

Abschlussbericht Teilprojekt 11.2.3

Projekttitlel: Mechanismen der Fibroseprogression bei der chronischen Hepatitis C

Projektleiter: Prof. Dr. med. G. Ramadori
Medizinische Universitätsklinik
Zentrum Innere Medizin
Robert-Koch-Str. 40
37075 Göttingen

Telefon: +49(0) 551-396 301

Fax: +49(0) 551-398 596

E-Mail: gramadori@med.uni-goettingen.de

Berichtszeitraum: 01.02.2002 – 31.01.2005

Ursprüngliche Ziele des Projektes

- a) Identifizierung von Zytokinen die bei der Aktivierung von mesenchymalen Zellen der Leber involviert sind.
- b) Untersuchung der Apoptosesignaltransduktionswege von hepatischen Sternzellen (HSC) und Leber-Myofibroblasten.
- c) Identifizierung von Überlebensfaktoren für hepatische Sternzellen und Leber-Myofibroblasten.

Ergebnisse:

Neben den aktivierten HSC sind in ähnlicher Weise auch aktivierte Leber-Myofibroblasten (MF) aus dem Portalfeld und dem perizentralen Bereich an den Reparaturvorgängen und der bindegewebigen Narbenbildung im Rahmen chronischer Leberschädigungen beteiligt. Da beide Zelltypen morphologisch sehr ähnlich sind und in ähnlicher Weise „HSC- Marker“ wie SMA und Desmin exprimieren, war eine Differenzierung schwierig. Ein wichtiger Unterschied zwischen aktivierten HSC und MF stellt das Kulturverhalten der beiden Zellpopulationen dar. Dies gab Anlass, HSC und MF hinsichtlich Apoptose und Proliferation zu untersuchen. Während sich MF beinahe unbegrenzt subkultivieren lassen, tritt bei aktivierten HSC Spontanapoptose auf, die eine wiederholte Subkultivierung unmöglich macht. Als Hauptmechanismus hierfür fand sich das CD95/ CD95L-System. Während aktivierte HSC sowohl den CD95- Rezeptor als auch den CD95L exprimieren, konnte auf MF lediglich der Rezeptor nachgewiesen werden. Verglichen mit aktivierten HSC findet sich dieser allerdings in höherer Konzentration. Dies ist für die erhöhte Anfälligkeit gegenüber CD95- induzierter Apoptose mitverantwortlich ^{1,2}. Weitere Untersuchungen zeigten, dass HSC zwar DNA synthetisieren, was (im Gegensatz zur bisherigen Lehrmeinung) jedoch nicht zur Proliferation, sondern zur Endoreplikation mit Polyploidie führt ³. Im Gegensatz dazu konnte für MF das komplette Durchlaufen des Zellzyklus mit anschließender Zellteilung gezeigt werden. Die profibrogenen Mediatoren TNF- α und TGF- β üben beide eine antiapoptotische Wirkung auf aktivierte HSC aus. Während TGF- β ebenfalls antiapoptotisch auf MF wirkt, lässt sich für TNF- α jedoch ein proapoptotischer Effekt nachweisen. Dagegen wirkt IGF-I auf aktivierte HSC pro- und auf MF antiapoptotisch. Dies erfolgt durch unterschiedliche Rekrutierung des bcl- Systems. Durch Blockade von ERK1/2 zeigte

