

**Effekte der Statine auf die kanonischen und nicht-kanonischen
Hedgehog Signalwege und auf die zirrhotische und die
nicht- zirrhotische portale Hypertonie**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Ganesh Ranabhat
aus Thuladihi / Nepal
2017

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Tilman Sauerbruch
2. Gutachter: Prof. Dr.med. Ulrich Töx

Tag der Mündlichen Prüfung: 06.12.2016

Aus der Klinik und Poliklinik der Innere Medizin I
Prof. Dr. med. Christian Strassburg

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis.....	4
2. Deutsche Zusammenfassung.....	6
2.1. Einleitung.....	6
2.2. Material und Methoden	7
2.3. Ergebnisse	11
2.4. Diskussion.....	13
2.5. Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung	17
3. Publikation	21
4. Danksagung	33

1. Abkürzungsverzeichnis

α -SMA	alpha smooth muscle actin
BDL	Gallengangsligatur
CCl ₄	Tetrachlorkohlenstoff
CD31+	cluster of differentiation 31+
Col 1a1	Kollagen typ 1
EC	Endotheliale Zelle
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
Gli-2	Gliom-assoziiertes Onkogen family zink finger 2
Hh	Hedgehog
Hhip	Hedgehog interacting protein
HSC	Hepatische Sternzellen
HVR	Hepatischer Gefäßwiderstand
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
Ihh	indian Hedgehog
MAP	Mittlerer Blutdruck
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
PHT	Portale Hypertonie
PP	Pfortaderdruck
PPVL	Partielle Pfortaderligatur
RT-PCR	Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
SEM	standard error of the mean
sFRP 1	secreted frizzled- related protein 1
Shh	sonic Hedgehog

VSMC Glatte Gefäßmuskelzellen

WT Wildtyp

Präambel

Diese Promotion wurde im Labor für Leberfibrose und Portale Hypertonie der Medizinischen Klinik und Poliklinik I, Universitätsklinikum Bonn, erstellt in Kooperation mit der Division for Gastroenterology, Department of Medicine, Duke University, Durham, USA und Institut für Zellbiologie, Universität Bonn. Sie wurde in der Zeitschrift Scientific Reports (Nature Publishing Group, IF 5,228) publiziert mit mir als Erstautor (geteilte Erstautorenschaft). Das Original der Arbeit findet sich im Kapitel 3 (ab Seite 21).

2. Deutsche Zusammenfassung

2.1. Einleitung

Chronische Leberschäden aktivieren Kollagen produzierende hepatische Sternzellen, die eine erhöhte Kontraktion zeigen (Friedman et al., 2008). Fibrose und die erhöhte Kontraktilität der kontraktilen Zellen führen zur portalen Hypertonie und Komplikationen (Sanyal et al., 2008). Zusätzlich ist eine Neoangiogenese als ein entscheidender Faktor in der Progression von Fibrose zur Zirrhose mit portaler Hypertonie identifiziert worden (Bosch et al., 2000). Neoangiogenese findet in der erkrankten Leber und im splanchnischen Gefäßbett statt. Die extrahepatische Angiogenese führt zu einem erhöhten Pfortaderfluss und zur Steigerung des Pfortaderdrucks. Der Pfortaderdruck wiederum führt zur Eröffnung der venösen Kollateralen mit konsekutiven Blutungen (Bosch et al., 2000), (Van de Casteele M et al., 2001), (Groszmann et al., 2005). Interessanterweise findet eine extrahepatische Angiogenese auch ohne Zirrhose statt, zum Beispiel durch eine Pfortaderobstruktion oder bei einer Thrombose. Bisher ist es schwierig, zwischen zirrhotischer und nicht-zirrhotischer portal hypertensiver Angiogenese zu unterscheiden.

Von Statinen ist bekannt, dass sie, u.a. durch eine Hemmung des RhoA/Rho-Kinase-Signalwegs, in den myofibroblastischen hepatischen Sternzellen (HSC) die Fibrose in Tieren und Menschen reduzieren und so die portale Hypertonie senken (Abralde et al., 2009), (Laufs et al., 1998), (Laufs et al., 1999), (Rikitake et al., 2005), (Trebicka et al., 2007), (Trebicka et al., 2008). Der RhoA/Rho-Kinase Signalweg spielt auch eine Rolle im nicht-kanonischen-Hedgehog Signalweg (Hh) (Yang et al., 2008). Dieser Crosstalk

zwischen der RhoA/Rho-Kinase und dem Hedgehog Signalweg ist wahrscheinlich durch Shh vermittelt und unabhängig von Gli-2.

Parallel zu diesen Mechanismen wird der kanonische-Hedgehog Signalweg (Hh) durch den Leberschaden aktiviert. In diesem Signalweg wird ein membranständiges Protein, Smoothed, von einem Zelloberflächenrezeptor, Patched-1, inhibiert. Durch Bindung des Hh-Liganden an Patched-1 kommt es zur Translokation des Smoothed und dadurch zur Aktivierung der Gli-Transkriptionsfaktoren. Diese führen zur Transkription der nachgeschalteten Zielgene, die die HSC aktivieren und das Überleben der fibrogenetischen und kontraktile Zellen aufrechterhalten (Beachy et al., 2012), (Omenetti et al., 2011), (Choi et al., 2010), (Jung et al., 2010), (Omenetti et al., 2011), (Omenetti et al., 2007), (Yang et al., 2008). Es wurde beschrieben, dass die Hh-Aktivität durch eine Statin-Behandlung reduziert werden kann (Beachy et al., 1997), (Cooper et al., 1998). Jedoch, es ist unklar, wie Statine mit dem kanonischen oder mit dem nicht-kanonischen-Hh Signalweg interferieren. Weiterhin ist dessen Rolle bei durch portale Hypertonie induzierter Angiogenese nicht beschrieben. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit der pathophysiologische Unterschied in der Angiogenese der zirrhotischen und nicht-zirrhotischen portalen Hypertonie, die Effekte von Statin in der Angiogenese der zirrhotischen und der nicht-zirrhotischen portalen Hypertonie, sowie deren Rolle im kanonischen und nicht-kanonischen-Hh Signalweg in der portalen Hypertonie untersucht.

2.2. Material und Methoden

Tiere. 55 Ratten (Sprague Dawley Wildtyp (WT)) wurden in unseren Experimenten verwendet. Das zuständige Gremium für Tierstudien in Nordrhein-Westfalen hat die Studien genehmigt (LANUV 8.87-50.10.31.08.287). Sprague Dawley Ratten wurden in eine kontrollierte Atmosphäre gebracht (12 Stunden Licht/Dunkel, Temperatur 22°C bis 24°C), und mit dem üblichen Ratten- Futter versorgt (Ssniff, Soest, Germany).

Modell der zirrhotischen portalen Hypertonie

Cholestatisches Modell der Zirrhose: Gallengangsligaturen (BDL) wurden in neuen WT Ratten mit einem initialen Körpergewicht (KG) von 180-200 g (Trebicka et al., 2010), (Trebicka et al., 2009) durchgeführt. Die Versuche wurden sechs Wochen nach der BDL durchgeführt. 8 Sham-operierte Ratten dienten als Kontrollgruppe. 5 Ratten mit der BDL

erhielten an den letzten sieben Tagen vor der Tötung Atorvastatin (15 mg/Kg KG pro Tag) (Trebicka et al., 2007).

Toxisches Modell der Zirrhose: 20 Ratten mit einem initialen KG von 100-120 g erhielten zweimal wöchentlich eine Inhalation mit 1 Liter/min CCl₄ für 16 Wochen, also bis zur Entwicklung des Aszites als Zeichen der portalen Hypertonie (Trebicka et al., 2009). Davon erhielten 7 Ratten an den letzten sieben Tagen vor der Tötung Atorvastatin (15 mg/Kg KG pro Tag).

Modell der nicht-zirrhatischen portalen Hypertonie

Partielle Pfortaderligatur (PPVL). PPVL wurden in 18 WT Ratten mit einem initialen KG von 180-200 g durchgeführt (Resch et al., 2009), (Wiest et al. 1999). Die Versuche wurden zwei Wochen nach der PPVL durchgeführt. Sieben Ratten erhielten an den letzten sieben Tagen vor der Tötung Atorvastatin (15 mg/kg KG pro Tag) (Resch et al., 2009), (Wiest et al., 1999).

Erfassung der portalen Hypertonie und Angiogenese in vivo

Hämodynamische Messungen in vivo. In vivo wurden Studien an 11 WT PPVL Ratten, 13 WT CCL₄ Ratten und 9 WT BDL Ratten und deren Kontrollgruppen (jeweils n= 11, 13 und 9) durchgeführt. Die Ratten wurden für die hämodynamische Studien wie zuvor beschrieben verwendet (Grace et al., 2013). Zur Abschätzung der Effekte von Atorvastatin erfolgten in den zirrhatischen Ratten die invasive Messung des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP) und des Pfortaderdrucks (PP).

Matrigel Angiogenese Assay. Zur Untersuchung der Angiogenese in zirrhatischer und nicht-zirrhatischer portaler Hypertonie wurde je 1ml Matrigel subkutan und intraperitoneal implantiert. Das Matrigel wurde immunhistochemisch für endotheliale Zellen (EC) mit dem Antikörper gegen CD31+ und für glatte Gefäßmuskelzellen (VSMC) mit dem Antikörper gegen α -SMA eingefärbt.

Microsphäre Technik. Zur Untersuchung der Hämodynamik wurde die gefärbte Mikrosphärentechnik, wie zuvor beschrieben durchgeführt (Grace et al., 2013). 300.000 systemische (rote) Microsphären (15 μ m Durchmesser, Triton-Technologie, San Diego, USA) wurden in den linken Ventrikel injiziert. Das mesenteriale portosystemische

Shuntvolumen wurde durch die Injektion der 150.000 Mikrosphären (gelb) in den ileocaecal Venen gemessen (Grace et al., 2013).

Humane Leberprobe. Das Ethikkomitee der Universität Bonn (202/01) genehmigte die Verwendung von humanen Lebern und Arteriae hepaticae, die während der Lebertransplantation von den Patienten mit alkoholinduzierter Leberzirrhose entnommen worden waren (n=5). Als Kontrollgruppe dienten die Leber und die Arteria hepatica-Proben von nicht-zirrhatischen Patienten, die bei einer Leberresektion entnommen worden waren (n=5). Keiner der Patienten oder Spender erhielten Kathecholamine, ACE-Hemmer oder Angiotensin-Rezeptor-Antagonisten vor der Transplantation (Trebicka et al., 2009). Die Proben wurden nach der Exzision sofort gefroren.

Western Blotting Die Leberproben wurden mit der Verwendung von SDS-PAGE Gele sowie nitrozellulosen Membranen bearbeitet. Ponceau-S Einfärbung ermöglichte gleichmäßige Proteinbeladung. GAPDH diente als endogene Kontrolle. Die Membranen wurden mit den primären und den dazugehörigen sekundären Peroxidase-gekoppelten Antikörper inkubiert (Santa-Cruz-Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Nach verstärkter Chemilumineszenz (ECL, Amersham, UK) wurde die digitale Detektion unter Verwendung von Chemi-Smart evaluiert (PeqLab, Biotechnologies, Erlangen, Germany).

Quantitative RT-PCR Die Isolierung der RNA, Reverse Transkription sowie die Detektion bei RT-PCR wurden wie zuvor beschrieben durchgeführt (Trebicka et al., 2007), (Trebicka et al., 2009). Assays wurden von der Firma Applied Biosystems (Foster City, USA) bereitgestellt. 18S rRNA diente als endogene Kontrolle.

Immunhistochemische Einfärbung der CD 31+ and α -SMA. Die Einfärbung der CD 31+ und α -SMA wurden in den Cryoschnitten der Lebergewebe sowie auf Matrigel (3 und 7 μ m dick) durchgeführt (Trebicka et al., 2011), (Huss et al., 2010), (Trebicka et al., 2014). Die Cryoschnitte wurden nach mehreren Stufen mit dem mouse-anti-SMA-Antikörper (clone 1A4; Sigma-Aldrich, Munich, Germany), oder mit dem Antikörper gegen CD31+ (ab 24590, Abcam, Cambrigde, UK) inkubiert. Danach wurde ein biotinylierte rabbit-anti-mouse secondary antibody (Dako, Glostrup, Denmark) verwendet.

