Abschlussbericht Teilprojekt 11.2.4

Projekttitel: Mechanismen der Fibroseprogression bei der chronischen Hepatitis C

Projektleiter: Prof. Dr. med. H. P. Dienes
Klinikum der Universität Köln
Institut für Pathologie
Joseph-Stelzmann-Str. 9
50931 Köln

Telefon: +49(0) 221-478 63 20

Fax: +49(0) 221-478 6360

E-Mail: HP.Dienes@medizin.uni-koeln.de

Berichtszeitraum: 01.02.2002 – 31.01.2005

I. Kurze Darstellung zu

1. Aufgabenstellung

Der zentrale zelluläre Prozeß der Leberfibrogenese ist die Differenzierung von Hepatischen Sternzellen (HSC) zu myofibroblastischen Zellen, die dann einen wesentlichen Anteil an der Akkumulation, dem Umbau und der veränderten Zusammensetzung des Bindegewebes (extrazelluläre Matrix) haben.

Zur Identifizierung diagnostischer Marker und therapeutischer Ansatzpunkte sollte eine molekulare Genexpressionsanalyse des myofibroblastischen Transdifferenzierungs-prozesses während der Leberfibrogenese vorgenommen werden.

Ein Markergen für die myofibroblastische Differenzierung ist das □-Smooth Muscle Actin (SMA). Ein weiterer Fokus der Projektarbeiten war daher das Regulationsvermögen des 5´- SMA-Genbereichs für eine myofibroblast-spezifische Genregulation zu untersuchen. In einem transgenen Mausreportermodell sollte ein bereits *in vitro* charakterisierter 5´-Teilbereich des SMA-Gens auf seine Eignung zur transkriptionellen Steuerung getestet werden. Ein besonderer Schwerpunkt der Untersuchungen war das differenzierungsabhängige, myofibroblastspezifische Regulationsvermögen des artifiziellen Promoters nach Fibroseinduktion durch chronische Organschädigung zu analysieren.

2. Wissenschaftlicher Stand zu Projektbeginn

Das differentielle Expressionsmuster während der myofibroblastischen Differenzierung von HSC war in der Vergangenheit u.a. für die Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM), für die Mediatoren des ECM-Umbaus und für zahlreiche Wachstumsfaktoren und deren Signaltransduktoren bearbeitet worden (zusammengefasst in [1-4]).

Während der Differenzierung von glatten Muskelzellen und der Transdifferenzierung verschiedener Zelltypen in Myofibroblasten steht die SMA-Expression unter dem Einfluß verschiedener Wachstumsfaktoren. Der Wachstumsfaktor Transforming

growth factor beta (TGF ß) ist wesentlich an der Stimulierung der SMA-Expression in glatten Muskelzellen, aber auch während der myofibroblastischen Differenzierung von HSC beteiligt [5, 6]. Die transkriptionelle Regulation des SMA-Gens durch Wachstumsfaktoren wird durch ein Zusammenspiel von positiv und negativ wirkenden regulatorischen Elementen des 5`-Bereiches vermittelt [7-10]. Reporterstudien an transgenen Reportermäusen der Arbeitsgruppe G. Owens zeigten, daß eine zusätzliche CArG-Box im ersten Intron für die *in-vivo*-Expression in Glatten Muskelzellen notwendig ist [11], während in *in vitro*-Studien die 5´-Region mit den CArG-Boxen A und B für eine Core-Aktivität des Promoters ausreicht [3-6].

