

Rola metaloproteinaz macierzowych w różnicowaniu mezenchymalnych komórek macierzystych*

Jolanta Opiela, Żaneta Bartel

*Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy,
Dział Biotechnologii Rozrodu Zwierząt, 32-083 Balice k. Krakowa*

Mezenchymalne komórki macierzyste (MSCs, ang. *mesenchymal stem cells*), izolowane z tkanek dorosłych osobników i hodowane w odpowiednich warunkach ze specyficznymi hormonami i czynnikami wzrostu, mają zdolność do różnicowania się w kierunku kości, chrząstki, tkanki tłuszczowej, mięśni szkieletowych, tkanki łącznej i mięśnia sercowego. Komórki MSC są obecne u dorosłego człowieka w zrębie szpiku kostnego jako frakcja komórek niehematopoetycznych. Występują także w okostnej, tkance tłuszczowej, wątrobie, a także w krwi pępowinowej, krwi płodowej, płynie owodniowym i łożysku (Olkowska-Truchanowicz, 2008). Zdolność komórek macierzystych do różnicowania się spowodowała, że zaczęto zastanawiać się nad ich plastycznością, czyli zdolnością do przekroczenia bariery pochodzenia z określonego listka zarodkowego i przyjęcia fenotypu komórki innej tkanki lub innego listka zarodkowego. Dotychczas nie określono jednak podstaw molekularnych tego zjawiska, głównie z powodu braku ściśle zdefiniowanych markerów swoistych dla danego typu komórki macierzystej czy stopnia jej zróżnicowania (Bajek i in., 2011). Z mezenchymalnymi komórkami macierzystymi duże nadzieje wiąże medycyna regeneracyjna z uwagi na ich właściwości immunosupresyjne i zdolność

do stymulacji endogennych mechanizmów naprawy, a także wydzielania cytokin, czynników wzrostu i czynników troficznych (Urbaniak-Kujda i in., 2005; Bajek i in., 2011; Opiela, 2012).

Po raz pierwszy MSCs zostały wyizolowane przez grupę Caplana z hodowanej *in vitro* frakcji szpiku kostnego (Caplan, 1991). Wtedy też po raz pierwszy zidentyfikowano antygeny specyficzne dla MSC, takie jak markery CD105 i CD73 (Haynesworth i in., 1992).

Za jeden z podstawowych dowodów na obecność komórek macierzystych w tkankach i narządach u dorosłego człowieka uważa się obecność w tych komórkach białek markerowych, typowych dla komórek węzła zarodkowego. Z tego powodu uważa się, że u dorosłego osobnika mogą być pozostałościami komórek zarodkowych, które ulegają podziałom.

W celu fenotypowego zdefiniowania mezenchymalnych komórek macierzystych, International Society for Cellular Therapy (ISCT) ustalił, że „jako MSC można określać komórki wykazujące pozytywną ekspresję dla antygenów: CD44, CD73, CD90 i CD105 oraz brak ekspresji dla następujących cząsteczek powierzchniowych: CD11b, CD14, CD34, CD45 lub CD79a, albo CD19 i HLA-DR” (Dominici i in., 2006).

W ciągu ostatnich kilku lat znaczący postęp osiągnięto w ujednoczeniu identyfikacji i hodowli ludzkich MSC. Należy jednak mieć na uwadze, że obecne kryteria, służące ich scharakteryzowaniu, nie są ostateczne. Jest prawdopodobne, że definicja ta będzie ewoluować z cza-

* Praca finansowana ze środków statutowych IZ PIB, temat 02-4.03.1; przez NCBiR ze środków na naukę w latach 2009–2012 jako projekt rozwojowy oraz ze środków Narodowego Centrum Nauki, przyznanych na podstawie decyzji nr DEC-2011/03/D/NZ9/05537.

sem. Należy również zauważyć, że zaobserwowano różnice między MSC myszy i człowieka. Mysie MSC nie zostały jeszcze scharakteryzowane w odniesieniu do antygenów powierzchniowych, ale generalnie uważa się za zasadne przyjęcie kryteriów obowiązujących dla ludzkich komórek. Jeszcze mniej zaawansowane są prace, mające na celu charakterystykę świńskich komórek mezenchymalnych.