In vitro Techniken

Isolation der Sternzellen HSC. Die Sternzellen wurden in einer zweistufigen Pronase-Kollagenase- Perfusion von der Leber der WT Ratten isoliert und bei der Dichtegradienten-Zentrifugation fraktioniert (Trebicka et al., 2009), (Wojtalla et al., 2012). Die Funktionsfähigkeit und Reinheit waren systematisch über 95 %. Die Zellen wurden in eine unbeschichtete Kulturschale eingebracht. Die Versuche wurden sieben Tagen nach der Isolation oder nach der ersten Passage (10 Tagen), durchgeführt.

Inkubation mit Atorvastatin. Entweder Atorvastatin (10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M) wurde zum Kulturmedium dieser Zellen für drei Tagen zugefügt oder die Zellen blieben unbehandelt.

Scratch Assay. Zur Beobachtung der Zellmigration wurde ein scratch Assay durchgeführt (Laufs et al., 1998). Die Zellen wurden in einer 24-well Scheibe kultiviert. Ein Spalt wurde durch die Zellen mit der Spitze einer Pipetten (1mm) gezogen. Am Anfang und zu einem definierten Zeitpunkt wurden Bilder aufgenommen (Nikon, Eclipse 50i) und die Spaltweite wurde unter Verwendung von der Software NIS Elements D 3.2 (Zeiss, Germany) gemessen.

Tube Formation Assay. Zur Evaluation der in vitro Effekte von Atorvastatin auf EC wurde ein Tube Formation Assay durchgeführt. Eine 24-well Scheibe wurde mit 300 μ l Matrigel, der 10 ng/ml VEGF enthält, beschichtet. Nach 24 Stunden wurden $2,5 \times 10^4$ endotheliale Zellen in 75 μ l Medium (Endothelia Cell Growth Medium + Supplemental Mix, PromoCell, Heidelberg, Cat.Nr. C-22010) auf jede Scheibe gegeben. Interzelluläre Verbindungen und die Tube Formation wurden unter Verwendung einer Nikon, Eclipse 50i Mikroskop mit 100 facher Vergrößerung gezählt.

Statistische Analyse. Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM, sofern nicht anders angegeben, dokumentiert. Die Daten wurden unter Verwendung von Student unpaaren und paaren t-Test analysiert. Die statistische Analyse und graphische Darstellung wurden unter Verwendung von Graph Pad Prism 4.0 für Macintosh durchgeführt.

$P < 0.05$ wurde als statistisch signifikant berücksichtigt.

2.3. Ergebnisse

Die Hämodynamik ändert sich in den Ratten mit portaler Hypertonie nach Behandlung mit einem Statin

Wir haben zwei Tiermodelle der zirrhotischen portalen Hypertonie (BDL, CCL₄-Intoxikation) mit der nicht-zirrhotischen portalen Hypertonie (PPVL) verglichen. Alle Tiere erhielten eine Woche vor der Tötung entweder Atorvastatin oder Placebo. Atorvastatin reduzierte im Vergleich zu unbehandelten Tieren den Pfortaderdruck in zirrhotischen CCl₄-intoxikierten Ratten, aufgrund der signifikanten Abnahme des hepatischen Gefäßwiderstandes. Der splanchnische und systemische Gefäßwiderstand blieb nach der Behandlung unverändert. Ferner wurde der Shunt-Fluss signifikant reduziert, der Cardiac-Output etwas erhöht. Dagegen erhöhte sich der Pfortaderdruck im Vergleich zu unbehandelten PPVL-Ratten trotz des niedrigen hepatischen splanchnischen Widerstands in den nicht-zirrhotischen PPVL-Ratten. Dieses war von einer signifikanten Abnahme des splanchnischen und systemischen Gefäßwiderstands begleitet. Die Behandlung mit Atorvastatin führte im Vergleich zu unbehandelten PPVL-Ratten zur dramatischen Zunahme des Shunt-Flusses sowie des Cardiac-Outputs in den PPVL-Ratten.

Angiogenese Assays in vivo

Durch die Behandlung mit Atorvastatin kam es zur Abnahme der Aussprossung neuer Gefäße im Matrigel bei den Ratten mit zirrhotischen portalen Hypertonie (BDL/CCL₄) und zur Zunahme bei den Ratten ohne zirrhotischen portalen Hypertonie (PPVL). Interessanterweise reduzierte Atorvastatin ebenfalls die subkutane Migration der VSMC in den Sham-Ratten. Dagegen führte die Behandlung mit Atorvastatin zur vermehrten intraperitonealen Migration von VSMC und EC im Matrigel in PPVL-Ratten. Desweiteren kam es zur verstärkten subcutanen Migration der EC (CD 31+) im Matrigel in den mit Atorvastatin behandelten PPVL-Ratten, jedoch blieb die Migration der VSMC (α -SMA) unverändert.

Aufgrund der Verminderung der Angiogenese bei den Ratten mit Zirrhose nach der Behandlung mit Atorvastatin und wegen der Zunahme der Angiogenese bei Ratten ohne Zirrhose mit portaler Hypertonie nach der Behandlung untersuchten wir die Rolle des kanonischen und des nicht-kanonischen Signalwegs in den extrahepatischen Gefäßen.

Hh-Signalweg und profibrotische Marker in Menschen und Ratten mit portaler Hypertonie

In Leberbiopsien von Patienten mit Leberzirrhose zeigte sich eine vermehrte Expression der Hh-Komponente, Shh und Gli-2-Protein. In gleicher Weise zeigte sich eine signifikante Hochregulation der Shh- und Gli-2-mRNA in zirrhotisch veränderter Leber. Nach Behandlung mit Atorvastatin kam es zum signifikanten Abfall dieser Proteine in diesen Lebern (BDL, CCL₄). Ebenfalls reduzierte sich die mRNA der profibrotischen Marker α -SMA, Collagen-1, sowie Vimentin nach der Behandlung mit Atorvastatin in dieser Gruppe (BDL und CCL₄).

Dagegen zeigte sich eine signifikante Zunahme der Shh-mRNA in PPVL-Ratten. Ferner kam es zur signifikanten Hochregulation der Gli-2-mRNA in mit Atorvastatin behandelten PPVL-Ratten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die mRNA der Hhip, einem Hh-Inhibitor war in PPVL-Ratten signifikant herunterreguliert und sFRP1, ein nachgeschaltetes Zielprotein von Gli-2, war nach der Behandlung signifikant hochreguliert. Zusätzlich blieben die α -SMA, Collagen-1 und Vimentin unverändert.

Damit ist der Hh Signalweg bei Leberzirrhose hochreguliert und eine Behandlung mit Atorvastatin hemmt diesen Signalweg. Dagegen ist bei PPVL-Ratten dieser Signalweg durch Atorvastatin verstärkt.

In vitro Analyse der Sternzellen HSC und human LX-2 Zellen

Diese Zellen sind hauptsächlich bei Fibrose und portaler Hypertonie involviert. Primäre hepatische Sternzellen der Ratten wurden mit unterschiedlicher Dosis von Atorvastatin (10^{-4} M, 10^{-5} M and 10^{-6} M) in vitro inkubiert. Interessanterweise kam es bei der Inkubation mit Atorvastatin zur signifikanten Abnahme der Migration der HSC. Die mRNA der profibrotischen Marker α -SMA und Collagen-1 war nach der Behandlung mit Atorvastatin in primären HSC signifikant herunterreguliert. Atorvastatin induzierte eine signifikante Abnahme der Shh und s-FRP1 in primären HSC.

Zur Differenzierung zwischen den kanonischen und den nicht-kanonischen Hh Signalwegen untersuchten wir den Effekt von Statinen auf den RhoA/Rho-Kinase-Signalweg in den aktivierten HSC. Humane LX-2-Zellen zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe nach der Transfektion mit RhoA-Plasmid eine signifikante Expression der

Proteine und der mRNA der Shh. Die Gli-2 Expression blieb unverändert. Die Inkubation mit Cyclopamin, einem Inhibitor des kanonischen Hh Signalwegs, machte diesen Effekt rückgängig.

Die angiogenetische und profibrotische Wirkung der aktivierten HSC sowie des Hh Signalweges sind durch Statine vermindert. Diese Effekte sind vor allem auf den nicht-kanonischen Signalweg zurückzuführen, wo Gli-2 Expression nicht signifikant reduziert und Shh Expression durch konsekutiv aktivierte RhoA hochreguliert ist.

Analyse des Hedgehog Signalwegs in den extrahepatischen Gefäße

Wir analysierten die Expression des Hh Signalwegs in Arteriae hepaticae gesunder Menschen und bei Patienten mit Leberzirrhose. Es zeigte sich eine signifikante Hochregulation des nicht-kanonischen Hh (Shh) in der arteria hepatica bei Patienten mit Zirrhose im Vergleich zum Gesunden. Dagegen blieb Gli-2-mRNA unverändert, wahrscheinlich durch die Aktivierung des nicht-kanonischen Hh Signalwegs. Unveränderte Gli-2 Expression deutet darauf hin, dass der kanonische Signalweg durch die Behandlung mit Atorvastatin unverändert blieb. Interessanterweise kam es zur Hochregulation (intraperitoneal und subkutan implantierte Matrigel) des kanonischen Hh Signalweges (Gli-2) in PPVL-Ratten, die mit Atorvastatin behandelt waren. Die Migration der VSMC in vitro war durch Atorvastatin verhindert. Die Inhibition des kanonischen Hh Signalwegs unter Cyclopamin hatte keinen Einfluss auf die Migration des VSMC in vitro. Dagegen bildeten HUVEC-Zellen signifikant mehr Tuben nach Inkubation mit Atorvastatin in vitro.

In Zusammenschau deuten diese Daten auf eine größere Rolle der Shh/RhoA Signalwege bei extrahepatischer Angiogenese und Leberzirrhose, wobei Gli-2 ein wichtiger Mediator des kanonischen-Hh Signalwegs bei Ratten ohne Zirrhose mit portaler Hypertonie zu sein scheint.

2.4. Diskussion

Diese Studie zeigt zum ersten Mal, dass die Mechanismen der Neoangiogenese bei portaler Hypertonie mit und ohne Leberzirrhose unterschiedlich sind und eine Therapie mit einem Statin die Neoangiogenese bei Leberzirrhose wahrscheinlich durch die Inhibition des nicht-kanonischen Hedgehog Signalwegs hemmt. Außerdem steigern

Statine bei portaler Hypertonie ohne Zirrhose die splanchnische und systematische Angiogenese durch die erhöhte Aktivität des kanonischen-Hedgehog Signalwegs.

Frühere Studien konnte zeigen, dass die Behandlung mit Atorvastatin bei BDL-Ratten mit Zirrhose und portaler Hypertonie den Pfortaderdruck senkt sowie die Fibrogenese signifikant vermindert (Trebicka et al., 2007), (Trebicka et al., 2010). Außerdem konnten Statine die Proliferation sowie die Apoptose inhibieren und die zelluläre Seneszenz in den hepatischen Myofibroblasten induzieren (Klein et al., 2012). Unsere aktuelle Studie bestätigte diese Ergebnisse im zweiten Modell der Fibrose (CCl₄-Intoxikation), auch in der CCl₄ induzierten Zirrhose, denn die Fibrosemarker α -SMA and Collagen-1 waren nach der Behandlung mit Statinen reduziert.

Die Hedgehog Signalweg Aktivierung wurde schon früher als eine Ursache der Aktivierung der hepatischen Sternzellen identifiziert, die zur Kontraktion und Produktion extrazellulärer Matrix führt (Choi et al., 2009). Tatsächlich zeigt diese aktuelle Studie ganz klar die Hochregulation des Hedgehog Signalwegs, assoziiert mit einer Progression der Leberfibrose. Ferner konnte die Statin-Behandlung die Aktivität des Hedgehog Signalwegs beim Leberzirrhose-Tiermodell und bei aktivierten HSC in vitro herabsetzen. Als Mechanismus kommt die Hemmung der nicht-kanonische Hh Aktivierung über RhoA/Rho-kinase in Frage, da Atorvastatin die RhoA/Rho-Kinase hemmt. Diese Hypothese wird bekräftigt durch unsere RhoA-Überexpressionsexperimente in HSC. Neben diesem Mechanismus könnte auch die direkte Hemmung des kanonischen Hh, gezeigt durch die Gli-2 Herabregulation in Lebern mit Zirrhose, eine zusätzliche Wirkung haben. (Trebicka et al., 2007), (Trebicka et al., 2010), (Klein et al., 2012)

Statine hemmten nicht nur die Fibrose, sondern verminderten auch die hepatische Vasokonstriktion bei den zirrhotischen BDL und CCl₄-intoxikierten Ratten. (Trebicka et al., 2007), (Abralde et al., 2007). Ähnlich wie in früher publizierten Untersuchungen unserer und anderer Gruppen fanden wir eine signifikante Abnahme des Pfortaderdrucks bei den BDL-Ratten und einen reduzierten Pfortaderdruck bei den CCl₄-intoxikierten Ratten, die mit Atorvastatin behandelt waren (Trebicka et al., 2007), (Abralde et al., 2007). Dieser Unterschied war auf das aggressivere cholestatische BDL-Modell zurückzuführen.

