

Abschlussbericht Teilprojekt 11.2.4

Projekttitle: Verbundprojekt 11.2 „Fibrogenese“: Chronic viral hepatitis: prognostic markers and mechanisms of fibrogenesis, strategies for inhibition

Projektleiter: Prof. Dr. med. Hans Peter Dienes, Dr. Margarete Odenthal
Klinikum der Universität zu Köln
Institut für Pathologie
Kerpener Str. 62
50924 Köln

Telefon: +49 (0) 221 / 478-6320

Fax: +49 (0) 221 / 478-6360

E-Mail: hp.dienes@medizin.uni-koeln.de

Berichtszeitraum: 01.02.2005 – 31.01.2007

I. Kurze Darstellung

1. Aufgabenstellung

Myofibroblastische Hepatische Sternzellen sind maßgeblich an der Akkumulation und Umstrukturierung extrazellulärer Matrix während der Leberfibrogenese beteiligt. Nach Aktivierung von Hepatischen Sternzellen (HSC) unter dem parakrinen Einfluß eines weiten Spektrums von Entzündungsmediatoren wird die myofibroblastische Differenzierung weitgehend auch durch autokrine Signale unterhalten. Die Bedeutung neuronaler Faktoren wie die des Nerve Growth Factors (NGF) für die Leberfibrogenese und die myofibroblastische Aktivierung von HSC ist bislang ungeklärt. Der Bedeutung der differentiellen Expression von neuronalen Faktoren sollte nachgegangen werden.

2. Voraussetzungen, unter denen das Projekt durchgeführt wurde

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 Laborräume sind als Kontrollbereich und als gentechnische Anlage der Sicherheitsstufe S2 zugelassen (Projektleitung M. Odenthal). Die Mikroarrayanalysen wurden in Zusammenarbeit mit dem Chipzentrum-NRW Münster bearbeitet.

3. 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]). Durch Array-Analyse hatten die Autoren des hier dargelegten Projektes festgestellt, dass während der myofibroblastischen Differenzierung neuronale Mediatoren verstärkt exprimiert werden, wie zum Beispiel die Neurotrophine und deren Rezeptoren, neuronale Vesikeltransportproteine (Synapsine) und die alpha und beta- Adrenozeptoren. In der Weiterführung des Projektes wurde aufgrund der deutlichen Expressionsinduktion der Bedeutung von NGF und der Bedeutung der sympathischen Innervierung nachgegangen.

NGF übt seine Wirkung zum einen durch Bindung an den NGF-spezifischen Tyrosinkinase-Rezeptor, trkA, aus und zum anderen durch Bindung an den Glykoproteinrezeptor p75NTR, der zur Tumor Nekrose Rezeptor-Familie gehört und neben NGF auch andere Neurotrophinmitglieder bindet [5]. Ausdifferenzierung und Wachstum neuronaler Zellen wird durch Bindung an den trkA-Rezeptor und anschließende Aktivierung verschiedener Signalkaskaden wie die des Ras-Erk-, des Phospholipase C- oder des PI3-Kinase-Weges eingeleitet [6, 7]. Durch den low-affinity Rezeptor p75 NTR werden sowohl Zellerhalt und -wachstum als auch Apoptose induziert. Die p75-Signalwege werden entsprechend den anderen Mitgliedern der TNF-Rezeptor-Familie durch intrazelluläre Death-Domainproteine eingeleitet [8] und münden zumeist in einer NF κ B-Aktivierung [9].

