Green a MitoTracker Red, tedy masy a potenciálu. Čím je daný koeficient nižší, tím více funkční je mitochondrie. Ze získaných výsledků vyplývá, že ovlivnění ROT nevedlo k významnému poškození mitochondrií. U OL jsme pozorovali významnější tendenci, především u $CD19^+$ buněk (viz. Obr. 12).



Obrázek 12. Vliv oligomycinu a rotenonu na stav mitochondrií ve SPL. Hodnoty jsou koeficienty podílu MFI (mean fluorescent intensity) mitochondriální masy a potenciálu. Měřeno ze 3 nezávislých pokusů. **SPL** – neovlivněné splenocyty, **OL** – SPL ovlivněné oligomycinem, **ROT** – SPL ovlivněné rotenonem, **MitoS** – MitoSpy Green, **MitoT** – MitoTracker Red.

5.4.2 Apoptóza

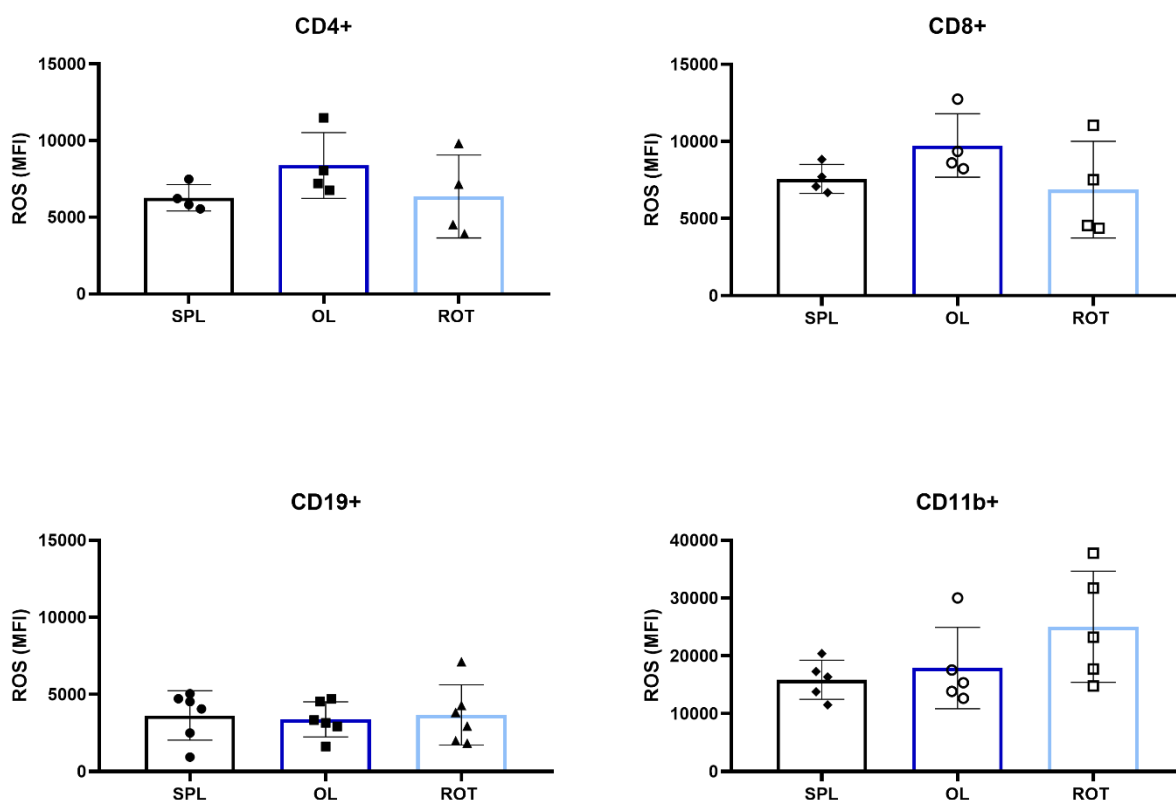
Dále jsme zjišťovali, zda OL a ROT ovlivní přežívání SPL. Po 2 hod kultivaci s OL a ROT nebylo detekováno signifikantní zvýšení procentuálního zastoupení Annexin V pozitivních buněk, tedy buněk nacházejících se v apoptóze. Na druhou stranu jsme ukázali, že B lymfocyty (CD19⁺) mají ze všech populací SPL největší podíl buněk v apoptóze, a to jak kontrolní skupina, tak skupiny ovlivněné OL/ROT (viz. Obr. 13).



Obrázek 13. Vliv oligomycinu a rotenonu na apoptózu SPL. Procentuální zastoupení apoptotických buněk exprimujících PS. Měřeno ze 3-4 nezávislých pokusů. **SPL** – neovlivněné splenocyty, **OL** – SPL ovlivněné oligomycinem, **ROT** – SPL ovlivněné rotenonem.

5.4.3 Tvorba kyslíkových radikálů

Kyslíkové radikály (ROS) indukují mitotransfer (Mistry et al., 2019). Z tohoto důvodu jsme potřebovali zjistit, zda OL a ROT ovlivní jejich tvorbu. Získané výsledky vypovídají o tom, že nedochází k signifikantnímu zvýšení tvorby ROS po ovlivnění OL a ROT. Dále bylo ukázáno, že CD19⁺ B lymfocyty mají tvorbu ROS ze všech populací nejnižší, naopak CD11b⁺ nejvyšší (viz. Obr. 14).

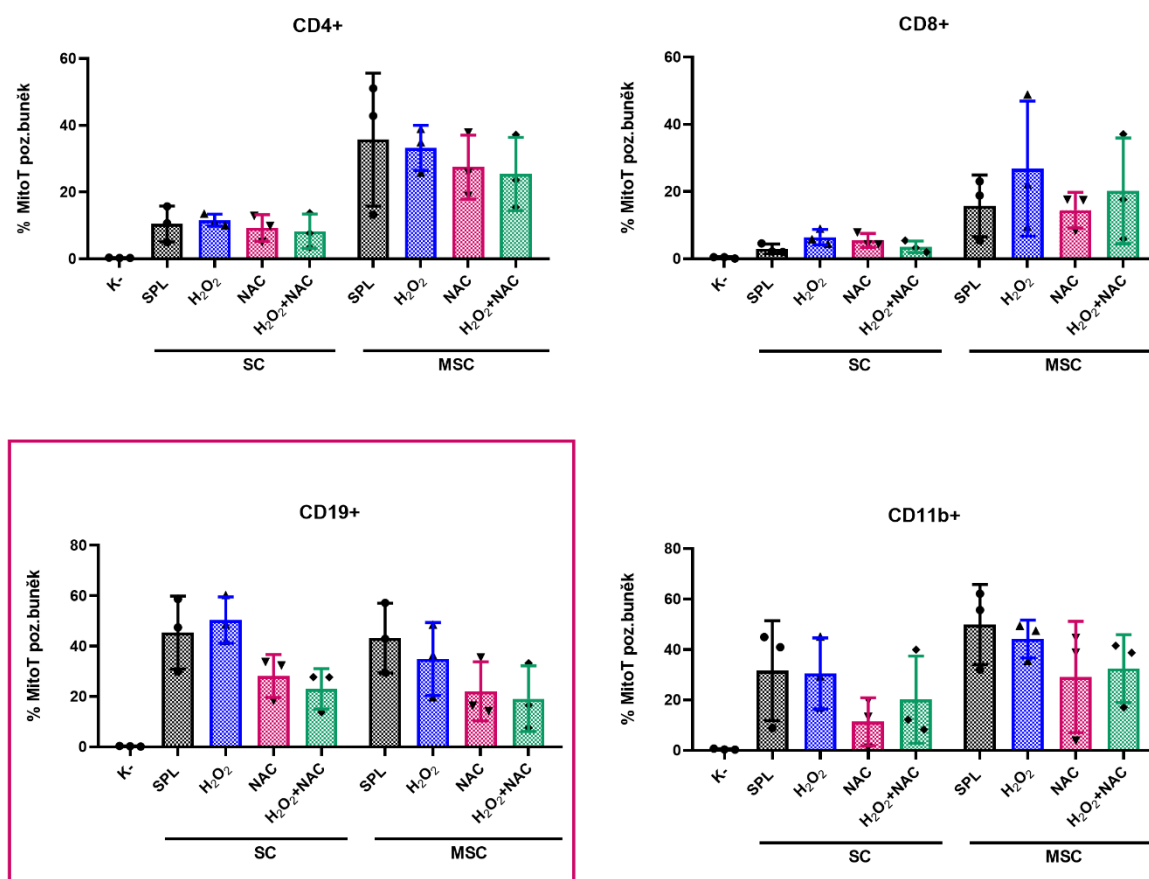


Obrázek 14. Vliv oligomycinu a rotenonu na tvorbu ROS. MFI markeru produkce ROS, DCF (Dichlorodihydrofluorescein), v jednotlivých populacích SPL. Měřeno ze 4-6 nezávislých pokusů. **SPL** – neovlivněné splenocyty, **OL** – SPL ovlivněné oligomycinem, **ROT** – SPL ovlivněné rotenonem. **MFI** – mean fluorescence intensity.

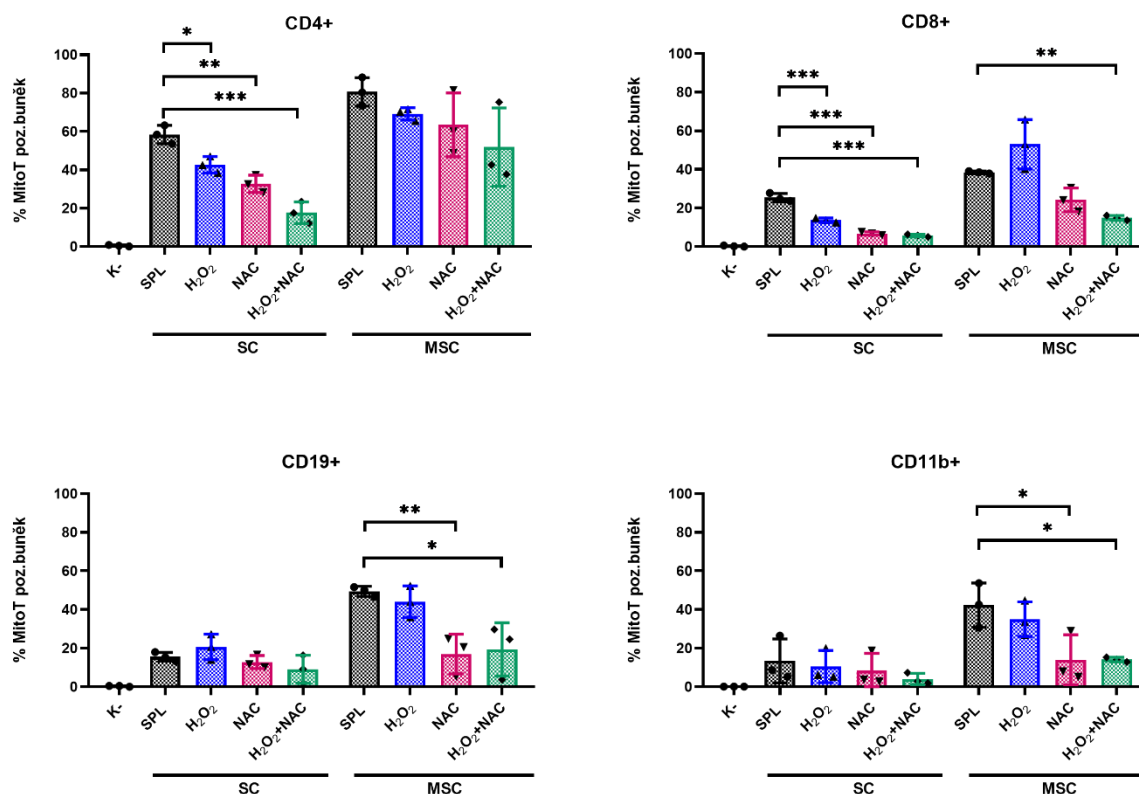
5.5 Vliv kyslíkových radikálů na mitochondriální transfer

Dále jsme ověřovali závislost mitotransferu na tvorbě ROS u SPL. V rámci následujícího pokusu byly SPL kultivovány s induktorem tvorby ROS – H₂O₂, antioxidantem – N-acetylcysteinem (NAC), nebo jejich kombinací po dobu 24 hod. Následovala 3hod ko-kultivace s MSC/SC a analýza mitotransferu. Získané výsledky byly překvapující především z důvodu, že neodpovídaly výsledkům předešlým (viz. Obr. 7). Tento experiment ukázal, že mají CD19⁺ buňky, a to i v případě kontrolní skupiny,

mitotransfer nejvyšší (viz. Obr. 15). Jelikož byl tento experiment prováděn na starších myších (~8měsíční), byl následně zopakován s využitím mladých myší (~2měsíční), které byly standartně využívány v předchozích experimentech (viz. Obr. 16). Z nově získaných výsledků znovu vyplývalo, že mají CD19⁺ buňky mitotransfer nejnižší, tentokrát ale srovnatelně s CD8⁺ populací T lymfocytů. Dále se ukázalo, že jak ovlivnění oxidačním činidlem, tak antioxidantem, nebo jejich kombinací, vede ke snížení mitotransferu. Z těchto výsledků je zároveň zřejmé, že nelze kombinovat experimenty na různě starých zvířatech a pro všechny naše byly následně používány myši ve věku max. 3 měsíců.