sich, dass in HSC bcl-2 und bax abwärts von ERK in der IGF-I-Signaltransduktionkette reguliert wird, während die Herunterregulation von NF κ B und konsekutiv von bcl-x_L oberhalb von ERK erfolgt. In MF wird sowohl bcl-2 als auch bcl-x_L IGF-I-abhängig oberhalb von ERK hochreguliert. Bax und NF κ B scheinen beim IGF-I-vermittelten antiapoptotischen Effekt in MF keine Rolle zu spielen⁴. Das inflammatorische Zytokin IFN- γ wirkt ebenfalls antiapoptotisch auf HSC, während IFN- α einen proapoptotischen Effekt ausübt. Erstaunlich ist, dass der Effekt von IFN- α und IFN- γ auf Apoptose und Zellzyklus bei Koadministration gleicher Dosen komplett aufgehoben wird. Überraschenderweise zeigte sich, dass JAK-2 in HSC am IFN- α -, nicht aber am IFN- γ -Effekt auf HSC beteiligt ist. So zeigte sich, dass der hemmende Effekt von IFN- α auf die Aktivität von Caspase-8 und Caspase-3 durch Blockade der JAK-2-Phosphorylierung neutralisiert wird, während dies die IFN- γ induzierte Aktivierung der Caspasen -8 und -3 nicht beeinflusste⁵. Diese Untersuchungen klärten jedoch noch nicht die Frage, warum der gegensätzliche Effekt der beiden IFN auf die Apoptose und die Zellzyklusregulation von HSC durch gleichzeitige Zugabe aufgehoben wird. Mittels eines Zell-Stress-Array fand sich schließlich HSP70, das durch IFN- α hoch-, durch IFN- γ jedoch herunterreguliert wird, was auf Proteinebene bestätigt werden konnte. Darüber hinaus zeigte sich, dass bei Koadministration von IFN- α und IFN- γ die HSP70-Expression auf das Kontrollniveau nivelliert wird. Weitere Untersuchungen ergaben, dass mittels HSP70-Antisenseoligonukleotiden der Effekt von IFN- α auf Apoptose (inklusive Aktivierung der Caspasen-8 und -3) und Zellzyklus von HSC komplett aufgehoben werden konnte, durch Überexpression von HSP70 der IFN- α -Effekt⁶. Das unterschiedliche Verhalten von HSC und MF in Kultur sowie die Unterschiede im Verhalten auf Zytokin-Stimulationen widerlegen die Ansicht, dass HSC zu Myofibroblasten transdifferenzieren könnten. Die bisherigen Erfahrungen im *in vivo*-System legen dagegen die Hypothese nahe, dass im Modell der chronischen Leberschädigung, die letztlich zur Leberzirrhose führt sowohl aktivierte HSC (am Septenrand) als auch MF an der Septenbildung beteiligt sind. Unklar ist, welche Bedeutung die Nachbarschaft von Entzündungszellen für die Apoptose und Endoreplikation bzw. Proliferation von HSC und MF haben und in welcher Zusammensetzung und lokalen Konzentration die fibrogenen und inflammatorischen Zytokine auftreten, die, wie aufgezeigt, gegensätzliche Effekte in Hinsicht auf Apoptose in HSC oder MF haben⁷. Die Kenntnisse um die bedeutsamen direkten

und indirekten (Zytokin- vermittelten) Zellinteraktionen und ihre Auswirkung auf die Apoptoseregulationssysteme von HSC und MF könnten schließlich Möglichkeiten zur effektiven Behandlung der entzündeten oder fibrotischen Leber eröffnen.

Publikationen:

- 1.) Saile B, Knittel T, Matthes N, Schott P, Ramadori G. CD95/CD95L-mediated apoptosis of the hepatic stellate cell. A mechanism terminating uncontrolled hepatic stellate cell proliferation during hepatic tissue repair. *Am J Pathol* 151 (1997) 1265-1272
- 2.) Saile B, Matthes N, Neubauer K, Eisenbach C, El-Armouche H, Dudas J, Ramadori G. Rat liver myofibroblasts and hepatic stellate cells differ in CD95-mediated apoptosis and response to TNF-alpha. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283 (2002) G435-G444
- 3.) Dudas J, Saile B, El-Armouche H, Aprigliano I, Ramadori G. Endoreplication and polyploidy in primary culture of rat hepatic stellate cells. *Cell Tissue Res* 313 (2003) 301-311
- 4.) Saile B, DiRocco P, Dudas J, El-Armouche H, Sebb H, Eisenbach C, Neubauer K, Ramadori G. IGF-I induces DNA synthesis and apoptosis in rat liver hepatic stellate cells (HSC) but DNA synthesis and proliferation in rat liver myofibroblasts (rMF). *Lab Invest* 84 (2004) 1037-1049
- 5.) Saile B, Eisenbach C, El-Armouche H, Neubauer K, Ramadori G. Antiapoptotic effect of interferon-alpha on hepatic stellate cells (HSC): a novel pathway of IFN-alpha signal transduction via Janus kinase 2 (JAK2) and caspase-8. *Eur J Cell Biol* 82 (2003) 31-41
- 6.) Saile B, Eisenbach C, Dudas J, El-Armouche H, Ramadori G. Interferon-gamma acts proapoptotic on hepatic stellate cells (HSC) and abrogates the antiapoptotic effect of interferon-alpha by an HSP70-dependant pathway. *Eur J Cell Biol* 83 (2004) 469-476
- 7.) Knittel T, Kobold D, Piscaglia F, Saile B, Neubauer K, Mehde M, Timpl R, Ramadori G. Localization of liver myofibroblasts and hepatic stellate cells in normal and diseased rat livers: distinct roles of (myo-)fibroblast subpopulations in hepatic tissue repair. *Histochem Cell Biol* 112 (1999) 387-401

Verwertungsplan:

Anhand der in der vergangenen Antragsperiode gewonnenen Erkenntnisse sollen nunmehr Zytokinkombinationen erarbeitet werden, die zum apoptotischen Zelluntergang von aktivierten HSC und/ oder Lebermyofibroblasten führen um so die Bedeutung der einzelnen Zelltypen für die Leberfibrogenese eindeutig zu definieren und der Entwicklung einer Leberzirrhose entgegenzuwirken bzw. diese zu behandeln.