Allerdings hat NGF auch Einfluß auf nicht-neuronale Zellen wie T- und B-Lymphozyten [10, 11] oder auch Monozyten/Makrophagen [12, 13]. In Mastzellen, die selber NGF synthetisieren können, induziert NGF die Mastzellenausreifung [14, 15]. NGF scheint vor allem eine Bedeutung als proinflammatorischer Mediator zu haben, denn bei asthmatischen und rheumatischen Erkrankungen steigt die NGF-Konzentration bis zum 35-fachen an [16, 17]. Neben der Wirkung auf Entzündungszellen und die Immunabwehr wurde auch ein NGF-Einfluß auf Haut- und Lungenfibroblasten beobachtet [18], deren Migration auf einer Fibronectinbasis stimuliert werden kann [19]. Da NGF beim Auswachsen peripherer Nervenstränge die Kollagensynthese von sogenannten Satellitenzellen fördert, wodurch die peripheren Nervenstränge eine unterstützende parallel laufende, fibrilläre Matrix erhalten, ist eine fibrogene, matrixinduzierende Wirkung von NGF

bei chronischen Erkrankungen möglich. Obwohl in den Arbeiten der Arbeitsgruppe Neurotrophine und deren Rezeptoren in der fibrotischen Leber nachgewiesen wurden [20, 21], konnte bislang die Bedeutung von NGF in chronischen, fibrotischen Erkrankungen nicht erfasst werden. Ebenso ist ungeklärt, ob NGF fibrogen auf Myofibroblasten wirkt oder ob NGF eine Rolle in der myofibroblastischen Differenzierung spielt und so den Fortschritt der Fibrose indirekt beeinflusst. Iredale et al. konnten zeigen, dass NGF in späten myofibroblastischen Differenzierungsstadien der HSC durch Aktivierung des p75NTR-Rezeptors Apoptose induziert wird [22]. Immunhistologische Daten zeigen, dass während der Leberfibrogenese der NGF-spezifische High Affinity Rezeptor, trkA, ebenfalls exprimiert wird. [21].

Die zentrale Rolle des sympathischen Nervensystems bei der Leberfibrogenese wird durch die Beobachtungen der Arbeitsgruppe Anna Mae Diehl unterstützt, die die Stimulierung der Kollagensynthese und der myofibroblastischen Differenzierung in Hepatischen Sternzellen durch sympathische Neurotransmitter *in vivo* und *in vitro* zeigen. [23, 24].

4. Planung und Ablauf des Vorhabens

Zur Hemmung der autokrinen NGF Signalwirkung bei HSC wurden zwei Ansätze durchgeführt: Zunächst sollte durch RNA-Interferenz die Hemmung der autokrinen Signalwirkung von NGF im Zellkultursystem erreicht werden. Dafür wurden small interfering (si) RNA Sequenzen, die gegen Transkripte des NGF-Rezeptors trkA und p75 gerichtet waren, auf ihre posttranskriptionelle Inhibierung der NGF Rezeptor-Expression durch Real-Time PCR überprüft. Die siRNA-kodierenden Sequenzen wurden zum einen in eine Polymerase III gesteuerte Expressionskassette als small hair-loop (sh) Sequenz kloniert, transfeziert und anschließend stabil exprimiert. Zum anderen wurde siRNA als doppelsträngige RNA chemisch synthetisiert, transfeziert und der transiente Einfluß untersucht. Die siRNA Sequenzen wurden an neuronalen Zellen (PC12-Zellen) mit Hilfe von Real-Time-Ansätzen getestet. Eine Hemmung konnte mit chemisch synthetisierter siRNA dargestellt werden, allerdings wurde auch eine wechselseitige Hemmung beider Rezeptoren beobachtet. Deshalb wurde in der weiteren Vorgehensweise die Hemmung der autokrinen NGF-Wirkung durch neutralisierende Antikörper durchgeführt. Die Wirkung von NGF wurde dann nach Unterbrechung der Signalwirkung wie geplant in einem Expressionsprofil durch Microarrays analysiert.

Für die Untersuchungen zur Rolle des sympathischen Nervensystems bei der Progression der Fibrogenese wurden in Kooperation mit Professor Dr. F. Lammert (Universitätsklinikum Bonn) Mdr-2 Knock-out -Mäuse herangezogen, die adult eine periportale, cholangioläre Leberfibrose entwickeln [25]. Die sympathische Signalwirkung wurde durch Propanolol, einem unselektiven Antagonisten von α_1 und α_2 -Adrenozeptoren, unterbrochen und die Auswirkungen auf die Fibrose analysiert.