Obrázek 15. Vliv oxidačního činidla a antioxidantu na mitotransfer. Měřeno na myších ve věku ~8 měsíců. Procentuální zastoupení MitoTracker pozitivních buněk. Měřeno ze 3 nezávislých pokusů. **SC** – ko-kultivace se Sertoliho buňkami, **MSC** – ko-kultivace s mezenchymálními kmenovými buňkami, **K-** – FMO kontrola, tedy SPL kultivované samostatně bez přítomnosti MSC/SC, **SPL** – neovlivněné splenocyty, **H₂O₂** – splenocyty ovlivněné oxidačním činidlem H₂O₂, **NAC** – splenocyty ovlivněné antioxidantem NAC. **H₂O₂+NAC** – splenocyty ovlivněné kombinací H₂O₂ a NAC. **MitoT** – buňky pozitivní na MitoTracker Red.



Obrázek 16. Vliv oxidačního činidla a antioxidantu na mitotransfer. Měřeno na myších ve věku ~2 měsíců. Procentuální zastoupení MitoT pozitivních buněk. Měřeno ze 3 nezávislých pokusů. **SC** – ko-kultivace se Sertoliho buňkami, **MSC** – ko-kultivace s mezenchymálními kmenovými buňkami, **K-** – FMO kontrola, tedy SPL kultivované bez přítomnosti MSC/SC, **SPL** – neovlivněné splenocyty, **H₂O₂** – splenocyty ovlivněné oxidačním činidlem H₂O₂, **NAC** – splenocyty ovlivněné antioxidantem NAC. **H₂O₂+NAC** – splenocyty ovlivněné kombinací H₂O₂ a NAC. **MitoT** – buňky pozitivní na MitoTracker Red. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 představuje statisticky významnou odchylku.

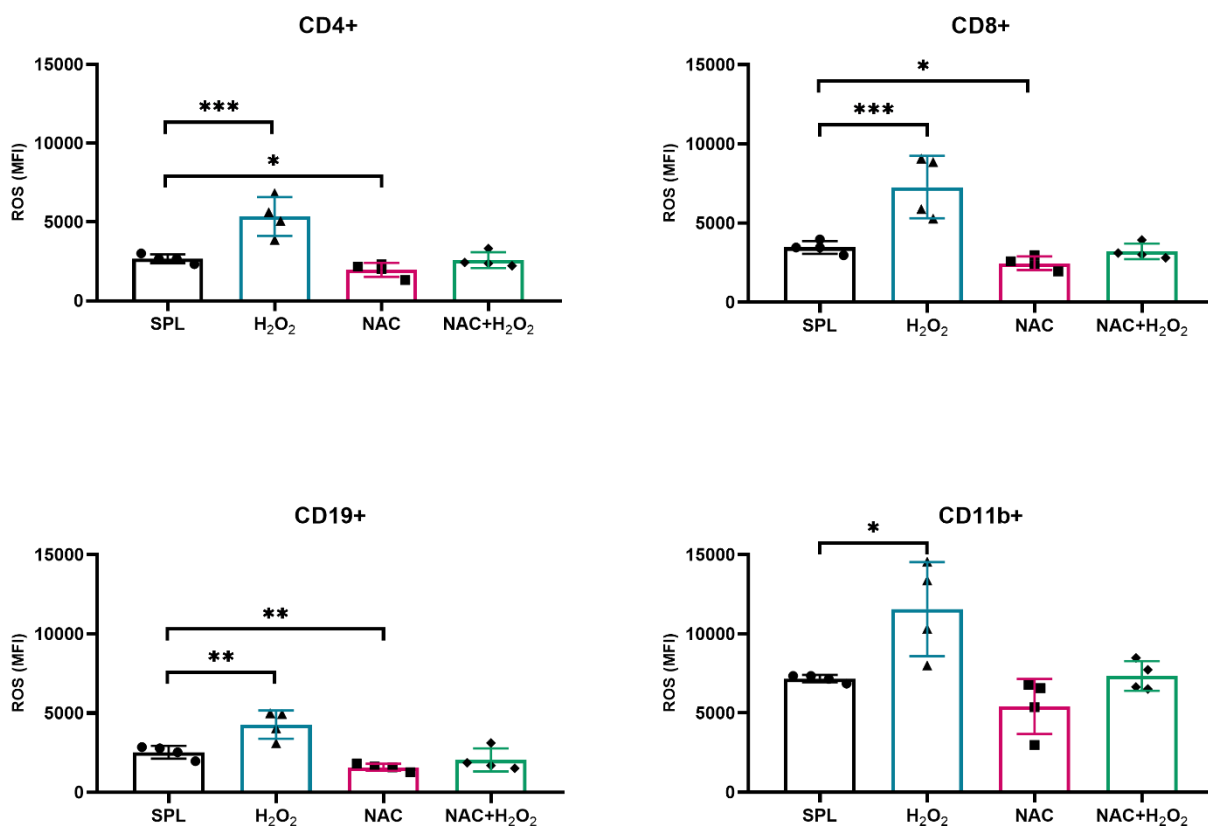
5.5.1 Vliv tvorby ROS a mitochondriálních ROS na mitochondriální transfer

Pro potvrzení, zda opravdu dochází ke zvýšené tvorbě ROS, nebo mitochondriálních ROS (mitoROS) po ovlivnění H₂O₂ a NAC, byly provedeny dva následující pokusy. Tvorba ROS (viz. Obr. 17) a mitochondriálních ROS (viz. Obr. 18) byla sledována u SPL ovlivněných H₂O₂/NAC/ H₂O₂ + NAC po dobu 24 hod.

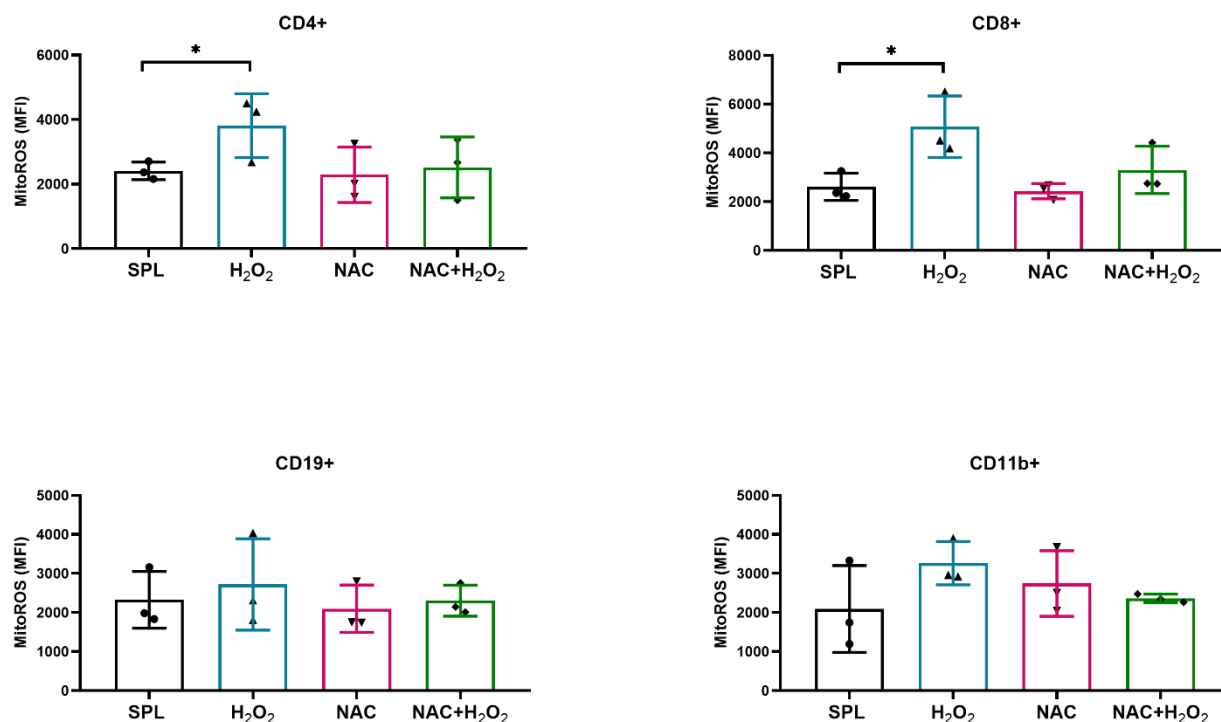
Ze získaných výsledků vyplývá, že docházelo ke zvýšené tvorbě celkových ROS po ovlivnění H₂O₂, naopak ovlivnění NAC vedlo k jejímu snížení. Ovlivnění kombinací H₂O₂ a NAC udrželo tvorbu ROS na hodnotě odpovídající kontrole.

Výsledky měření mitoROS ukazují jejich zvýšenou produkci po ovlivnění H₂O₂ pouze u CD4⁺ a CD8⁺ populací SPL a mírnou nesignifikantní tendenci u CD11b⁺.

Signifikantní pokles tvorby mitoROS po ovlivnění NAC nebyl pozorován u žádné ze čtyř populací SPL.



Obrázek 17. Vliv oxidačního činidla a antioxidantu na celkovou tvorbu ROS. MFI markeru produkce ROS – DCF, v jednotlivých populacích SPL. Měřeno ze 4 nezávislých pokusů. *SPL* – neovlivněné SPL, *H₂O₂* – SPL ovlivněné oxidačním činidlem H₂O₂, *NAC* – SPL ovlivněné antioxidantem NAC. *H₂O₂+NAC* – SPL ovlivněné kombinací H₂O₂ a NAC. **MFI** – mean fluorescence intensity. **p*<0,05; ***p*<0,01; ****p*<0,001 představuje statisticky významnou odchylku.

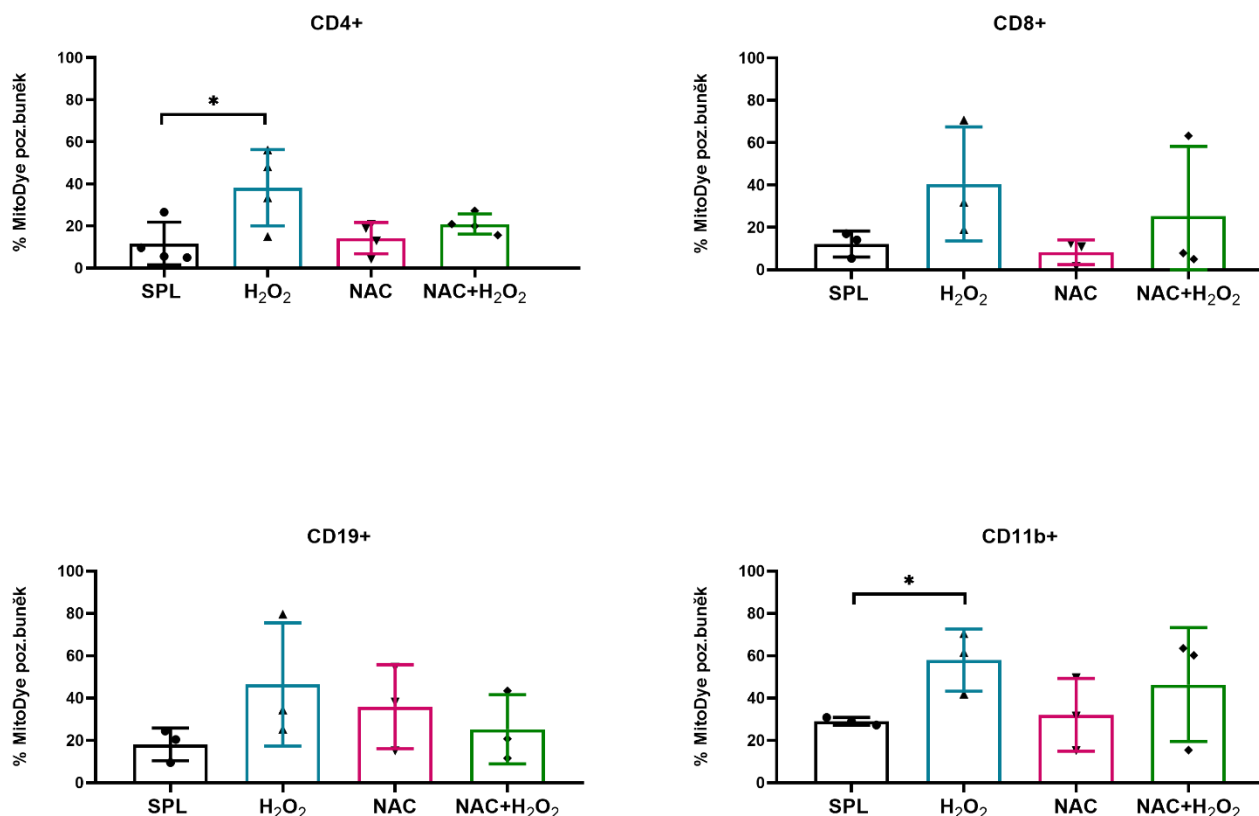


Obrázek 18. Vliv oxidačního činidla a antioxidantu na tvorbu mitochondriálních ROS. MFI markeru produkce mitoROS, MitoSOX, v jednotlivých populacích SPL. Měřeno ze 3 nezávislých pokusů. **SPL** – neovlivněné SPL, **H₂O₂** – SPL ovlivněné oxidačním činidlem H₂O₂, **NAC** – SPL ovlivněné antioxidantem NAC. **H₂O₂+NAC** – SPL ovlivněné kombinací H₂O₂ a NAC. **MFI** – mean fluorescence intensity. **p*<0,05 představuje statisticky významnou odchylku.

