

Untersuchung der Angiotensin II-Typ 1- Rezeptor-vermittelten kontraktilen Signalwege in der hepatischen Fibrose

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

MICHAELA GRANZOW

aus

BAD HERSFELD

BONN 2013

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Tilman Sauerbruch
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Dieter Fürst

Tag der Promotion: 19. August 2013

Erscheinungsjahr: 2013

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	IX
ABSTRACT	XI
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	XIII
TABELLENVERZEICHNIS	XV
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	XVII
I. EINLEITUNG	1
1. Anatomie und Fibrogenese der Leber.....	1
2. Komplikationen der Leberfibrose	4
2.1. Leberzirrhose	4
2.2. Portale Hypertonie	5
2.3. Weitere Komplikationen	7
3. Ursprungszellen der Leberfibrose	7
3.1. Rolle der hepatischen Sternzellen in der Leberfibrose	8
4. Das Renin-Angiotensin-System (RAS)	11
5. Der Angiotensin II-Typ 1-Rezeptor (AT1R).....	13
5.1. Klassischer kontraktiler Signalweg des AT1R.....	14
5.2. Kontraktiler Signalweg über Janus-Kinase-2 (JAK2)-Aktivierung	15
5.3. Rezeptor-Internalisierung über β -Arrestin-2 (bArr2)	17
6. Therapeutische Strategien zur Behandlung der Leberfibrose.....	20
II. ZIELSETZUNG	23
III. MATERIAL UND METHODEN	25
1. Material	25
1.1. Chemikalien	25
1.2. Enzyme	27
1.3. Antikörper.....	27

1.4. Oligonukleotide	29
1.5. Laborgeräte	29
1.6. Verbrauchsmaterialien	31
1.7. Größenstandards	32
1.8. Kits	33
1.9. Software	33
1.10. Versuchstiere	34
1.10.1. AT1a-Rezeptor <i>knock out</i> Mäuse	34
1.10.2. β -Arrestin-2 <i>knock out</i> Mäuse	34
1.11. Gewinnung humaner Leberproben	35
2. <i>in vivo</i> Methoden	35
2.1. Anästhesie	35
2.2. Isolierung primärer hepatischer Sternzellen	35
2.2.1. Lösungen	35
2.2.1.1. HSC-spezifische Lösungen	37
2.2.1.2. Hepatozyten-spezifische Lösungen	37
2.2.1.3. Kupferzell-spezifische Lösungen	38
2.2.2. Isolierung primärer muriner HSCs	38
2.2.3. Isolierung primärer muriner Hepatozyten	39
2.2.4. Isolierung primärer muriner Kupferzellen	40
2.3. Induktion der Fibrose in Maus und Ratte	40
2.3.1. Gallengangsligatur	40
2.3.2. Tetrachlorkohlenstoff(CCl ₄)-Intoxikation	41
2.4. <i>In situ</i> Leberperfusion	42
2.5. Hämodynamische Messungen	43
2.5.1. Messung von Blut- und Pfortaderdruck	43
2.5.2. Messung der Durchblutung mittels kolorierter Mikrosphären	44
2.6. Pharmakologische Modulation von Maus und Ratte	46
2.6.1. Implantation osmotischer Minipumpen	46
2.6.2. Injektion von AG490	46
2.7. Organentnahme	46
3. Molekularbiologische Methoden	47
3.1. Isolierung und Reinigung von DNA	47
3.2. Isolierung und Reinigung von RNA	47
3.3. Horizontale Gelelektrophorese - Auftrennung von DNA	48

3.4. Polymerasekettenreaktion (PCR).....	49
3.4.1. Standard-PCR	49
3.4.2. Reverse Transkription	50
3.4.3. Relative Echtzeit-PCR	51
4. Biochemische Methoden	52
4.1. Homogenisierung von Leberproben	52
4.2. Bestimmung der Proteinkonzentration	52
4.3. Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid Gel- elektrophorese (SDS-PAGE)	53
4.4. Transfer von Proteinen auf eine Membran (Western Blot).....	55
4.5. Immunologische Detektion von Proteinen mittels Chemilumineszenz..	56
4.6. Densitometrische Quantifizierung der Protein-Menge	57
4.7. Hydroxyprolinmessung.....	58
5. Zellbiologische Methoden	59
5.1. Zellkulturmedien.....	59
5.2. Zellzahlbestimmung	60
5.3. Zellkultivierung	60
5.3.1. LX2-Zelllinie (human)	60
5.3.2. primäre hepatische Sternzellen (HSC)	60
5.3.3. primäre Hepatozyten	60
5.4. Inkubation der Zellen.....	61
5.4.1. Angiotensin-II-Inkubation	61
5.4.2. AG490-Inkubation.....	61
5.5. Ernten der Zellen für DNA- oder RNA-Isolation	61
6. Immunhistochemie.....	62
6.1. Immunhistochemische Färbung	62
6.1.1. Janus-Kinase-2 (JAK2) / pJAK2-Färbung	62
6.1.2. <i>α-smooth muscle</i> Aktin (α SMA)-Färbung	63
6.1.3. Sirius-Rot Färbung	63
6.2. Indirekte Immunfluoreszenzmarkierung	63
6.3. Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (LSM)	64
6.4. Auswertung der Immunhistochemie.....	64
6.4.1. Digitalisierung der Färbungen	64
6.4.2. Auswertung mittels spezieller Software	65
7. Statistische Auswertung	65