Populacja komórek mezenchymalnych oglądana w odwróconym mikroskopie jest podobna do fibroblastów. Komórki MSC wydzielają niehematopoetyczne i hematopoetyczne czynniki wzrostu, chemokiny i interleukiny. Dzięki produkcji cytokin stymulują hematopoezę (Urbaniak-Kujda i in., 2005; Bajek i in., 2011).

Jak wcześniej wspomniano, MSC są zdolne do różnicowania się, między innymi w kierunku komórek tkanki chrzęstnej (chondrocytów), czy kostnej (osteoblastów). Z uwagi na niepełną efektywność różnicowania MSC w żądany typ komórek (np. osteocyty, adipocyty, mioblasty lub komórki śródbłonna) celowe jest poszukiwanie genów odpowiedzialnych za kontrolowanie ww. procesu. Istnieją dowody wskazujące na bezpośrednią funkcję metaloproteinaz macierzowych w tym procesie (Son i in., 2006).

Metaloproteinazy macierzowe (MMPs, ang. *matrix metalloproteinases*) wchodzi w skład licznej rodziny wielodomenowych cynkowych endopeptydaz. Są to ważne enzymy proteolityczne, trawiące komponenty macierzy pozakomórkowej, jak i liczne cząsteczki na powierzchni komórek. Główną rolą MMPs jest degradowanie białek macierzy pozakomórkowej: kolagenu, laminy, proteoglikanów i fibronektyny, co ułatwia migrację komórek. Uczestniczą i kontrolują angiogenezę, embriogenezę, przebudowę tkanek, apoptozę, a także uczestniczą w patogenezie wielu chorób, np. nowotworowych, sercowo-naczyniowych, czy w chorobie Alzheimera (Łukaszewicz i in., 2008). Ze względu na budowę oraz swoistość MMPs, dzielimy je na podgrupy: matrylizyny, kolagenazy, stromelizyny, gelatynazy, błonowe MMPs oraz pozostałe, które nie zostały przypisane do wymienionych grup (Lipka i Boratyński, 2008).

Jedna z metaloproteinaz – żelatynaza-A u myszy uczestniczy w procesie osteogenezy, jak również jest odpowiedzialna za degradację kolagenu typu IV, który jest głównym składni-

kiem naczyniowej błony podstawnej, przez co umożliwia migrację leukocytów (Lipka i Boratyński, 2008). Degradacja błony podstawnej jest bezpośrednio związana z miejscowym wzrostem nowotworów i powstawaniem przerzutów, dlatego dogłębne poznanie mechanizmów molekularnych, warunkujących ten proces, może zaowocować wykryciem terapii przeciwnowotworowej.

Funkcja macierzowych metaloproteinaz regulowana jest białkami, które mają właściwości ograniczające lub blokujące aktywność MMPs. Inhibitory metaloproteinaz, tzw. TIMPs (ang. *tissue inhibitor of metalloproteinases*), występują pod czterema postaciami: TIMP1, TIMP2, TIMP3 i TIMP4. Ich ekspresja jest kontrolowana podczas rozwoju i różnicowania tkanek (Kowalski i in., 2008). Ekscytujące raporty o wysokiej ekspresji genów kilku metaloproteinaz macierzy i ich inhibitorów – TIMPs w MSCs (tj. MMP-1, -2, -19 i TIMP-1, -2, -3) (Silva i in., 2003; Panepucci i in. 2004; Cronwright i in., 2005) stały się podstawą do wysunięcia hipotezy na temat ich kluczowej funkcji w różnicowaniu MSCs (Mannello i in., 2006; Manello, 2006). Sposób ich działania nie jest poznany, najprawdopodobniej MSCs decydują o swoim losie, przekształcając się w dojrzałe, zróżnicowane komórki nie drogą długich kaskad aktywacji i inhibicji określonych białek, ale raczej przez przesunięcie kierunku różnicowania w wyniku parakrynych i/lub autokrynych mechanizmów. Przypuszcza się, że w macierzy pozakomórkowej wydzielane są biocząsteczki, które mogą regulować różnicowanie komórek przez wewnątrz- i zewnątrzkomórkowe ścieżki sygnału (Philp i in., 2005; Stojkovic i in., 2005). Kilka składników macierzy pozakomórkowej może wspólnie aktywować lub hamować ekspresję (na poziomie RNA i białek) różnych MMPs, zdolnych do przebudowy macierzy (sprzyjając migracji komórek do określonej tkanki lub modulując zasiedlanie specyficznych komórek) (Lisignoli i in., 2006). Białka strukturalne macierzy pozakomórkowej, cytokiny i czynniki wzrostu mają potencjał do interakcji z MMPs i w ten sposób mogą indukować różnicowanie MSCs pod wpływem mikrośrodowiska. Z drugiej strony, nieaktywne czynniki wzrostu i chemokiny mogą być aktywowane przez proteolityczne działanie MMPs, sprzyjając różnicowaniu i zasiedlaniu określonego rejonu (Lisignoli i in.,