5.5.2 Mitofagie a její vliv na mitochondriální transfer

Dále jsme sledovali, zda pokles mitotransferu po ovlivnění H₂O₂ není způsobený rozběhlou mitofagií, při které dochází k depolarizaci mitochondrií a zhasnutí MitoTracker Red.

Pro ověření tohoto předpokladu byla u SPL ovlivněných H₂O₂/NAC/ H₂O₂ + NAC po dobu 24 hod pozorována mitofagie s využitím detekčního kitu MitophagyDye (MitoDye). Tento pokus ukázal, že po ovlivnění H₂O₂ dochází ke zvýšení míry mitofagie v buňkách, v případě CD4⁺ a CD11b⁺ se jednalo o zvýšení signifikantní (viz. Obr. 19).



Obrázek 19. Vliv oxidačního činidla a antioxidantu na mitofagii. MFI markeru produkce mitoROS, MitoSOX, v jednotlivých populacích SPL. Měřeno ze 3-4 nezávislých pokusů. **SPL** – neovlivněné SPL, **H₂O₂** – SPL ovlivněné oxidačním činidlem H₂O₂, **NAC** – SPL ovlivněné antioxidantem NAC. **H₂O₂+NAC** – SPL ovlivněné kombinací H₂O₂ a NAC. **p*<0,05 představuje statisticky významnou odchylku.

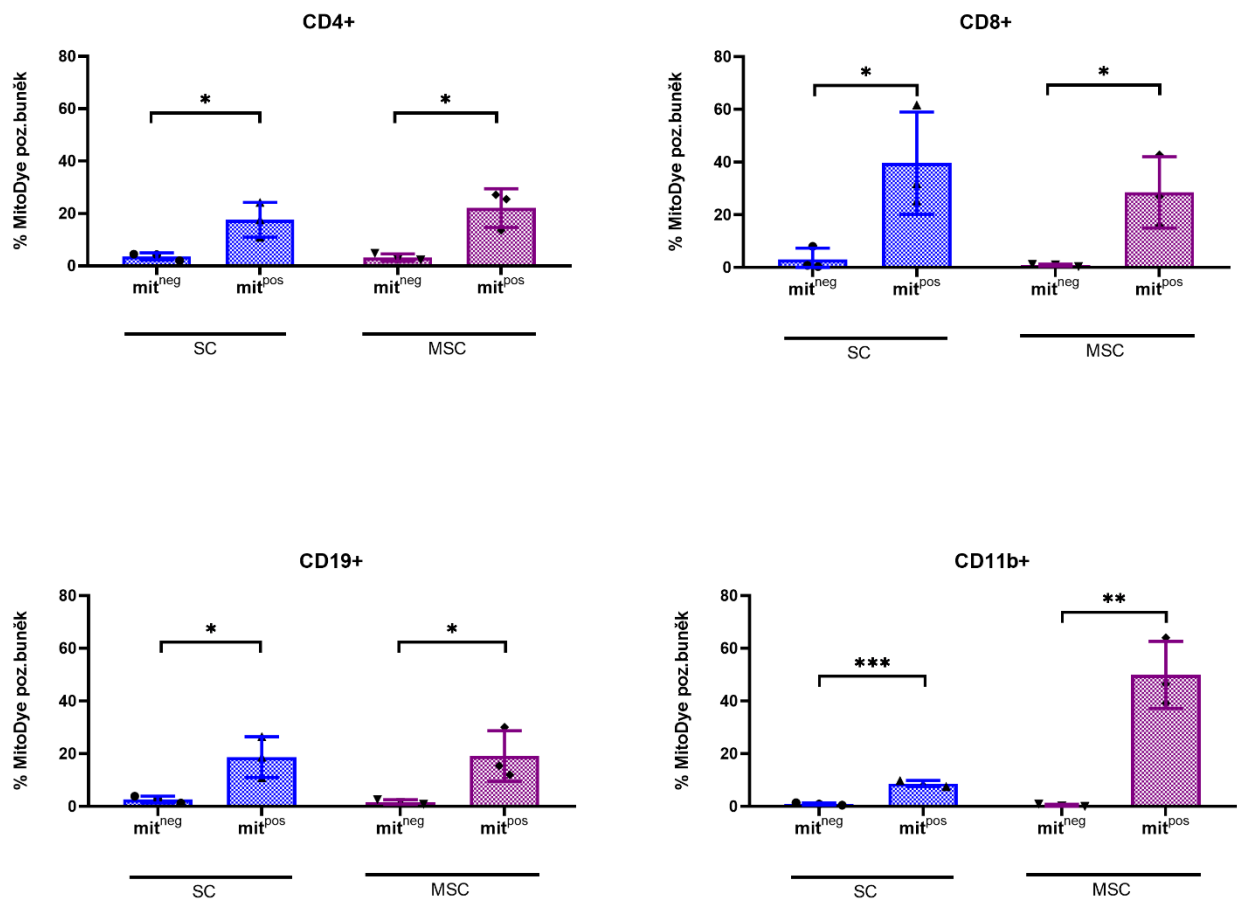
5.6 Mitochondriální transfer a jeho vliv na mitofagii

Dále nás zajímalo, zda může samotný mitotransfer indukovat mitofagii v SPL. Mitofagii jsme pozorovali dvěma způsoby – s využitím průtokové cytometrie a qPCR.

5.6.1 Průtoková cytometrie – mitofagie

Po ko-kultivaci SPL s MSC/SC jsme chtěli metodou průtokové cytometrie zjistit, zda mitotransfer indukuje mitofagii v buňkách. Detekčním kitem MitophagyDye byly obarveny mitochondrie jak SPL, tak MSC/SC. MSC/SC byly rovněž obarveny MitoTracker Red, což umožnilo korelovat mitotransfer s mitofagii v SPL. Byly porovnány vždy dvě skupiny SPL – mit^{pos} a mit^{neg}, tedy buňky, které dostaly/nedostaly mitochondrie po ko-kultivaci s MSC/SC.

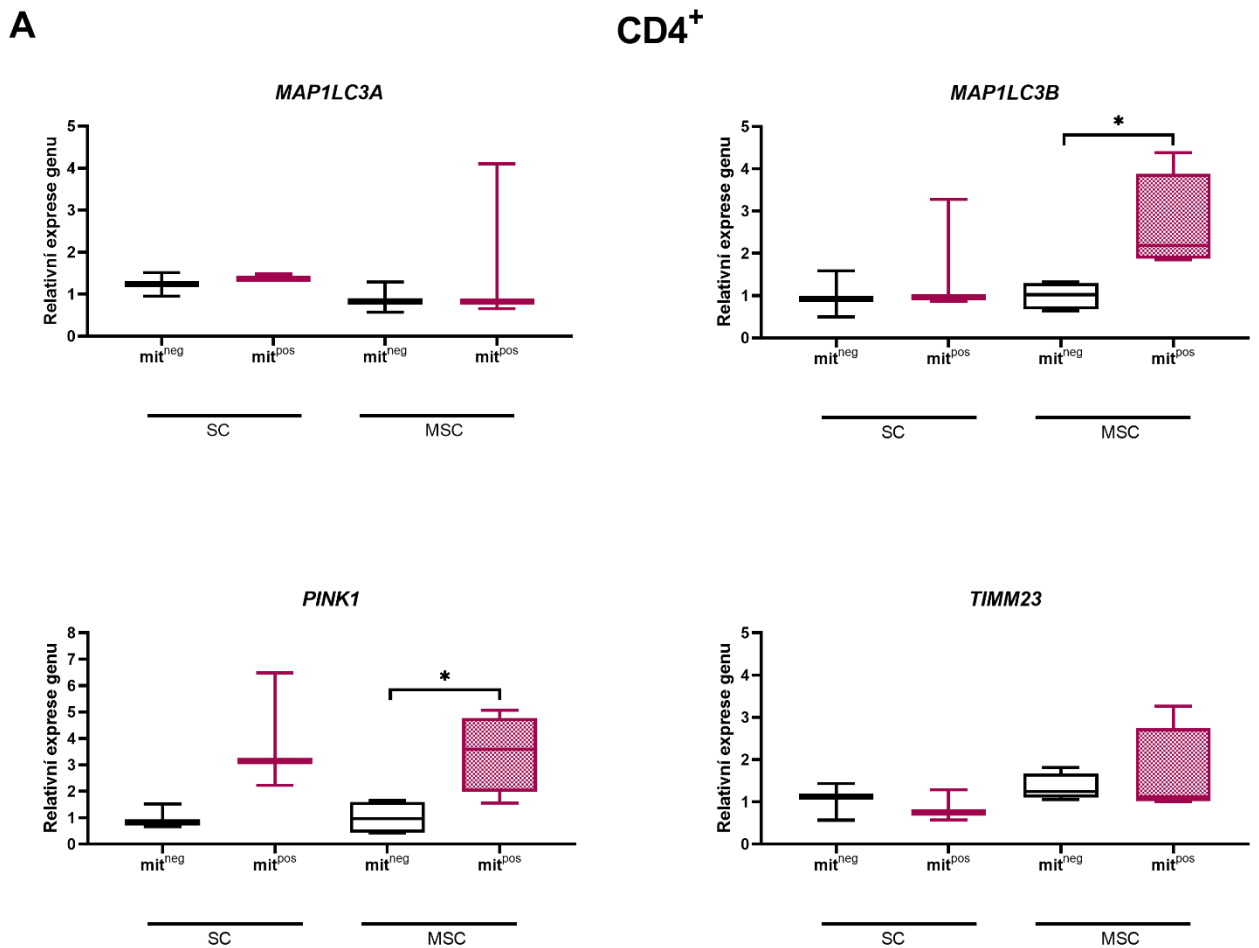
Ze získaných výsledků vyplývá, že ve SPL, které přijaly mitochondrie dochází k významnému nárůstu mitofagie, a to u všech pozorovaných populací buněk jak po ko-kultivaci s MSC, tak se SC (viz. Obr. 20).

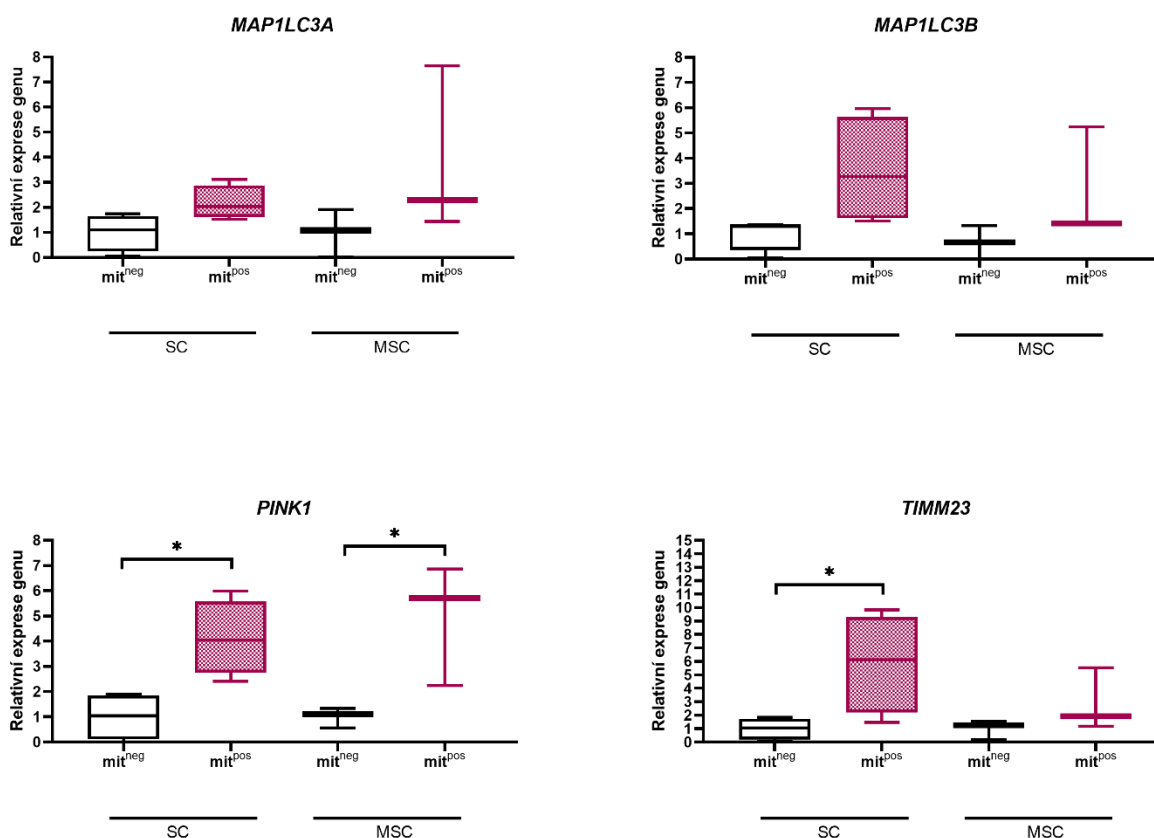


Obrázek 20. Vliv mitotransferu na mitofagii v splenocytech. Procentuální zastoupení MitophagyDye (MitoDye) pozitivních buněk v jednotlivých populacích SPL a skupinách mito^{pos} a mito^{neg}. Měřeno ze 3 nezávislých pokusů. **SC** – ko-kultivace SPL se Sertoliho buňkami, **MSC** – ko-kultivace SPL s mezenchymálními kmenovými buňkami, **mit^{neg}** – SPL, které po ko-kultivaci nedostaly mitochondrie, **mit^{pos}** – SPL, které po ko-kultivaci dostaly mitochondrie. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ představuje statisticky významnou odchylku.