IV. ERGEBNISSE	67
1. Rolle von JAK2 in der AT1R-vermittelten Fibrose	67
1.1. Hepatische Expression von AT1R und dessen Effektoren	67
1.1.1. Expression in der humanen Zirrhose	69
1.1.2. Expression im Rattenmodell	69
1.1.3. Expression im Mausmodell	72
1.2. Zelluläre Verteilung von JAK2 und pJAK2 in gesundem und fibrotischem Lebergewebe	72
1.3. JAK2 wird in aktivierten HSCs phosphoryliert.....	74
1.3.1. Expression von AT1R und dessen Effektoren in primären Leber- zellen.....	75
1.4. Die JAK2-Hemmung oder das Fehlen des AT1R verzögert die hepatis- che Fibrogenese	76
1.4.1. Hepatische Fibrose, α SMA- und pJAK2-Immunhistochemie in BDL-Ratten nach JAK2-Hemmung	76
1.4.2. Hepatische Proteinexpression und Fibrose in AT1R ^{-/-} und WT- Mäusen nach CCl ₄ -Intoxikation.....	78
1.4.3. Hepatische α -SMA-, JAK2- und pJAK2-Immunhistochemie in AT1R ^{-/-} und WT-Mäusen nach CCl ₄ -Intoxikation	80
1.5. Die Stimulation des AT1R aktiviert JAK2 in HSCs <i>in vivo</i>	81
1.5.1. Hepatische Proteinexpression nach Ang II-Gabe in Ratten.....	81
1.5.2. Hepatische Fibrose, Protein- und pJAK2-Expression in AT1R ^{-/-} und WT-Mäusen nach Ang II-Gabe	82
1.5.3. Hepatische Fibrose, α SMA- und Proteinexpression in WT-Ratten nach Ang II-Gabe mit oder ohne JAK2-Hemmung	85
1.6. Einfluss der JAK2-Hemmung auf die Hämodynamik.....	85
1.6.1. Effekt von AG490 auf die portale Hämodynamik und den mittleren arteriellen Druck in zirrhotischen Ratten <i>in vivo</i>	85
1.6.2. Effekt von AG490 und AT1R-Blockade auf den hepatischen Wi- derstand in Ratten <i>in situ</i>	87
2. Rolle von bArr2 in der AT1R-vermittelten Fibrose	89
2.1. Expression der bArr2/ERK-Achse im Mausmodell.....	89
2.2. Expression und Aktivierung von ERK1/2 in fibrotischen AT1R ^{-/-} Mäu- sen.....	90

2.3. Stimulation des AT1R entkoppelt den JAK2/Rho-Kinase-Signalweg vom Rezeptor <i>in vitro</i>	90
2.4. Ang II-Gabe und JAK2-Hemmung in bArr2 ^{-/-} Mäusen	91
2.4.1. Fibrose und HSC-Aktivierung nach AT1R-Stimulation und JAK2- Hemmung.....	92
2.4.2. Expression des JAK2/Rho-Kinase-Signalwegs nach AT1R- Stimulation und JAK2-Hemmung.....	93
V. DISKUSSION.....	95
1. Charakterisierung von JAK2 in der hepatischen Fibrogenese	95
1.1. JAK2 wird in der Leberfibrose aktiviert	95
1.2. JAK2 wird in Myofibroblasten-ähnlichen HSCs exprimiert und aktiviert	96
1.3. Die JAK2-Aktivierung erfolgt AT1R-abhängig.....	98
1.4. Eine Hemmung von JAK2 verlangsamt die Fibrogenese.....	100
1.5. Der erhöhte intrahepatische Widerstand in der Fibrose kann durch eine JAK2-Hemmung vermindert werden	101
2. Charakterisierung von bArr2 in der hepatischen Fibrogenese.....	102
2.1. Die bArr2/ERK-Achse wird in der hepatischen Fibrose größtenteils AT1R-abhängig hochreguliert	103
2.2. Nach einer starken AT1R-Stimulation entkoppelt bArr2 den JAK2/Rho- Kinase Signalweg in HSCs	104
2.3. Bei Fehlen von bArr2 führt die AT1R-Stimulation durch eine JAK2- Aktivierung zur hepatischen Fibrose	104
3. Zusammenspiel von pJAK2 und bArr2 in der hepatischen Fibrose....	105
4. Fazit	107
VI. AUSBLICK.....	109
VII. LITERATURVERZEICHNIS	111
VII. ANHANG.....	131
1. Publikationen	131

ZUSAMMENFASSUNG

In chronischen Leberschäden trägt das Renin-Angiotensin-System (RAS) zur hepatischen Fibrose bei. Daher dient die Erforschung der intrazellulären Signalwege des Angiotensin II-Typ 1-Rezeptors (AT1R) dem besseren Verständnis der Strukturveränderungen der Leber und deren Regulation. Diese Arbeit zeigt, dass diese Signalkaskaden vor allem in den aktivierten hepatischen Sternzellen (HSC) relevant sind, da sie die Hauptproduzenten der extrazellulären Matrix (ECM) darstellen und somit am meisten zur Fibrose beitragen.

Es konnte erstmals gezeigt werden, dass die phosphorylierte Janus Kinase 2 (pJAK2) eine große Rolle in einem AT1R-vermittelten G-Protein-abhängigen Signalweg spielt. Dieser führt über RhoA und Arhgef1 zur Rho-Kinase-Aktivierung und trägt dadurch zur Fibrose bei. Nach dessen Stimulation phosphorylieren G-Protein-Rezeptor-Kinasen (GRK) den AT1R, was die Bindung von β -Arrestin 2 (bArr2) an den Rezeptor ermöglicht. bArr2 entkoppelt daraufhin die G-Protein-abhängigen Signalwege, wodurch die Signalweiterleitung des pJAK2/Rho-Kinase-Signalwegs unterbrochen wird. Während die Induktion der G-Protein-abhängigen Signalwege und die AT1R-Desensibilisierung in der gesunden Leber in einem Gleichgewicht stehen, scheint sich dieser Prozess während einer chronischen Leberschädigung zugunsten der hepatischen Fibrose zu verschieben.