2006). Son i in. (2006) zidentyfikowali obecność transkryptów oraz białek MMP-2 i (MT1)-MMP w niezróżnicowanych MSC szpiku kostnego i krwi pępowinowej, co sugeruje ich rolę w ułatwianiu migracji MSC poprzez degradację błony podstawnej w obecności swoistych czynników wzrostu i podścieliska. Son i in. (2006) wykazali ponadto obecność w MSCs CXCR4 i protoonkogeny c-met (unikalne receptory dla SDF-1 (*stromal derived factor*) i HGF (*hepatocyte growth factor*)). Ich wyniki dowodzą, że obie ścieżki SDF-1/CXCR4 i HGF/c-met mogą regulować, poprzez aktywację MMPs, proliferację i ukierunkowane zasiedlanie przez komórki macierzyste uszkodzonych tkanek *in vivo*.

Obserwacje te potwierdzają hipotezę, że MMP mogą odgrywać kluczową rolę w proliferacji i migracji MSCs (Son i in., 2006; Mannello, 2006; Kasper i in., 2007). Podczas uszkodzenia tkanek kilka składników macierzy pozakomórkowej (ECM, ang. *extracellular matrix*) jest aktywowanych i przyłączonych do MSCs i w ten sposób są „przechowywane” w niszy – komórek macierzystych. Czynniki wzrostu podścieliska aktywują MT1-MMP, który może degradować białka ECM lub specyficznie aktywować MMP-2, kluczową metaloproteinazę w procesach rozwojowych (np. różnicowania w kierunku adipocytów, chondrocytów i neurocytów) (Frölichsthal-Schoeller i in., 1999; Bourlier i in., 2005; Mannello i in., 2006).

W oparciu o dotychczasowe badania można wysnuć hipotezę, że na powierzchni MSC jest struktura, która przez utworzenie kompleksu MT1-MMP/TIMP-2/proMMP-2 może aktywować lub hamować MMP-2, kluczowy enzym proteolityczny kolagenu, regulujący interakcje komórka-komórka i komórka-macierz (Mannello i in., 2006).

Transbłonowa kolagenaza MT1-MMP nie tylko uczestniczy w okołokomórkowej proteolizie zewnątrzkomórkowej macierzy, ale również wpływa na mikrośrodowisko komórki, oddziałując na szlaki sygnalizacji komórkowej (Itoh i Seiki, 2006). MT1-MMP może być intrygującym modulatorem funkcji komórki poprzez tworzenie kompleksu homo-oligomeru, który

reguluje aktywację MMP-2. Spośród tworzących taki kompleks dwóch cząsteczek MT1-MMP jedna działa jako receptor, a druga jako aktywator MMP. Aktywna MT1-MMP, zakotwiczona w błonie wiąże TIMP-2, hamując jego aktywność. Proenzym MMP-2 wiąże się z TIMP-2. Z kolei, drugi aktywny MT1-MMP, bez przyłączonego białka TIMP-2, może przyłączyć proMMP-2.