Es ist bekannt, dass die portale Hypertonie zur Zunahme der splanchnischen Neoangiogenese und damit zur Verstärkung des portosystemischen Shunts führt (Bosch et al., 2000). Unsere aktuelle Studie hat nicht nur die früheren Untersuchungsergebnisse der BDL-Ratten bestätigt, dass die Behandlung mit Atorvastatin den hepatischen Shunt-Fluss reduziert, sondern erweitert diese Befunde auch noch um das CCl₄-Modell (Trebicka et al., 2007). Fasst man die früheren und aktuellen Ergebnisse zusammen, so zeigen die beiden Zirrhose-Modelle an Ratten, dass die Behandlung mit Atorvastatin die Fibrogenese, den hepatischen Widerstand sowie den Shunt-Fluss erniedrigt.

Zudem reduzierten Statine die Neoangiogenese im Splanchnicusgebiet. Die verminderte splanchnische Neovaskularisation der mit Statin behandelten Tiere und Zirrhose könnte auf antifibrotische sowie auf Pfortaderdruck senkende Effekte von Atorvastatin zurückzuführen sein. Die Scherspannung in der splanchnischen Strombahn wird reduziert und dadurch wird ein wichtiger Faktor der Angiogenese bei der portalen Hypertonie gehemmt. D.h., unsere Ergebnisse sind nicht nur auf die Senkung des portalen Hypertonus zurückzuführen. Auch der antiangiogenetischer Effekt von Statinen, wahrscheinlich vermittelt durch den Hedgehog Signalweg, spielt eine Rolle. Dies bestätigt Befunde bei der Tumovaskularisation sowie beim Remodelling erkrankter Lebern (Xie et al., 2013), (Pola et al., 2001), (Pinter et al., 2013). Wahrscheinlich beeinflusst die reduzierte Aktivität des Hedgehog Signalwegs in den zirrotischen Lebern die splanchnische Angiogenese. Interessanterweise sind - wie bei den Ratten - auch in humanen Lebern mit Zirrhose die Hedgehog Liganden, jedoch nicht die Effektor Gli-2, hochreguliert. Eine mögliche Erklärung könnte in der Hemmung der zirkulierenden proangiogenetischen Hedgehog Komponenten liegen. Sie sind generell bei Leberzirrhose hochreguliert.

Die Behandlung der portal hypertensiven Ratten ohne Zirrhose mit Statinen führt zu überraschenden und gegensätzlichen Ergebnissen. Atorvastatin steigert sowohl den Pfortaderdruck als auch den Shunt-Fluss in diesem Modell. Diese Effekte sind wahrscheinlich auf eine stark hochregulierte Neoangiogenese durch Statine in den peritonealen sowie in den subkutanen Gefäßen der nicht-zirrotischen portal hypertensiven Ratten, zurückzuführen. Auf der anderen Seite führt die Behandlung mit Statinen zu einer Verstärkung der Aktivität des Hedgehog Signalwegs in den

splanchnischen und den systemischen Gefäßen bei den PPVL-Ratten. Bei Leberzirrhose können möglicherweise durch die hepatische Fibrose und Entzündung verschiedene Cytokine und Chemokine in der Zirkulation abgegeben werden und diese dann die extrahepatischen Gefäßveränderungen hervorrufen. Wenn aber Statine das Fortschreiten der Leberzirrhose und auch die obengenannten Prozesse vermindern, könnten im Umkehrschluss Statine ebenfalls die extrahepatischen Veränderungen in der Leberzirrhose verbessern. Im Gegensatz dazu sind bei PPVL-Ratten die Lebern nicht zirrhotisch und dadurch fehlen die hepatischen Effekte der Statine. Dies mag eine mögliche Erklärung dafür sein, dass Atorvastatin einen negativen Effekt in PPVL-Ratten hat. Diese Studie zeigt zum ersten Mal, dass sich die molekularen Mechanismen bezüglich der Angiogenese bei Tieren mit und ohne Zirrhose und portaler Hypertonie signifikant unterscheiden.

Die klinische Relevanz dieser Studie könnte zur breiteren Verwendung von Statinen bei der Behandlung von Leberzirrhose und portaler Hypertonie führen, (Abralde et al., 2009), (Zafra et al., 2004). Unsere Daten liefern eine weitere Evidenz für die Verwendung von Statinen bei Zirrhose. Hingegen ist Vorsicht geboten bei ihrer Anwendung in der Situation einer portalen Hypertonie ohne Zirrhose. Um die unterschiedlichen zellulären Mechanismen in der Regulation der Angiogenese bei zirrhotischer und nicht-zirrhotischer portaler Hypertonie besser zu untersuchen, sollten weitere Studien durchgeführt werden.

2.5. Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung

Abraldes J G, Albillos A, Bañares R, et al. Simvastatin lowers portal pressure in patients with cirrhosis and portal hypertension: a randomized controlled trial. *Gastroenterology*. 2009; 136: 1651–1658

Abraldes J G, Rodríguez-Vilarrupla A, Graupera M, et al. Simvastatin treatment improves liver sinusoidal endothelial dysfunction in CCl₄ cirrhotic rats. *J. Hepatol*. 2007; 46: 1040–1046

Beachy P A, Cooper M K, Young K E, et al. Multiple roles of cholesterol in hedgehog protein biogenesis and signaling. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol*. 1997; 62: 191–204

Beachy P A, Hymowitz S G, Lazarus R A, Leahy D J, Siebold C. Interactions between Hedgehog proteins and their binding partners come into view. *Genes Dev*. 2010; 24: 2001–2012

Bosch J, García-Pagán J C. Complications of cirrhosis. I. Portal hypertension. *J. Hepatol*. 2000; 32: 141–156

Choi S S, Omenetti A, Witek R P, et al. Hedgehog pathway activation and epithelial-to-mesenchymal transitions during myofibroblastic transformation of rat hepatic cells in culture and cirrhosis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*. 2009; 297: G1093–1106

Choi S S, Syn W-K, Karaca G F, et al. Leptin promotes the myofibroblastic phenotype in hepatic stellate cells by activating the hedgehog pathway. *J. Biol. Chem*. 2010; 285: 36551–36560

Cooper M K, Porter J A, Young K E, Beachy P A. Teratogen-mediated inhibition of target tissue response to Shh signaling. *Science*. 1998; 280: 1603–1607

Friedman S L. Mechanisms of Hepatic Fibrogenesis. *Gastroenterology*. 2008; 134: 1655–1669

Grace J A, Klein S, Herath C B, et al. Activation of the MAS receptor by angiotensin - (1-7) in the renin-angiotensin system mediates mesenteric vasodilatation in cirrhosis. *Gastroenterology*. 2013; 145: 874–884.e5

Groszmann R J, Abraldes J G. Portal hypertension: from bedside to bench. *J. Clin. Gastroenterol*. 2005; 39: S125–130

Huss S, Schmitz J, Goltz D, et al. Development and evaluation of an open source Delphi-based software for morphometric quantification of liver fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2010; 3: 10

Jung Y, Witek R P, Syn W-K, et al. Signals from dying hepatocytes trigger growth of liver progenitors. *Gut*. 2010; 59: 655–665

Klein S, Klösel J, Schierwagen R, et al. Atorvastatin inhibits proliferation and apoptosis, but induces senescence in hepatic myofibroblasts and thereby attenuates hepatic fibrosis in rats. *Lab. Invest*. 2012; 92: 1440–1450

Laufs U, Liao J K. Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *J. Biol. Chem*. 1998; 273: 24266–24271

Laufs U, Marra D, Node K, Liao J K. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors attenuate vascular smooth muscle proliferation by preventing rho GTPase-induced down-regulation of p27(Kip1). *J. Biol. Chem*. 1999; 274: 21926–21931

Omenetti A, Choi S, Michelotti G, Diehl A M. Hedgehog signaling in the liver. *J. Hepatol*. 2011; 54: 366–373

Omenetti A, Diehl A M. Hedgehog signaling in cholangiocytes. *Curr. Opin. Gastroenterol*. 2011; 27: 268–275

Omenetti A, Yang L, Li Y-X, et al. Hedgehog-mediated mesenchymal-epithelial interactions modulate hepatic response to bile duct ligation. *Lab. Invest*. 2007; 87: 499–514

Pinter M, Sieghart W, Schmid M, et al. Hedgehog inhibition reduces angiogenesis by downregulation of tumoral VEGF-A expression in hepatocellular carcinoma. *United European Gastroenterol J.* 2013; 1: 265–275

Pola R, Ling L E, Silver M, et al. The morphogen Sonic hedgehog is an indirect angiogenic agent upregulating two families of angiogenic growth factors. *Nat. Med.* 2001; 7: 706–711

Resch M, Wiest R, Moleda L, et al. Alterations in mechanical properties of mesenteric resistance arteries in experimental portal hypertension. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2009; 297: G849–857

Rikitake Y, Liao J K. Rho GTPases, statins, and nitric oxide. *Circ. Res.* 2005; 97: 1232–1235

Sanyal A J, Bosch J, Blei A, Arroyo V. Portal hypertension and its complications. *Gastroenterology.* 2008; 134: 1715–1728

Trebicka J, Hennenberg M, Laleman W, et al. Atorvastatin lowers portal pressure in cirrhotic rats by inhibition of RhoA/Rho-kinase and activation of endothelial nitric oxide synthase. *Hepatology.* 2007; 46: 242–253

Trebicka J, Hennenberg M, Odenthal M, et al. Atorvastatin attenuates hepatic fibrosis in rats after bile duct ligation via decreased turnover of hepatic stellate cells. *J. Hepatol.* 2010; 53: 702–712

Trebicka J, Hennenberg M, Schulze Pröbsting A, et al. Role of β 3-adrenoceptors for intrahepatic resistance and portal hypertension in liver cirrhosis. *Hepatology.* 2009; 50: 1924–1935

Trebicka J, Racz I, Siegmund S V, et al. Role of cannabinoid receptors in alcoholic hepatic injury: steatosis and fibrogenesis are increased in CB2 receptor-deficient mice and decreased in CB1 receptor knockouts. *Liver Int.* 2011; 31: 860–870

Trebicka J, Wix C, von Heydebrand M, et al. Expression of vasoactive proteins in gastric antral mucosa reflects vascular dysfunction in patients with cirrhosis and portal hypertension. *Liver Int.* 2014; doi: 10.1111/liv.12613

Van de Casteele M, Sägeser H, Zimmermann H, Reichen J. Characterisation of portal hypertension models by microspheres in anaesthetised rats: a comparison of liver flow. *Pharmacol. Ther.* 2001; 90: 35–43

Wiest R, Das S, Cadelina G, et al. Bacterial translocation in cirrhotic rats stimulates eNOS-derived NO production and impairs mesenteric vascular contractility. *J. Clin. Invest.* 1999; 104: 1223–1233


Wojtalla A, Herweck F, Granzow M, et al. The endocannabinoid N-arachidonoyl dopamine (NADA) selectively induces oxidative stress-mediated cell death in hepatic stellate cells but not in hepatocytes. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2012; 302: G873–887

Xie G, Choi S S, Syn W-K, et al. Hedgehog signalling regulates liver sinusoidal endothelial cell capillarisation. *Gut.* 2013; 62: 299–309

Yang L, Wang Y, Mao H, et al. Sonic hedgehog is an autocrine viability factor for myofibroblastic hepatic stellate cells. *J. Hepatol.* 2008; 48: 98–106

Zafra C, Abraldes J G, Turnes J, et al. Simvastatin enhances hepatic nitric oxide production and decreases the hepatic vascular tone in patients with cirrhosis. *Gastroenterology.* 2004; 126: 749–755