Diese Arbeit zeigt, dass die verstärkte AT1R-Stimulation zur Aktivierung der HSCs und infolgedessen zur Leberfibrose führt.

ABSTRACT

The Renin Angiotensin System (RAS) contributes to hepatic fibrosis in chronic liver injury. Therefore, the investigation of intracellular pathways of the Angiotensin II-type 1-receptor (AT1R) provides a better understanding for the structural changes of the liver and its regulation. This work displays the relevance of these signalling pathways in the activated hepatic stellate cells (HSCs). These are the main producers of the extracellular matrix (ECM) and thus the main responsible hepatic celltype for the development of liver fibrosis.

It could be shown for the first time that the phosphorylated Janus kinase 2 (pJAK2) plays a crucial role in the AT1R-mediated G-protein-dependent pathway. It leads to Rho-kinase activation via RhoA and Arhgef1 and thereby contributes to HSC-activation. After its stimulation, the AT1R is phosphorylated by G-protein-receptor-kinases (GRKs), which allows the uncoupling of the G-protein-dependent pathways by the binding of β -Arrestin2 (bArr2) to the AT1R. This causes an interruption of the JAK2/Rho-kinase-pathway. While the induction of the G-protein-dependent pathways and the AT1R-densensitization are balanced in a healthy liver, this process seems to be dysregulated in a chronic liver injury in favour of the hepatic fibrosis.

This thesis demonstrates that the increased AT1R-stimulation leads to the activation of the HSCs and consequently liver fibrosis.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. I/1.	Überblick über ein Sinusoid mit den umgebenden Zellen einer gesunden Leber.....	2
Abb. I/2.	Entstehung und Komplikation der portalen Hypertension	6
Abb. I/3.	Schematischer Überblick über die HSC-Aktivierung und Leberfibrose.....	10
Abb. I/4.	Schematisches Diagramm über das RAS	12
Abb. I/5.	Schema des ternären Komplexmodells für die Bindung von Agonisten und G-Proteinen an GPCRs	13
Abb. I/6.	Schematischer Überblick über den klassischen kontraktilen Signalweg des AT1R.....	15
Abb. I/7.	Schematischer Überblick über den kontraktilen JAK2/Rho-Kinase-Signalweg des AT1R.....	16
Abb. I/8.	Schematischer Überblick über die Entkopplung des AT1R durch bArr2 nach G-Protein-Bindung	18
Abb. IV/1.	Hepatische Expression des AT1R und dessen Effektoren in der humanen Zirrhose.	68
Abb. IV/2.	Hepatische Expression von AT1R und dessen Effektoren in der experimentellen Fibrose im Rattenmodell	70
Abb. IV/3.	Hepatische Expression von AT1R und dessen Effektoren in der experimentellen Fibrose im Mausmodell.....	71
Abb. IV/4.	JAK2- und pJAK2-Immunhistochemie in gesundem und fibrotischem Lebergewebe.	73
Abb. IV/5.	Doppelfärbung von pJAK2 und α SMA in zirrhotischen humanen Leberschnitten.	74
Abb. IV/6.	Hepatische Proteinexpression in primären Leberzellen aus der Maus.....	75
Abb. IV/7.	Hepatische Fibrose, α -SMA- und pJAK2-Immunhistochemie in BDL-Ratten nach JAK2-Hemmung.....	77
Abb. IV/8.	Hepatische Proteinexpression und Fibrose in AT1R ^{-/-} und WT-Mäusen nach CCl ₄ -Intoxikation	79
Abb. IV/9.	Hepatische α SMA-, JAK2 und pJAK2-Immunhistochemie in AT1R ^{-/-} und WT-Mäusen nach CCl ₄ -Intoxikation.....	80
Abb. IV/10.	Hepatische Proteinexpression nach Ang II-Gabe in Ratten	82

Abb. IV/11.	Hepatische Fibrose, Protein- und pJAK2-Expression in AT1R ^{-/-} und WT-Mäusen nach Ang II-Gabe.....	83
Abb. IV/12.	Hepatische Fibrose, αSMA- und Proteinexpression in WT-Ratten nach Ang II-Gabe mit oder ohne JAK2-Hemmung	84
Abb. IV/13.	Effekt von AG490 auf die portale und systemische Hämodynamik in zirrhotischen Ratten <i>in vivo</i>	86
Abb. IV/14.	Effekt von AG490 und Losartan auf den hepatischen Widerstand in Ratten <i>in situ</i>	88
Abb. IV/15.	Expression der bArr2/ERK-Achse im Mausmodell	89
Abb. IV/16.	Expression und Aktivierung von ERK1/2 in fibrotischen AT1R ^{-/-} Mäusen.....	90
Abb. IV/17.	Proteinexpression von bArr2 und pJAK2 in LX2-Zellen nach Ang II-Gabe.....	91
Abb. IV/18.	Fibrose und HSC-Aktivierung nach AT1R-Stimulation und JAK2-Hemmung	92
Abb. IV/19.	Expression des JAK2/Rho-Kinase-Signalwegs nach AT1R-Stimulation und JAK2-Hemmung in bArr2 ^{-/-} Mäusen.....	93
Abb. V/1.	Schematischer Überblick über den hypothetischen AT1R-abhängigen Signalweg der JAK2-Aktivierung	99
Abb. V/2.	Überblick über den hypothetischen JAK2/Rho-Kinase- und bArr2/ERK-Signalweg in der gesunden und fibrotischen Leber .	106

TABELLENVERZEICHNIS

Abb. III/1.	Primäre Antikörper	27
Abb. III/2.	Sekundäre Antikörper, gekoppelt an ein Konjugat.....	28
Abb. III/3.	Intoxikationsschema	41
Abb. III/4.	Standard-PCR-Programm.....	49

