

PD 160 din 25/08/2020

(PN-III-P1-1.1-PD-2019-1234 (acronim **FIBROSTEM**))

„ROLUL INTERACȚIUNII DINTRE CELULELE STROMALE MEZENCHIMALE
ȘI FIBROBLAȘTI ÎN MODULAREA FIBROZEI CARDIACE PRIN
INTERMEDIUL METALOPROTEINAZEI MATRICEALE CD147”

RAPORT ȘTIINȚIFIC FINAL

privind implementarea proiectului în perioada 01/09/2020 - 31/08/2022

În cadrul proiectului de cercetare PD 160 din 25/08/2020 (acronim FIBROSTEM)) cu titlul: „Rolul interacțiunii dintre celulele stromale mezenchimale și fibroblaști în modularea fibrozei cardiace prin intermediul metaloproteinazei matriceale CD147” au fost realizate următoarele activități planificate în cadrul Etapei cu numărul 2:

Scopul acestui proiect este de a reduce fibroza cardiacă printr-un mecanism celular dependent de calea de semnalizare FGFR2-CD147; datele obținute ar ajuta la o mai bună înțelegere a proceselor fiziologice ale fibrozei cardiace în care fibroblastul joacă un rol major. **Ipoteza** de la care s-a pornit este aceea că prin utilizarea celulelor stromale mezenchimale (MSC) ca vectori ai procesului de reducere a fibrozei, capacitatea fibroblaștilor activați (miofibroblaști) să fie modulată de prezența MSC prin schimbarea balanței dintre matrix metaloproteinaze (MMP) și inhibitori de MMP din țesut (TIMP). Acest proces, presupunem că, este controlat direct către prezența și concentrația CD147 (CD147 sau Basigin) și receptorul de tip 2 pentru factorul de creștere al fibroblaștilor (FGFR2). Prin explorarea acestei noi căi de semnalizare se pot atenua efectele patologice ale fibrozei cardiace.

Obiectivele proiectului sunt:

1. Evaluarea efectului CD147 asupra activității MSC, miofibroblaștilor și cardiomiocitelor umane prin analiza expresiei genice, proteice și funcționale a acestora în modele experimentale bidimensionale cât și tridimensionale.
2. Investigarea capacității MSC sau ale produșilor paracrini ale acestora de a modula funcțiile și morfologia țesutului cardiac fibrosat pe model murin folosind calea de acțiune FGFR2-CD147.

Pentru întreaga perioadă a acestui proiect (Septembrie 2020 - August 2022), ne-am planificat următoarele activități:

1. Identificarea influenței inhibitorului de FGFR2 asupra activității CD147 în fibroblaștii cardiaci umani într-un sistem 2D și 3D într-un mediu fiziologic sau inflamator prin analiza activității balanței MMP/TIMP;

2. Evaluarea MSC-urilor și efectele factorilor secretați (CD147) asupra funcțiilor cardiace, morfologiei și echilibrului MMP-urilor într-un model in vivo:

Etapă 1- Identificarea influenței inhibitorului de FGFR2 asupra activității rhCD147 în fibroblaștii cardiaci umani într-un sistem 2D și 3D într-un mediu fiziologic sau inflamator prin analiza activității balanței MMP/TIMP

Activitatea 1.1 - Diferențierea și caracterizarea unor cardiomiocite umane derivate din celulele stromale mezenchimale umane, fibroblaști derivați din celulele stromale ombilicale mezenchimale umane și macrofage derivate din monocite umane;

I. Design experimental

Pentru determinarea efectului rhCD147 asupra celulelor stromale mezenchimale am utilizat o linie celulară primară umană caracterizată anterior. Această linie celulară a fost obținută din gelatina Wharton a cordonului ombilical. În toate experimentele s-au utilizat linii celulare ce nu au fost cultivate mai mult de opt pasaje.

La testarea efectului CD147 asupra MSC s-a folosit proteina recombinantă CD147 la concentrații de 1, 5 și 10 $\mu\text{g/mL}$ la timpi diferiți (24, 48 și 72 de ore).