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

Statins activate the canonical hedgehog-signaling and aggravate non-cirrhotic portal hypertension, but inhibit the non-canonical hedgehog signaling and cirrhotic portal hypertension

Received: 18 February 2015
Accepted: 01 September 2015
Published: 28 September 2015

Frank E. Uschner^{1,*}, Ganesh Ranabhat^{1,*}, Steve S. Choi², Michaela Granzow¹, Sabine Klein¹, Robert Schierwagen¹, Esther Raskopf², Sebastian Gautsch¹, Peter F. M. van der Ven³, Dieter O. Fürst³, Christian P. Strassburg¹, Tilman Sauerbruch¹, Anna Mae Diehl² & Jonel Trebicka¹

Liver cirrhosis but also portal vein obstruction cause portal hypertension (PHT) and angiogenesis. This study investigated the differences of angiogenesis in cirrhotic and non-cirrhotic PHT with special emphasis on the canonical (Shh/Gli) and non-canonical (Shh/RhoA) hedgehog pathway. Cirrhotic (bile duct ligation/BDL; CCl₄ intoxication) and non-cirrhotic (partial portal vein ligation/PPVL) rats received either atorvastatin (15 mg/kg; 7d) or control chow before sacrifice. Invasive hemodynamic measurement and Matrigel implantation assessed angiogenesis *in vivo*. Angiogenesis *in vitro* was analysed using migration and tube formation assay. In liver and vessel samples from animals and humans, transcript expression was analyzed using RT-PCR and protein expression using Western blot. Atorvastatin decreased portal pressure, shunt flow and angiogenesis in cirrhosis, whereas atorvastatin increased these parameters in PPVL rats. Non-canonical Hh was upregulated in experimental and human liver cirrhosis and was blunted by atorvastatin. Moreover, atorvastatin blocked the non-canonical Hh-pathway RhoA dependently in activated hepatic stellate cells (HSCs). Interestingly, hepatic and extrahepatic Hh-pathway was enhanced in PPVL rats, which resulted in increased angiogenesis. In summary, statins caused contrary effects in cirrhotic and non-cirrhotic portal hypertension. Atorvastatin inhibited the non-canonical Hh-pathway and angiogenesis in cirrhosis. In portal vein obstruction, statins enhanced the canonical Hh-pathway and aggravated PHT and angiogenesis.

Chronic liver injury activates hepatic stellate cells (HSCs), which produce collagen and show increased contraction¹. Fibrosis and increased contraction of contractile cells lead to portal hypertension and complications². Additionally, neo-angiogenesis has been identified as a key mechanism in the progression of liver cirrhosis with portal hypertension³. Neo-angiogenesis occurs within the diseased liver and in the

¹Department of Internal Medicine I, University of Bonn, Germany. ²Division of Gastroenterology, Department of Medicine, Duke University Medical Center, Durham, North Carolina, USA. ³Institute for Cell Biology, University of Bonn, Germany. *These authors contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to J.T. (email: jonel.trebicka@ukb.uni-bonn.de)

Simplified canonical and non-canonical hedgehog pathway and their potential implication in portal hypertension.

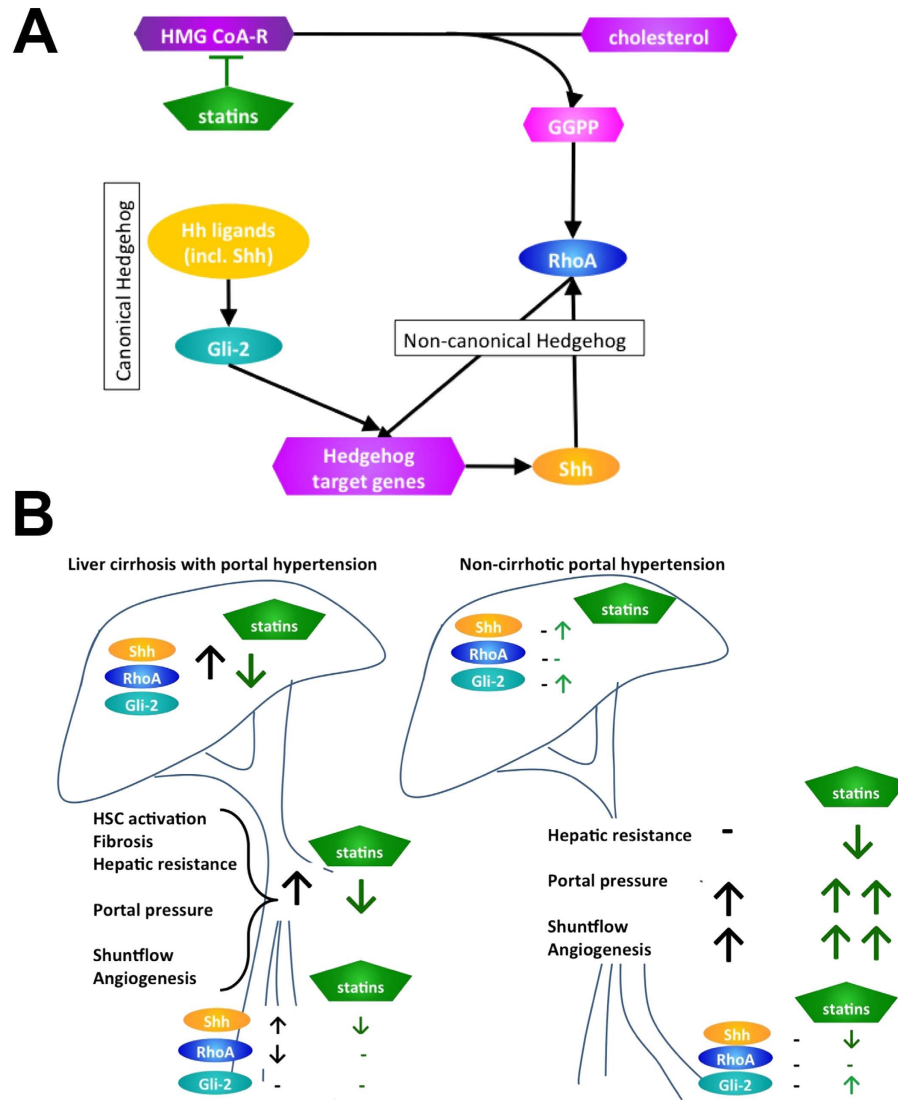


Figure 1. Simplified canonical and non-canonical hedgehog pathway and their potential implication in portal hypertension. (A) Statin inhibit RhoA activation by hindering its isoprenylation by depletion of geranylgeranyl-pyrophosphate (GGPP). RhoA seems also to play a role in the non-canonical Hedgehog-signaling (Hh). This crosstalk between RhoA/Rho-kinase and Hh-pathway might be mediated by Shh and is Gli-2 independent. The canonical Hh-pathway is activated by Hh ligands, which after several steps activates Gli. Gli enhances transcription of downstream target genes. (B) Statins decrease fibrosis and lower portal hypertension in animals and humans with liver cirrhosis by blunting the RhoA/Rho-kinase-pathway and downregulation of canonical and non-canonical Hh-pathway in myfibroblastic HSCs. The non-canonical Shh/RhoA-signaling seems to play a major role in the extrahepatic angiogenesis in cirrhosis, whereas Gli-2 is a predominant mediator of canonical Hh-pathway in non-cirrhotic portal hypertension potentially mediating angiogenesis and aggravation of portal hypertension.

splanchnic vascular bed. The extrahepatic angiogenesis further worsens the portal pressure due to higher portal venous inflow and by opening venous collaterals³⁻⁵. Interestingly, extrahepatic angiogenesis also occurs in absence of cirrhosis, for example due to portal vein obstruction or thrombosis⁶⁻⁸. However, there is scant information about the differences between cirrhotic and non-cirrhotic portal hypertensive angiogenesis.

Statins decrease fibrosis and lower portal hypertension in animals and humans mainly by blunting the RhoA/Rho-kinase-pathway in myfibroblastic HSCs⁹⁻¹⁶. Interestingly, RhoA/Rho-kinase-pathway seems

to also play a role in the non-canonical Hedgehog-signaling (Hh)^{17,18}. This crosstalk between RhoA/Rho-kinase and Hh-pathway might be mediated by Shh and is Gli-independent (Fig. 1A).

In liver cirrhosis, also canonical Hh-pathway is activated¹⁹. In this pathway, the cell surface receptor Patched-1 inhibits Smoothed. When Hh ligands bind Patched-1, Smoothed translocates and activates Gli transcription factors. Previous studies described that Hh pathway leads to the progression of liver diseases. Thereby, Gli enhances transcription of downstream target genes, which activate HSCs and promote the survival of these fibrogenic and contractile cells^{19–25}.

Interestingly, it has been described that statin treatment might decrease Hh activation^{26,27}. However, it is unknown whether statins interfere with canonical or with the non-canonical Hh signaling and which is their role in angiogenesis induced by portal hypertension.

Therefore, we investigated (i) the pathophysiological differences in angiogenesis induced by cirrhotic or non-cirrhotic portal hypertension, (ii) the effects of statins on angiogenesis in cirrhotic and non-cirrhotic portal hypertension and (iii) their role on the canonical and non-canonical Hh-pathway in portal hypertension.

Results

Hemodynamic changes in rats with portal hypertension after statin treatment. We compared two animal models of cirrhotic portal hypertension (BDL; CCl₄-intoxication) with non-cirrhotic portal hypertension (PPVL). One week before sacrifice all animals received either atorvastatin-chow or control-chow (Fig. 2A). Atorvastatin reduced portal pressure in cirrhotic, CCl₄-intoxicated rats, due to a significantly decreased hepatic vascular resistance compared to untreated animals (Fig. 2B,C). Splanchnic and systemic vascular resistance remained unchanged after atorvastatin treatment (Fig. 2D–F). Moreover, shunting was significantly decreased and accompanied by a slight increase in cardiac output ($p = 0.0625$) (Fig. 2E–G). By contrast, in non-cirrhotic PPVL rats, portal pressure increased compared to untreated PPVL rats, despite lower hepatic vascular resistance (Fig. 2B,C). This is accompanied by a significant decrease in splanchnic and systemic vascular resistance (Fig. 2D–F). Atorvastatin treatment led to a dramatic augmentation of shunt flow and cardiac output in PPVL rats compared to untreated PPVL rats (Fig. 2E–G).

In summary, portal pressure, hepatic vascular resistance and shunt flow in cirrhosis were decreased by atorvastatin, as previously shown for the BDL model¹³. By contrast, they were enhanced in non-cirrhotic portal hypertension.

Hh signaling and profibrotic markers in human and rat portal hypertension. Since atorvastatin decreased hepatic vascular resistance in portal hypertension, we compared the expression of Hh-signaling in atorvastatin-treated animals with untreated animals.

It has been shown, that Shh and Gli are increased in cirrhosis, as well as RhoA/Rho-kinase-pathway. Interestingly, in human cirrhotic liver samples Sonic hedgehog (Shh) and Glioma associated oncogene family zink finger-2 (Gli-2) mRNA levels were increased (Fig. 3A). Similarly, Shh and Gli-2 protein expression was significantly upregulated in cirrhotic livers (Fig. 3B,C). Furthermore, the Hh components Shh and Gli-2 were significantly downregulated in cirrhotic livers of BDL and CCl₄ - intoxicated rats after atorvastatin treatment (Fig. 3D). The mRNA levels of the profibrotic markers α -SMA, collagen-1, as well as vimentin were decreased after atorvastatin treatment in BDL and CCl₄-intoxicated rat liver samples (Fig. 3E).

By contrast, Shh mRNA levels were significantly increased in PPVL rats (Fig. 3D). Gli-2 mRNA levels were significantly upregulated in atorvastatin treated PPVL rats compared to the control group (Fig. 3D). mRNA levels of Hedgehog interacting protein (Hhip), a Hh-inhibitor, were significantly downregulated in PPVL rats and secreted frizzled-related protein 1 (sFRP1), a downstream target of Gli-2, was highly upregulated after atorvastatin treatment (Fig. 3D). In PPVL rats, the α -SMA, collagen-1 and vimentin levels were not altered by atorvastatin (Fig. 3E). Hh-signaling is enhanced in liver cirrhosis and atorvastatin blunts Hh-pathway together with profibrotic factors. By contrast, in the livers of PPVL rats, atorvastatin enhanced the Hh-pathway, which might be associated with increased levels of Hh ligands into circulation.