5. 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) und F. Lammert (Mdr-2 Mäuse), 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 Gewebesbank in Kooperation mit PD Dr. Weiskirchen und Professor Dr. Gressner (Universitätsklinikum TH Aachen) für die in dem Aachener Arbeitskreis etablierten TGF β -spezifischen SNP-Analysen vorbereitet. Von der AG Odenthal wurde dann an diesen Proben die Alanin-Prolin Mutation am PPAR α sowie die Polymorphismen an den β -Adrenozeptoren bearbeitet. In Kooperation mit den Arbeitsgruppen Canbay (Universitätsklinikum Essen) und Weiskirchen (s.o.) wurden die SNP des Adiponektins untersucht. Blutproben, die durch Unterstützung von Herrn T. Müller (Universität München) nach HCV-Status und Fibrosestadium ausgewählt wurden, konnten aus der von M. Roggendorf angelegten

Blutbank (Universitätsklinikum Essen) durch Hilfestellung der Arbeitsgruppe Roggendorf herausgesucht werden. Die DNA wurde extrahiert und stand dann auch dem HepNet-Antrag auf Probenmaterial von Sabine Mihm (G. Ramadori, Universitätsklinikum Göttingen) zur Verfügung.

1. Gressner AM. Transdifferentiation of hepatic stellate cells (Ito cells) to myofibroblasts: a key event in hepatic fibrogenesis. *Kidney Int Suppl.* 1996;54:S39-45.
2. Ramadori G and Saile B. Mesenchymal cells in the liver--one cell type or two? *Liver.* 2002;22(4):283-294.
3. Eng FJ and Friedman SL. Transcriptional regulation in hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis.* 2001;21(3):385-395.
4. Reeves HL and Friedman SL. Activation of hepatic stellate cells--a key issue in liver fibrosis. *Front Biosci.* 2002;7:d808-826.
5. Meakin SO and Shooter EM. The nerve growth factor family of receptors. *Trends Neurosci.* 1992;15(9):323-331.
6. Sofroniew MV, Howe CL and Mobley WC. Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annu Rev Neurosci.* 2001;24:1217-1281.
7. Esposito D, Patel P, Stephens RM, et al. The cytoplasmic and transmembrane domains of the p75 and Trk A receptors regulate high affinity binding to nerve growth factor. *J Biol Chem.* 2001;276(35):32687-32695.
8. Roux PP and Barker PA. Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog Neurobiol.* 2002;67(3):203-233.
9. Maggirwar SB, Sarmiere PD, Dewhurst S, et al. Nerve growth factor-dependent activation of NF-kappaB contributes to survival of sympathetic neurons. *J Neurosci.* 1998;18(24):10356-10365.
10. Lambiase A, Bracci-Laudiero L, Bonini S, et al. Human CD4+ T cell clones produce and release nerve growth factor and express high-affinity nerve growth factor receptors. *J Allergy Clin Immunol.* 1997;100(3):408-414.
11. Torcia M, Bracci-Laudiero L, Lucibello M, et al. Nerve growth factor is an autocrine survival factor for memory B lymphocytes. *Cell.* 1996;85(3):345-356.
12. Barouch R, Kazimirsky G, Appel E, et al. Nerve growth factor regulates TNF-alpha production in mouse macrophages via MAP kinase activation. *J Leukoc Biol.* 2001;69(6):1019-1026.
13. Kobayashi H and Mizisin AP. Nerve growth factor and neurotrophin-3 promote chemotaxis of mouse macrophages in vitro. *Neurosci Lett.* 2001;305(3):157-160.
14. Welker P, Grabbe J, Grutzkau A, et al. Effects of nerve growth factor (NGF) and other fibroblast-derived growth factors on immature human mast cells (HMC-1). *Immunology.* 1998;94(3):310-317.
15. Horigome K, Bullock ED and Johnson EM, Jr. Effects of nerve growth factor on rat peritoneal mast cells. Survival promotion and immediate-early gene induction. *J Biol Chem.* 1994;269(4):2695-2702.
16. Bonini S, Lambiase A, Angelucci F, et al. Circulating nerve growth factor levels are increased in humans with allergic diseases and asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(20):10955-10960.
17. Aloe L and Taveri MA. Nerve growth factor and autoimmune rheumatic diseases. *Clin Exp Rheumatol.* 1997;15(4):433-438.
18. Micera A, Vigneti E, Pickholtz D, et al. Nerve growth factor displays stimulatory effects on human skin and lung fibroblasts, demonstrating a direct role for this factor in tissue repair. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(11):6162-6167.
19. Kohyama T, Liu X, Wen FQ, et al. Nerve growth factor stimulates fibronectin-induced fibroblast migration. *J Lab Clin Med.* 2002;140(5):329-335.
20. Cassiman D, Libbrecht L, Desmet V, et al. Hepatic stellate cell/myofibroblast subpopulations in fibrotic human and rat livers. *J Hepatol.* 2002;36(2):200-209.
21. Cassiman D, Deneff C, Desmet VJ, et al. Human and rat hepatic stellate cells express neurotrophins and neurotrophin receptors. *Hepatology.* 2001;33(1):148-158.