Folosind aparatul xCelligence împreună cu plăcile speciale dedicate ePlate și CIM-Plate am putut determina efectul citotoxic al prezenței rhCD147 asupra MSC în timp real. Totodată am studiat și influența acesteia asupra capacității de migrare a MSC.

II. Rezultate

- *Determinarea ratei proliferării și a citotoxicității MSC stimulate cu rhCD147*

MSC au fost cultivate la densitatea celulară de ~7000 celule/godeu pentru fiecare studiu, fiind analizate în timp real în urma stimulării cu rhCD147; toate experimentele au fost făcute în triplicat. Mediul de cultură utilizat a fost DMEM 1% la care s-a adăugat 10% FBS și 1% antibiotic. După cum arătăm în *Figura 1*, după 70 de ore, rata proliferativă a tuturor celulelor nu este afectată de prezența CD147, cu excepția celor stimulate cu 10 $\mu\text{g/mL}$. Rezultatele acestor experimente au arătat faptul că prezența rhCD147 la o concentrație de 5 $\mu\text{g/mL}$ influențează pozitiv rata de proliferare a MSC și, de asemenea, nu prezintă un efect citotoxic pentru condițiile de cultivare *in vitro* pentru MSC. Controlul este reprezentat de către celulele nestimulate cu rhCD147.

- *Determinarea capacității de migrare a MSC stimulate cu rhCD147*

Analiza răspunsului migrării MSC la stimularea cu rhCD147 s-a efectuat în timp real prin intermediul dispozitivului CIM-Plate (ACEA Bioscience, CA, USA) atașat la dispozitivul de citire a impedanței în timp real (xCelligence) (*figura 6*). Prin adăugarea de CD147 în mediul celulelor s-a demonstrat că celulele au o viteză de migrare mai mare decât cele care nu sunt stimulate cu proteina recombinantă. S-a observat că prin stimularea MSC cu 5 $\mu\text{g/mL}$ rata de migrare a fost mult îmbunătățită pe o perioadă de 96 de ore (*Figura 2*). Controlul a fost reprezentat de către celulele nestimulate.

- *Analiza expresie genice a MSC stimulate cu rhCD147*

Analiza expresiei genice s-a concentrat pe gene de interes se intră în cuantumul balanței tipice dintre MMP-uri și și inhibitorii lor, TIMP. Analiza s-a făcut utilizând metoda qRT-PCR, rezultatele au evidențiat faptul că atât concentrația cât și perioada de stimulare a MSC cu rhCD147 influențează expresia genelor ce mențin echilibrul MMP-urilor în țesuturi (MMP-2, MMP-9, MMP-14, TIMP-1 și TIMP-2) (Figura 3). Se observă faptul că expresia genică a MMP-14, MMP-9 și a TIMP-2 este puternic modificată în MSC stimulate cu rhCD147 într-o manieră dependentă de concentrație și timp.

Etapă 2 - Identificarea influenței inhibitorului de FGFR2 asupra activității rhCD147 în fibroblaștii cardiaci umani într-un sistem 2D și 3D într-un mediu fiziologic sau inflamator prin analiza activității balanței MMP/TIMP

Activitatea 2.1 - Testarea viabilității fibroblaștilor cardiaci în urma stimulării cu TGFβ și a transformării lor în miofibroblaști;

Activitatea 2.2 – Evaluarea expresiei moleculare a MMP și TIMP în miofibroblaști stimulați cu rhCD147 în prezență de inhibitor anti FGFR2.

Activitatea 2.3 – Evaluarea activității proteolitice a MMP 2 și MMP9 și a concentrației MMP14 în mediul de cultură al miofibroblaști stimulați cu rhCD147 în prezență de inhibitor anti FGFR2.