5.6.2 qPCR – autofagie a mitofagie

Po ko-kultivaci MSC/SC se SPL byly vysortovány populace SPL pozitivní a negativní na mitochondrie (viz. Obr. 6). Z technických důvodů byly sledovány pouze populace $CD4^+$ a $CD19^+$. Následně v nich byla zjištěna relativní exprese genů specifických pro autofagii a mitofagii (viz. Obr. 21A, B). Ze získaných výsledků vyplývá, že po 3hod ko-kultivaci nedochází k významným rozdílům v expresi genů pro autofagii (*MAP1LC3A* a *MAP1LC3B*). Byla pozorována pouze tendence ke zvýšené expresi těchto genů u $CD19^+$. Výjimkou jsou $CD4^+$ buňky ko-kultivované s MSC, u kterých dochází k signifikantnímu zvýšení exprese *MAP1LC3B*. Naopak u $CD4^+$ tak u $CD19^+$ SPL pozorujeme signifikantní zvýšení v expresi genu specifického pro mitofagii *PINK1*. Expresi dalšího genu spojeného s mitofagií *TIMM23* se signifikantně zvyšuje v případě $CD19^+$ ko-kultivovaných se SC.



B**CD19⁺**

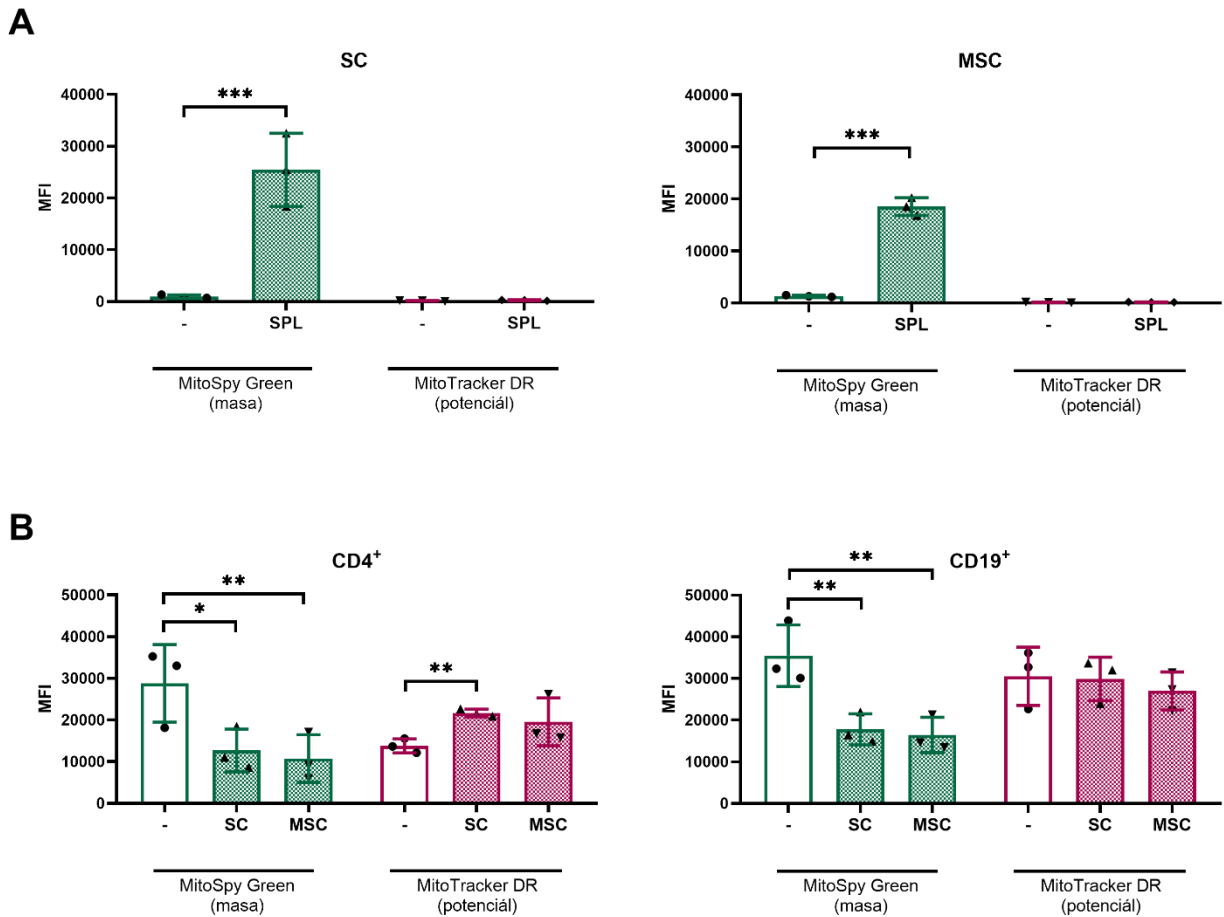
Obrázek 21. Relativní exprese vybraných genů charakteristických pro autofagii a mitofagii. A. CD4⁺ SPL vysortované po 3hod ko-kultivaci s MSC/SC. B. CD19⁺ SPL vysortované po 3hod ko-kultivaci s MSC/SC. Měřeno ze 3-4 nezávislých pokusů. SC – ko-kultivace se Sertoliho buňkami, MSC – ko-kultivace s mezenchymálními kmenovými buňkami, *mit^{neg}* – SPL, které po ko-kultivaci nedostaly mitochondrie, *mit^{pos}* – SPL, které po ko-kultivaci dostaly mitochondrie. * $p < 0,05$ představuje statisticky významnou odchylku.

5.7 Obousměrnost mitochondriálního transferu

Mitotransfer z MSC/SC do SPL se mi povedlo v práci opakovaně potvrdit. Dosud ale nebylo známo, zda probíhá i v případě komunikace se SPL obousměrně a zda jsou přenášeny převážně mitochondrie funkční, nebo nikoliv.

Pro potvrzení toho, zda je mitotransfer v případě ko-kultivace MSC/SC se SPL obousměrný, byl proveden pokus, při kterém byly SPL obarveny mitochondrie s využitím MitoSpy Green (masa) a MitoTracker Deep Red (potenciál). Po 3hod ko-kultivaci MSC/SC+SPL byla sledována dynamika přenosu mitochondrií do MSC/SC (viz. Obrázek 22A). Ze získaných výsledků je zřejmé, že MSC/SC ko-kultivované se SPL dostaly mitochondriální masu od SPL. Žádné z buněk ale nebyly pozitivní na MitoTracker Deep Red, tedy přijaté mitochondrie nevykazovaly potenciál.

Po ko-kultivaci byla detekována také změna MFI v obou kanálech sledovaných u SPL (viz. Obr. 22B). Pozorujeme úbytek mitochondriální masy, což odpovídá přenosu mitochondrií ze SPL. Naopak potenciál mitochondrií se v případě $CD4^+$ buněk zvyšoval, kdežto u $CD19^+$ nedošlo k žádné změně. Jako příklad jsou uvedeny pouze tyto dvě populace, jelikož se u nich prokázal největší rozdíl v mitotransferu.



Obrázek 22. Obousměrnost mitotransferu. MFI MitoSpy Green a MitoTracker Deep Red, znázorňující přenos mitochondrií z hlediska masy a potenciálu. Měřeno ze 3 nezávislých pokusů. - - A: MSC/SC samostatně, B: SPL samostatně, SC – ko-kultivace se Sertolihovo buňkami, MSC – ko-kultivace s mezenchymálními kmenovými buňkami, MitoTracker DR – MitoTracker Deep Red, MFI – mean fluorescence intensity. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ představuje statisticky významnou odchylku.

6. Diskuze

Přenos mitochondrií probíhá mezi MSC a okolím za fyziologických i stresových podmínek. Mitotransfer podporuje oxidativní fosforylaci a přežívání buněk a má tedy velký terapeutický potenciál jak z hlediska životnosti cílových buněk, tak metabolických změn v imunitních buňkách, které mohou navodit změnu fenotypu. SC mají vlastnosti podobné MSC, včetně schopnosti transferu mitochondrií do buněk imunitního systému (Porubska et al., 2021). Podrobnější popis mechanismu mitotransferu a jeho vlivu na imunitní buňky přinese nové poznatky a možnosti terapeutického využití. Dalším cílem je porovnání dvou typů kmenových buněk – MSC a SC z hlediska přenosu mitochondrií. Pro tuto práci byl zvolen myší model a série ko-kultivačních pokusů *in vitro*.

SC vytváří těsnou komunikační síť se sousedními SC, a jsou tak schopny poskytovat SSC prostředí potřebné k jejich zrání. BTB je tvořená mj. gap junctions a SC jsou tak buňky bohaté na Cx43 (Hilbold et al., 2020), což je connexinový protein, který se podílí na tvorbě TNT a přenosu mitochondrií mezi buňkami (Li et al., 2019; Yao et al., 2018). Naším předpokladem tak bylo, že SC budou z pohledu mitotransferu lepší než MSC. Naše výsledky ale ukázaly, že MSC jsou v *in vitro* podmínkách zdatnější, co se přenosu mitochondrií týče. To může být dáno jejich větší velikostí, při které zabírají větší plochu na dně kultivační destičky, a která teoreticky hraje rozhodující roli při náhodné tvorbě TNT mezi buňkami.

Přenos mitochondrií probíhá několika způsoby – parakrinně, např. prostřednictvím EV, nebo v důsledku přímého kontaktu mezi buňkami a vzniku nanotrubičky. Existují zmínky o tom, že MSC využívají k přenosu mitochondrií do epitelálních buněk oba způsoby (Islam et al., 2012). Nejdříve jsme potřebovali potvrdit, že opravdu dochází k přenosu mitochondrií mezi MSC/SC a SPL. Mitotransfer byl detekován dvěma způsoby: s využitím průtokové cytometrie a fluorescenční mikroskopie a byl v obou případech potvrzen. Z výsledků průtokové cytometrie ve většině případů vyplývalo, že mitotransfer do CD19⁺ B lymfocytů je ze všech populací nejnižší, což bylo poprvé okrajově zmíněno, ale neobjasněno, ve studii z roku 2019 (Luz-Crawford et al., 2019). Další populace, u které byl mitotransfer opakovaně pozorován jako nižší (nebo v některých případech nejnižší) byly CD8⁺ SPL, což může být způsobeno tím, že v poměrně velké části mit^{pos} CD8⁺ buněk byla indukována apoptóza. Fluorescenční mikroskopie ukázala, že k přenosu mitochondrií mezi buňkami docházelo především v důsledku přímého kontaktu. Ukázali jsme, že dochází k přenosu mitochondrií mj. prostřednictvím nanotrubiček, jelikož byla detekována

i aktinová vlákna. Abychom zjistili, zda se jedná o preferenční způsob přenosu mitochondrií z MSC/SC do SPL, byly buňky ko-kultivovány po dobu 3 hod s využitím tzv. transwell kultivační destičky. Membrána, která oddělovala MSC/SC a SPL, obsahovala póry o velikosti 3 μm , což by mělo být dostatečné k případnému průniku EV (viz. kapitola 2.2.1 Extracelulární vezikuly), nebo mitochondrií, které se dostaly do média extruzí. V porovnání s kontrolní kultivací umožňující přímý kontakt nedocházelo k žádnému přenosu mitochondrií do SPL při použití transwell systému, což svědčí o závislosti mitotransferu mezi MSC/SC a SPL na přímém kontaktu a tvorbě nanotrubičky v našich experimentálních podmínkách. Již dříve bylo ukázáno, že transwell systém zamezil mitotransferu a ochraně buněk akutní lymfoblastické leukémie před oxidativním stresem (Burt et al., 2019).

