

## **Abschlussbericht Teilprojekt 11.2.1**

**Projekttitlel:** Mechanismen der Fibroseprogression bei der chronischen Hepatitis C

**Projektleiter:** Prof. Dr. med. A. M. Gressner, PD Dr. R. Weiskirchen  
Universitätsklinikum RWTH Aachen  
Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie  
Pauwelstr. 30  
52074 Aachen

**Telefon:** +49(0) 241-8088 683

**Fax:** +49(0) 241-8082 512

**E-Mail:** gressner@ukaachen.de, rweiskirchen@ukaachen.de

**Berichtszeitraum:** 01.02.2002 – 31.01.2005

## **I) Kurzdarstellung**

### **1. Aufgabenstellung**

- a) Evaluation von Zytokin-Polymorphismen für den klinischen Verlauf fibrosierender Lebererkrankungen
- b) Entwicklung gentherapeutischer Strategien zur Behandlung der Leberfibrose

### **2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde**

Das Projekt wurde in der ersten Förderperiode (02/02-01/05) mit einer halben BATVb-Stelle und Sachmitteln in Höhe von 14.725 € gefördert. Wir konnten aus organisatorischen Gründen die halbe Stelle am 15. September 2002 mit Frau Senait Mengsteab (MTA) besetzen. Diese Mitarbeiterin wurde zunächst in die erforderlichen Techniken (biochemische, immunzytochemische und molekulare Untersuchungen von hepatischen Sternzellen, DNA-Isolation aus EDTA-Vollblut, LightCycler-Technologie) eingearbeitet.

Die im Rahmen von Hep-Net bearbeitete Thematik „Identifikation von prädisponierenden Faktoren der Fibrogenese“ passt in idealer Weise zu dem Forschungsschwerpunkt der Antragsteller. Die Assoziation von Polymorphismen, der Synthese extrazellulärer Matrixkomponenten, die Pathophysiologie entzündlicher Lebererkrankungen werden seit vielen Jahren im Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie erforscht. Daher ergeben sich zahlreiche Synergismen zu anderen Projekten, die dazu beitragen, dass sich das Projekt in dem gesteckten Zeitrahmen befindet. Dieses betrifft sowohl die Etablierung von Analysenverfahren mittels LightCycler-Technologie als auch die Erzeugung von Adenoviren mit antifibrotischem Wirkpotential.

### **3. Planung und Ablauf des Vorhabens**

Frau Mengsteab hat in den Labors der Antragsteller die Etablierung verschiedener Analysetechniken zum Nachweis einzelner polymorpher DNA-Bereiche mittels LightCycler-Technologie verantwortlich übernommen. Es wurde eine Analytik etabliert, die es erlaubt, verschiedene Polymorphismen des TGF- $\beta$ 1 Gens zu analysieren.

In der Anfangsphase stellte die Rekrutierung von geeigneten Patientenmaterialien das Hauptproblem für dieses Projekt dar. Es war uns zunächst aus logistischen und ethischen Gründen nicht möglich, DNA-Proben von Patienten mit Hepatitis B- bzw.

Hepatitis C-Infektion direkt aus dem Hep-Net zu beziehen, da die geplante Sammlung entsprechender Materialien (DNA- bzw. Serum-Bank) bis dahin nicht existierte. Wir haben uns daher entschlossen, diese Materialien in Form von Kooperationen von anderen Stellen einzuwerben. So zum Beispiel erhielten wir eine größere Anzahl von DNA-Proben aus China. Weitere Patientenproben erhielten wir von Herrn PD. Dr. F. Lammert (Innere Medizin III, Universitätsklinikum Aachen) und Herrn PD Dr. C. Hellerbrand (Innere Medizin I, Universität Regensburg). In Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof. Dienes (Institut für Pathologie, Universität Köln) haben wir zudem Arbeitsprotokolle erstellt mit denen wir, für die Typisierung, ausreichende Mengen DNA aus Biopsiematerialien gewinnen können. Damit ist es uns seit kurzem möglich auf ein gut charakterisiertes Patientenkollektiv zurück zugreifen.

Wesentliche Fortschritte wurden auch bei der Entwicklung experimenteller, gentherapeutischer Ansätze zur Behandlung der Leberfibrose erzielt. Dabei haben wir unsere Experimente zunächst so konzipiert, dass wir unsere transgenen Expressionkonstrukte *in vitro* (Transdifferenzierungsmodell kultivierter, hepatischer Sternzellen) und dann *in vivo* (Gallengangligaturmodell der Ratte) einsetzen und das antifibrotische Wirkpotential aufnehmen (s. u.).