3. Voraussetzungen, Planung und Ablauf des Vorhabens

In Kooperation mit dem Institut für Neurophysiologie der Universität zu Köln waren zwei 5`-Sequenzbereiche des SMA-Gens (-700 und –190) auf ihr transientes zelltypspezifisches Regulationsvermögen während der Ausdifferenzierung von embryonalen Stammzellen zu Embryonic Bodies getestet und so die Voraussetzungen für in vivo-Promoteranalysen geschaffen worden. Mit dem –700-Konstrukt konnte ein Reporterexpressionsmuster in den Embroid Bodies erreicht werden, das das zelltypspezifische SMA-Expressionsmuster während der Embryogenese widerspiegelt. Das –700 bp Promoterkonstrukt wurde daher für ein transgenes Mausreportermodell herangezogen, in dem die transiente und differenzierungsabhängige Regulation überprüft werden sollte. Zur Durchführung des Projektes stand dem Arbeitskreis eine gut ausgestattete Labor- und Tierhaltungsinfrastruktur zur Verfügung. Es handelt sich hier um S1-Tierlabore (521-K-1.31/96 Projektleitung H.P. Dienes), in denen Platz für die Haltung der Tiere des beantragten Projektes und die gewünschte Ausstattung für die vorgesehenen Experimente vorhanden war.

Die Versuchsgenehmigungen für die geplanten Tierexperimente zur Induktion der myofibroblastischen Differenzierung nach chronischer Organschädigung wurden beantragt und lagen zu Projektbeginn vor (M. Odenthal 50.203.2K22 1/02). Für die Arbeiten mit viralen Vektoren wurde eine S2-Genehmigung im Dezember 2002 für den Laborbereich eingeholt (64-K-1.72/02). Für die Makroarrayanalysen stand ein im Labortrakt integrierter Kontrollbereich zur Verfügung; die Mikroarrayanalysen wurden in Zusammenarbeit mit dem Chipzentrum-NRW Münster bearbeitet.

4. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Das Projekt wurde in enger Verbindung mit zahlreichen Partnern des HepNet-Netzwerkes, die an der Bedeutung inter- und intrazellulärer Signale im Verlauf der chronischen Hepatitis arbeiten, angegangen. Neben der engen Zusammenarbeit mit den Gruppen des Fibrogenese-Arbeitskreises (11.2.1), wurde immer der Austausch mit den klinischen Partner gesucht, um eine Basis zur Evaluierung der experimentellen Daten am klinischen Material wie Patientenbiopsien und Seren zu schaffen. So wurden die Proben der im HepNet unter Leitung von Professor Dr. Dienes aufgebauten Gewebsbank in Kooperation mit PD Dr. Weiskirchen und Professor Dr. Gressner für die in dem Aachener Arbeitskreis etablierten TGF ß-spezifischen SNP-Analysen vorbereitet.

1. Gressner, A.M., *Transdifferentiation of hepatic stellate cells (Ito cells) to myofibroblasts: a key event in hepatic fibrogenesis.* Kidney Int Suppl, 1996. **54**: p. S39-45.
2. Ramadori, G. and B. Saile, *Mesenchymal cells in the liver--one cell type or two?* Liver, 2002. **22**(4): p. 283-94.
3. Eng, F.J. and S.L. Friedman, *Transcriptional regulation in hepatic stellate cells.* Semin Liver Dis, 2001. **21**(3): p. 385-95.
4. Reeves, H.L. and S.L. Friedman, *Activation of hepatic stellate cells--a key issue in liver fibrosis.* Front Biosci, 2002. **7**: p. d808-26.
5. Hautmann, M.B., C.S. Madsen, and G.K. Owens, *A transforming growth factor beta (TGFbeta) control element drives TGFbeta-induced stimulation of smooth muscle alpha-actin gene expression in concert with two CArG elements.* J Biol Chem, 1997. **272**(16): p. 10948-56.
6. Ramadori, G., et al., *Expression of the gene of the alpha-smooth muscle-actin isoform in rat liver and in rat fat-storing (ITO) cells.* Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol, 1990. **59**(6): p. 349-57.
7. Carroll, S.L., D.J. Bergsma, and R.J. Schwartz, *Structure and complete nucleotide sequence of the chicken alpha-smooth muscle (aortic) actin gene. An actin gene which produces multiple messenger RNAs.* J Biol Chem, 1986. **261**(19): p. 8965-76.