In vitro analyses of primary HSCs and human derived LX-2 cells. These cells are crucially involved in fibrosis and PHT. Cultured primary rat HSCs, were incubated with different doses of atorvastatin (10^{-4} M, 10^{-5} M and 10^{-6} M). The rationale for using scratch assay to investigate the migration is that the cell-ECM and cell-cell interactions are still intact compared to other methods such as Boyden Chamber²⁸. Interestingly, HSC migration as measured by scratch assay was significantly blunted by atorvastatin incubation (Fig. 4A,B). mRNA levels of the profibrotic markers α -SMA and collagen-1 were significantly downregulated after atorvastatin treatment in primary HSCs (Fig. 4C) and atorvastatin induced a significant decrease of Shh and sFRP1 (Fig. 4D).

To differentiate between canonical and non-canonical Hh-signaling, we investigated statin effects on RhoA/Rho-kinase-pathway in activated HSCs. Human derived LX-2 cells transfected with a constitutively active (CA) RhoA plasmid had significantly increased mRNA and protein expression levels of Shh, compared to control cells and cells transfected with dominant negative (Dn) RhoA (Fig. 4E,F), while

Hemodynamic changes after atorvastatin treatment.

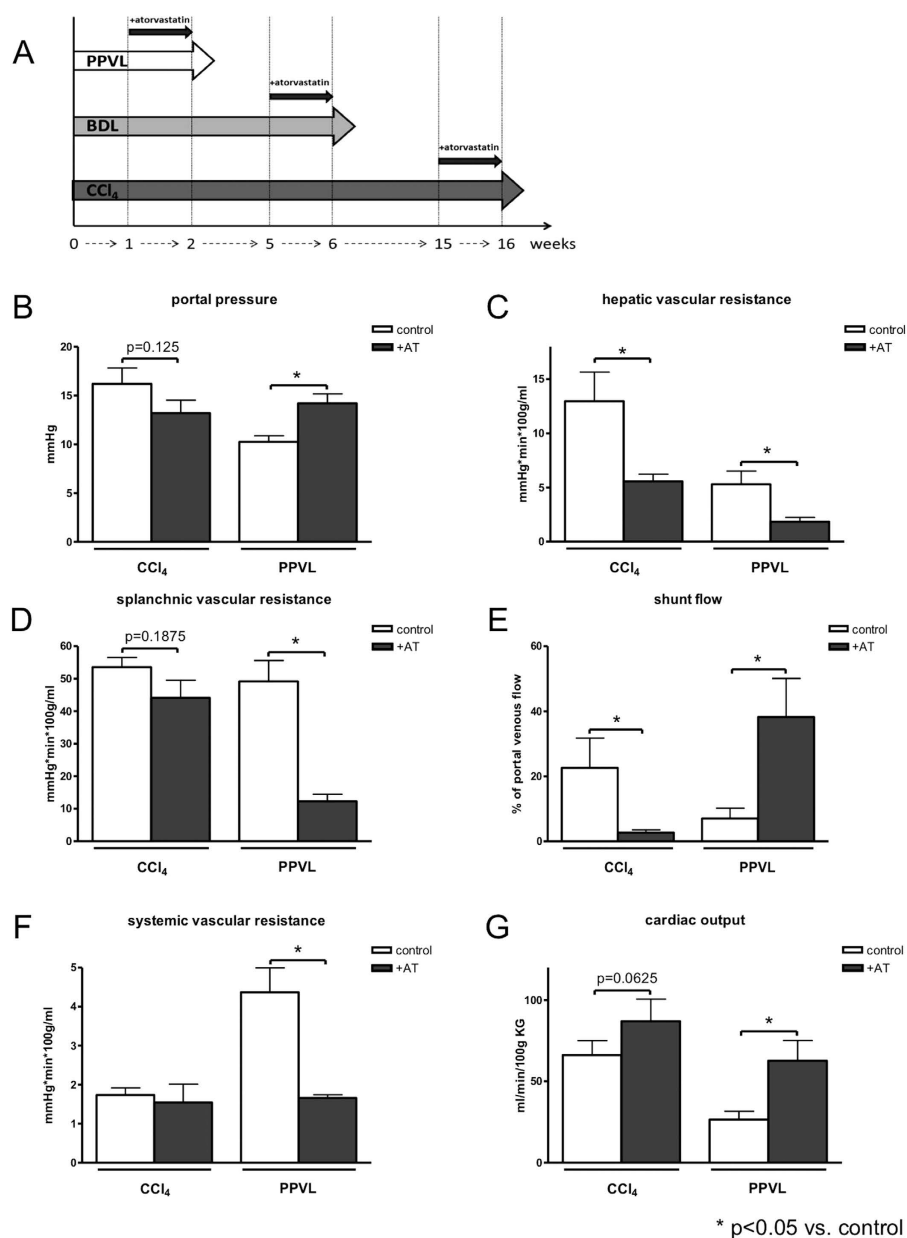


Figure 2. *In vivo* hemodynamic measurements of CCl₄-intoxicated and partial portal vein ligated (PPVL) rats with and without atorvastatin treatment. (A) One week after PPVL, five weeks after BDL or fifteen weeks after CCl₄-intoxication, rats received atorvastatin or control chow for 7 days before sacrifice. (B) Portal pressure was decreased in CCl₄ rats and significantly upregulated in PPVL rats. (C) Hepatic vascular resistance was significantly downregulated in CCl₄ as well as in PPVL rats. (D) Splanchnic vascular resistance remained unchanged in CCl₄ rats and was significantly decreased in PPVL rats. (E) Shunt flow was decreased in CCl₄ rats and significantly enhanced in PPVL rats after statin treatment compared to control. (F) Systemic vascular resistance was significantly reduced in PPVL rats and remained unchanged in CCl₄-intoxicated rats. (G) In PPVL, as well as in CCl₄-intoxicated rats, cardiac output was increased.

Gli-2 expression remained unchanged (data not shown). Incubation with cyclopamine, an inhibitor of the canonical Hh-pathway, reversed these effects (Fig. 4E).

The angiogenic and profibrotic potential of activated HSCs, as well as Hh-signaling is blunted by statins. This effect is mainly due to the non-canonical pathway, where Gli-2 expression has not been significantly decreased and Shh protein expression was upregulated by constitutive active RhoA.

Hedgehog signaling and profibrotic markers in human and rat livers.

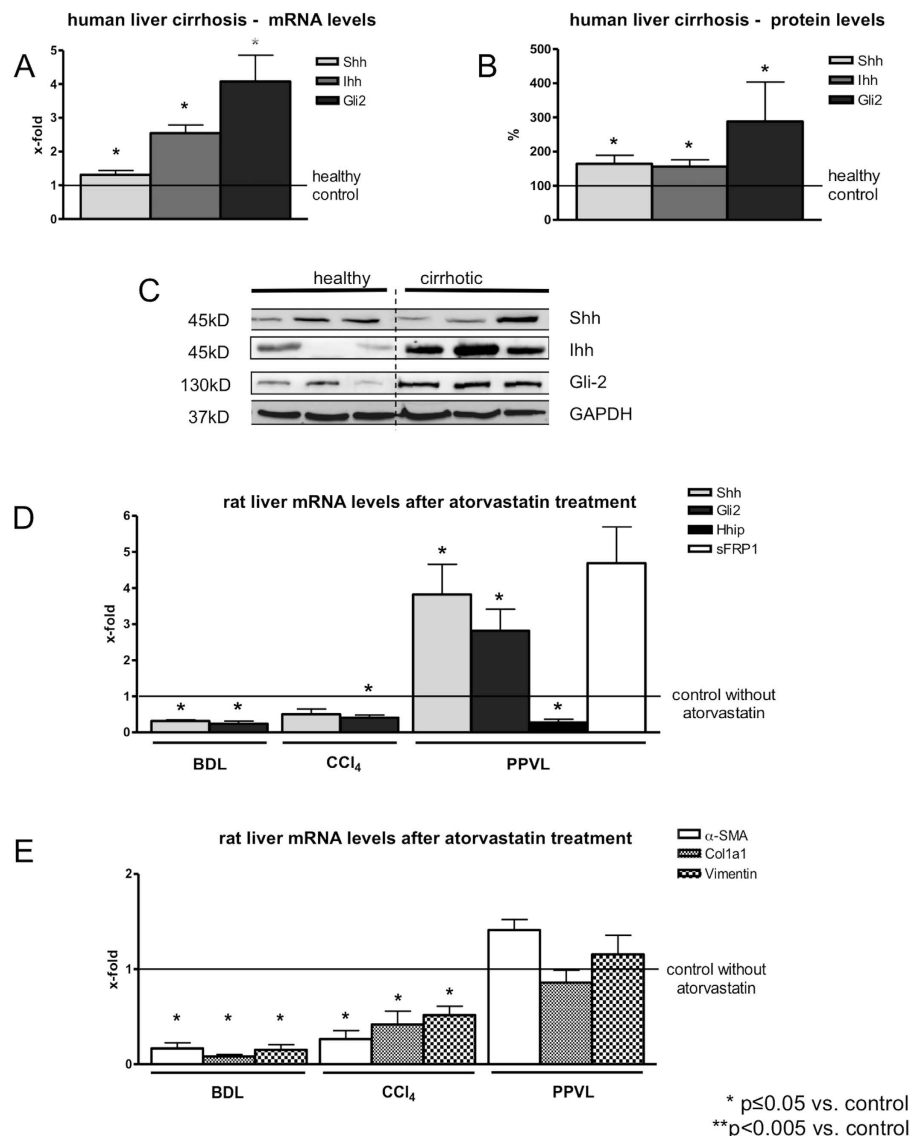


Figure 3. Hedgehog-signaling and profibrotic markers in human and rat livers. (A) Shh and Gli-2 mRNA levels were upregulated in human cirrhotic liver samples and (B,C) protein expression levels of Shh and Gli-2 were significantly increased confirming previous data in animal models^{19–25}, which were not repeated in this study. (D) Shh and Gli-2 mRNA levels were significantly downregulated in BDL and CCl₄-intoxicated cirrhotic rat livers and significantly upregulated in PPVL liver samples after atorvastatin treatment. (E) The profibrotic markers α-SMA, Col1a1 and Vimentin were downregulated in BDL and CCl₄-intoxicated rat livers after statin treatment and not affected in PPVL rat livers. In Fig. 3C the blots shown are from cropped nitrocellulose membranes, however the gel was not cropped and therefore have been run under the same experimental conditions. The cropping lines are shown in black.

Angiogenesis assays *in vivo*. Since shunt flow was reduced in cirrhotic and enhanced in non-cirrhotic portal hypertensive animals as compared to controls, we investigated the role of angiogenesis in extrahepatic vessels. Matrigels (collagen plug) were implanted for the investigation of angiogenesis in cirrhotic and non-cirrhotic portal hypertension. Intraperitoneal and subcutaneous matrigels were immunohistochemically stained for endothelial cells (ECs) with an antibody against CD31 and for vascular smooth muscle cells (VSMCs) with an α-SMA antibody. Similar to the hemodynamic changes, sprouting of new vessels in matrigel was decreased in cirrhotic portal hypertension (BDL/CCl₄) by atorvastatin, whereas it was enhanced in non-cirrhotic portal hypertension (PPVL) by atorvastatin treatment (Fig. 5A,D; Suppl. Fig. 1A–D).

