

Iris Sawitza: Differentielle Signale während der myofibroblastischen Transdifferenzierung von Hepatischen Sternzellen. 2002

Hepatische Sternzellen (HSC) sind sinusoidale, perizytenähnliche Zellen der Leber. Nach chronischer Leberschädigung differenzieren sie in myofibroblastische Zellen, die maßgeblich am Fortschreiten der Leberfibrose beteiligt sind. Im Zellkultursystem durchlaufen die Zellen einen der Leberfibrogenese entsprechenden Transdifferenzierungsprozeß, der aber gegenüber dem in vivo Verlauf, in vitro auf 7 Tage verkürzt ist. HSC in Primärzellkulturen bieten daher die Möglichkeit, den myofibroblastischen Transdifferenzierungsprozeß auf seine molekularen Zusammenhänge und Hintergründe zu untersuchen. Daher wurden HSC aus der Ratte isoliert und das differentielle Expressionsmuster sowie wesentliche fibrogene und mitogene Signalwege in verschiedenen Stadien der myofibroblastischen Differenzierung untersucht.

Einer der wesentlichen fibrogenen Mediatoren ist Transforming Growth Factor β (TGF β), der auf epithelialen Zellen antiproliferativ wirkt, in mesenchymalen Zellen aber den verminderten Abbau und die vermehrte Synthese extrazellulärer Matrixproteine induziert. Die durch TGF- β initiierte intrazelluläre Signaltransduktion scheint in multiple Wege zu münden, die zum einen das MAPK-Kaskade-Netzwerk umfassen. Nach Identifizierung der Smad-Proteine, konnte zum anderen in epithelialen Zellen ein direkter und zusammenhängender Signalweg für die TGF β -Signaltransduktion beschrieben werden.

Mit Hilfe von Reporter-Assays an AP1 und Smad-responsiven Kontrollelementen wurde in der Promotionsarbeit gezeigt, dass es in Abhängigkeit von TGF β , ebenfalls in Fibroblasten, nicht nur zu einer Aktivierung von AP-1 sondern auch des Smad-Signalweges kommt. Die Anreicherung der TGF β -Signaltransduktoren, Smad 2, 3 und 4 während der myofibroblastischen Differenzierung geht mit ihrer Translokation in den Kern einher. In Electromobility Shift Assays konnte die Aktivierung von AP1 und der Smad-Signalmediatoren durch die Bindung nukleärer Proteine an ein AP1-Response und ein Smad Binding Element (SBE) dokumentiert werden. Die AP1-Bindung nimmt während der myofibroblastischen Transdifferenzierung ab, während die Bindung von SBE moderat zunimmt. Bei der Untersuchung des Smad-Transkript-Levels stellte sich heraus, dass sowohl Smad3 als auch Smad4 nicht auf Transkriptionsebene reguliert werden.

Insgesamt spricht die dargelegte autokrin stimulierte, posttranskriptionelle Aktivierung von Smad2/3 und 4 in myofibroblastischen HSC für eine gegenüber der AP1-Aktivierung- zunehmenden Bedeutung des Smad-Signalweges in der Vermittlung der fibrogenen TGF β -Wirkung. Die Aktivierung von AP1, als einer der Zieltranskriptionsfaktoren der MAPK-Signalkaskaden, sowie die Analyse des differentiellen Expressionsmusters in ruhenden und myofibroblastischen HSC weisen dagegen auf eine frühe Stimulierung mitogener Signalwege hin. In Makro-Array-Analysen des Expressionsmusters von HSC in verschiedenen Stadien der myofibroblastischen Differenzierung wurde neben der bekannten Expression des mitogenen Faktors PDGF, auch die transiente Expression von neuronalen Faktoren wie Nerve Growth Factor (NGF) gezeigt.