#### **4. wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde, insbesondere**

##### **a) Angabe bekannter Konstruktionen, Verfahren und Schutzrechte, die für die Durchführung des Vorhabens benutzt wurden**

Die Darstellung von TGF- $\beta$ 1 Genpolymorphismen wurde früher in unserem und anderen Labors durch ARMS-PCR, SSOP, RFLP-Analyse, 5' Nuklease Assay oder spezieller Fingerprint-Verfahren, durchgeführt. Diese zeitaufwendigen, teuren Analyseverfahren sind nicht geeignet, um Typisierungen an großen Patientenkollektiven durchzuführen. Wir haben daher Methoden generiert, die einen hohen Probendurchsatz erlauben. Diese beruhen auf der sog. LightCycler-Methodik. Die dazu notwendige, kommerziell erhältliche Analysenplattform (LightCycler) wird von der Firma Roche Diagnostik vertrieben. Durch Wahl spezifischer Primer und Hybridisierensonden können auf diesem Instrumentarium spezifische, anwenderorientierte Typisierungstests etabliert werden.

## **b) Angabe der verwendeten Fachliteratur, sowie der benutzten Informations- und Dokumentationsdienste**

Zur Durchführung des Projektes werden die üblichen Informations- und Dokumentationsdienste (z. B. Medline, GenBank etc.) verwendet. Aus diesen Quellen werden Erkenntnisse gewonnen, die insbesondere dazu dienen themenverwandte Literatur aufzuspüren. Diese wiederum wird eingehend studiert und wissenschaftlich ausgewertet und mit den Ergebnissen der hier durchgeführten Diagnostik verglichen.

## **5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen**

Es bestehen intensive Kooperationen mit den Arbeitsgruppen der einzelnen Hep-Net Arbeitsgruppen, die sich mit der Erforschung der molekularen Prozesse und den genetischen (prädisponierenden) Faktoren des Fibrogenesegeschehens der Leber beschäftigen. Ebenso unterhalten die Antragsteller zahlreiche Kooperationen mit nationalen und internationalen Arbeitsgruppen. Insbesondere eine Kooperation mit Herrn PD Dr. C. Hellerbrand (Innere Medizin I, Universität Regensburg) und Frau Prof. C.-F. Gao (Department of Laboratory Medicine, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai, China) haben in der Vergangenheit dazu gedient Patientenproben und –material zu rekrutieren.

## **II) Eingehende Darstellung**

### **1. des erzielten Ergebnisses**

In der ersten Förderperiode wurden zwei verschiedene Schwerpunktthemen experimentell analysiert:

**a)** Analyse von Polymorphismen des transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)-Gen und deren mögliche Assoziation mit der Entwicklung der Leberfibrogenese im Rahmen einer HBV- oder HCV-Infektion. Zur Analytik des TGF- $\beta$ 1 Gens wurden erstmalig Methoden entwickelt, die eine schnelle Bestimmung von Polymorphismen, wie z. B. Arg25Pro, Leu10Pro oder Thr263Ile, in größeren Kollektiven erlauben. Mittels dieser auf LightCycler-Analyse basierenden Verfahrenstechniken wurden die Genotypverteilungen in insgesamt 350 Patienten mit HBV- bzw. HCV-Infektion sowie etwa 240 Kontrollen analysiert. Die Auswertung der gemessenen Genfrequenzen im Codon 25 ergab eine signifikante Korrelation des Pro25-Allels mit dem Schweregrad

des Fibrosegeschehens (METAVIR-Score). Derzeit werden die gefundenen Genfrequenzen im Codon 10 und 263 mit den gemessenen klinisch chemischen Kenngrößen und histologischen Befunden verglichen. Erste statistische Analysen zeigen, dass das Auftreten einzelner Polymorphismen von der ethnischen Gruppe abhängig ist. So tritt in asiatischen Volksgruppen nur Arginin in der Position 25 des TGF- $\beta$ 1 Gens auf. Ebenso konnten wir nachweisen, dass in Menschen kaukasischen Ursprungs die Präsenz eines Prolins an der Position 25 stets die Präsenz eines Prolins an der Position 10 bedingt. Eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse wurde kürzlich zur Publikation eingereicht.