8. Blank, R.S., et al., *Elements of the smooth muscle alpha-actin promoter required in cis for transcriptional activation in smooth muscle. Evidence for cell type-specific regulation.* J Biol Chem, 1992. **267**(2): p. 984-9.
9. Jung, F., et al., *Characterization of an E-box-dependent cis element in the smooth muscle alpha-actin promoter.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(11): p. 2591-9.
10. Nakano, Y., et al., *Transcriptional regulatory elements in the 5' upstream and first intron regions of the human smooth muscle (aortic type) alpha-actin-encoding gene.* Gene, 1991. **99**(2): p. 285-9.
11. Mack, C.P. and G.K. Owens, *Regulation of smooth muscle alpha-actin expression in vivo is dependent on CArG elements within the 5' and first intron promoter regions.* Circ Res, 1999. **84**(7): p. 852-61.

II. Eingehende Darstellung der erzielten Resultate

1. Erzielte Ergebnisse

Zur differentiellen Genexpressionsanalyse während der myofibroblastischen Transdifferenzierung von HSC wurden RNA-Populationen charakterisierter HSC-Kulturen des $1^1/_2$ d, 3 d und des 7 d, die den ruhenden, aktivierten und myofibroblastischen Zustand in der Leberfibrogenese widerspiegeln, durch Hybridisierungsarrays untersucht. Insgesamt unterliegen die Gene des Lipidstoffwechsels, des Vesikeltransportes sowie Gene des ribosomalen Apparates einer besonders ausgeprägten differentiellen Expression während der myofibroblastischen Differenzierung. Die Genexpressionsanalyse weist aufgrund der 5 bis 10 fachen Expressionsinduktion von Proteinen, die weitgehend am synaptischen Transport beteiligt sind, darauf hin, daß synaptisch assoziierte Proteine möglicherweise beim Lipidvesikeltransport in HSC involviert sind (Tabelle 1). Dabei sind einzelne von diesen Proteinen bislang ausschließlich im Gehirn beschrieben worden wie z.B. Synaptotagmin XI. Andere Proteine lassen ebenfalls auf eine neuronale Verwandschaft bzw. Herkunft von HSC schließen wie z.B. das periphere Myelin 22 (PMP 22, SR 13). Neben der neuronalen Expression von PMP 22 in Schwann-Zellen und der neuronassoziierten Funktion scheint PMP 22 in non-neuronalen Zellen in den Zellzyklus inhibierend einzugreifen (*Niemann S. et al. J Neurosci. 20: 4120-8 (2000)*). Die induzierte Expression von PMP 22 während der

myofibroblastischen Differenzierung geht einher mit der von BTG2, einem durch NGF (Nerve Growth Factor) induzierten antiproliferativ wirkenden Peptid (*Rouault, J. P. et al. Nat Genet. 14:4 82-6 (1996)*). BTG 2 wurde nur in HSC des 3. und 7. Tages gefunden (Tabelle 1). Auch die zellzykluseingreifenden Proteine, p53 und RB, werden ebenfalls in myofibroblastischen HSC verstärkt exprimiert. Die Cycline und Cyclin-Kinasen sind unterschiedlich in HSC reguliert, auffallend ist die Induktion von Cyclin D2 (vin). Die Expression des Apoptosemediators bcl2 wurde vor allem in HSC des 7. Tages beobachtet.