V následujícím kroku jsme chtěli zjistit, zda přijetí mitochondrií od MSC/SC ovlivní přežívání SPL. Kladný vliv přenosu zdravých mitochondrií na přežívání buněk byl prokázán např. při komunikaci MSC s neurony a alveolárními epiteliálními buňkami (Islam et al., 2012; Li et al., 2019). Podobný efekt byl pozorován i v naší laboratoři na příkladu mitotransferu mezi MSC/SC a imunitními buňkami (Porubská et al., 2021). Pro potvrzení, že mitotransfer zlepšil přežívání u všech námi zvolených populací SPL, byly SPL kultivovány v přítomnosti MSC/SC a byla detekována úroveň apoptózy. Procentuální zastoupení apoptotických SPL se porovnávalo vždy v rámci dvou skupin: buněk, které po ko-kultivaci nedostaly mitochondrie (mit^{neg}) a buněk, které po ko-kultivaci dostaly mitochondrie (mit^{pos}). Ukázali jsme, že mit^{pos} SPL přežívají ve většině případů významně lépe než mit^{neg} . Je nutno zdůraznit CD19^+ populaci, z větší části sestávající z B lymfocytů, u které je rozdíl přežívání mit^{neg} a mit^{pos} buněk nejvyšší. To může být vysvětleno tím, že větší část B lymfocytů se nacházela v apoptóze a v důsledku přenosu mitochondrií docházelo k záchraně těchto buněk. Opačný efekt mitotransferu jsme pozorovali u CD8^+ populace. Možným vysvětlením je, že po přímém kontaktu mezi buňkami dochází k interakci Fas a Fas-L, což je jeden z prokázaných mechanismů regulace imunitního systému, zprostředkovaného MSC (Akiyama et al., 2012). V důsledku této interakce nejspíš nedochází k záchraně buněk před apoptózou, nýbrž k její indukci.

MSC reagují na mitochondriální poškození buněk ve svém okolí. Oxidativní stres, ischemie, a nakonec poškození mitochondrií jsou známy tím, že indukují mitotransfer, např. zvýšenou sekrecí $\text{TNF}\alpha$ (Tseng et al., 2021), nebo uvolnění mtDNA (Mahrouf-Yorgov et al., 2017). Podobný efekt jsme očekávali i při poškození mitochondrií u SPL.

SPL byly ovlivněny dvěma typy činidel: OL, inhibitorem ATP-syntázy, a ROT, inhibitorem 1. komplexu elektrontransportního řetězce, které měly způsobit vážné poškození mitochondrií. Následovaly ko-kultivační pokusy s MSC/SC a byla sledována míra mitotransferu. Překvapivě, až na CD8⁺ poškozené OL, nedocházelo ke zvýšenému přenosu mitochondrií. V případě ovlivnění ROT dokonce docházelo k poklesu míry mitotransferu. Pro objasnění, čím jsou takové rozdíly v rámci populací SPL i jednotlivých skupin způsobeny, jsme sledovali, jaký vliv mají OL a ROT na míru apoptózy SPL, tvorbu ROS a funkčnost mitochondrií, která byla znázorněna jako podíl jejich masy a membránového potenciálu. Dalším možným důvodem zjevného poklesu mitotransferu může být rozběhlá mitofagie, která je ROT indukována (Kubli et al., 2015). Tato hypotéza ale nebyla ověřena.

Zjistili jsme, že ani funkčnost mitochondrií z hlediska koeficientu masy a potenciálu, ani apoptóza, ani tvorba ROS nejsou výrazně ovlivněny OL a ROT. Pozorujeme tendenci ke snížení funkčnosti mitochondrií po ovlivnění OL u CD19⁺ buněk, žádné ze získaných výsledků ale nebyly signifikantní. Je možné, že byla použita příliš nízká koncentrace činidel, nebo doba kultivace nebyla dostatečná na to, aby způsobila zjevnější poškození mitochondrií. Nicméně i tyto výsledky přinesly pár zajímavých pozorování. Vyplývá z nich, že populace CD19⁺ B lymfocytů přežívá ze všech populací nejhůř a dalo by se čekat, že v důsledku toho bude do ní mitotransfer nejvyšší, např. vzhledem k expresi fosfatidylserinu na povrchu apoptotických buněk (Liu et al., 2014). Zároveň ale z našich výsledků vyplývá, že B lymfocyty mají z vybraných populací SPL nejnižší tvorbu ROS. ROS hrají důležitou roli v signalizačních kaskádách vedoucích ke tvorbě TNT mezi buňkami (Mistry et al., 2019). Naší hypotézou tedy bylo, že právě závislost na tvorbě ROS má za následek nízký mitotransfer do B lymfocytů.

V následujícím kroku jsme chtěli hypotézu vzniklou z předešlých výsledků ověřit. Z tohoto důvodu byly SPL před ko-kultivací s MSC/SC ovlivněny oxidačním činidlem H₂O₂, antioxidantem NAC, nebo jejich kombinací po dobu 24 hod. Následovala 3hod ko-kultivace s MSC/SC. Nejprve jsme získali výsledek, který byl v rozporu z předešlými pozorováními – ukazoval totiž, že mají B lymfocyty mitotransfer nejvyšší, a to včetně kontrolní (neovlivněné) skupiny buněk. Možným důvodem mohlo být to, že pro tento pokus byly použity starší myši (~8měsíční). Senescence imunitního systému je asociována s oxidačním stresem a vyšší produkcí ROS (Garrido et al., 2019). Dalším možným důvodem je výskyt velké populace hyper-metabolických B lymfocytů ve slezině starších

myší, které mj. produkují více ROS (Frasca et al., 2021). Poté byl tento pokus zopakován s využitím mladých myší a dostali jsme výsledek, který odpovídal našim očekáváním. Rovněž jsme ukázali, že jak ovlivnění H_2O_2 , tak NAC, nebo jejich kombinací vede u některých populací k poklesu mitotransferu. Nejvýrazněji je to vidět v případě $CD4^+$ a $CD8^+$ T lymfocytů ko-kultivovaných se SC. Na druhou stranu $CD19^+$ B lymfocyty nebyly tak výrazně ovlivněny oxidačním činidlem H_2O_2 , jak jsme čekali. Nejvíce překvapujícím bylo, že ovlivnění H_2O_2 nejen že nezvýšilo mitotransfer, ale dokonce vedlo v některých případech k jeho zjevnému poklesu. Možným vysvětlením je, že nebyla použita dostatečná koncentrace H_2O_2 , a tedy nedocházelo ke zvýšené produkci ROS, příp. specificky mitochondriálních ROS (mitoROS). Dalším možným vysvětlením je, že po ovlivnění H_2O_2 buňky více umíraly, nebo byla v nich indukována mitofagie (Frank et al., 2012). V důsledku toho část mitochondrií přenášovaných od MSC/SC mohla být rovnou zabalena do autofagozomu, což vedlo ke zhasnutí MitoTracker Red, které se jeví jako snížení mitotransferu. Pro zodpovězení těchto otázek byly analyzovány: tvorba ROS, mitoROS a mitofagie v SPL po ovlivnění H_2O_2 , NAC a jejich kombinací.

Zaznamenali jsme zvýšenou produkci ROS po 24hod kultivaci SPL s H_2O_2 a mírný pokles po kultivaci s NAC, avšak při specifické analýze mitoROS, tedy superoxidů produkovaných výhradně mitochondriemi, jsme nepozorovali tak zřetelné rozdíly. Docházelo pouze k mírnému nárůstu tvorby mitoROS u $CD4^+$ a $CD8^+$ T lymfocytů. U $CD8^+$ a $CD19^+$ rovněž docházelo k náznaku zvýšení produkce mitoROS, tyto výsledky však nebyly signifikantní. Z toho můžeme usoudit, že superoxidy produkované mitochondriemi jsou z pohledu tvorby TNT opravdu důležitější, což je v souladu s několika studiemi (Marlein et al., 2017; Mistry et al., 2019), a takto malý nárůst jejich produkce proto nedokázal zvýšit mitotransfer. H_2O_2 nebo námi použitá koncentrace se ukázala jako neefektivní pro indukci mitoROS. Stále to ale nevysvětlovalo zjevný pokles mitotransferu po ovlivnění buněk H_2O_2 . V následujícím kroku byla analyzována mitofagie. Ukázali jsme, že v důsledku poškození buněk H_2O_2 dochází ke zvýšení míry mitofagie v buňkách. I přesto, že nebyl tento nárůst signifikantní u $CD8^+$ a $CD19^+$ populací, je výraznější než v případě mitoROS, a tak nemůžeme vyloučit, že zjevné snížení mitotransferu po ovlivnění H_2O_2 bylo způsobeno probíhající mitofagii v buňkách.

Z našich výsledků vyplývalo, že mitofagie hraje důležitou roli při přenosu a následném zpracování mitochondrií buňkami imunitního systému. V následujícím kroku jsme se zaměřili na to, zda a do jaké míry indukuje samotný mitotransfer mitofagii v SPL.

Tento předpoklad mohl zároveň vysvětlit i nízký mitotransfer do B lymfocytů, pokud by se ukázalo, že mají tyto buňky ze všech populací největší podíl buněk v mitofagii. Mitofagie v imunitních buňkách indukovaná mitotransferem byla dosud popsána pouze u makrofágů, u kterých docházelo k tzv. transmitofagii (Phinney et al., 2015). Naše hypotéza byla nejprve ověřena s využitím průtokové cytometrie. Po 3hod ko-kultivaci se znovu porovnávaly mit^{pos} a mit^{neg} skupiny jednotlivých populací SPL. Ukázali jsme probíhající mitofagii v buňkách, do kterých byly přenášeny mitochondrie. CD4⁺ a CD19⁺ mají shodný podíl buněk v mitofagii, což vyvrací naši hypotézu o tom, že právě mitofagie může za nejnižší mitotransfer u CD19⁺ B lymfocytů. Lze ale polemizovat o tom, že populace CD19⁺ je široký pojem a je tedy dost možné, že budou tyto rozdíly pozorovány až na úrovni jednotlivých subpopulací B lymfocytů a T lymfocytů ve slezině. Nejvyšší hladinu mitofagie jsme detekovali u CD11b⁺ populace SPL, která dostala mitochondrie od MSC. Jelikož do CD11b⁺ spadají např. i makrofágy, můžeme předpokládat, že se jedná i částečně o transmitofagii, tedy přenášení nefunkčních mitochondrií, které jsou ihned zpracovány mitofagií (Phinney et al., 2015).

Pro potvrzení mitofagie na genové úrovni, byly po 3hod ko-kultivaci s MSC/SC vysortovány mit^{pos} a mit^{neg} CD4⁺ a CD19⁺ buňky. U těchto skupin byla pak pozorována exprese genů asociovaných s autofagií: *MAP1LC3A* a *MAP1LC3B*, a dále specificky s mitofagií: *PINK1* a *TIMM23* (Bhansali et al., 2017; Zhang et al., 2019). Nepozorovali jsme skoro žádný nárůst v expresi genů pro autofagii. Jedinou výjimku pak tvořily CD4⁺ SPL, do kterých byly přenášeny mitochondrie z MSC. Naopak jsme zaznamenali nárůst v expresi genu asociovaného s mitofagií *PINK1* u CD19⁺ i CD4⁺. Exprese *TIMM23* se signifikantně zvyšovala u CD19⁺ ko-kultivovaných se SC přesto, že markerem mitofagie je její pokles. Je možné, že se jednalo o kompenzační mechanismus v důsledku momentálního přísunu nových mitochondrií. Pokles *TIMM23* pravděpodobně vyžadoval delší dobu ko-kultivace, nebo se jednalo o nevhodný marker pro detekci mitofagie po mitotransferu. Na genové úrovni jsme ukázali, že obě pozorované populace SPL vstupují po mitotransferu do mitofagie a zvyšují expresi genu *PINK1*.

Nakonec jsme zkoumali, zda kromě přenosu mitochondrií z MSC/SC do SPL dochází také k transferu mitochondrií z jednotlivých populací imunitních buněk do kmenových buněk. Tento jev byl již dříve prokázán v případě komunikace mezi MSC a buňkami vaskulárního hladkého svalstva (Vallabhaneni et al., 2012), nebylo ale dosud známo, zda ke stejnému efektu dochází v případě MSC/SC a buněk imunitního systému.

Obousměrnost mitotransferu jsme sledovali s využitím kombinace mitochondriálních markerů, značících mitochondrie na základě jejich masy (MitoSpy Green) a potenciálu (MitoTracker Deep Red) tak, aby ze získaných výsledků vynikla i kvalita přenášených mitochondrií. Ukázali jsme, že MSC/SC přijímají mitochondriální masu od SPL. Žádné mitochondrie ale nebyly pozitivní na MitoTracker Deep Red, který značí mitochondrie na základě membránového potenciálu. Při depolarizaci mitochondrií dochází ke zhasnutí barviva, což svědčí o tom, že přenesené mitochondrie nebyly funkční (Perry et al., 2011). Z toho je možné vyvodit dvě hypotézy, které nebyly dosud zkoumány. Po obdržení zdravých mitochondrií od MSC/SC se SPL zbavují zátěže vlastních nefunkčních mitochondrií. Druhá možnost je, že mitochondrie se stanou nefunkčními až ve chvíli, kdy se dostanou do MSC/SC – dojde např. k jejich zabalení do autofagozomu, což vede k depolarizaci mitochondrií a zhasnutí barviček značících mitochondrie (Xiao et al., 2016). Analýza mitochondrií ve SPL ukázala, že dochází ke snížení MFI MitoSpy Green, což je v souladu s předchozím výsledkem a potvrzuje to, že SPL odevzdávají mitochondriální masu. Nedochází ale ke snížení MFI MitoTracker Deep Red, což znamená, že nejsou přenášeny funkční mitochondrie. V případě CD4⁺ populace SPL dokonce dochází k jeho zvýšení po ko-kultivaci, což může souviset s metabolickou změnou v SPL v důsledku mitotransferu. Již dříve bylo prokázáno, že MFI MitoTracker Deep Red roste ve chvíli, kdy dochází k upřednostnění v buňkách oxidativní fosforylace (Mot et al., 2016), která je asociována s protizánětlivým fenotypem imunitních buněk (viz. kapitola 2.3).