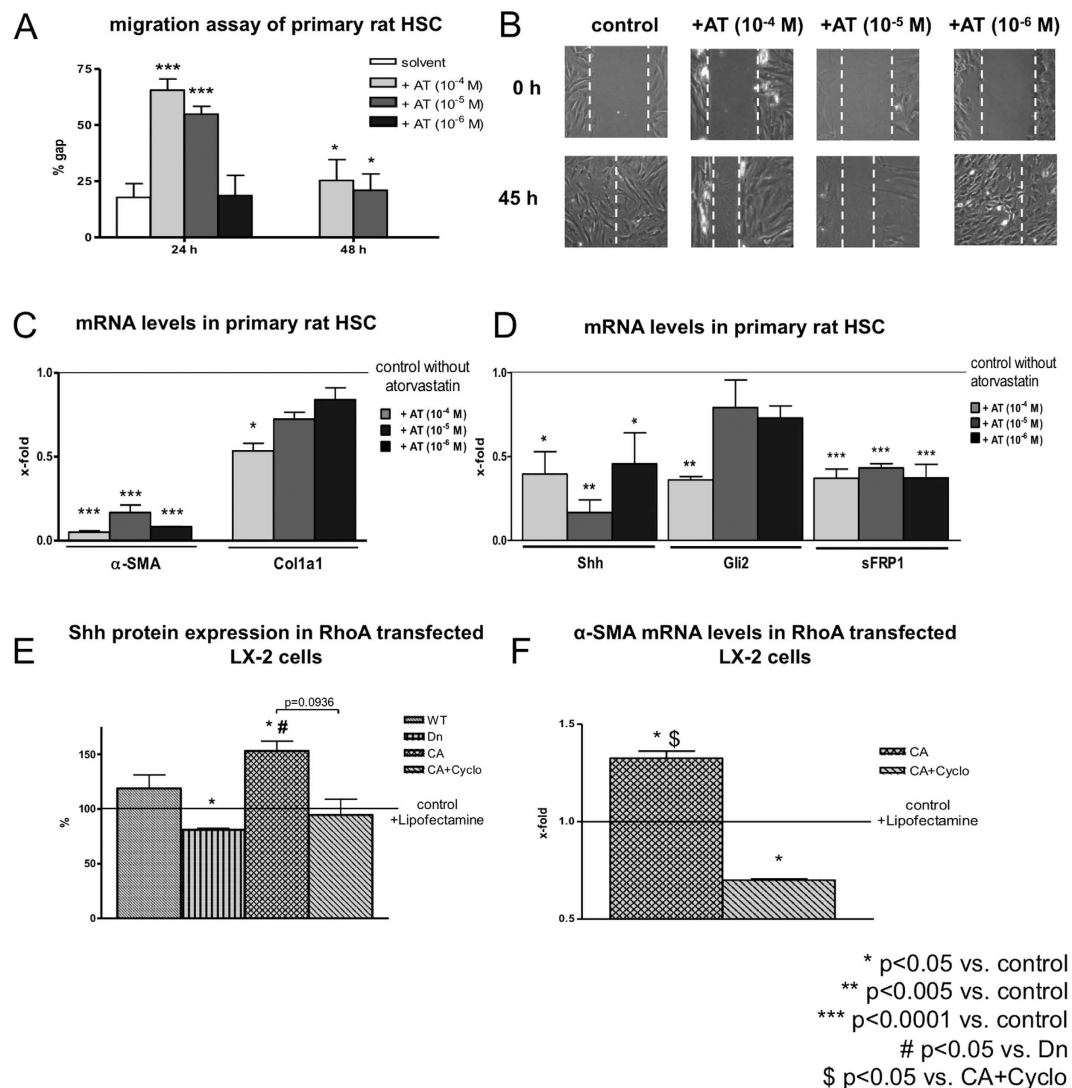
in vitro analysis of primary rat HSC and human derived LX-2 cells.

Figure 4. *In vitro* analysis of primary rat HSCs and human derived LX-2 cells. (A,B) HSCs had a reduced migration capability after incubation with atorvastatin. (C) α -SMA and Col1a1 mRNA levels were significantly reduced in HSCs incubated with atorvastatin. (D) Shh, Gli-2 and sFRP1 mRNA expression was downregulated in atorvastatin incubated HSCs. (E) Constitutive active (CA) RhoA increased Shh protein expression levels and cyclopamine inhibited this effect. (F) α -SMA mRNA levels in constitutive active RhoA transfected LX-2 cells were upregulated and cyclopamine reversed this effect.

Interestingly, atorvastatin also reduced VSMC migration in subcutaneously implanted matrigels (Fig. 5D; Suppl. Fig. 1D), which cannot be explained by shear stress due to portal hypertension in cirrhosis.

By contrast, atorvastatin treatment enhanced intraperitoneal migration of VSMCs (α -SMA) and ECs (CD31) into the matrigel in PPVL rats (Fig. 5A,B; Suppl. Fig. 1A,B). Furthermore, the subcutaneous migration of ECs (CD31) inside the matrigel was enhanced in atorvastatin treated PPVL rats but remained unchanged for VSMCs (α -SMA) (Fig. 5C,D; Suppl. Fig. 1C,D). Atorvastatin decreased subcutaneous VSMC migration in Sham rats (Fig. 5D; Suppl. Fig. 1D).

Since, similarly to the activation of Hh-signaling in the respective livers, angiogenesis is blunted in cirrhosis after atorvastatin treatment, but enhanced in non-cirrhotic portal hypertension, we investigated the role of canonical and non-canonical Hh-signaling in the extrahepatic vessels.

Analysis of extrahepatic vessels. We evaluated the expression of Hh-signaling pathway in hepatic arteries of cirrhotic and healthy humans, as well as in the matrigel of the portal hypertensive animals after treatment with atorvastatin. Non-canonical Hh (Shh) was highly upregulated in cirrhotic hepatic

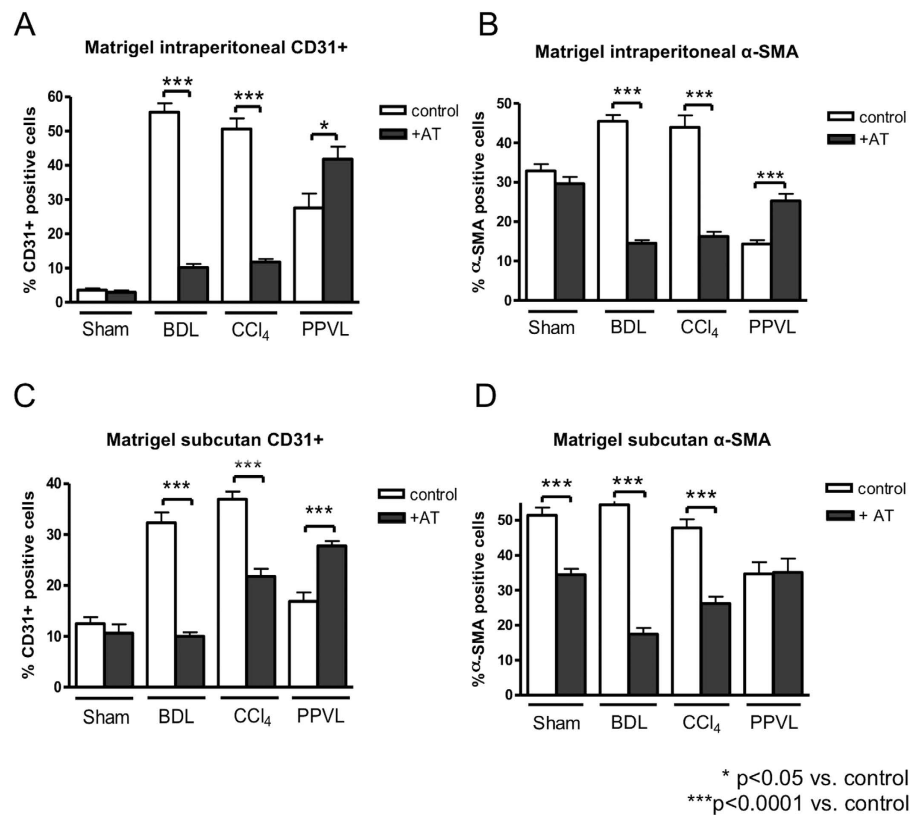
Angiogenesis assays *in vivo*.

Figure 5. Angiogenesis assays *in vivo*. (A) CD31 positive cells were reduced in intraperitoneal implanted matrigels of BDL and CCl₄-intoxicated rats and enhanced in PPVL rats. (B) In BDL and CCl₄-intoxicated rats, α-SMA positive cells were decreased in intraperitoneal implanted matrigels and upregulated in PPVL rats. (C) CD31+ cells were decreased in subcutaneous implanted matrigels of BDL and CCl₄-intoxicated rats after atorvastatin treatment and upregulated in PPVL rats. (D) After atorvastatin treatment the amount of α-SMA positive cells in subcutaneous implanted matrigel was decreased in Sham, BDL and CCl₄-intoxicated rats and remained unchanged in PPVL rats.

arteries compared to non-cirrhotic arteries (Fig. 6A). In contrast, Gli2 mRNA levels were not affected (Fig. 6A), which might suggest the activation of non-canonical Hh-signaling. The explanted matrigels were analyzed using RT-PCR. Unchanged Gli-2 expression indicated that atorvastatin treatment did not alter canonical Hh-signaling, while downregulation of Shh abolished the non-canonical variant in subcutaneous and intraperitoneal implanted matrigels of BDL and CCl₄-intoxicated rats (Fig. 6B,C). Interestingly, canonical Hh-pathway (Gli-2) was highly upregulated in PPVL rats treated with atorvastatin in both, intraperitoneal and subcutaneous implanted matrigels (Fig. 6B,C). The migration of VSMC *in vitro* was inhibited by atorvastatin incubation, similarly to the effect of atorvastatin on VSMC migration into subcutaneous matrigel of Sham rats (Fig. 6D). Moreover, the inhibition of canonical Hh-pathway using cyclopamine had no effect on the migration of VSMCs *in vitro*. By contrast, human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) formed significantly more tubes after incubation with atorvastatin *in vitro*.

In summary, these data suggest a greater role of Shh/RhoA-signaling in the extrahepatic angiogenesis in cirrhosis, whereas Gli-2 is a predominant mediator of canonical Hh-pathway in non-cirrhotic portal hypertension (Fig. 1B).

Discussion

This study shows for the first time, that the mechanisms of neo-angiogenesis in cirrhotic and non-cirrhotic portal hypertension are different. Statin therapy blunts neo-angiogenesis in liver cirrhosis, probably due to an inhibition of non-canonical Hedgehog signaling among other mechanisms. Furthermore, in non-cirrhotic portal hypertension, statins increase splanchnic and systemic angiogenesis, together with an upregulation of the canonical Hedgehog pathway activity.

In previous studies we showed that atorvastatin significantly blunts portal hypertension and fibrogenesis in BDL rats^{13,14}, and that statins inhibit proliferation and apoptosis and induce senescence in hepatic myofibroblasts¹⁵. Our present study confirms these results in a second model of fibrosis

Analysis of extrahepatic vessels.