Neben dem Wachstumsfaktor NGF wird auch der spezifische *high-affinity* NGF-Rezeptor, trkA, in der frühen Phase der myofibroblastischen Aktivierung exprimiert. Daten von Trim *et al.* zeigen, dass der apoptoseinduzierende NGF-Rezeptor, p75NTR, dagegen nur in späten myofibroblastischen Stadien der HSC-Entwicklung synthetisiert wird (*Trim et al. Am. J. Pathology, 2000*). Durch Real-Time-PCR konnten die Arraydaten der NGF und NGF-Rezeptorexpression bestätigt werden. Die autokrine NGF Stimulierung des trkA-Rezeptors mündet in der Aktivierung des MAPK-Signalweges und führt so zur Phosphorylierung der Kinasen, Erk1/2. Nach lang andauernder, autokriner NGF-Stimulierung wird die NGF / trkA initiierte MAPK-Aktivierung jedoch gehemmt. Die NGF-vermittelte HSC-Aktivierung über trkA und den MAPK-Weg während der frühen Phase der myofibroblastischen HSC-Differenzierung scheint in den späten myofibroblastischen Stadien durch die p75NTR assoziierte Signaltransduktion des Wachstumsfaktors NGF abgelöst zu werden.

Tabelle 1: ♦ Differentiell exprimierte Gene während der myofibroblastischen Differenzierung

Cytokines, Growth Factoris and Receptors		
Cytokines	**Growth Factors**	**Receptors**
MIP 1 a	VEGF-D, VEGF glioma derived	bFGF-R; FRAG1
CXC	PDGF	PDGF ß
Receptors	Endothelin-Converting Enzyme	Endothelin-R, ET-A (3d), ET-B (7d)
Neurotensin R	TGF ß 1	TGF R I, II, (III)
Somatostatin R	**NGF** & Neurotrophin 3 (3 d); Neurotrophin 5 (7 d)	Trk A , *Dicoidin R DDR (trk E)*
Arg Vassopressin type II R	IGF I *; IGF II*	M6P-R, IGF I a
Serotonin R		IL-6-R (gp130). IL 4 R, IL 1 R (p80)
Proteins Involved in Neuronal Functions		
Neurexin III □	**Transport**	**Receptors**
SR13 myelin	Synaptobrevin 1, 2, Synaptophysin p38	Neuronal Acetylcholin R□ 3□ 5
NGF and Neurotrophins	Synaptotagmin I,II,III,V (5d), XI (3d)	Neuronal Pentraxine R
Transporter	synaptic vesicle amine transporter	Purinerig R Channel P2X4
Na/Cl Neurotransmitter /transp.	Rim, RAB3 (7d)	GABA Receptor A □
Na Neurotransmitter Transporter	Synapsin 1 A & B, 2A	GABA Receptor A □2
Na Channel SBNB2 (brain)	**Synaptic vesicle protein 2 (SV2) & 2 B**	GABA Receptor A □
Purinerig R Channel P2X4 (7d)	Snap 25	Glutamat R. metabotropic
Cl Channel CIC 7 & RCL 1, K KIR6b ,	Secretogranin V (Neuroendocrine)	
Intracellular Mediators of Signalling		
Cell Cycle & Apoptosis	**Signal Transductors**	**Transcription Factors**
bcl 2 (Cyclin B1)	Ras-related rab 1A, rab 13	NDK-B myc related
bcl x (Cyclin C)	**Mos (c-mos)**	fos L2 (Fra2), Jun D
vin-1 (Cyclin D2) , (Cyclin D1)	Raf 1	p130 Rb, CREBP, HMG 2
Cdc2, Cyclin D3 (cdc 25 B)	Erk1, Erk 2, Erk 3	ID 3 (7d); Max
Gax , Cyclin G, PCNA, BTG2		Ets1, esp 1, methyl CpG BP
Cyclin G		Stat 3 (7d), egr1 (3d) WT 1 (7d)

Italics: Genes upregulated in quiescent HSC;
Normal: Genes upregulated in activated or myofibroblastic HSC after maintaining up to 7 d in primary culture;
Bold: Expression profiles which are in focus of future studies or of special interest