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
A	Adenosin
ACE	<i>Angiotensin-converting Enzyme</i>
AGT	Angiotensinogen
AK	Antikörper
Ang	Angiotensin
Arhgef-1	<i>Rho-Guanin-Nukleotid Exchange Factor 1</i>
α -SMA	<i>alpha-smooth muscle Actin</i>
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AT1R	Angiotensin II-Typ 1-Rezeptor
AT1R ^{-/-}	AT1-Rezeptor <i>knock out</i>
AT2R	Angiotensin II-Typ 2-Rezeptor
bArr	β -Arrestin
bArr2 ^{-/-}	β -Arrestin2 <i>knock out</i>
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
BCA	<i>Bicichoninic Acid</i>
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-Phosphat
Bcl-xL	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BDL	Gallengangsligatur
bidest.	bidestilliert
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
Ca ²⁺	Kalzium
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CaM	Calmodulin
CCl ₄	Tetrachlorkohlenstoff
cDNA	komplementäre DNA
CuCl ₂	Kupferchlorid
d	Tag

Da	Dalton
DAG	Diacylglycerol
DC	<i>Detergent Compatible</i>
demin.	demineralisiert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxynuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>Epithelial Growth Factor</i>
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
ERK	<i>Extracellular signal Regulated Kinase</i>
FAM	6-Carboxyfluoreszin
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
g	relative Zentrifugalbeschleunigung
G	Guanosin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GBSS	<i>Gey's Balanced Sodium Solution</i>
GDP	Guanin-Diphosphat
GEF	Guanin-Austauschfaktor
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GRK	<i>G-Protein Regulated Kinase</i>
GTP	Guanin-Triphosphat
h	Stunde
H ⁺	Hydron
HBSS	<i>Hank's Balanced Sodium Solution</i>
HBV	Hepatitis B-Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCl	Salzsäure
HCV	Hepatitis C-Virus
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Hoechst	2'-(4-Ethoxyphenyl)-5-(4-methyl-1-piperazinyl)-2,5'-bi-1H-benzimidazol trihydrochlorid

H ₂ O	Wasser
HSC	Hepatische Sternzelle
IGF	<i>Insulin Like Growth Factor</i>
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IKK	I kappa B Kinase
IL-6	Interleukin 6
IP ₃	Inositoltriphosphat
JAK2	Janus-Kinase 2
K	Dissoziationskonstante
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
K ₂ HPO ₄	Dikaliumhydrogenphosphat
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
kb	Kilobasenpaar(e)
Lsg.	Lösung
LSM	<i>Laser Scanning Microscopy</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MasR	Mas-Rezeptor
MEK	<i>Mitogen-activated extracellular kinase</i>
MFB	Myofibroblast
MgCl ₂	Magnesiumdichlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
miRNA	mikroRNA
MLC	<i>Myosin Light Chain</i> , Myosin-leichte-Kette
MLCP	Myosin-leichte-Kette Phosphatase
MLCK	Myosin-leichte-Kette Kinase
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
MMP	Matrix Metalloprotease
mRNA	<i>messenger RNA</i>
Na ⁺	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (reduziert)
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat

NASH	nicht-alkoholische Steatohepatitis
ns	nicht signifikant
p.a.	<i>per analysis</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>Phosphat Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PEG	Polyethylenglycol
PLC	Phospholipase C
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C
PYK2	Protein-Tyrosin-Kinase 2
Raf1	<i>Rat fibrosarcoma</i>
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
RAS	Renin-Angiotensin-System
RGD	Arginin-Glycin-Asparaginsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i>
SH2	<i>Src Homology 2</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SOCS	<i>Suppressors of Cytokine Signaling</i>
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAMRA	Tetramethylrhodamin
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris Buffered Saline
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>

TIMP	<i>Tissue Inhibitor of Metalloproteinase</i>
T _M	Schmelztemperatur
TLR	<i>Toll like Receptor</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween	Polyoxyethylenglykolsorbitolmonolaureat
Tyr	Tyrosin
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolettes Licht
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VSMC	<i>Vascular Smooth Muscle Cell</i>
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
ZnSO ₄	Zinksulfat
7TMR	Sieben Transmembrandomänen-Rezeptor

I. EINLEITUNG

1. Anatomie und Fibrogenese der Leber

Die Aufgabe der Leber ist hauptsächlich die Entgiftung des Körpers. Dabei wird das Blut, das aus dem Magen und dem Darm in die Leber gelangt, in der Leber aufbereitet. Die Nährstoffe und Medikamente werden in Produkte aufgespalten, die vom restlichen Körper einfacher aufgenommen werden können. Außerdem spielt die Leber im weiteren Metabolismus, wie der Glykogenspeicherung, dem Abbau von roten Blutkörperchen, der Plasma-Protein-Synthese und der Hormonproduktion, eine große Rolle.

Die Leber befindet sich im rechten oberen Bereich der Bauchhöhle unterhalb des Zwerchfells und über dem Magen, der rechten Niere und des Darms. Sie ist dunkelrot-braun gefärbt und wiegt beim erwachsenen Menschen etwa 1,5 kg. Das sauerstoffreiche Blut fließt durch die *Arteria hepatica* in die Leber, während das nährstoffreiche Blut durch die hepatische Portalvene in das Organ gelangt. Die acht Leberlappen, aus denen die humane Leber aufgebaut ist, bestehen wiederum aus tausenden von winzigen Leberläppchen, an deren Eckpunkte die Portalfelder liegen. Diese Einheit, bestehend aus der *Arteria interlobularis*, einem Ast der Leberarterie, der *Vena interlobularis*, einem Ast der Pfortader und aus dem *Ductus biliferus*, dem Gallengang, wird auch als Glisson Trias bezeichnet. Die Leber ist aus epithelialen Zellen (Hepatozyten), endothelialen Zellen und ruhenden nichtparenchymalen Zellen aufgebaut, wozu auch die hepatischen Sternzellen (HSC) und die Kupfferzellen zählen. Das Sinusoid ist die hepatisch mikrovaskuläre Einheit, die von dem Endothelium umgeben ist. Im subendothelialen Dissé-Raum, der das Endothelium von den Hepatozyten trennt, befinden sich die HSCs. In diesem Raum ist eine Basalmembran-ähnliche Matrix lokalisiert, die essentiell zur Instandhaltung der differenzierten Funktion der Parenchymzellen ist. Diese erlauben den metabolischen Austausch zwischen dem Blut und den Hepatozyten (Abb. 1/1., Bedossa & Paradis 2003).