22. Trim N, Morgan S, Evans M, et al. Hepatic stellate cells express the low affinity nerve growth factor receptor p75 and undergo apoptosis in response to nerve growth factor stimulation. *Am J Pathol.* 2000;156(4):1235-1243.
23. Oben JA, Yang S, Lin H, et al. Norepinephrine and neuropeptide Y promote proliferation and collagen gene expression of hepatic myofibroblastic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;302(4):685-690.
24. Oben JA, Yang S, Lin H, et al. Acetylcholine promotes the proliferation and collagen gene expression of myofibroblastic hepatic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;300(1):172-177.
25. Fickert P, Fuchsbichler A, Wagner M, et al. Regurgitation of bile acids from leaky bile ducts causes sclerosing cholangitis in Mdr2 (Abcb4) knockout mice. *Gastroenterology.* 2004;127(1):261-274.

II. Eingehende Darstellung der erzielten Resultate

1. Erzielte Ergebnisse

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. Die Signale des NGF über den trkA-Rezeptor münden in der Aktivierung des fibrogenen Mediators, Endothelin-1 und von Purinrezeptoren. Dadurch wirkt NGF vasoconstriktiv. NGF könnte daher indirekt durch Vasoconstriktion aber auch durch die Stimulation proinflammatorischer Mediatoren die Fibrogenese fördern.

Die vasoconstriktive Bedeutung kommt auch bei den Untersuchungen zur sympathischen Innervierung zum Tragen. Das gewählte MDR-2 Knock-out Modell entwickelte in 6 Wochen eine moderate und in drei Monaten eine deutliche, periportale Leberfibrose. Die Leberfibrose begründet sich in einer ausgeprägten Cholestase und ist nicht durch myofibroblastische Zellen getriggert. Durch Hemmung der sympathischen Innervierung kam es zur signifikanten Verbesserung der Leberfibrose. Das konnte am besten durch den Vergleich der behandelten und unbehandelten mikrodisssezierten Portalfelder gezeigt werden. Die Expression von CTGF, TGF β , Endothelin und Endothelin-Rezeptor A war durch die β -Blockade im Portalfeld signifikant supprimiert.

2. Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit

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 von neuronalen Faktoren 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. Die β -Blockade stellt einen neuen optionalen Ansatz für die Therapie der Leberfibrose dar.