Das differentielle Expressionsmuster von NGF in myofibroblastisch-aktivierten HSC wurde durch RNase-Protection-Assays und Realtime-PCR bestätigt. Neben NGF wird ebenfalls der NGF-Rezeptor TrkA in frühen Stadien der myofibroblastischen Differenzierung gebildet. Immunologische Ansätze und Kinase-Assays belegen die autokrine Stimulierung des Rezeptors TrkA durch NGF und die anschließende Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges, die zu einer Phosphorylierung der Kinasen, ERK 1 und 2, führt. Als Antwort auf eine andauernde NGF-Stimulierung, wird der durch NGF/TrkA eingeleitete Signalweg über die MAP-Kinasen in späteren Stadien der myofibroblastischen Differenzierung inhibiert. Die begrenzte Expression des apoptose-induzierenden NGF-Rezeptors p75NTR auf späte Stadien der myofibroblastischen HSC-Entwicklung ergänzt das Bild einer autokrinen Signalalteration von aktivierenden, mitogenen zu fibrogenen und apoptotischen Signalen.

Hepatic stellate cells (HSC) are regarded as one of the key cell types involved in the progression of

liver fibrosis. Transdifferentiation of HSC into a myofibroblastic cell type is the central mechanism of fibrogenesis.

For this reason, HSC were isolated from rats and the differential expression of genes from different stages of transdifferentiation was investigated. In addition important fibrogenic and mitogenic signal cascades were examined.

The fibrogenic mediator Transforming Growth Factor- β (TGF- β) is involved in the phenotypical alterations of HSC by induction of extracellular matrix protein synthesis and cytoskeletal changes. TGF- β initiates signalling through heteromeric complexes of type I and type II serine/threonine kinase receptors. Activated TGF- β receptor phosphorylates receptor regulated smad2/3 which then form complexes with the common-mediator smad4. This complex translocates into the nucleus, where they regulate the transcription of target genes.

As shown in the previous work smad proteins are synthesized in HSC. An increase in protein expression during HSC transdifferentiation could be observed by Western blotting and immunocytochemistry. Enhanced activation and translocation in myofibroblastic HSC could be demonstrated by autocrine TGF- β stimulation. In electrophoretic mobility shift assays the binding of an AP-1- and a smad-binding-element (SBE) could be shown. The AP-1-binding decreased during transdifferentiation whereas binding to SBE increased moderately. This shows the increasing importance of the smad-mediated-pathway in later stages of HSC differentiation. Determining the smad transcript level of HSC no transcriptional regulation of smad3 or smad4 could be shown. In conclusion the enhancement of smad2/3 and 4 protein synthesis and translocation during myofibroblastic transdifferentiation leads to the suggestion 1. that the smad-mediated signal transduction of TGF- β is involved in the progression of liver fibrogenesis and 2. that in myofibroblastic HSC the TGF- β signalling smad-pathway is activated by autocrine stimulated posttranslational modification of Smad2/3 and 4.

By macroarray analysis the altered expression of the mitogenic nerve growth factor (NGF) during myofibroblastic differentiation was identified. Since NGF mediates cellular processes like differentiation, proliferation and apoptosis by different receptors, the TrkA and the p75NTR, the receptor expression and signalling in HSC during myofibroblastic development was studied. For this reason isolated rat HSC and HSC induced to myofibroblastic differentiation by primary culture (1 to 10 days), were used for immunocytochemistry, RNA extraction and preparation of protein extracts. Transcript levels of NGF and its receptors were analysed by RNase- Protection-Assays and Real-Time-PCR. Protein and phosphorylation levels of signal transducers (TrkA, Erk 1 and 2, JNK) were investigated by immunoblotting or kinase assays. Neutralizing NGF antibodies were used for inhibition of autocrine NGF stimulation.

The p75NTR receptor, affecting apoptosis and cell proliferation, is expressed in late stages of myofibroblastic differentiation. In contrast, both, NGF and the TrkA receptor, are transiently synthesized in HSC upon early myofibroblastic activation, shown on protein and transcript level. Autocrine stimulation of the TrkA receptor results in activation of the MAPK pathway and in phosphorylation of Erk 1 and 2. In response to long term autocrine NGF stimulation, however, NGF/TrkA initiated MAPK signalling is inhibited. It was demonstrated that the loss of NGF mediated MAPK activation is attributed to the decrease of TrkA receptors upon autocrine NGF stimulation. In conclusion, the autocrine NGF stimulation takes part in early cellular HSC activation by TrkA stimulation of MAPK mediated signal transduction. TrkA induced signalling, however, is subject of a negative feedback regulation, which is suggested to an altered signal transduction in myofibroblastic HSC expressing the p75NTR receptor.