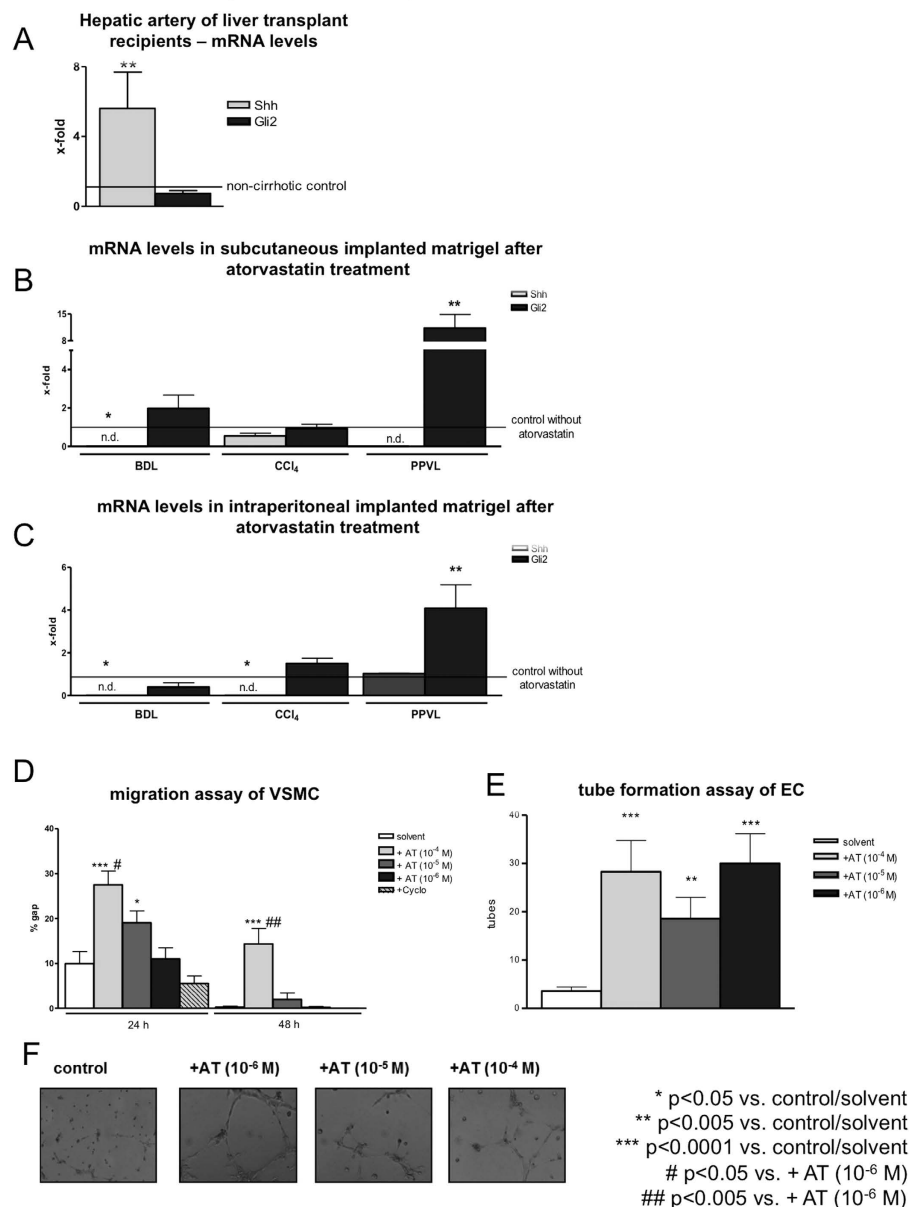


Figure 6. Analysis of extrahepatic vessels. (A) Shh mRNA levels were highly upregulated in hepatic arteries of liver transplant recipients compared to donors. (B) Shh mRNA levels were downregulated in subcutaneous implanted matrigel of BDL rats after atorvastatin treatment. Gli-2 was highly upregulated in subcutaneous implanted matrigels of PPVL rats. (C) Shh mRNA levels were reduced in intraperitoneal implanted matrigel of BDL and CCl₄-intoxicated rats after statin treatment and Gli-2 was highly upregulated in PPVL rats. (D) Atorvastatin reduced migration of A7r5 rat aortic VSMCs significantly *in vitro*. Incubation with cyclopamine had no effect on migration capability of VSMCs. (E,F) Endothelial cells (HUVEC) formed more tubes after incubation with atorvastatin in tube formation assay.

(CCl₄-intoxication): also in the CCl₄-induced cirrhosis, the profibrotic markers α -SMA and collagen-1 were decreased after statin treatment.

Hedgehog pathway activation has previously been identified as a cause of activation of hepatic stellate cells and in consequence contraction and production of extracellular matrix²⁹. Indeed, the present study clearly shows an upregulation of the Hedgehog pathway, associated with progression of liver fibrosis. Moreover, statin treatment reduced Hedgehog pathway activity in cirrhotic livers and in activated hepatic stellate cells. This might be a consequence of the previously suggested non-canonical mechanisms of Hedgehog downstream activation, via RhoA/Rho-kinase^{17,30}, since atorvastatin inhibits RhoA^{13,14}, which is clearly interacting with Hh-signaling as shown by our gain of function experiments in HSCs. At least partly by this mechanism, statins decrease Hedgehog pathway activity in cirrhotic rat livers.

Moreover, statin treatment may lead to inhibition of canonical Hedgehog pathway, shown by decreased Gli-2 expression. This probably is a further explanation for the previously described beneficial effects of statins on liver fibrosis^{13–15}.

In cirrhotic BDL and CCl₄-intoxicated rats not only fibrosis was blunted by statins, but also the intrahepatic vasoconstriction was significantly reduced^{13,31}. In line with these previously published findings from others and our group, a significant decrease in portal pressure in BDL rats and a trend towards lower portal pressure in CCl₄-intoxicated rats after treatment with atorvastatin was reported^{13,31}. This difference between the models might be caused by a more aggressive, cholestatic injury induced by the BDL model.

Portal hypertension leads to increased neo-angiogenesis and thereby enhances portal-systemic shunting³. Our current study not only confirmed previous finding in BDL rats that the hepatic shunt flow was reduced in atorvastatin-treated rats¹³, but also extended this finding to the CCl₄-model. Summarizing previous and current results, atorvastatin treatment decreased fibrogenesis, hepatic resistance and shunt flow in both cirrhotic models in rats.

Moreover, statins reduced neo-angiogenesis in the splanchnic circulation. The decreased splanchnic neo-vascularization in statin-treated cirrhotic animals may be due to the decreasing effects of atorvastatin on fibrosis and portal pressure. Thereby, shear stress in splanchnic vessels is reduced and one of the major driving forces for angiogenesis in portal hypertension is blunted. However, atorvastatin blunted the neo-vascularization of subcutaneously implanted matrigels in the cirrhotic rats. Therefore, these results cannot only be explained by the role of portal pressure, but also by the general anti-angiogenic effect of statins, that might be mediated by Hedgehog signaling. Indeed, Hedgehog pathway is crucially involved in angiogenesis, tumor vascularization and remodeling in diseased livers^{32–34}. The reduced Hedgehog pathway activity in cirrhotic livers may affect the splanchnic angiogenesis via influencing endothelial and vascular smooth muscle cells. Interestingly, and similar to the findings in rats, in human cirrhosis the Hedgehog ligands, but not their effector Gli-2, are upregulated. Therefore, a possible explanation could be the inhibition of circulating pro-angiogenic factors, as well as Hedgehog components, which in cirrhosis generally show increased expression and are released into the circulation.

Statin treatment of non-cirrhotic portal hypertensive rats led to surprising and contrary results. In these rats atorvastatin increased portal pressure and shunt flow, probably due to highly upregulated neo-angiogenesis in peritoneal and subcutaneous vessels. Contrary to its effect in hepatic and cirrhotic vessels, statin treatment enhanced the activation of Hedgehog pathway in splanchnic and systemic vessels of PPVL rats. Fibrosis, inflammation and portal hypertension in cirrhosis might lead through different cytokines and chemokines to extrahepatic vascular changes. Since atorvastatin ameliorates fibrosis and portal hypertension, these liver derived effects are less pronounced after atorvastatin treatment. In PPVL the liver is not cirrhotic and the hepatic effects of statins mediated by modulation of cirrhosis are lacking. This might be a possible explanation, that atorvastatin has opposing effects in PPVL rats due to a non-canonical Hedgehog regulation. Furthermore, this study showed that different molecular mechanisms underlie angiogenesis in cirrhotic and non-cirrhotic portal hypertension.

In conclusion, the broad use of statins, and their recently recognized beneficial effect on liver cirrhosis and portal hypertension^{9,35,36} point towards a potential clinical relevance of this study. While our data present further evidence for the beneficial use of statins in liver cirrhosis, caution is required in non-cirrhotic portal hypertension. Further studies are warranted, to investigate the different cellular mechanisms regulating angiogenesis in cirrhotic and non-cirrhotic portal hypertension.

Materials and Methods

Animals. 55 wild type (WT) rats (Sprague Dawley) were used for our experiments. All experiments were performed in accordance with relevant guidelines and regulations approved by LANUV, the responsible committee for animal studies in North Rhine-Westphalia (permission number 8.87-50.10.31.08.287). Sprague Dawley rats were housed in a controlled environment (12 hour light/dark, temperature 22 °C to 24 °C), and fed standard rat chow (Ssniff, Soest, Germany).

Model of cirrhotic portal hypertension. *Cholestatic model of cirrhosis.* Bile duct ligation (BDL) was performed in nine WT rats with an initial body weight (BW) of 180–200 g as described previously^{13,37}. Experiments were carried out six weeks after BDL. Eight sham-operated rats served as controls. Five rats undergoing BDL for six weeks received atorvastatin (15 mg/kg BW per day) on the last seven days before sacrifice, as described previously¹³.

Toxic model of cirrhosis. 20 rats with an initial BW of 100–120 g twice weekly underwent inhalation of 1 l/min CCl₄ for 16 weeks until ascites, as a definite sign of portal hypertension, was present as described previously³⁷. Seven rats undergoing CCl₄-intoxication for 16 weeks received atorvastatin (15 mg/kg BW per day) on the last seven days before sacrifice.

Model of non-cirrhotic portal hypertension. *Partial portal vein ligation (PPVL).* PPVL was performed in 18 WT rats with an initial BW of 180–200 g as described previously^{38,39}. Experiments were

carried out two weeks after PPVL. Seven rats undergoing PPVL for two weeks received atorvastatin (15 mg/kg BW per day) on the last seven days before sacrifice^{38,39}.

In vivo hemodynamic experiments. *In vivo* studies were performed in eleven WT PPVL rats, 13 WT CCl₄ and nine WT BDL rats and their respective controls. Rats were used for the hemodynamic studies as described previously⁴⁰. To assess the effects of atorvastatin, invasive measurements of mean arterial pressure (MAP) and portal pressure (PP) were performed in cirrhotic rats.

Microsphere technique. To investigate hemodynamics, the colored microsphere technique was performed as described previously⁴⁰. 300.000 systemic (red) microspheres (15 μm diameter, Triton-Technologies, San Diego, USA) were injected in the left ventricle. Mesenteric portal-systemic shunt volume was estimated by injection of 150.000 microspheres (yellow) in the ileocecal vein⁴⁰.

Human liver samples. The Human Ethics Committee of the University of Bonn (202/01) approved the use of human liver and hepatic arteries, taken during liver transplantation from patients with alcohol-induced cirrhosis (n = 5). Liver and hepatic artery samples from non-cirrhotic patients submitted to liver resection served as controls (n = 5). The methods were carried out in accordance with the approved guidelines. An informed consent was obtained from all patients. No patient or donor received catecholamines, ACE inhibitors or angiotensin receptor antagonists before transplantation³⁷. Samples were snap frozen following excision.

Western blotting. Liver samples were processed as previously described using SDS-PAGE gels and nitrocellulose membranes^{13,15}. Ponceau-S staining assured equal protein loading. GAPDH served as endogenous controls. Membranes were incubated with the respective primary antibody (Supplementary Table 1) and corresponding secondary peroxidase-coupled antibody (Santa-Cruz-Biotechnology, Santa Cruz, USA). After enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham, UK) digital detection was evaluated using Chemi-Smart (PeqLab Biotechnologies, Erlangen, Germany).

Quantitative RT-PCR. RNA isolation, reverse transcription and detection by RT-PCR were performed as described previously^{13,37}. Assays provided by Applied Biosystems (Foster City, USA) are listed in Supplementary Table 2. 18S rRNA served as endogenous control. Results of HSCs and liver samples were expressed as $2^{-\Delta\Delta C_T}$, and express the x-fold increase of gene expression compared to the control group.

Immunohistochemical staining for CD31 and α -SMA. Stainings for CD31 and α -SMA were performed in cryosections from liver tissue (3 and 7 μm thick, respectively) as described previously^{41–43}. Briefly, after several steps cryosections were incubated with a mouse-anti-SMA antibody (clone 1A4; Sigma-Aldrich, Munich, Germany), or with antibody against CD31 (ab24590, Abcam, Cambridge, UK). Thereafter, a biotinylated rabbit-anti-mouse secondary antibody (Dako, Glostrup, Denmark) was used.

Isolation of primary HSCs. Rat HSCs were isolated as described previously^{37,44}. Briefly, primary HSCs were isolated in a two-step pronase-collagenase perfusion from the livers of WT rats and fractionated by density gradient centrifugation. Viability and purity were systematically over 95%. Cells were seeded on uncoated plastic culture dishes. Experiments were performed seven days after isolation or after the first passage (10 days) when HSCs were fully activated.

Incubation with atorvastatin. Atorvastatin (10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M) was added to the culture medium of these cells as indicated for three days, or cells remained untreated.

Transfection with RhoA plasmids. LX-2 cells were kindly provided by our co-operation partner Vijay H. Shah (Mayo Clinic, Rochester, USA)⁴⁵. Twenty-four hours before transfection, 6×10^5 LX2 cells were incubated with transfection media (Dulbecco's modified Eagle's medium [DMEM] with 10% fetal calf serum [FCS] without penicillin/streptomycin). The RhoA plasmid (pEGFP-C2) and the respective empty control plasmid were isolated according to manufacturer instructions (NucleoBond Xtra Maxi kit; Machery, Nagel, Germany). Plasmid (15 μg) and 37.5 μL of lipofectamine were incubated for 20 minutes with a total volume of 3.6 mL of media. After removal of media the plasmid/lipofectamine mix was added drop-wise to cells. After 3–4 hours, mixture removed and cells were again incubated with fresh media, containing 10% FCS, and harvested after 3 days. Efficacy of transfection was tested by their GFP-expression and confirmed by RT-PCR and Western blotting.