Die Erkrankung der Leber ist in Deutschland die vierthäufigste Todesursache. Die Leberfibrose stellt dabei eine reversible Leberschädigung dar, die durch eine akute oder chronische Zellschädigung hervorgerufen wird. Während sich bei einer akuten Verletzung die Veränderungen in der Leberstruktur wieder zurückbilden, wird bei einer chronischen Entzündung der Leber das Leberparenchym zunehmend durch

Narbengewebe, der sogenannten extrazellulären Matrix (ECM), ersetzt. Dies ruft über einen längeren Zeitraum verschiedene Komplikationen hervor, die in Abschnitt I/2. genauer erläutert werden. Eine Ablagerung von ECM im Dissé-Raum führt zum Verlust der normalen Fenestration, die charakteristisch für die Endothelschicht ist. Diese veränderte Fenestration verursacht wiederum eine Beeinträchtigung im normalen bidirektionalen metabolischen Austausch zwischen dem Portalvenenblutfluss und den Hepatozyten (Schaffner *et al.* 1963; Abb. I/3.).

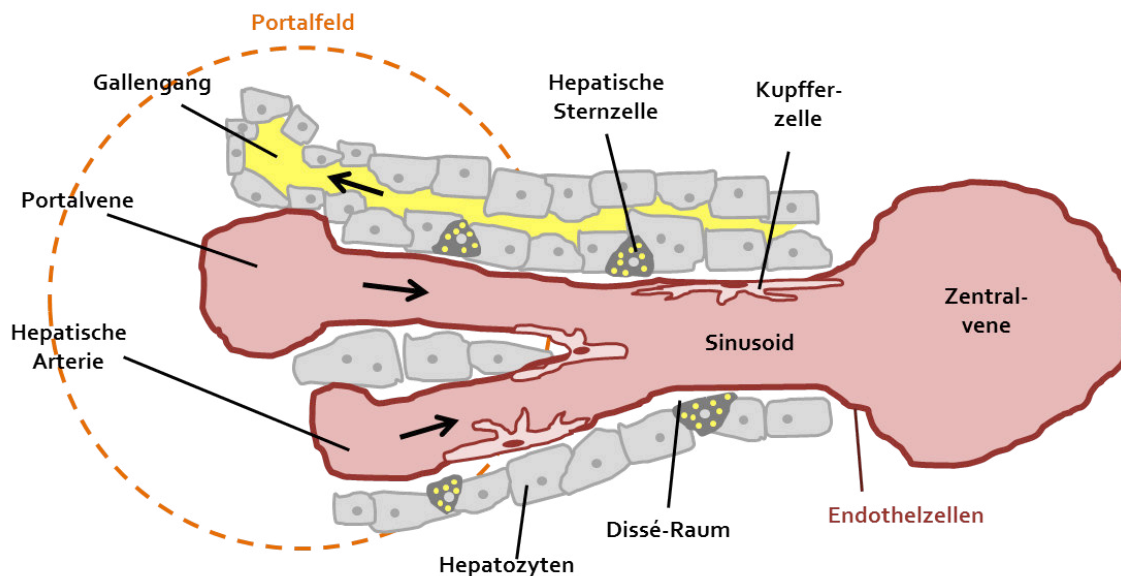


Abb. I/1. Überblick über ein Sinusoid mit den umgebenden Zellen einer gesunden Leber [eigene Darstellung, modifiziert nach Frevert *et al.* 2005]

Das Sinusoid der Leber ist von verschiedenen Zelltypen umgeben. Das Blut aus der Portalvene und der hepatischen Arterie fließt im Sinusoid zusammen und führt zur Zentralvene der Leber. Die Gefäße werden von Endothelzellen (dargestellt durch die rote Linie) umgeben, die im Sinusoid-Bereich fenestriert sind. Außerdem sind die Kupferzellen in den Blutgefäßen lokalisiert. Um die Endothelzellen, durch den Dissé-Raum getrennt, liegen die Hepatozyten. Die ruhenden hepatischen Sternzellen mit ihren Lipidtropfen (gelbe Punkte) liegen im Dissé-Raum. In entgegengesetzter Richtung zum Blutstrom fließt die von den Hepatozyten gebildete Galle in den Gallengang ab. Zusammen mit der Portalvene und der hepatischen Arterie bildet der Gallengang ein sogenanntes Portalfeld.

Die Fibrose entwickelt sich in unterschiedlichem Maße und hängt von dem Krankheitsauslöser, wie Infektionen, Ernährung, Toxine oder Stoffwechselveränderungen ab (Bircher *et al.* 1999, Sherlock & Dooley 2002, Schiff *et al.* 2003). Durch virale Infektionen mit dem Hepatitis B oder C-Virus (HBV, HCV), Fettleibigkeit, die zur nicht-alkoholischen Fettleber (NASH) führt, toxischen Komponenten, wie Alkohol, Cholestase und genetischen Erkrankungen, kann die Leberfibrose induziert werden

(Schuppan & Afdhal 2008). Je nachdem, wo die Schädigung auftritt, welche fibrogenen Zellen involviert sind, welche Krankheitsursache vorliegt und welcher vorherrschende fibrogene Mechanismus besteht, werden verschiedene Muster der Fibroseentwicklung beschrieben (Cassiman *et al.* 2002).

