

Abschlussbericht Teilprojekt 11.2.3

Projekttitlel: Einfluss von Zytokinen und Zell-Matrix-Interaktionen auf Apoptose von hepatischen Sternzellen und Myofibroblasten

Projektleiter: Prof. Dr. med. G. Ramadori
Medizinische Universitätsklinik
Zeentrum 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: 01.02.2005 – 31.01.2007

1. Aufgabenstellung

Klärung der produktiven Leistung von HSC und Lebermyofibroblasten (MF) im Rahmen akuter und chronischer Schädigungsmodelle *in vivo*.

Identifizierung der für die produktive Leistung maßgeblichen Zytokine *in vitro* und Vergleich von Ratten- HSC und MF mit humanen Zellen.

Klärung der Bedeutung der produzierten extrazelluläre Matrix (ECM) - Proteine für das Überleben oder Absterben von HSC und Lebermyofibroblasten (Ratte und Mensch).

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Analyse des akut und chronisch geschädigten Lebergewebes im Rahmen des toxischen Schädigungsmodells.

Unterscheidung zwischen Hepatischen Sternzellen (HSC) und Lebermyofibroblasten (MF) der Ratte durch Markerproteine.

Klärung der Bedeutung der produzierten ECM- Proteine für das Apoptoseverhalten von HSC und MF.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Im Lebergewebe wurden ruhende und aktivierte HSC sowie MF mittels Immunhistologie identifiziert. Als Differenzierungsmarker zwischen HSC und MF werden Fibulin-2 (nur MF sind positiv) und Reelin (nur HSC sind positiv) verwendet. Ratten- HSC und MF könnten durch mehrere Markerproteine (z.B. Fibulin-2, CD95L und reelin) unterschieden werden. Im Folgenden sollten auch humane HSC und MF untersucht werden. Aus diesem Grund sollten humane HSC und MF zunächst unter Verwendung der selben Marker charakterisiert werden und die Daten mit denen aus dem Rattensystem verglichen werden. In vitro sollte die Produktion der oben genannten ECM- Proteine durch HSC und Lebermyofibroblasten (Ratte und Mensch) in Abhängigkeit von jeweils pro- und anti- apoptotisch wirkenden Zytokinen untersucht werden.

4. Wissenschaftlichem und technischem Stand, Ergebnisse

Akut und chronisch geschädigtes Lebergewebe im Rahmen des toxischen Schädigungsmodells mit CCl₄ wurde gewonnen. Des Weiteren haben wir ein nicht-invasive Leberschädigungs-Modell in Ratten mittels Thyoacetamide erfolgreich etabliert. Das Modell ist mit der humanen chronischen Leberschädigung und mit dem konventionellen Rattenmodellen der chronischen Leberschädigung vergleichbar. Als Differenzierungsmarker zwischen HSC und MF hatten wir Fibulin-2 (nur MF sind positiv) und Reelin (nur HSC sind positiv) verwendet. Des Weiteren hatten wir einen neuen Zell-Oberflächen-Marker: Thy-1 an Lebermyofibroblasten indentifiziert. Diesen Marker haben wir in Myofibroblasten anderer Organe gefunden (Pankreas, Lunge, Knochenmark, Niere, Darm), und damit konnten wir den Myofibroblast-Subpopulation zuordnen. Mit Hilfe der Kombination von mehreren Markern konnten wir Hepatische Sternzellen von Lebermyofibroblasten unterscheiden, und diese Zellpopupationen nicht nur *in vitro*, aber auch *in vivo* identifizieren. Wir haben die Produktion von Kollagenen (Kollagen Typ I, Typ III, Typ IV und Typ VI), von Glykoproteinen (Fibronektin, Tenascin, Laminin), Proteoglykanen (Dekorin, Syndecan), Glykosamino-glykanen (Hyaluronsäure, Heparansulphat) sowie von Fibrillin und Elastin untersucht

Wir haben die Isolierungsmethode für humane Lebermyofibroblasten etabliert, diese Zellen sind mit dem Ratten-Myofibroblasten morphologisch vergleichbar (wie Veröffentlicht bei Knittel et al. 1999; beide fibroblastische und myofibroblastische Morphologie hatten wir identifiziert). Demnächst werden wir die weiteren Eigenschaften dieser Zellen mit dem Lebermyofibroblasten der Ratte vergleichen.