I. Design experimental:



Am folosit fibroblaști cardiaci umani comerciali (CF) care au fost activați timp de 24 de ore cu TGFβ (5nM). Ulterior, miofibroblaști (MyCF) au fost supuși unei stimulări de 1 oră cu inhibitor pentru FGFR2-26nM (LY2874455), urmată de stimulare de încă 24 de ore cu Basigin (1 μM-Rh-CD147). Mediul de cultură și celulele au fost recoltate și au fost supuse activității proteolitice respectiv expresiei genice și proteice

Utilizând tehnici uzuale de analiză de biologie moleculară (PCR în timp real), măsurare a activității proteolitice (zimografie completată și de zimografie inversă) și cuantificare a concentrației proteice (ELISA), am determinat modificarea MMP2, MMP9, MMP14, TIMP-1 și TIMP-2 cu sau fără prezența LY2874455 în mediul de cultură al MyCF.

II. Rezultate

Prin efectuarea activităților de mai sus am obținut următoarele rezultate preliminare:

Rezultatele obținute în urma **Activității 2.1:**

- În urma acestei activități am stabilit faptul că stimularea fibroblaștilor cardiaci umani cu diferite de substanțe de interes pentru viitoarele experimente sunt viabili 72h în urma stimulării cu 26nM LY2874455 și 1 μ M-Rh-CD147

- În urma stimulării cu LY2874455 timp de o oră a CF, detecția receptorului de tip 2 pentru FGF a scăzută cu aproximativ 90%

- Prin stimularea cu 5nM TGF β 1 a CF timp de 24 de ore se observă o creștere a proteinei actină de tip α specifică mușchiului neted (α SMA) cu până la 50 %. Această proteină fiind un marker de caracterizare pentru fibroblaști activați sau miofibroblaști.

Rezultatele obținute în urma **Activității 2.2:**

- În urma stimulării MyCF cu Ly și RhCD147 conform designului mai sus menționat, expresia genică a MMP2, MMP14, TIMP1 și TIMP2 a fost semnificativ modificată. De asemenea, prin prezența inhibitorului de FGFR2 s-a demonstrat și că raportul dintre TIMP și MMP2, MMP9 și MMP14 s-a modificat. Aceasta fiind o dovadă a rolului FGFR2 în modularea expresie genice în cazul MyCF.

Rezultatele obținute în urma **Activității 2.3:**

- Conform designului mai sus menționat, stimularea MyCF cu Ly și Rh-CD147 a modificat și activitatea proteolitică a MMP și TIMP secretate în mediu și concentrația de MMP14 din același mediu condiționat.

Etapa 3. - Evaluarea MSC-urilor și efectele factorilor secretați (CD147) asupra funcțiilor cardiace, morfologiei și echilibrului MMP-urilor într-un model in vivo

Activitatea 3.1 - Cuantificarea nivelului seric al MMP-urilor de șoarece și al anti-MMP-urilor după administrarea de factori secretați de MSCs sau MSC-uri umane la șoareci cu ischemie cardiacă indusă;

Activitatea 3.2 - Măsurarea funcțiilor și structurii cardiace după administrarea MSC-urilor și/sau a factorilor secretați de către MSC la șoarecii imunosupresați cu fibroză cardiacă indusă;

I. Design experimental:



Pentru a studia efectul inhibitorului de FGFR2 în experimente *in vivo* de hipertrofie cardiacă indusă am folosit loturi de șoareci C57Bl6 (masculi) cu vârsta mai mare de 8 săptămâni. Loturile de șoareci au fost împărțite în 4 grupe. Grupurile control au constat în grupuri de șoareci fără vreo intervenție, grupuri injectați cu Acid Pluronic F127 (AP-F127), folosit ca agent de eliberare controlată a medicamentului și un grup de șoareci injectați cu AC-F127 și 2,4 mg/kg corp ANG II. După două

săptămâni de eliberare prelungită a ANG II conform datelor din literatură și a măsurătorilor efectuate pe lotul de tratament se observă o hipertrofie cardiacă. Categoriile experimentale de șoareci folosite în experiment au constat dintr-un grup de șoareci cărora li s-a indus hipertrofia cardiacă și care, ulterior, au fost injectați de două ori intra peritoneal cu 26 ng/kg corp Ly, un grup cu hipertrofie cardiacă cărora li s-a administrat intra venos în două doze mediu condiționat concentrat obținut de la MSC umane și un grup de șoareci cu hipertrofie cardiacă injectați atât cu Ly cât și cu mediu condiționat concentrat MSC simultan.