Bei der chronisch viralen Hepatitis B und Hepatitis C-Infektion tritt meist die überbrückende (*bridging*) Fibrose auf, die zur Bildung von portal-zentral fibrotischen Septen führt. Bei alkoholbedingten Krankheiten und in der nichtalkoholischen Fettleber wird meist die perisinusoidale oder perizelluläre Fibrose beobachtet. Die Fibrose, die durch Alkoholmissbrauch entsteht, wird durch eine ECM-Ablagerung im Dissé-Raum um die Sinusoide oder Hepatozyten charakterisiert. Bei der biliären Fibrose proliferieren die Gallengänge um die periduktulären Myofibroblasten (MFB), was zur Bildung von portal-portal fibrotischen Septen um die Leberknoten führt. Wird durch eine Leberschädigung der Venenfluss verändert, bildet sich die zentrolobuläre Fibrose, die durch zentral-zentral fibrotische Septen gekennzeichnet ist (Hernandez-Gea & Friedman 2011).

Die hepatische Fibrose wird durch unterschiedliche Stimuli ausgelöst. Ein Auslöser sind die reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Diese instabilen Moleküle, wie z.B. Superoxid, Hydroxyl-Radikale, Hydrogenperoxid und Aldehyd-Endprodukte, werden durch Lipid-Peroxidation gebildet und können von Hepatozyten, Makrophagen, Sternzellen oder inflammatorischen Zellen stammen (Parola & Robino 2001, Jaeschke 2006). Der klassische Signalweg in Hepatozyten, der durch ROS ausgelöst wird, resultiert aus der Induktion des Zytochroms P450 2E1 und führt zur perizentralen Schädigung in der alkoholischen und nicht-alkoholischen Steatohepatitis (Castillo *et al.* 1992, Chitturi & Farrell 2001). Außerdem konnte eine reduzierte Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH)-Oxidase als eine weitere Quelle des oxidativen Stresses in hepatischen Sternzellen und Kupfferzellen identifiziert werden (De Minicis & Brenner 2007).

Die Apoptose parenchymaler Zellen ist ein wichtiger inflammatorischer Stimulus in der Leberfibrose (Jaeschke 2003) der zur HSC-Aktivierung führt, wodurch die HSCs die Fähigkeit zur Phagozytose von apoptotischen Zellkörper erlangen (Canbay *et al.* 2004). Dies führt schließlich zur Induktion von NADPH (Zhan *et al.* 2006). Ein profibrogener Prozess kann auch durch die Apoptose von Hepatozyten, induziert durch die Störung des anti-apoptotischen Mediators Bcl-xL und Fas, hervorgerufen werden (Canbay *et al.* 2002, Takehara *et al.* 2004). Sind in der Leberfibrose die Schäden durch äußere Stimuli sehr hoch, spielt die Nekrose in der Zellantwort eine größere Rolle als die Apoptose (Parola & Robino 2001, Jaeschke 2006). Zum

Verständnis der humanen Pathogenese hat die Entdeckung der *Toll-like*-Rezeptoren (TLR) maßgeblich beigetragen (Wagner & Bauer 2006). Während die Identifizierung des TLR4 auf Kupfferzellen gut bekannt ist (Poltorak *et al.* 1998, Hoshino *et al.* 1999, Uesugi *et al.* 2001), war die Expression auf HSCs unerwartet (Paik *et al.* 2003). Es ist bekannt, dass die Signalweiterleitung über TLR4 in Makrophagen essentiell für die inflammatorische Antwort ist (Hua *et al.* 2007). Die Signalgebung als Antwort auf Lipopolysaccharide und möglicherweise endogenen TLR4-Liganden in HSCs scheint jedoch bei der Ausbildung einer fibrogenen Antwort wichtiger zu sein als in Kupfferzellen. Die Expression des Knochenmorphogenen Proteins (BMP) und des Activin-Inhibitors, der den *Transforming Growth* Faktor β 1 (TGF β 1) hemmt, werden in HSCs herunterreguliert. Dadurch wird vermehrt TGF β 1 freigesetzt, was das bedeutendste Zytokin in der Fibrogenese ist (Seki *et al.* 2007).

Während eine Fibrosierung der Leber anfangs größtenteils asymptomatisch verläuft, führt das Fortschreiten der Erkrankung im weiteren Verlauf zur Leberzirrhose und ihren Komplikationen bis hin zum Leberversagen.

2. Komplikationen der Leberfibrose

Im Gegensatz zu vielen anderen Organen besitzt die Leber die Fähigkeit, sich nach einer Schädigung zu regenerieren. Eine andauernde Belastung der Leber führt allerdings zur Zersetzung des gesunden Lebergewebes und somit zu verschiedenen Komplikationen.

2.1. Leberzirrhose

Die Leberzirrhose resultiert aus einer fortgeschrittenen hepatischen Fibrose. Wie häufig eine Zirrhose in der europäischen Bevölkerung auftritt kann nicht genau bestimmt werden, da die Prävalenz sehr stark von den Risikofaktoren und dem untersuchten Patientenkollektiv abhängt. In Obduktionsstudien beispielsweise schwankt die Häufigkeit von etwa 5% in Dänemark bis hin zu 10% in Italien (Graudal *et al.* 1991, Savolainen *et al.* 1992).