Wynikiem powstania klastru MT1-MMP/TIMP-2/proMMP-2/MT1-MMP może być:

a) uwolnienie aktywnego MT1-MMP, który może degradować takie substraty, jak np. kilka rodzajów kolagenu, białko CD44, wybrane integryny i lamininy oraz generować sygnały, które promują migrację i proliferację komórek;

b) hamowanie / inaktywacja MT1-MMP przez TIMP-2;

c) uwolnienie aktywnej formy MMP-2; Aktywne MMP-2 dysocjuje od zakotwiczonego w błonie kompleksu i po całkowitej aktywacji może albo związać się z TIMP-2 (hamowanie funkcji MMP-2), albo swobodnie degradować różne substraty, takie jak białka ECM (np. pro-czynnik martwicy nowotworu, elastynę i interleukinę-1 β), proformy MMP (np. proMMP-9 i proMMP-13) oraz białka macierzy jądrowej (np. polimerazę poli-ADP-rybozy i laminy) (cyt. za Mannello i in., 2006);

d) uwalnianie wolnych cząsteczek TIMP, które bezpośrednio mogą wpływać na różnicowanie komórek, proliferację i procesy apoptotyczne (Visse i Nagase, 2003; Mannello i Gazzanelli, 2001).

Obecnie możemy stwierdzić, że zarówno macierz pozakomórkowa, jak i mikrośrodowisko otaczające MSCs są nie tylko rusztowaniem, ale pełnią również biologiczne funkcje, ujawnione przez proteolizę (Mannello i in., 2006). Stąd wniosek, że aktywacja lub hamowanie MMPs podczas różnicowania MSCs (Mannello i in., 2006; Frölichsthal-Schoeller i in., 1999; Bourlier i in., 2005) może odzwierciedlać balans pomiędzy MMPs a TIMPs w migracji, plastyczności, samoodnowie i pluripotencji MSCs.