Scratch assays. To observe the cell migration a scratch assay was performed as described previously²⁸. Briefly, primary rat HSCs or A7r5 VSMCs were cultured in 24-well plates until the wells were completely covered with cells. A line was scratched through the cell layer with a pipette tip (1 mm). Directly after scratching and at defined time points pictures were taken (Nikon, Eclipse 50i) and the scratch width was measured using the software NIS Elements D 3.2 (Zeiss, Germany).

Tube formation. To evaluate *in vitro* effects of atorvastatin on endothelial cells (HUVEC) (PromoCell, Heidelberg, Germany), a tube formation assay was performed as described previously^{46,47}. A 24-well plate was coated with 300 μ l Matrigel (Gibco/BRL, Karlsruhe, Germany) containing 10 ng/ml VEGF. After 24 h, 2.5×10^4 endothelial cells in 75 μ l medium (Endothelial Cell Growth Medium+Supplemental Mix, PromoCell, Heidelberg, Cat.No. C-22010) were seeded in each well. Intercellular connections and tube-like formations were counted using a Nikon, Eclipse 50i microscope at 100 \times magnification.

Statistical analysis. Results are expressed as mean \pm SEM unless otherwise indicated. Data were analyzed using Student's unpaired and paired t-test where appropriate. Statistical analyses and graphing were performed using GraphPad Prism 4.0 for Macintosh. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

References

- Friedman, S. L. Mechanisms of Hepatic Fibrogenesis. *Gastroenterology* **134**, 1655–1669 (2008).
- Sanyal, A. J., Bosch, J., Blei, A. & Arroyo, V. Portal hypertension and its complications. *Gastroenterology* **134**, 1715–1728 (2008).
- Bosch, J. & García-Pagán, J. C. Complications of cirrhosis. I. Portal hypertension. *J. Hepatol.* **32**, 141–156 (2000).
- Van de Casteele, M., Sägeser, H., Zimmermann, H. & Reichen, J. Characterisation of portal hypertension models by microspheres in anaesthetised rats: a comparison of liver flow. *Pharmacol. Ther.* **90**, 35–43 (2001).
- Groszmann, R. J. & Abraldes, J. G. Portal hypertension: from bedside to bench. *J. Clin. Gastroenterol.* **39**, S125–130 (2005).
- Darwish Murad, S. *et al.* Etiology, management, and outcome of the Budd-Chiari syndrome. *Ann. Intern. Med.* **151**, 167–175 (2009).
- Plessier, A. *et al.* Acute portal vein thrombosis unrelated to cirrhosis: a prospective multicenter follow-up study. *Hepatology* **51**, 210–218 (2010).
- Seijo, S. *et al.* Good long-term outcome of Budd-Chiari syndrome with a step-wise management. *Hepatology* **57**, 1962–1968 (2013).
- Abraldes, J. G. *et al.* Simvastatin lowers portal pressure in patients with cirrhosis and portal hypertension: a randomized controlled trial. *Gastroenterology* **136**, 1651–1658 (2009).
- Laufs, U. & Liao, J. K. Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *J. Biol. Chem.* **273**, 24266–24271 (1998).
- Laufs, U., Marra, D., Node, K. & Liao, J. K. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors attenuate vascular smooth muscle proliferation by preventing rho GTPase-induced down-regulation of p27(Kip1). *J. Biol. Chem.* **274**, 21926–21931 (1999).
- Rikitake, Y. & Liao, J. K. Rho GTPases, statins, and nitric oxide. *Circ. Res.* **97**, 1232–1235 (2005).
- Trebicka, J. *et al.* Atorvastatin lowers portal pressure in cirrhotic rats by inhibition of RhoA/Rho-kinase and activation of endothelial nitric oxide synthase. *Hepatology* **46**, 242–253 (2007).
- Trebicka, J. *et al.* Atorvastatin attenuates hepatic fibrosis in rats after bile duct ligation via decreased turnover of hepatic stellate cells. *J. Hepatol.* **53**, 702–712 (2010).
- Klein, S. *et al.* Atorvastatin inhibits proliferation and apoptosis, but induces senescence in hepatic myofibroblasts and thereby attenuates hepatic fibrosis in rats. *Lab. Invest.* **92**, 1440–1450 (2012).
- Marrone, G. *et al.* KLF2 exerts antifibrotic and vasoprotective effects in cirrhotic rat livers: behind the molecular mechanisms of statins. *Gut* (2014). doi: 10.1136/gutjnl-2014-308338.
- Chinchilla, P., Xiao, L., Kazanietz, M. G. & Riobo, N. A. Hedgehog proteins activate pro-angiogenic responses in endothelial cells through non-canonical signaling pathways. *Cell Cycle* **9**, 570–579 (2010).
- Renault, M.-A. *et al.* Sonic hedgehog induces angiogenesis via Rho kinase-dependent signaling in endothelial cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **49**, 490–498 (2010).
- Omenetti, A., Choi, S., Michelotti, G. & Diehl, A. M. Hedgehog signaling in the liver. *J. Hepatol.* **54**, 366–373 (2011).
- Beachy, P. A., Hymowitz, S. G., Lazarus, R. A., Leahy, D. J. & Siebold, C. Interactions between Hedgehog proteins and their binding partners come into view. *Genes Dev.* **24**, 2001–2012 (2010).
- Choi, S. S. *et al.* Leptin promotes the myofibroblastic phenotype in hepatic stellate cells by activating the hedgehog pathway. *J. Biol. Chem.* **285**, 36551–36560 (2010).
- Jung, Y. *et al.* Signals from dying hepatocytes trigger growth of liver progenitors. *Gut* **59**, 655–665 (2010).
- Omenetti, A. & Diehl, A. M. Hedgehog signaling in cholangiocytes. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **27**, 268–275 (2011).
- Omenetti, A. *et al.* Hedgehog-mediated mesenchymal-epithelial interactions modulate hepatic response to bile duct ligation. *Lab. Invest.* **87**, 499–514 (2007).
- Yang, L. *et al.* Sonic hedgehog is an autocrine viability factor for myofibroblastic hepatic stellate cells. *J. Hepatol.* **48**, 98–106 (2008).
- Beachy, P. A. *et al.* Multiple roles of cholesterol in hedgehog protein biogenesis and signaling. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **62**, 191–204 (1997).
- Cooper, M. K., Porter, J. A., Young, K. E. & Beachy, P. A. Teratogen-mediated inhibition of target tissue response to Shh signaling. *Science* **280**, 1603–1607 (1998).
- Liang, C.-C., Park, A. Y. & Guan, J.-L. *In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*. *Nat Protoc* **2**, 329–333 (2007).
- Choi, S. S. *et al.* Hedgehog pathway activation and epithelial-to-mesenchymal transitions during myofibroblastic transformation of rat hepatic cells in culture and cirrhosis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **297**, G1093–1106 (2009).
- Maitah, M. Y., Ali, S., Ahmad, A., Gadgeel, S. & Sarkar, F. H. Up-regulation of sonic hedgehog contributes to TGF- β 1-induced epithelial to mesenchymal transition in NSCLC cells. *PLoS ONE* **6**, e16068 (2011).
- Abraldes, J. G. *et al.* Simvastatin treatment improves liver sinusoidal endothelial dysfunction in CCl₄ cirrhotic rats. *J. Hepatol.* **46**, 1040–1046 (2007).
- Xie, G. *et al.* Hedgehog signalling regulates liver sinusoidal endothelial cell capillarisation. *Gut* **62**, 299–309 (2013).
- Pola, R. *et al.* The morphogen Sonic hedgehog is an indirect angiogenic agent upregulating two families of angiogenic growth factors. *Nat. Med.* **7**, 706–711 (2001).
- Pinter, M. *et al.* Hedgehog inhibition reduces angiogenesis by downregulation of tumoral VEGF-A expression in hepatocellular carcinoma. *United European Gastroenterol J* **1**, 265–275 (2013).
- Zafra, C. *et al.* Simvastatin enhances hepatic nitric oxide production and decreases the hepatic vascular tone in patients with cirrhosis. *Gastroenterology* **126**, 749–755 (2004).
- Simon, T. G., King, L. Y., Zheng, H. & Chung, R. T. Statin use is associated with a reduced risk of fibrosis progression in chronic hepatitis C. *J. Hepatol.* (2014). doi: 10.1016/j.jhep.2014.08.013.

37. Trebicka, J. *et al.* Role of β 3-adrenoceptors for intrahepatic resistance and portal hypertension in liver cirrhosis. *Hepatology* **50**, 1924–1935 (2009).
38. Resch, M. *et al.* Alterations in mechanical properties of mesenteric resistance arteries in experimental portal hypertension. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **297**, G849–857 (2009).
39. Wiest, R. *et al.* Bacterial translocation in cirrhotic rats stimulates eNOS-derived NO production and impairs mesenteric vascular contractility. *J. Clin. Invest.* **104**, 1223–1233 (1999).
40. Grace, J. A. *et al.* Activation of the MAS receptor by angiotensin-(1-7) in the renin-angiotensin system mediates mesenteric vasodilatation in cirrhosis. *Gastroenterology* **145**, 874–884.e5 (2013).
41. Trebicka, J. *et al.* Role of cannabinoid receptors in alcoholic hepatic injury: steatosis and fibrogenesis are increased in CB2 receptor-deficient mice and decreased in CB1 receptor knockouts. *Liver Int.* **31**, 860–870 (2011).
42. Huss, S. *et al.* Development and evaluation of an open source Delphi-based software for morphometric quantification of liver fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair* **3**, 10 (2010).
43. Trebicka, J. *et al.* Expression of vasoactive proteins in gastric antral mucosa reflects vascular dysfunction in patients with cirrhosis and portal hypertension. *Liver Int.* (2014). doi: 10.1111/liv.12613.
44. Wojtalla, A. *et al.* The endocannabinoid N-arachidonoyl dopamine (NADA) selectively induces oxidative stress-mediated cell death in hepatic stellate cells but not in hepatocytes. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **302**, G873–887 (2012).
45. Granzow, M. *et al.* Angiotensin-II type 1 receptor-mediated Janus kinase 2 activation induces liver fibrosis. *Hepatology* **60**, 334–348 (2014).
46. Raskopf, E. *et al.* Toxic damage increases angiogenesis and metastasis in fibrotic livers via PECAM-1. *Biomed Res Int* **2014**, 712893 (2014).
47. Schmitz, V. *et al.* Plasminogen fragment K1-5 improves survival in a murine hepatocellular carcinoma model. *Gut* **56**, 271–278 (2007).

Acknowledgments

The authors thank G. Hack and S. Bellinghausen for excellent technical assistance. The study was supported by grants from Bonfor Foundation (to JT), the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB TRR57 to JT), as well as from grants of H. J. & W. Hector Stiftung (to JT).

Author Contributions

J.T. initiated and coordinated the work. F.E.U., G.R., S.S.C., M.G., S.K., E.R., S.G. and J.T. performed experiments. F.E.U., G.R., S.S.C., M.G. and J.T. performed statistics. P.F.M.v.d.V. and D.O.F. provided essential materials. F.E.U., G.R., S.S.C., M.G., T.S., P.F.M.v.d.V., A.M.D. and J.T. drafted the manuscript. All authors critically discussed and corrected the manuscript. All authors reviewed the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Uschner, F. E. *et al.* Statins activate the canonical hedgehog-signaling and aggravate non-cirrhotic portal hypertension, but inhibit the non-canonical hedgehog signaling and cirrhotic portal hypertension. *Sci. Rep.* **5**, 14573; doi: 10.1038/srep14573 (2015).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

4. Danksagung

Ich möchte allen Mitarbeiter vom Labor für Leberfibrose und portale Hypertonie der Universität Bonn für die umfangreiche Hilfe bedanken. Ganz besonders möchte ich mein Betreuer Prof. Dr.med. Jonel Trebicka für die gute Betreuung, Anleitung und Motivation bedanken.

Außerdem möchte ich mich herzlichst bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. T. Sauerbruch für seine umfangreiche Hilfe bedanken. Ihm verdanke ich die Chance, diese Arbeit machen zu dürfen. Seine Erfahrung und tiefgreifende Kenntnisse hat mir sehr viel geholfen diese Arbeit fertig zu machen.

Zuletzt möchte ich meine Familie bedanken, die immer auf meine Seite stand und ohne sie wäre diese nicht möglich gewesen.