Bei der hepatischen Zirrhose füllt sich vor allem der Dissé-Raum als Antwort auf die chronische Schädigung zunehmend mit Narbengewebe und ECM, wodurch die endotheliale Fenestration verloren geht. Dieser Prozess wird als sinusoidale Kapil-

larisierung bezeichnet (Schaffner & Hopper 1963). Die vaskularisierten fibrotischen Septen verbinden die Portalfelder untereinander und mit den Zentralvenen. Dadurch bilden sich abgeschnürte Inseln von Hepatozyten, die von den fibrotischen Septen umgeben sind, aber dadurch keine Verbindung mehr zur Zentralvene besitzen. Dies resultiert in einer beeinträchtigten Hepatozyten- und somit Leberfunktion. Außerdem erhöht sich der Widerstand für den portalvenösen Ausfluss, wodurch die portale Hypertension entsteht, die in Abschnitt II./2.2. näher beschrieben wird. Eine weitere schwerwiegende Folgeerkrankung ist die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms (HCC), auf das in Abschnitt II./2.3. eingegangen wird.

Normalerweise wird die Leberzirrhose mit ihren veränderten Gefäßstrukturen als irreversibel erachtet (Friedman & Bansal 2006, Mallet *et al.* 2008), doch einige Studien zeigen, dass der Rückgang der Zirrhose nach Unterbrechung des entzündlichen Reizes zumindest teilweise möglich ist (Wanless *et al.* 2000, Desmet & Roskams 2004, Ramachandran & Iredale 2009, Henderson & Iredale 2007).

2.2. Portale Hypertonie

Die portale Hypertension ist eine schwere Komplikation der Leberzirrhose (Bosch 2007, Iwakiri & Groszmann 2006) und ist mit einer intra- und extrahepatischen Störung der Endothelfunktion verbunden (Iwakiri & Groszmann 2007). Der Pfortaderdruck, der als Druckgradient über der Leber gemessen wird, wird nach dem Ohm'schen Gesetz als das Produkt aus dem portalen Blutfluss und dem intrahepatischen Widerstand definiert (Bosch *et al.* 1992). Demnach kann die portale Hypertonie durch die Zunahme des Blutflusses („*Forward-Flow-Theory*“) als auch durch eine Erhöhung des intrahepatischen Widerstandes bedingt sein („*Backward-Flow-Theory*“). Die Durchblutung des Gefäßbettes der Leber wird durch präsinosoidale portale Venolen reguliert. Durch die Aktivierung und Transdifferenzierung von hepatischen Sternzellen und Kupfferzellen kapillarisieren die Sinusoide, was eine Widerstandserhöhung hervorruft (Housset *et al.* 1993, Kawada *et al.* 1993, Bauer *et al.* 1994). Die „*Backward-Flow-Theory*“ besagt, dass die Verstärkung des portalen Hochdrucks auf die primäre Erhöhung des intrahepatischen Widerstands zurückzuführen ist (Bosch & Garcia-Pagan 2000). An der Dysregulation der Gefäßkontraktion in der Leber und der Vasodilatation der splanchnischen Gefäße sind vor allem Endotoxine, Plättchen-aktivierende Faktoren und Stickstoffmonoxid (Mahl & Groszmann 1990, Lee *et al.* 1993), aber auch die Gefäßneubildung und gesteigerte Angiogenese beteiligt (Geerts *et al.* 2006).

Die Druckerhöhung vor der Pfortader, die an alle zuführenden Äste weitergegeben wird, bedingt die Bildung von Kollateralen und Anastomosen, die das portalvenöse Blut an der Leber vorbei zum kavalen Venensystem leiten (Abb. I/2.). Von großer klinischer Bedeutung sind die entstehenden gastro-ösophagealen Kollaterale, die sich zu Varizen entwickeln. Je größer diese Varizen werden und je höher der Portaldruck steigt, desto wahrscheinlicher wird eine Ruptur, die in bis zu 50% der Fälle für den Patienten tödlich endet.

Eine weitere aus der portalen Hypertonie resultierende Komplikation ist die Bildung von Aszites, eine Flüssigkeitsansammlung in der Bauchhöhle. Daraus ergeben sich weitere klinische Komplikationen, wobei die spontan-bakterielle Peritonitis das größte Risiko für den Patienten darstellt, da hierbei die Sterberate bei etwa 50% liegt (Wiest *et al.* 2000).