Autofagie v T a B lymfocytech podporuje přežívání a proliferaci, udržuje homeostázu endoplazmatického retikula a mitochondrií, včetně odklizení a recyklace přebytečných, nebo nefunkčních organel (He et al., 2021; Oravec-Wilson et al., 2021). Nami získané výsledky znovu zdůrazňují roli autofagie a mitofagie v imunitních buňkách a popisují možný mechanismus nakládání s mitochondriemi přenašenými z MSC a SC. Dále ukazují, že není skoro žádný rozdíl ve zdatnosti MSC a SC přenášet mitochondrie do SPL za *in vitro* podmínkách. Stále je ale možné, že budou SC zdatnější *ex vivo*, nebo *in vivo* a za specifických okolností, např. během zánětu. Dalším důležitým zjištěním je to, že mitotransfer probíhá obousměrně. Otázkou ale zůstává, zda využívají SPL mitotransferu k tomu, aby se zbavily zátěže, nebo dochází k přenosu funkčních mitochondrií do MSC/SC, kde jsou následně zpracovány mitofagií. Ze získaných výsledků je možné odvodit, že vzhledem ke zjevnému poklesu mitochondriální masy u SPL, dochází právě ke „zbavování se“ nefunkčních mitochondrií. Je ale potřeba hlubšího výzkumu v této oblasti.

7. Závěr

- Potvrdili jsme, že dochází k přenosu mitochondrií jak z MSC, tak ze SC, do čtyř námi zvolených populací imunitních buněk. Navzdory očekáváním, nebyla míra přenosu mitochondrií ze SC vyšší než z MSC.
- Byl opakovaně zaznamenán nejnižší mitotransfer do CD19⁺ B lymfocytů.
- Ukázali jsme, že přenos mitochondrií z MSC/SC je silně závislý na přímém kontaktu buněk a podporuje přežívání CD4⁺, CD19⁺ a CD11b⁺ populací SPL, naopak v CD8⁺ buňkách indukoval mitotransfer apoptózu.
- U CD19⁺ B lymfocytů byla zaznamenána nejnižší tvorba ROS. Její souvislost s nižším mitotransferem ale nebyla potvrzena.
- Dalším možným důvodem nižšího mitotransferu do CD19⁺ B lymfocytů mohla být mitofagie, nezaznamenali jsme však významné rozdíly v míře mitofagie mezi B a T lymfocyty.
- Mitofagie může ovlivnit mitotransfer, ale také samotný mitotransfer indukuje v buňkách příjemce mitofagii, což může být součástí strategie přežívání a získu energie ze zpracování přebytečných mitochondrií.
- Mitotransfer mezi MSC/SC a SPL je obousměrný, přičemž mitochondrie přenášené do MSC/SC jsou pravděpodobně nefunkční. Z našich výsledků je možné usuzovat, že byly nefunkční před přenosem, a docházelo tedy ke „zbavování se zátěže“. Nelze ale vyloučit, že se staly nefunkčními uvnitř MSC/SC, ve kterých byly hned po přenosu zpracovány mitofagií. Tato otázka spolu s dalšími vyplývajícími ze získaných výsledků vyžadují řadu dalších studií, které by mohly ukázat i možnosti praktického využití mitotransferu z MSC/SC do imunitních i jiných buněk ovlivněných zánětlivými stavy.

8. Použité zdroje

Abounit, S., Bousset, L., Loria, F., Zhu, S., Chaumont, F., Pieri, L., Olivo-Marin, J., Melki, R., and Zurzolo, C. (2016). Tunneling nanotubes spread fibrillar α -synuclein by intercellular trafficking of lysosomes. *EMBO J.* 35, 2120–2138.

Aggarwal, S., and Pittenger, M.F. (2005). Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 105, 1815–1822.

Ahmad, T., Mukherjee, S., Pattnaik, B., Kumar, M., Singh, S., Rehman, R., Tiwari, B.K., Jha, K.A., Barhanpurkar, A.P., Wani, M.R., et al. (2014). Miro1 regulates intercellular mitochondrial transport & enhances mesenchymal stem cell rescue efficacy. *EMBO J.* 33, 994–1010.

Akiyama, K., Chen, C., Wang, D., Xu, X., Qu, C., Yamaza, T., Cai, T., Chen, W., Sun, L., and Shi, S. (2012). Mesenchymal-stem-cell-induced immunoregulation involves FAS-ligand-/FAS-mediated T cell apoptosis. *Cell Stem Cell* 10, 544–555.

*Almannai, M., El-Hattab, A.W., Ali, M., Soler-Alfonso, C., and Scaglia, F. (2020). Clinical trials in mitochondrial disorders, an update. *Mol. Genet. Metab.* 131, 1–13.

Angelin, A., Gil-de-Gómez, L., Dahiya, S., Jiao, J., Guo, L., Levine, M.H., Wang, Z., Quinn, W.J., Kopinski, P.K., Wang, L., et al. (2017). Foxp3 Reprograms T Cell Metabolism to Function in Low-Glucose, High-Lactate Environments. *Cell Metab.* 25, 1282–1293.e7.

*Bazzan, E., Tinè, M., Casara, A., Biondini, D., Semenzato, U., Cocconcelli, E., Balestro, E., Damin, M., Radu, C.M., Turato, G., et al. (2021). Critical Review of the Evolution of Extracellular Vesicles' Knowledge: From 1946 to Today. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 6417.

Bhansali, S., Bhansali, A., Walia, R., Saikia, U.N., a Dhawan, V. (2017). Alterations in Mitochondrial Oxidative Stress and Mitophagy in Subjects with Prediabetes and Type 2 Diabetes Mellitus. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 8, 347.

Böttcher, M., D. Hofmann, A., Bruns, H., Haibach, M., Loschinski, R., Saul, D., Mackensen, A., Le Blanc, K., Jitschin, R., and Mougiakakos, D. (2016). Mesenchymal Stromal Cells Disrupt mTOR-Signaling and Aerobic Glycolysis During T-Cell Activation. *Stem Cells* 34, 516–521.

Brestoff, J.R., Wilen, C.B., Moley, J.R., Li, Y., Zou, W., Malvin, N.P., Rowen,

M.N., Saunders, B.T., Ma, H., Mack, M.R., et al. (2021). Intercellular Mitochondria Transfer to Macrophages Regulates White Adipose Tissue Homeostasis and Is Impaired in Obesity. *Cell Metab.* 33, 270–282.e8.

*Burnham, A.J., Daley-Bauer, L.P., and Horwitz, E.M. (2020). Mesenchymal stromal cells in hematopoietic cell transplantation. *Blood Adv.* 4, 5877–5887.

Burt, R., Dey, A., Aref, S., Aguiar, M., Akarca, A., Bailey, K., Day, W., Hooper, S., Kirkwood, A., Kirschner, K., et al. (2019). Activated stromal cells transfer mitochondria to rescue acute lymphoblastic leukemia cells from oxidative stress. *Blood* 134, 1415–1429.

Chen, K., Xu, Z., Liu, Y., Wang, Z., Li, Y., Xu, X., Chen, C., Xia, T., Liao, Q., Yao, Y., et al. (2017). Irisin protects mitochondria function during pulmonary ischemia/reperfusion injury. *Sci. Transl. Med.* 9, eaao6298.

Chou, W.C., Guo, Z., Guo, H., Chen, L., Zhang, G., Liang, K., Xie, L., Tan, X., Gibson, S.A., Rampanelli, E., et al. (2021). AIM2 in regulatory T cells restrains autoimmune diseases. *Nature* 591, 300–305.

Chuang, Y.C., Liou, C.W., Chen, S. Der, Wang, P.W., Chuang, J.H., Tiao, M.M., Hsu, T.Y., Lin, H.Y., and Lin, T.K. (2017). Mitochondrial Transfer from Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cell to MERRF Cybrid Reduces Oxidative Stress and Improves Mitochondrial Bioenergetics. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017, 5691215.

Court, A.C., Le-Gatt, A., Luz-Crawford, P., Parra, E., Aliaga-Tobar, V., Bátiz, L.F., Contreras, R.A., Ortúzar, M.I., Kurte, M., Elizondo-Vega, R., et al. (2020). Mitochondrial transfer from MSCs to T cells induces Treg differentiation and restricts inflammatory response. *EMBO Rep.* 21, e48052.

Dal Secco, V., Riccioli, A., Padula, F., Ziparo, E., and Filippini, A. (2008). Mouse Sertoli cells display phenotypical and functional traits of antigen-presenting cells in response to interferon gamma. *Biol. Reprod.* 78, 234–242.

Dang, S., Xu, H., Xu, C., Cai, W., Li, Q., Cheng, Y., Jin, M., Wang, R.X., Peng, Y., Zhang, Y., et al. (2014). Autophagy regulates the therapeutic potential of mesenchymal stem cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Autophagy* 10, 1301.

DeFalco, T., Potter, S.J., Williams, A. V., Waller, B., Kan, M.J., and Capel, B. (2015). Macrophages Contribute to the Spermatogonial Niche in the Adult Testis. *Cell Rep.* 12, 1107.

*Dikic, I., and Elazar, Z. (2018). Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2018 19, 349–364.

Do, J.S., Zwick, D., Kenyon, J.D., Zhong, F., Askew, D., Huang, A.Y., Van't Hof, W., Finney, M., and Laughlin, M.J. (2021). Mesenchymal stromal cell mitochondrial transfer to human induced T-regulatory cells mediates FOXP3 stability. *Sci. Reports* 2021 111 11, 1–15.

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

*Dutta, S., Sandhu, N., Sengupta, P., Alves, M.G., Henkel, R., and Agarwal, A. (2021). Somatic-Immune Cells Crosstalk In-The-Making of Testicular Immune Privilege. *Reprod. Sci.* Epub ahead of print.

Fan, X.L., Zhang, Y., Li, X., and Fu, Q.L. (2020). Mechanisms underlying the protective effects of mesenchymal stem cell-based therapy. *Cell. Mol. Life Sci.* 77, 2771.

*França, L.R., Hess, R.A., Dufour, J.M., Hofmann, M.C., and Griswold, M.D. (2016). The Sertoli cell: one hundred fifty years of beauty and plasticity. *Andrology* 4, 189.

Frank, M., Duvezin-Caubet, S., Koob, S., Occhipinti, A., Jagasia, R., Petcherski, A., Ruonala, M.O., Priault, M., Salin, B., and Reichert, A.S. (2012). Mitophagy is triggered by mild oxidative stress in a mitochondrial fission dependent manner. *Biochim. Biophys. Acta* 1823, 2297–2310.

Frasca, D., Romero, M., Garcia, D., Diaz, A., and Blomberg, B.B. (2021). Hypermetabolic B cells in the spleens of old mice make antibodies with autoimmune specificities. *Immun. Ageing* 18, 1–11.

Galardo, M.N., Regueira, M., Riera, M.F., Pellizzari, E.H., Cigorraga, S.B., and Meroni, S.B. (2014). Lactate Regulates Rat Male Germ Cell Function through Reactive Oxygen Species. *PLoS One* 9, e88024.

Galleu, A., Riffo-Vasquez, Y., Trento, C., Lomas, C., Dolcetti, L., Cheung, T.S., Von Bonin, M., Barbieri, L., Halai, K., Ward, S., et al. (2017). Apoptosis in mesenchymal stromal cells induces in vivo recipient-mediated immunomodulation. *Sci. Transl. Med.* 9, eaam7828.

Gao, J., Wang, X., Wang, Y., Han, F., Cai, W., Zhao, B., Li, Y., Han, S., Wu, X., and Hu, D. (2016a). Murine Sertoli cells promote the development of tolerogenic dendritic cells: a pivotal role of galectin-1. *Immunology* 148, 253–265.

Gao, L., Cen, S., Wang, P., Xie, Z., Liu, Z., Deng, W., Su, H., Wu, X., Wang, S.,

Li, J., et al. (2016b). Autophagy Improves the Immunosuppression of CD4⁺ T Cells by Mesenchymal Stem Cells Through Transforming Growth Factor- β 1. *Stem Cells Transl. Med.* *5*, 1496–1505.

Garrido, A., Cruces, J., Ceprián, N., Vara, E., and de la Fuente, M. (2019). Oxidative-Inflammatory Stress in Immune Cells from Adult Mice with Premature Aging. *Int. J. Mol. Sci.* *20*, 769.

Gilleron, J., Carette, D., Durand, P., Pointis, G., and Segretain, D. (2009). Connexin 43 a potential regulator of cell proliferation and apoptosis within the seminiferous epithelium. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *41*, 1381–1390.

Gong, D., Zhang, C., Li, T., Zhang, J., Zhang, N., Tao, Z., Zhu, W., and Sun, X. (2017). Are Sertoli cells a kind of mesenchymal stem cells? *Am. J. Transl. Res.* *9*, 1067.

Gong, Z., Pan, J., Shen, Q., Li, M., and Peng, Y. (2018). Mitochondrial dysfunction induces NLRP3 inflammasome activation during cerebral ischemia/reperfusion injury. *J. Neuroinflammation* *15*, 242.