Literatura

- Bajek A., Olkowska J., Drewa T. (2011). Mesenchymal stem cells as a therapeutic tool in tissue and organ regeneration. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 65: 124–132.
- Bourlier V., Zakaroff-Girard A., Barros S. de, Pizacalla C., Saint Front V.D. de, Lafontan M., Bouloumié A., Galitzky J. (2005). Protease inhibitor treatments reveal specific involvement of matrix metalloproteinase-9 in human adipocyte differentiation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 312: 1272–1279.
- Caplan A.I. (1991). Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.*, 9: 641–650.
- Cronwright G., Blanc K. le, Götherström C., Darcy P., Ehnman M., Brodin B. (2005). Cancer/testis antigen expression in human mesenchymal stem cells: Down-regulation of SSX impairs cell migration and matrix metalloproteinase 2 expression. *Cancer Res.*, 65: 2207–2215.
- Dominici M., Blanc K. le, Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D., Horwitz E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8: 315–317.
- Frölichsthal-Schoeller P., Vescovi A.L., Krekoski C.A., Murphy G., Edwards D.R., Forsyth P. (1999). Expression and modulation of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitors of metalloproteinases in human embryonic CNS stem cells. *Neuroreport*, 10: 345–351.
- Haynesworth S.E., Baber M.A., Caplan A.I. (1992). Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone*, 13: 69–80.
- Itoh Y., Seiki M. (2006). MT1-MMP: A potent modifier of pericellular microenvironment. *J. Cell Physiol.*, 206: 1–8.
- Kasper G., Glaeser J.D., Geissler S., Ode A., Tuischer J., Matziolis G., Perka C., Duda G.N. (2007). Matrix metalloprotease activity is an essential link between mechanical stimulus and mesenchymal stem cell behavior. *Stem Cells*, 25: 1985–1994.
- Kowalski M., Walczak A., Majsterek I. (2008). Matrix metalloproteinases (MMPs): Modern molecular markers of open-angle glaucoma diagnosis and therapy. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 62: 582–592.
- Lipka D., Boratyński J. (2008). Metalloproteinases. Structure and function. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 62: 328–336.
- Lisignoli G., Cristino S., Piacentini A., Cavallo C., Caplan A.I., Facchini A. (2006). Hyaluronan-based polymer scaffold modulates the expression of inflammatory and degradative factors in mesenchymal stem cells: Involvement of CD44 and CD54. *J. Cell Physiol.*, 207: 364–373.
- Łukaszewicz M., Mroczko B., Szmitkowski M. (2008). The role of metalloproteinases and their inhibitors in pancreatic cancer. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 62: 141–147.
- Mannello F. (2006). Multipotent mesenchymal stromal cell recruitment, migration, and differentiation: what have matrix metalloproteinases got to do with it? *Stem Cells*, 24: 1904–1907.
- Mannello F., Gazzanelli G. (2001). Tissue inhibitors of metalloproteinases and programmed cell death: conundrums, controversies and potential implications. *Apoptosis*, 6: 479–482.
- Mannello F., Tonti G.A., Papa S. (2006). Role and function of matrix metalloproteinases in the differentiation and biological characterization of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 24: 475–481.
- Olkowska-Truchanowicz J. (2008). Izolacja i charakterystyka komórek progenitorowanych tkanki tłuszczowej. *Post. Biol. Kom.*, 4: 517–526.
- Opiela J. (2012). Mezenchymalne komórki macierzyste w transplantologii. *Wiad. Zoot.*, 50, 3: 37–44.
- Panepucci R.A., Siufi J.L., Silva W.A. Jr., Proto-Siqueira R., Neder L., Orellana M., Rocha V., Covas D.T., Zago M.A. (2004). Comparison of gene expression of umbilical cord vein and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 22: 1263–1278.
- Philp D., Chen S.S., Fitzgerald W., Orenstein J., Margolis L., Kleinman H.K. (2005). Complex extracellular matrices promote tissue-specific stem cell differentiation. *Stem Cells*, 23: 288–296.
- Silva W.A. Jr., Covas D.T., Panepucci R.A., Proto-Siqueira R., Siufi J.L., Zanette D.L., Santos A.R., Zago M.A. (2003). The profile of gene expression of human marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 21: 661–669.

Son B.R., Marquez-Curtis L.A., Kucia M., Wysoczynski M., Turner A.R., Ratajczak J., Ratajczak M.Z., Janowska-Wieczorek A. (2006). Migration of bone marrow and cord blood mesenchymal stem cells *in vitro* is regulated by stromal-derived factor-1-CXCR4 and hepatocyte growth factor-c-met axes and involves matrix metalloproteinases. *Stem Cells*, 24: 1254–1264.

Stojkovic P., Lako M., Przyborski S., Stewart R., Armstrong L., Evans J., Zhang X., Stojkovic M. (2005). Human-serum matrix supports undifferen-

tiated growth of human embryonic stem cell. *Stem Cells*, 23: 895–902.

Urbaniak-Kujda D., Wołowiec D., Tomaszewska-Toporska B., Kapelko-Słowik K., Kuliczkowski K. (2005). Mezenchymalne komórki macierzyste: ich biologia i perspektywy zastosowań klinicznych. *Acta Haematol. Pol.*, 2: 161–166.

Visse R., Nagase H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ. Res.*, 92: 827–839.

THE POSSIBLE FUNCTION OF MATRIX METALLOPROTEINASES (MMPs) IN MSCs DIFFERENTIATION TOWARDS THE REQUIRED TYPE OF CELLS

Summary

Today we can say, that both the extracellular matrix and the MSCs surrounding microenvironment do not act only as the scaffold, but also perform biological functions revealed by proteolysis. Therefore the activation or inhibition of MMPs during differentiation of MSCs may reflect the balance between MMPs and TIMPs in migration, plasticity and pluripotency of MSCs. The article describes the possible function of MMPs and their inhibitors TIMPs in MSCs differentiation towards the required type of cells. The possible molecular mechanism is presented.



Fot.: E. Atkinson