**b) *In vitro*-** (Transdifferenzierung von hepatischen Sternzellen zu Myofibroblasten) und *in vivo*-Modelle (Gallengangligaturmodell in der Ratte) wurden eingesetzt, um antifibrotisch wirksame Strategien zur Behandlung fibrosierender Erkrankungen der Leber zu evaluieren. Es konnte gezeigt werden, dass die klonierten, adenoviralen Expressionskonstrukte eine hohe Transduktionseffizienz in Leberzellen erreichen und eine starke Expression der Transgene erlauben. Durch Expression der Transgene unter Promotoren die eine hohe Selektivität bzw. eine Transdifferenzierungs-abhängige Aktivität besitzen, soll die Expression der Transgene an das Fibrosegeschehen gekoppelt werden. Als Erfolgs versprechend erwies sich die Expression der Thymidinkinase des Herpes Simplex-Virus unter Regulation des TIMP-1 Promoters. Northern- und Westernblot-Analysen zeigten, dass dieses tk-Konstrukt eine starke Expression des Transgens in aktivierten hepatischen Sternzellen erzeugt, die zu einer Suszeptibilität für Ganciclovir führt. Das Enzym katalysiert die Konvertierung (Phosphorylierung) von Ganciclovir und führt in den aktivierten, fibrosierenden Zellen zur Induktion von programmiertem Zelltod (Apoptose). Dieses konnte durch Messung der Caspase-3-Aktivität und der Präsenz von Phosphoserinen auf der Zelloberfläche mittels FITC markierter Annexin-V Färbung nachgewiesen werden.

## **2. des voraussichtlichen Nutzens, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinnes des fortgeschriebenen Verwertungsplans**

Die im Rahmen des hier durchgeführten Projektes erhaltenen Ergebnisse dienen zum einen dem Erkenntnisgewinn in der Grundlagenforschung und zum anderen fließen sie direkt in die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien zur Behandlung

der Leberfibrose ein.

### **3. des während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt**

#### **gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen**

Die Analyse von prädisponierenden Krankheitsfaktoren (z. B. Genpolymorphismen) ist ein wichtiger Zweig der heutigen Medizin. Bei vielen Erkrankungen ist ein direkter Zusammenhang zwischen dem Auftreten und dem Schweregrad des Krankheitsgeschehens nachgewiesen (z. B. Hämochromatose). Die Assoziation zwischen Genpolymorphismen einzelner Zytokingene, insbesondere innerhalb kodierender oder regulierender Kontrolleinheiten, und der Progression einzelner Erkrankungen ist ebenfalls bekannt. Eine mögliche Assoziation einzelner Polymorphismen des TGF- $\beta$ 1 Gens und der Entstehung bzw. Progression von entzündlichen Lebererkrankungen wird jedoch kontrovers diskutiert. Daher ist es weiterhin unabdingbar die Penetranz der einzelnen Genotypen und deren Verbindung zur Entstehung fibrosierender Erkrankungen aufzunehmen.

### **4. des erfolgten oder geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses**

Wir sind bestrebt die Ergebnisse in international renommierten Zeitschriften der Öffentlichkeit zu präsentieren. Wir hoffen, dass die Ergebnisse dazu beitragen werden, das molekulare Verständnis des Fibrogenesegeschehens zu verstehen. Aus der ersten Förderperiode sind folgende Arbeiten hervorgegangen:

#### **Originalarbeiten:**

1. Tag, C. G., Mengsteab, S., Hellerbrand, C., Lammert, F., Gressner, A. M., Weiskirchen, R. (2003): Analysis of the transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) codon 25 gene polymorphism by LightCycler-analysis in patients with hepatitis C infection. *Cytokine* 24, 173-181.
2. Arias, M., Sauer-Lehnen, S., Treptau, J., Janoschek, N., Theuerkauf, I., Buettner, R., Gressner, A. M., Weiskirchen, R. (2003): Expression of a transforming growth factor- $\beta$ 1 antisense mRNA is effective in preventing liver fibrosis in bile-duct ligated rats. *BMC Gastroenterology* 3 (29), 1-12.
3. Janoschek, N., van de Leur, E., Gressner, A. M., Weiskirchen, R. (2004): Induction of cell death in activated hepatic stellate cells by target gene