Guo, W. Bin, Huang, Z.H., Yang, C., Lv, X.Y., Xia, H., Tian, H., Yang, J.K., Zhou, Q.Z., Chen, M.K., Xue, K.Y., et al. (2020). Down regulating PHGDH affects the lactate production of sertoli cells in varicocele. *Reprod. Biol. Endocrinol.* *18*, 1–9.

*Harrell, C.R., Jovicic, N., Djonov, V., Arsenijevic, N., and Volarevic, V. (2019). Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes and Other Extracellular Vesicles as New Remedies in the Therapy of Inflammatory Diseases. *Cells* *8*, 1605.

Hashimoto, M., Bhuyan, F., Hiyoshi, M., Noyori, O., Nasser, H., Miyazaki, M., Saito, T., Kondoh, Y., Osada, H., Kimura, S., et al. (2016). Potential Role of the Formation of Tunneling Nanotubes in HIV-1 Spread in Macrophages. *J. Immunol.* *196*, 1832–1841.

Hayakawa, K., Esposito, E., Wang, X., Terasaki, Y., Liu, Y., Xing, C., Ji, X., and Lo, E.H. (2016). Transfer of mitochondria from astrocytes to neurons after stroke. *Nature* *535*, 551–555.

He, C., Wang, S., Zhou, C., He, M., Wang, J., Ladds, M., Lianoudaki, D., Sedimbi, S.K., Lane, D.P., Westerberg, L.S., et al. (2021). CD36 and LC3B initiated autophagy in B cells regulates the humoral immune response. *Autophagy* *17*, 3577–3591.

Hilbold, E., Distl, O., Hoedemaker, M., Wilkening, S., Behr, R., Rajkovic, A., Langeheine, M., Rode, K., Jung, K., Metzger, J., et al. (2020). Loss of Cx43 in Murine Sertoli Cells Leads to Altered Prepubertal Sertoli Cell Maturation and Impairment of the Mitosis-Meiosis Switch. *Cells* *9*, 676.

Hong, X., Wang, Q., Yang, Y., Zheng, S., Tong, X., Zhang, S., Tao, L., and Harris, A.L. (2012). Gap junctions propagate opposite effects in normal and tumor testicular cells in response to cisplatin. *Cancer Lett.* *317*, 165–171.

Hussein, M.R., Abou-Deif, E.S., Bedaiwy, M.A., Said, T.M., Mustafa, M.G., Nada, E., Ezat, A., and Agarwal, A. (2005). Phenotypic characterization of the immune and mast cell infiltrates in the human testis shows normal and abnormal spermatogenesis. *Fertil. Steril.* *83*, 1447–1453.

Islam, M.N., Das, S.R., Emin, M.T., Wei, M., Sun, L., Westphalen, K., Rowlands, D.J., Quadri, S.K., Bhattacharya, S., and Bhattacharya, J. (2012). Mitochondrial transfer from bone-marrow-derived stromal cells to pulmonary alveoli protects against acute lung injury. *Nat. Med.* *18*, 759–765.

Jackson, M. V., Morrison, T.J., Doherty, D.F., McAuley, D.F., Matthay, M.A., Kissenpfennig, A., O’Kane, C.M., and Krasnodembskaya, A.D. (2016). Mitochondrial Transfer via Tunneling Nanotubes is an Important Mechanism by Which Mesenchymal Stem Cells Enhance Macrophage Phagocytosis in the In Vitro and In Vivo Models of ARDS. *Stem Cells* *34*, 2210–2223.

Jha, A.K., Huang, S.C.C., Sergushichev, A., Lampropoulou, V., Ivanova, Y., Loginicheva, E., Chmielewski, K., Stewart, K.M., Ashall, J., Everts, B., et al. (2015). Network integration of parallel metabolic and transcriptional data reveals metabolic modules that regulate macrophage polarization. *Immunity* *42*, 419–430.

*Jiang, W., and Xu, J. (2020). Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Cell Prolif.* *53*, 2169–2179.

Jiang, Z., Liu, Z., Li, M., Chen, C., and Wang, X. (2019). Increased glycolysis correlates with elevated immune activity in tumor immune microenvironment. *EBioMedicine* *42*, 431–442.

Jung, J.E., Sun, G., Garrido, J.B., Obertas, L., Mobley, A.S., Ting, S.M., Zhao, X., and Aronowski, J. (2020). The Mitochondria-Derived Peptide Humanin Improves Recovery from Intracerebral Hemorrhage: Implication of Mitochondria Transfer and Microglia Phenotype Change. *J. Neurosci.* *40*, 2154–2165.

Kadiu, I., and Gendelman, H.E. (2011). Macrophage bridging conduit trafficking of HIV-1 through the endoplasmic reticulum and Golgi network. *J. Proteome Res.* *10*, 3225–3238.

Kanai, R., Nakashima, A., Doi, S., Kimura, T., Yoshida, K., Maeda, S., Ishiuchi, N., Yamada, Y., Ike, T., Doi, T., et al. (2021). Interferon- γ enhances the therapeutic effect of mesenchymal stem cells on experimental renal fibrosis. *Sci. Reports* 2021 111 *11*, 1–14.

Ke, F., Zhang, L., Liu, Z., Yan, S., Xu, Z., Bai, J., Zhu, H., Lou, F., Cai, W., Sun, Y., et al. (2016). Soluble Tumor Necrosis Factor Receptor 1 Released by Skin-Derived Mesenchymal Stem Cells Is Critical for Inhibiting Th17 Cell Differentiation. *Stem Cells Transl. Med.* 5, 301–313.

Keller, K. (2020). Tunneling nanotubes and actin cytoskeleton dynamics in glaucoma. *Neural Regen. Res.* 15, 2031–2032.

Kim, D.S., Jang, I.K., Lee, M.W., Ko, Y.J., Lee, D.H., Lee, J.W., Sung, K.W., Koo, H.H., and Yoo, K.H. (2018). Enhanced Immunosuppressive Properties of Human Mesenchymal Stem Cells Primed by Interferon- γ . *EBioMedicine* 28, 261–273.

Kim, K.W., Moon, S.J., Park, M.J., Kim, B.M., Kim, E.K., Lee, S.H., Lee, E.J., Chung, B.H., Yang, C.W., and Cho, M. La (2015). Optimization of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells by rapamycin in a murine model of acute graft-versus-host disease. *Stem Cell Res. Ther.* 6, 202.

Kubli, D.A., Cortez, M.Q., Moyzis, A.G., Najor, R.H., Lee, Y., and Gustafsson, Å.B. (2015). PINK1 Is Dispensable for Mitochondrial Recruitment of Parkin and Activation of Mitophagy in Cardiac Myocytes. *PLoS One* 10, e0130707.

Leichtmann-Bardoogo, Y., Cohen, L.A., Weiss, A., Marohn, B., Schubert, S., Meinhardt, A., and Meyron-Holtz, E.G. (2012). Compartmentalization and regulation of iron metabolism proteins protect male germ cells from iron overload. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 302, e1519–e1530.

Li, X. (2019). Gap junction protein connexin43 and tunneling nanotubes in human trabecular meshwork cells. *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.* 11, 212.

Li, H., Wang, C., He, T., Zhao, T., Chen, Y. ying, Shen, Y. liang, Zhang, X., and Wang, L. lin (2019). Mitochondrial Transfer from Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells to Motor Neurons in Spinal Cord Injury Rats via Gap Junction. *Theranostics* 9, 2017–2035.

Li, X., Zhang, Y., Yeung, S.C., Liang, Y., Liang, X., Ding, Y., Ip, M.S.M., Tse, H.F., Mak, J.C.W., and Lian, Q. (2014). Mitochondrial transfer of induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells to airway epithelial cells attenuates cigarette smoke-induced damage. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 51, 455–465.

Liu, K., Ji, K., Guo, L., Wu, W., Lu, H., Shan, P., and Yan, C. (2014). Mesenchymal stem cells rescue injured endothelial cells in an in vitro ischemia–reperfusion model via tunneling nanotube like structure-mediated mitochondrial transfer. *Microvasc. Res.* 92, 10–18.

Lock, J.T., Parker, I., and Smith, I.F. (2016). Communication of Ca²⁺ signals via

tunneling membrane nanotubes is mediated by transmission of inositol trisphosphate through gap junctions. *Cell Calcium* 60, 266.

Lou, E., Zhai, E., Sarkari, A., Desir, S., Wong, P., Iizuka, Y., Yang, J., Subramanian, S., McCarthy, J., Bazzaro, M., et al. (2018). Cellular and Molecular Networking Within the Ecosystem of Cancer Cell Communication via Tunneling Nanotubes. *Front. Cell Dev. Biol.* 6, 95.

Luz-Crawford, P., Noël, D., Fernandez, X., Khoury, M., Figueroa, F., Carrión, F., Jorgensen, C., and Djouad, F. (2012). Mesenchymal stem cells repress Th17 molecular program through the PD-1 pathway. *PLoS One* 7, e45272.

Luz-Crawford, P., Hernandez, J., Djouad, F., Luque-Campos, N., Caicedo, A., Carrère-Kremer, S., Brondello, J.M., Vignais, M.L., Pène, J., and Jorgensen, C. (2019). Mesenchymal stem cell repression of Th17 cells is triggered by mitochondrial transfer. *Stem Cell Res. Ther.* 10, 1–13.

Mahrouf-Yorgov, M., Augeul, L., Da Silva, C.C., Jourdan, M., Rigolet, M., Manin, S., Ferrera, R., Ovize, M., Henry, A., Guguin, A., et al. (2017). Mesenchymal stem cells sense mitochondria released from damaged cells as danger signals to activate their rescue properties. *Cell Death Differ.* 24, 1224–1238.

Marlein, C.R., Zaitseva, L., Piddock, R.E., Robinson, S.D., Edwards, D.R., Shafat, M.S., Zhou, Z., Lawes, M., Bowles, K.M., and Rushworth, S.A. (2017). NADPH oxidase-2 derived superoxide drives mitochondrial transfer from bone marrow stromal cells to leukemic blasts. *Blood* 130, 1649–1660.

Mateus, I., Feijó, M., Espínola, L.M., Vaz, C. V., Correia, S., and Socorro, S. (2018). Glucose and glutamine handling in the Sertoli cells of transgenic rats overexpressing regucalcin: plasticity towards lactate production. *Sci. Reports* 2018 8, 1–13.

Melief, S.M., Schrama, E., Brugman, M.H., Tiemessen, M.M., Hoogduijn, M.J., Fibbe, W.E., and Roelofs, H. (2013). Multipotent stromal cells induce human regulatory T cells through a novel pathway involving skewing of monocytes toward anti-inflammatory macrophages. *Stem Cells* 31, 1980–1991.

Michaeloudes, C., Li, X., Mak, J.C.W., and Bhavsar, P.K. (2021). Study of Mesenchymal Stem Cell-Mediated Mitochondrial Transfer in In Vitro Models of Oxidant-Mediated Airway Epithelial and Smooth Muscle Cell Injury. *Methods Mol. Biol.* 2269, 93–105.

*Mishra, V.K., Shih, H.H., Parveen, F., Lenzen, D., Ito, E., Chan, T.F., and Ke, L.Y. (2020). Identifying the Therapeutic Significance of Mesenchymal Stem Cells. *Cells* 9, 1145.

Mistry, J.J., Marlein, C.R., Moore, J.A., Hellmich, C., Wojtowicz, E.E., Smith, J.G.W., Macaulay, I., Sun, Y., Morfakis, A., Patterson, A., et al. (2019). ROS-mediated PI3K activation drives mitochondrial transfer from stromal cells to hematopoietic stem cells in response to infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *116*, 24610–24619.

*Mita, P., Hinton, B.T., and Dufour, J.M. (2011). The blood-testis and blood-epididymis barriers are more than just their tight junctions. *Biol. Reprod.* *84*, 851–858.

Morrison, T.J., Jackson, M. V., Cunningham, E.K., Kissenpfennig, A., McAuley, D.F., O’Kane, C.M., and Krasnodembskaya, A.D. (2017). Mesenchymal Stromal Cells Modulate Macrophages in Clinically Relevant Lung Injury Models by Extracellular Vesicle Mitochondrial Transfer. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *196*, 1275–1286.

Mot, A.I., Liddell, J.R., White, A.R., and Crouch, P.J. (2016). Circumventing the Crabtree Effect: A method to induce lactate consumption and increase oxidative phosphorylation in cell culture. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *79*, 128–138.

Nakada, K., Sato, A., Yoshida, K., Morita, T., Tanaka, H., Inoue, S.I., Yonekawa, H., and Hayashi, J.I. (2006). Mitochondria-related male infertility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 15148–15153.

Oravec-Wilson, K., Rossi, C., Zajac, C., Sun, Y., Li, L., Decoville, T., Fujiwara, H., Kim, S., Peltier, D., and Reddy, P. (2021). ATG5-Dependent Autophagy Uncouples T-cell Proliferative and Effector Functions and Separates Graft-versus-Host Disease from Graft-versus-Leukemia. *Cancer Res.* *81*, 1063–1075.