3. Fortschritt des Vorhabens an anderen Stellen

An anderer Stelle wurde der Fokus auf die Rolle des unspezifischen p75NTR Rezeptors während der Fibrogenese gelegt, da bereits in früheren Arbeiten dem p75NTR eine Wirkung bei inflammatorischen Prozessen zugeschrieben wurde. Dies bestätigt, dass p75NTR nicht nur als neuronal spezifischer Rezeptor agiert. Die hier bedeutendste Arbeit stellt den Beitrag von p75NTR bei der Initiation der myofibroblastischen Differenzierung von HSC heraus (Passimo et al. 2007 Science 315: pp1853). Das hier beobachtete Signalprofil von p75NTR steht allerdings im Widerspruch zu den Arbeiten von Trim et al. (Am J Pathol, 2000. 156 (4): pp. 1235).

Während diese Studien den p75NTR in den Mittelpunkt der Projektarbeit stellen, wurde in den eigenen Experimenten vor allem die Bedeutung des spezifischen NGF Rezeptors trkA untersucht.

4. Veröffentlichungen und geplante Veröffentlichungen

7. Odenthal M, Sawitza I, Lohfink D, Broza A., Dienes HP. Autocrine signalling of nerve growth factor in hepatic stellate cells upon early myofibroblastic differentiation. publication in preparation. abstract in [Z. Gastroenterol.; 01, 45, 2007](#)
8. Strack I., Scheffler M., Varnholt H., Schulte S., Lammert F., Dienes H.P., and Odenthal M. Blockade of the sympatheticus by inhibition of beta-adrenoceptors results in delayed fibrosis in MDR2 knockout mice. publication in preparation, abstract in: J. Hepatology 46: S133-S134 341 Suppl. 1 2007
9. Wedemeyer I., Petmecky K., Drebber U., Kühnen E., Mohren S., Weiskirchen R., Canbay A., Odenthal M., and HP Dienes Adiponectin as a putative modulator of hepatitis in chronic HCV-infection. manuscript already prepared; abstract in: [Z. Gastroenterol.; 01, 45, 2007](#)
10. Varnholt, H., Drebber, U., Schulze, F., Wedemeyer, I., Schirmacher, P., Dienes, H.P. and Odenthal, M. MicroRNA gene expression profile of HCV-associated hepatocellular carcinoma. Hepatology 2007 in review. abstract in: J. Hepatology 46: S33-S33 74 Suppl. 1 2007

III. Erfolgskontrollbericht

1. Beitrag zu den förderpolitischen Zielen

Die Ergebnisse des Teilprojektes Dienes / Odenthal bilden eine Grundlage für das Verständnis, aber auch für neue Möglichkeiten in der Diagnostik und Therapie der Hepatitis, die allerdings erst durch den Bezug zu den klinischen Arbeiten des Netzwerkes an Bedeutung gewinnen.

2. Wissenschaftlich technische Ergebnisse und wesentliche Erfahrungen

Neuronale Faktoren müssen vertiefend untersucht werden, da sie in dem Fibrogenese eine entscheidene Rolle spielen. Die autokrine NGF Stimulierung führt zu einem negativen Feed-Back-Mechanismus. Die Arbeiten zur Blockade des Sympathicus zeigen einen möglichen Ansatz für die Therapie der Leberfibrose auf.

3. Fortschreibung des Verwertungsplans

Die Ergebnisse tragen zum Verständnis der Mechanismen und der Bedeutung der neuronalen Faktoren bei chronischer Leberschädigung bei, lassen aber keine kommerzielle Verwertung erkennen. Inwieweit eine β -Blockade zur Hemmung der Fibrose klinisch einsetzbar ist, kann in diesem Stadium nicht eingeschätzt werden.

4. Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben

Die Arbeiten mit siRNA brachten kein zuverlässiges Ergebnis in der Expressionshemmung, da es zur unspezifischen Inhibierung von mehreren Faktoren kam. Diese Probleme wurden durch Signaltransduktionshemmung mit neutralisierenden Antikörpern überwunden.

5. Präsentationsmöglichkeiten für mögliche Nutzer

entfällt

6. Einhaltung der Ausgaben- und Zeitplanung

Die Ausgaben- und Zeitplanung wurde eingehalten. Die Ergebnisse werden zur Zeit für die Publikation zusammengefasst.

I. Kurzfassung (Berichtsblatt) (siehe Anlage)