In dem zweiten Projektfokus wurde das etablierte transgene Mausreportermodell, dessen Reporter unter Kontrolle des –700 bp Promoterabschnitts des SMA-Gens stand, herangezogen, um den SMA-Promoter auf seine Fähigkeit, myofibroblastische Genexpressionen zu dirigieren, zu untersuchen. Der durch *in vitro*-Versuche definierte Sequenzbereich dirigierte in einem transgenen Mausmodell eine myofibroblastspezifische Reporterexpression während der Wundheilung. Nach chronischer Leberschädigung durch CCl_4 wurde allerdings nur eine moderate Leberfibrose mit begrenzter Zahl myofibroblastischer und reporterpositiver Zellen erreicht. Um die myofibroblastische Steuerung des Promoterabschnittes dennoch in einem chronischen Schädigungsmodell darzustellen, wurde eine einseitige Nierenschädigung durch Ureterligatur vorgenommen. Der SMA-Promoter induzierte 7 - 14 Tage nach Ureterligatur in sklerosierenden Nierenarealen in Abhängigkeit der myofibroblastischen Differenzierung eine ausgeprägte Reporterexpression. Die Resultate zeigen daher, daß der SMA-Promoterbereich eine myofibroblastspezifische Genexpression dirigieren kann und ein wertvoller Ansatz für die genetische Kontrolle myofibroblastischer Zellen ist.

2. Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit

Das dargelegte myofibroblastspezifische Direktionsvermögen des SMA-Promoters eröffnet die Möglichkeit neue Ansätze innerhalb der pharmakologischen Sichtung oder der Gentherapie bei fibrosierenden Erkrankungen zu testen. Die Bedeutung der gezeigten Expression von differentiell exprimierten neuronalen Faktoren für den Fortschritt der Fibrogenese bei chronischen Lebererkrankungen soll zukünftig untersucht werden. Die dann im Zellkultur- und Tiermodell gezeigten Indizien über die Beteiligung an der Leberfibrogenese sollen publiziert werden. Die HepNet-Vernetzung ermöglicht, die neuronalen Parameter auf den klinischen und histopathologischen Bezug und auf eine mögliche klinische Verwertung zu prüfen.

3. Fortschritt des Vorhabens an anderen Stellen

Die Daten von Cassiman *et al.* bestätigten durch immunhistologische Studien an tier-experimentellen sowie humanen Hepatitisgewebsproben, daß Neurotrophine wie

NGF und deren Rezeptoren während der Leberfibrogenese exprimiert werden und von Bedeutung sind (*Cassiman, D. et al. Hepatology, 33, 148 (2001)* und *J Hepatol, 36, 200 (2002)*. Die Rolle der Neurotrophine für den Fortschritt der Leberfibrogenese wurde bislang noch nicht beschrieben.

4. Geplante Veröffentlichungen

1. Odenthal, M., Wallraf, J., H.P. Dienes, H.P., Fries J.W. Myofibroblast-specific transcriptional regulation by the smooth muscle actin promoter.
   In dieser Publikation wird dargelegt, daß der Promoter des α-smooth muscle Aktins die Möglichkeit bietet, die Genexpression differenzierungsabhängig während der in vitro induzierten myofibroblastischen Aktivierung zu steuern.

2. Odenthal M, Licht C, Khimji AS, Jung D, Sawitza I, Dienes HP, Fries JW. The smooth muscle actin promoter directs myofibroblast specific gene expression during scaring processes.
   Die hier präsentierten Arbeiten geben Aufschluß über das Vermögen des Promoters des α-smooth muscle Aktin-Gens während der Wundheilung und in fibrotisierenden Erkrankungen eine myofibroblastisch spezifische Genexpression zu regulieren.

3. Odenthal M, Sawitza I, Lohfink D, Spindler MP, Dienes HP. Autocrine signalling of nerve growth factor in hepatic stellate cells upon early myofibroblastic differentiation.

   In diese Studie wird die autokrine Stimulierung von myofibroblastisch aktivierten HSC durch den Nerve Growth Factor und dessen Rezeptor trkA präsentiert.