II. Rezultate

Prin efectuarea activităților de mai sus am obținut următoarele rezultate preliminare:

- Rezultatele obținute în urma **Activității 3.1:**

Analiza cantitativă a nivelului de proteine (MMP2, MMP9, TIMP-1 și TIMP-2) din serul șoarecilor C57blk6 a relevat faptul că prin prezența mediului condiționat de la MSC-uri și a inhibitorului pentru FGFR2 s-a obținut o creștere/scădere a concentrației proteinelor de interes.

- Rezultatele obținute în urma **Activității 3.2:**

- Valorile morfo funcționale ale mușchiului ventricular sunt direct influențate de către prezența mediului condiționat de la MSC prin creșterea capacității fracției de ejeție și scăderea grosimii peretelui ventricular.

IV. Diseminarea rezultatelor: Rezultatele obținute în cadrul proiectului au fost prezentate sub forma a 2 articole publicate în reviste cotate ISI, un articol în curs de publicare, două participări la conferințe internaționale unde am susținut prezentări orale cu rezultatele obținute în cadrul acestui proiect.

Astfel:

- cele două articole:

- ✓ <https://doi.org/10.3390/cells100> - „Proteomic Analysis of Estrogen-Mediated Enhancement of Mesenchymal Stem Cell-Induced Angiogenesis In Vivo”
- ✓ doi:10.1002/2211-5463.13442 - „Fibroblast growth factor receptor-2 modulates the MMP2 and MMP14/TIMP1 ratio in human cardiac myofibroblasts,,

- titlul celor două prezentări orale la conferințe:

- Simpozionul din 4-6 NOVEMBER - THE 42nd ANNIVERSARY SYMPOSIUM OF THE INSTITUTE OF CELLULAR BIOLOGY AND PATHOLOGY “NICOLAE SIMIONESCU” held jointly with THE 38th ANNUAL SCIENTIFIC SESSION OF THE ROMANIAN SOCIETY FOR CELL BIOLOGY. Titlul prezentării a fost: THE ROLE OF FGFR2 SIGNALING IN MODULATING MMP/TIMP BALANCE IN CARDIAC MYOFIBROBLASTS
- The Biochemistry Global Summit, 25th IUBMB Congress, 46th FEBS Congress, 15th PABMB Congress, July 9–14, 2022, Lisbon, Portugal cu titlul: „Fibroblast growth factor

receptor-2 modulates the MMP2 and MMP14/TIMP1 ratio in human cardiac myofibroblasts,,

- **Articol în curs de publicare:**

- Cu titlul: „*Mechanism of dihydrotestosterone stimulated endothelial progenitors cells in heart tissue,,*. Urmând a fi publicat în revista **Cells**

IV. Concluzii:

- Prezența în mediul de cultură al celulelor a rhCD147 la concentrații de 1 și respectiv 5 μg/mL este benefică proliferării celulare și crește capacitatea celulelor de migrare;
- Stimularea MSC cu rhCD147 influențează balanța genelor implicate în migrarea și modelarea matricei extracelulare.
- Datorită acestor răspunsuri celulare, se conturează că prezența CD147 este benefică regenerării tisulare.
- Studiul nostru a arătat că inhibarea farmacologică a FGFR2 acționează ca un modulator important al raportului MMP/TIMP în miofibroblastele cardiace. Aceste rezultate oferă o bază rațională pentru evaluarea ulterioară a eficacității inhibitorilor FGFR2 în tratamentul fibrozei cardiace și, probabil, a altor afecțiuni maligne, în care semnalizarea FGF2/FGFR2 are un rol important.
- Capacitatea mediului condiționat de la MSC este limitată în stabilizarea funcțiilor cardiace datorită prezenței inhibitorului pentru FGFR2 în experimente *in vivo*.

Link accesare proiect:

http://www.icbp.ro/static/en/en-networking_grants-grants-national_grants/fibrostem.html

În concluzie, obiectivele proiectului PN-III-P1-1.1-PD-2019-1234 a fost îndeplinite in totalitate.

31.08.2022