Osteikoetxea-Molnár, A., Szabó-Meleg, E., Tóth, E.A., Oszvald, Á., Izsépi, E., Kremlitzka, M., Biri, B., Nyitray, L., Bozó, T., Németh, P., et al. (2016). The growth determinants and transport properties of tunneling nanotube networks between B lymphocytes. *Cell. Mol. Life Sci.* *73*, 4531–4545.

Ozturk, M., Ozsoylemez, O.D., a Dagistanli, F.K. (2019). The Detection Techniques for Autophagy-Associated Cell Death-Related Genes and Proteins: Gene Expression Assay and Immunohistochemistry. *Methods Mol. Biol.* *1854*, 119–130.

*Perry, S.W., Norman, J.P., Barbieri, J., Brown, E.B., a Gelbard, H.A. (2011). Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *Biotechniques* *50*, 98–115.

Phinney, D.G., Di Giuseppe, M., Njah, J., Sala, E., Shiva, S., St Croix, C.M., Stolz, D.B., Watkins, S.C., Di, Y.P., Leikauf, G.D., et al. (2015). Mesenchymal stem cells use extracellular vesicles to outsource mitophagy and shuttle microRNAs. *Nat. Commun.* *6*, 8472.

Piekarska, K., Urban-Wójciuk, Z., Kurkowiak, M., Pelikant-Małecka, I., Schumacher, A., Sakowska, J., Spodnik, J.H., Arcimowicz, Ł., Zielińska, H., Tymoniuk, B., et al. (2022). Mesenchymal stem cells transfer mitochondria to allogeneic Tregs in an HLA-dependent manner improving their immunosuppressive activity. *Nat. Commun.* 2022 131 13, 1–20.

Porubska, B., Vasek, D., Somova, V., Hajkova, M., Hlaviznova, M., Tlapakova, T., Holan, V., and Krulova, M. (2021). Sertoli Cells Possess Immunomodulatory Properties and the Ability of Mitochondrial Transfer Similar to Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cell Rev. Reports* 17, 1905–1916.

Preda, M.B., Neculachi, C.A., Fenyo, I.M., Vacaru, A.M., Publik, M.A., Simionescu, M., and Burlacu, A. (2021). Short lifespan of syngeneic transplanted MSC is a consequence of in vivo apoptosis and immune cell recruitment in mice. *Cell Death Dis.* 2021 126 12, 1–12.

Rainy, N., Chetrit, D., Rouger, V., Vernitsky, H., Rechavi, O., Marguet, D., Goldstein, I., Ehrlich, M., and Kloog, Y. (2013). H-Ras transfers from B to T cells via tunneling nanotubes. *Cell Death Dis.* 4, e726.

Sadeghian-Nodoushan, F., Aflatoonian, R., Borzouie, Z., Akyash, F., Fesahat, F., Soleimani, M., Aghajanpour, S., Moore, H.D., and Aflatoonian, B. (2016). Pluripotency and differentiation of cells from human testicular sperm extraction: An investigation of cell stemness. *Mol. Reprod. Dev.* 83, 312–323.

Saha, T., Dash, C., Jayabalan, R., Khiste, S., Kulkarni, A., Kurmi, K., Mondal, J., Majumder, P.K., Bardia, A., Jang, H.L., et al. (2022). Intercellular nanotubes mediate mitochondrial trafficking between cancer and immune cells. *Nat. Nanotechnol.* 17, 98–106.

Schrade, A., Kyrölahti, A., Akinrinade, O., Pihlajoki, M., Fischer, S., Rodriguez, V.M., Otte, K., Velagapudi, V., Toppari, J., Wilson, D.B., et al. (2016). GATA4 Regulates Blood-Testis Barrier Function and Lactate Metabolism in Mouse Sertoli Cells. *Endocrinology* 157, 2416–2431.

Sengupta, V., Sengupta, S., Lazo, A., Woods, P., Nolan, A., and Bremer, N. (2020). Exosomes Derived from Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells as Treatment for Severe COVID-19. *Stem Cells Dev.* 29, 747.

Sharma, M., and Braun, R.E. (2018). Cyclical expression of GDNF is required for spermatogonial stem cell homeostasis. *Development* 145, dev151555.

Shigemoto-Kuroda, T., Oh, J.Y., Kim, D. ki, Jeong, H.J., Park, S.Y., Lee, H.J., Park, J.W., Kim, T.W., An, S.Y., Prockop, D.J., et al. (2017). MSC-derived Extracellular

Vesicles Attenuate Immune Responses in Two Autoimmune Murine Models: Type 1 Diabetes and Uveoretinitis. *Stem Cell Reports* 8, 1214.

Song, N., Scholtemeijer, M., and Shah, K. (2020). Mesenchymal Stem Cell Immunomodulation: Mechanisms and Therapeutic Potential. *Trends Pharmacol. Sci.* 41, 653–664.

Sun, Z., Nie, Q., Zhang, L., Niu, R., Wang, J., and Wang, S. (2017). Fluoride reduced the immune privileged function of mouse Sertoli cells via the regulation of Fas/FasL system. *Chemosphere* 168, 318–325.

Sylvester, S.R., and Griswold, M.D. (1994). The Testicular Iron Shuttle: A “Nurse” Function of the Sertoli Cells. *J. Androl.* 15, 381–385.

Tannahill, G.M., Curtis, A.M., Adamik, J., Palsson-Mcdermott, E.M., McGettrick, A.F., Goel, G., Frezza, C., Bernard, N.J., Kelly, B., Foley, N.H., et al. (2013). Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α . *Nature* 496, 238–242.

Tarulli, G.A., Stanton, P.G., Lerchl, A., and Meachem, S.J. (2006). Adult sertoli cells are not terminally differentiated in the Djungarian hamster: Effect of FSH on proliferation and junction protein organization. *Biol. Reprod.* 74, 798–806.

*Tarulli, G.A., Stanton, P.G., and Meachem, S.J. (2012). Is the adult Sertoli cell terminally differentiated? *Biol. Reprod.* 87, 13.

Thomi, G., Surbek, D., Haesler, V., Joerger-Messerli, M., and Schoeberlein, A. (2019). Exosomes derived from umbilical cord mesenchymal stem cells reduce microglia-mediated neuroinflammation in perinatal brain injury. *Stem Cell Res. Ther.* 10, 105.

Tóth, E.A., Oszvald, Á., Péter, M., Balogh, G., Osteikoetxea-Molnár, A., Bozó, T., Szabó-Meleg, E., Nyitrai, M., Derényi, I., Kellermayer, M., et al. (2017). Nanotubes connecting B lymphocytes: High impact of differentiation-dependent lipid composition on their growth and mechanics. *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell Biol. Lipids* 1862, 991–1000.

Tseng, N., Lambie, S.C., Huynh, C.Q., Sanford, B., Patel, M., Herson, P.S., and Ormond, D.R. (2021). Mitochondrial transfer from mesenchymal stem cells improves neuronal metabolism after oxidant injury in vitro: The role of Miro1. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 41, 761–770.

Vallabhaneni, K.C., Haller, H., and Dumler, I. (2012). Vascular Smooth Muscle Cells Initiate Proliferation of Mesenchymal Stem Cells by Mitochondrial Transfer via Tunneling Nanotubes. *Stem Cells Dev.* 21, 3104.

Wang, X., and Gerdes, H.H. (2015). Transfer of mitochondria via tunneling nanotubes rescues apoptotic PC12 cells. *Cell Death Differ.* 2015 227 22, 1181–1191.

Wang, J., Liu, X., Qiu, Y., Shi, Y., Cai, J., Wang, B., Wei, X., Ke, Q., Sui, X., Wang, Y., et al. (2018). Cell adhesion-mediated mitochondria transfer contributes to mesenchymal stem cell-induced chemoresistance on T cell acute lymphoblastic leukemia cells. *J. Hematol. Oncol.* 11, 11.

Wang, L.L., Li, Z.H., Duan, Y.G., Yuan, S.Q., Mor, G., and Liao, A.H. (2019). Identification of programmed cell death 1 and its ligand in the testicular tissue of mice. *Am. J. Reprod. Immunol.* 81, e13079.

Wang, M., Fijak, M., Hossain, H., Markmann, M., Nüsing, R.M., Lochnit, G., Hartmann, M.F., Wudy, S.A., Zhang, L., Gu, H., et al. (2017). Characterization of the Micro-Environment of the Testis that Shapes the Phenotype and Function of Testicular Macrophages. *J. Immunol.* 198, 4327–4340.

Weiss, A.R.R., Lee, O., Eggenhofer, E., Geissler, E., Korevaar, S.S., Soeder, Y., Schlitt, H.J., Geissler, E.K., Hoogduijn, M.J., and Dahlke, M.H. (2020). Differential effects of heat-inactivated, secretome-deficient MSC and metabolically active MSC in sepsis and allogenic heart transplantation. *Stem Cells* 38, 797–807.

de Witte, S.F.H., Luk, F., Sierra Parraga, J.M., Gargesha, M., Merino, A., Korevaar, S.S., Shankar, A.S., O'Flynn, L., Elliman, S.J., Roy, D., et al. (2018). Immunomodulation By Therapeutic Mesenchymal Stromal Cells (MSC) Is Triggered Through Phagocytosis of MSC By Monocytic Cells. *Stem Cells* 36, 602–615.

Xiao, B., Deng, X., Zhou, W., and Tan, E.K. (2016). Flow Cytometry-Based Assessment of Mitophagy Using MitoTracker. *Front. Cell. Neurosci.* 10, 76.

Xiao, X., Yan Cheng, C., and Mruk, D.D. (2012). Intercellular adhesion molecule-1 is a regulator of blood-testis barrier function. *J. Cell Sci.* 125, 5677–5689.

Xu, W., Santini, P.A., Sullivan, J.S., He, B., Shan, M., Ball, S.C., Dyer, W.B., Ketas, T.J., Chadburn, A., Cohen-Gould, L., et al. (2009). HIV-1 evades virus-specific IgG2 and IgA responses by targeting systemic and intestinal B cells via long-range intercellular conduits. *Nat. Immunol.* 10, 1008–1017.

Yamauchi, S., Yamamoto, K., and Ogawa, K. (2022). Testicular Macrophages Produce Progesterone De Novo Promoted by cAMP and Inhibited by M1 Polarization Inducers. *Biomed.* 2022, Vol. 10, Page 487 10, 487.

Yan, W. (2015). Gene knockouts that affect Sertoli cell function. *Sertoli Cell Biol.* 437–469.

Yao, Y., Fan, X.L., Jiang, D., Zhang, Y., Li, X., Xu, Z. Bin, Fang, S. Bin, Chiu, S., Tse, H.F., Lian, Q., et al. (2018). Connexin 43-Mediated Mitochondrial Transfer of iPSC-MSCs Alleviates Asthma Inflammation. *Stem Cell Reports* *11*, 1120–1135.

Ye, G., Wang, P., Xie, Z., Cao, Q., Li, J., Zheng, G., Wang, S., Li, M., Liu, W., Cen, S., et al. (2021). Autophagy-Mediated Activation of Mucosal-Associated Invariant T Cells Driven by Mesenchymal Stem Cell-Derived IL-15. *Stem Cell Reports* *16*, 926.

Yuan, Y., Yuan, L., Li, L., Liu, F., Liu, J., Chen, Y., Cheng, J., and Lu, Y. (2021). Mitochondrial transfer from mesenchymal stem cells to macrophages restricts inflammation and alleviates kidney injury in diabetic nephropathy mice via PGC-1 α activation. *Stem Cells* *39*, 913–928.

Zaker, H., Razi, M., Mahmoudian, A., and Soltanalinejad, F. (2022). Boosting effect of testosterone on GDNF expression in Sertoli cell line (TM4); comparison between TM3 cells-produced and exogenous testosterone. *Gene* *812*, 146112.

Zhang, Y., Yao, Y., Qiu, X., Wang, G., Hu, Z., Chen, S., Wu, Z., Yuan, N., Gao, H., Wang, J., et al. (2019). *Listeria* hijacks host mitophagy through a novel mitophagy receptor to evade killing. *Nat. Immunol.* *20*, 433–446.

Zhang, J., Guan, J., Niu, X., Hu, G., Guo, S., Li, Q., Xie, Z., Zhang, C., and Wang, Y. (2015). Exosomes released from human induced pluripotent stem cells-derived MSCs facilitate cutaneous wound healing by promoting collagen synthesis and angiogenesis. *J. Transl. Med.* *13*, 49.

Zhang, J., Whitehead, J., Liu, Y., Yang, Q., Leach, J.K., and Liu, G.Y. (2018). Direct Observation of Tunneling Nanotubes within Human Mesenchymal Stem Cell Spheroids. *J. Phys. Chem. B* *122*, 9920–9926.

Zhao, J., Li, X., Hu, J., Chen, F., Qiao, S., Sun, X., Gao, L., Xie, J., and Xu, B. (2019). Mesenchymal stromal cell-derived exosomes attenuate myocardial ischaemia-reperfusion injury through miR-182-regulated macrophage polarization. *Cardiovasc. Res.* *115*, 1205–1216.

Zhao, J., Qu, D., Xi, Z., Huan, Y., Zhang, K., Yu, C., Yang, D., Kang, J., Lin, W., Wu, S., et al. (2021). Mitochondria transplantation protects traumatic brain injury via promoting neuronal survival and astrocytic BDNF. *Transl. Res.* *235*, 102–114.

* Review jsou označeny hvězdičkou