Weitere Arbeiten könnten nachweisen, dass Dekorin, ein Inhibitor von TGF- β 1, ein wichtiger fibrogenetischer Faktor ist. Obwohl während des fibrotischen Leberumbaus signifikant

erhöhte Konzentrationen von Dekorin gemessen werden, kommt es zu einem weiteren Fortschreiten der Erkrankung, bis zur Entwicklung einer Zirrhose. Während des aktuellen Projekts - der Expression und Synthese von wichtigen extrazellulären Matrix (ECM)-Proteine - wurde in Hepatische Sternzellen (HSC) und Myofibroblasten nach der Stimulierung mit Dekorin und TGF β 1 gemessen. Die Expression von solchen Matrixproteinen wurde auf RNA-Ebene durch real-time RT-PCR und Northern Blot, auf Protein-Ebene durch Western Blot, und durch biosynthetischer Markierung und Immunpräzipitation untersucht. Hepatische Sternzellen und Myofibroblasten haben auf TGF β 1-Stimulierung unterschiedlich reagiert. In der HSC induzierte TGF β 1 die mRNA Expression und Protein Synthese von verschiedenen Matrixproteinen, wohingegen in Ratten Lebermyofibroblasten keine signifikante Regulation von der Matrixprotein-Expression nachgewiesen werden konnte. Der stärkste Unterschied wurde bei der Kollagen I Expression gefunden. Ein Hemmungseffekt von Dekorin, an der TGF β 1-stimulierten Produktion von Kollagen I, III, wurde in HSC gefunden. Dekorin alleine konnte die Genexpression von Matrixproteinen (insbesondere Kollagen I, III) hemmen, und zusätzlich Dekorin behandelte Ratten Lebermyofibroblasten waren TUNEL (terminal dNTP nick end labeling) -positiv. Dieser Befund weist auf die apoptotische Antwort auf besonderen Matrixbestandteile in Ratten Lebermyofibroblasten hin.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Während des Projekts haben wir an internationaler Kooperation teilgenommen.

Kooperationspartner: Prof. Dr. Ilona Kovalszky, I. Abt. Pathologie und Exp. Krebsforschung, Semmelweis Universität, Budapest, Ungarn

6. Die erfolgten oder geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses

7. Erfolgte Veröffentlichungen

1. Aprigliano I, Dudas J, Ramadori G, Saile B. Atorvastatin induces apoptosis in activated rat hepatic stellate cells by a caspase-9 dependant pathway (accepted in **Liver International**), 2007.
2. Neuman MG, Sha K, Esguerra R, Zakhari S, Winkler RE, Hilzenrat N, Wyse J, Cooper CL, Seth D, Gorrell MD, Haber PS, McCaughan GW, Leo MA, Lieber CS, Voiculescu M, Buzatu E, Ionescu C, Dudas J, Saile B, Ramadori G. Inflammation and Repair in Viral Hepatitis C. **Dig Dis Sci.** 2007 Nov 10
3. Dudas J, Mansuroglu T, Batusic D, Saile B, Ramadori G. Thy-1 is an in vivo and in vitro marker of liver myofibroblasts. **Cell Tissue Res.** 2007; 329 (3): 503-514.
4. Saile B, Ramadori G. Inflammation, damage repair and liver fibrosis--role of cytokines and different cell types. **Z Gastroenterol.** 2007; 45(1):77-86.
5. Tátrai P, Dudás J, Batmunkh E, Máthé M, Zalatnai A, Schaff Z, Ramadori G, Kovalszky I. Agrin, a novel basement membrane component in human and rat liver, accumulates in cirrhosis and hepatocellular carcinoma. **Lab Invest.** 2006; 86(11) :1149-1160.
6. Dudas J, Elmaouhoub A, Mansuroglu T, Batusic D, Tron K, Saile B, Papoutsis M, Pieler T, Wilting J, Ramadori G. Prospero-related homeobox 1 (Prox1) is a stable hepatocyte marker during liver development, injury and regeneration, and is absent from "oval cells". **Histochem Cell Biol.** 2006;126 (5): 549-562.
7. Sheikh N, Tron K, Dudas J, Ramadori G. Cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 is released by the noninjured liver in a rat acute-phase model. **Lab Invest.** 2006; 86(8): 800-814.

8. Novosyadlyy R, Dudas J, Pannem R, Ramadori G, Scharf JG. Crosstalk between PDGF and IGF-I receptors in rat liver myofibroblasts: implication for liver fibrogenesis. **Lab Invest.** 2006; 86(7):710-723.

8. Geplante Veröffentlichungen

9. Firneisz G, Dudás J, Fullár A, Szarvas T, Sári E, Hammoudeh El Armouche, Ramadori G Kovalszky I. Different transforming growth factor-beta-1 induced extracellular matrix production in rat hepatic stellate cells versus hepatic myofibroblasts, inhibitory effects of decorin

10. Dudas J, Mansuroglu T, Ramadori G: Thy-1-gene-expression in rat liver injury and regeneration

11. Dudas J, Mansuroglu T, Ramadori G: Analysis of lipid rafts and lipid raft markers in hepatic stellate cells and rat liver myofibroblasts in vitro and in vivo

12. Dudas J, Ramadori G: Matrix (a book chapter planned in 2008)

13. Dudas J, Ramadori G: Thy-1⁺ Myofibroblasts in the liver (a book chapter planned in 2008)