- expression of the thymidine kinase/Ganciclovir system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 316, 1107-1115.
4. Stoll, C., Mengsteab, S., Stoll, D., Riediger, D., Gressner, A. M., Weiskirchen, R. (2004): Analysis of polymorphic *TGFB1* codons 10, 25, 263 in a German patient group with nonsyndromic cleft lip, alveolus, and palate compared with healthy controls. *BMC Med Genet.*, 5 (15), 1-9.
  5. Weiskirchen, R., Gressner, A. M. (2004): Isolation and culture of hepatic stellate cells. In *Methods in Molecular Medicine: Fibrosis Research, Liver Section*. J. Varga, D. Brenner, and P. Shen (eds). Humana Press, Totowa, NJ, USA (im Druck).
  6. Geier, A., Reugels, M., Weiskirchen, R., Wasmuth, H. E., Dietrich, C. G., Gartung, C., Lorenzen, J., Bosserhoff, A. K., Brüggmann, M., Gressner, A. M., Matern, S., Lammert, F. (2004): Common heterozygous hemochromatosis gene mutations are risk factors for inflammation and fibrosis in chronic hepatitis C. *Liver Int.* 24, 285-294.
  7. Hillebrandt, S., Wasmuth, H. E., Weiskirchen, R., Keppeler, H., Werth, A., Wilkens, G., Geier, A., Hellerbrand, C., Lorenzen, J., Gressner, A. M., Matern, S., Lammert, F. (2004): Complement factor 5 (C5) is a genetic determinant of liver fibrogenesis in mice and humans. *Nature Genet.*, in Revision.
  8. Wang, H., Mengsteab, S., Tag, C. G., Gao, C. F., Hellerbrand, C., Lammert, F., Gressner, A. M., Weiskirchen, R. (2004): Transforming growth factor- $\beta$ 1 gene polymorphisms are associated with progression of liver fibrosis in Caucasians with chronic hepatitis C infection. Eingereicht zur Publikation.
  9. Hillebrandt, S., Weiskirchen, R., Gressner, A. M., Roderfeld, M., Roeb, E., Matern, S., Lammert, F (2004): The multiligand receptor megalin - a novel marker for hepatic stellate cells. Eingereicht zur Publikation.
  10. Roderfeld, M., Weiskirchen, R., Wagner, S., Berres M. L., Henkel, C., Strick, K., Jansen, B., Dahmen, J., Groetzing, J., Gressner, A. M., Matern, S., Roeb, E. (2004): Inhibition of hepatic fibrogenesis by MMP-9 mutants in mice. Eingereicht zur Publikation.
  11. Henkel, C., Roderfeld, M., Weiskirchen, R., Scheibe, B., Matern, S., Roeb, E. (2004): Identification of fibrosis relevant proteins using DIGE (Difference in Gel electrophoresis) in different fibrosis models. Eingereicht zur Publikation.

### **Abstracts:**

1. Weiskirchen, R., Tag, C. G., Mengsteab, S., Hellerbrand, C., Lammert, F., Gressner, A. M. (2003): LightCycler-based analysis of the transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) codon 25 gene polymorphism in German patients with chronic hepatitis C infection. *Clin. Chem. Lab. Med.* 41, A93.
2. Reugels, M., Geier, A., Weiskirchen, R., Wasmuth, H. E., Dietrich, C. G., Siewert, E., Gartung, C., Lorenzen, J., Bosserhoff, A. K., Brüggmann, M., Gressner, A. M., Matern, S., Lammert, F. (2003): Common heterozygous hemochromatosis gene mutations are risk factors for inflammation and fibrosis in chronic hepatitis C. *Clin. Chem. Lab. Med.* 41, A98-A99.
3. Weiskirchen, R., Mengsteab, S., Tag, C. G., Hellerbrand, C., Lammert, F., Gressner, A. M. (2004): LightCycler-analysis of the transforming growth factor- $\beta$ 1 codon 25 gene polymorphism in German patients with chronic hepatitis C infection. *Z. Gastroent.* 42, 53.
4. Wang, H., Weiskirchen, R., Mengsteab, S., Gressner, A. M. (2004): Development and application of new LightCycler protocols for the determination of gene polymorphisms in *TGFB1* codons 10, 25, and 263. *Clin. Chem. Lab. Med.*, im Druck.

### **IV) Kurzfassung des Schlussberichtes**

In der ersten Förderperiode wurden Analysen durchgeführt, die klären sollten, ob einzelne Polymorphismen des transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)-Gen mit der Schwere der Leberfibrogenese nach HBV- oder HCV-Infektion korrelieren. Zur Analytik entsprechender Genabschnitte wurden erstmalig Methoden entwickelt, die eine schnelle Bestimmung von Polymorphismen des TGF- $\beta$ 1 Gens, wie z. B. Arg25Pro, Leu10Pro oder Thr263Ile, in größeren Kollektiven erlauben. Mittels dieser auf LightCycler-Analyse basierenden Verfahrenstechnologie wurden die Genotypverteilungen in insgesamt 350 Patienten mit HBV- bzw. HCV-Infektion sowie in etwa 240 Kontrollen analysiert. Die Auswertung der gemessenen Genfrequenzen im Codon 25 ergab eine signifikante Korrelation des Pro25-Allels mit dem Schweregrad des Fibrosegeschehens (METAVIR-Score). Ebenso konnten starke Schwankungen der Genfrequenzen in unterschiedlichen ethnischen Gruppen

beschrieben werden. Des Weiteren wurden in einem *in vitro*- Kulturmodell (Transdifferenzierung von hepatischen Sternzellen zu Myofibroblasten) sowie in einem *in vivo*-Modell (Gallengangsligaturmodell in der Ratte) neue antifibrotisch wirksame Strategien evaluiert. Diese beruhen auf der Applikation von transkriptionell regulierten adenoviralen Konstrukten, die verschiedene antifibrotisch bzw. apoptotisch wirksame Genkassetten exprimieren.