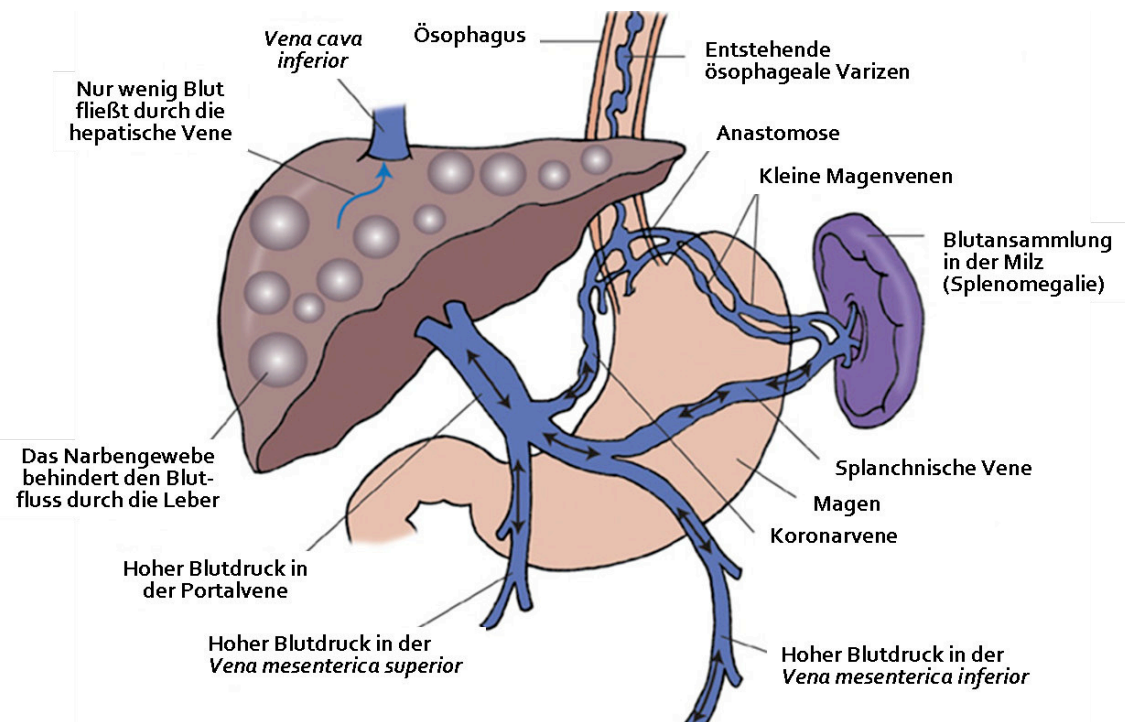


Abb. I/2. Entstehung und Komplikation der portalen Hypertension

Mit zunehmender Vernarbung kann das Blut nur noch verlangsamt und in geringem Maße durch die erkrankte Leber fließen. Dieser intrahepatische Widerstand verursacht einen Blutstau in der Pfortader, was wiederum zu einem höheren Blutdruck in den splanchnischen Gefäßen führt. Die Bildung von Varizen im Ösophagus und Magen sowie Anastomosen stellen dabei die gefährlichste Komplikation der portalen Hypertension dar.

Bildquelle: <http://www.vascularsurgeon.org/vascular/images/stories/acf57d.jpg>, die Abbildung wurde modifiziert, indem der untere Teil abgeschnitten und Beschriftungen aus dem Englischen ins Deutsche übersetzt wurden

2.3. Weitere Komplikationen

Verliert die Leber zunehmend intakte Hepatozyten und kann aufgrund ihrer Erkrankung nicht mehr ausreichend durchblutet werden, kommt es zur Leberinsuffizienz. Die Schwere der Leberschädigung wird anhand des sogenannten *Child-Pugh-Score* ermittelt (Child & Turgotte 1964, Pugh *et al.* 1973). Dieser Score wird anhand zwei klinischer Befunde und drei Laborwerten ermittelt und gibt eine Aussage über die Mortalitätsprognose des Patienten und somit auch über die Dringlichkeit einer Lebertransplantation.

Die hepatische Enzephalopathie entsteht durch die Auswirkung von Giftstoffen im Blut auf das zentrale Nervensystem und wird im Endstadium als Leberkoma bezeichnet. Doch auch das hepatorenale Syndrom sowie Ikterus über unterschiedliche pathophysiologische Wege sind Folgen des Leberversagens. Dies kann zum Multiorganversagen und schlussendlich zum Tod führen.

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist einer der meist verbreiteten Organumore weltweit. Er entsteht hauptsächlich als Folge einer Leberzirrhose (Bruix *et al.* 2001, Llovet *et al.* 2003, Sherman & Klein 2004). In Entwicklungsländern sind sehr häufig junge Patienten mit einer chronischen HBV-Infektion betroffen (Zhou *et al.* 2001), während in den Industrieländern vor allem ältere Patienten, die aufgrund HCV-Infektion an einer Zirrhose leiden, an HCC erkranken (Bruix *et al.* 1989, Colombo *et al.* 1991). Jährlich sterben etwa 700.000 Menschen an HCC, was 9 % der weltweiten Krebstodursachen entspricht (Ferlay *et al.* 2010)

3. Ursprungszellen der Leberfibrose

Nach der Entdeckung der portalen Fibroblasten in der Leber (Steiner & Carruthers 1961, Carruthers *et al.* 1962) konnte gezeigt werden, dass die α -smooth-muscle Aktin (α SMA)-exprimierenden Myofibroblasten (MFB) die Zellen sind, die hauptsächlich das Narbengewebe bei der Wundheilung produzieren (Schurch *et al.* 1998). Die ruhenden Zellen in der Leber können durch verschiedene Stimuli aktiviert und so zu MFB werden. Dafür kommen zum einen die in den hepatischen Portaltrakten lokalisierten Fibroblasten und zum anderen vor allem die im Dissé-Raum ruhenden hepatischen Sternzellen (HSC) in Betracht (Brenner 2009). So wurde

beispielsweise in den typischen Kollagenbereichen zirrhotischer Lebern eine große Anzahl an aktivierten HSCs gefunden (Olaso *et al.* 2001).

Bisher ist die exakte Herkunft der MFB allerdings noch ungeklärt, da verschiedene Zellen in Betracht kommen. Einiges deutet darauf hin, dass Fibrozyten aus dem Knochenmark oder zirkulierende mesenchymale Zellen in die geschädigte Leber einwandern und durch Transdifferenzierung zu MFBs zur Fibrose beitragen können (Bhunchet & Wake, 1992, Knittel *et al.* 1998, Kinnman *et al.* 2003, Guyot *et al.* 2006, Kisseleva *et al.* 2006, Asahina 2011)). Darüber hinaus gibt es auch vereinzelte Hinweise auf eine Umwandlung von Hepatozyten, Cholangiozyten oder Endothelzellen zu mesenchymalen Zellen, die wiederum zu aktivierten MFBs werden können. Dieser Prozess wird bei Hepatozyten und Cholangiozyten als epithelial-mesenchymale Transition (EMT) bezeichnet (Kalluri & Neilson 2003, Thiery & Sleeman 2006, Thiery *et al.* 2009, Piera-Valazquez *et al.* 2011). Es spricht aber sehr viel dafür, dass vor allem die Aktivierung der HSCs, die auf verschiedenste Wege erfolgen kann, zur Entstehung und Entwicklung der Leberfibrose beiträgt (Friedman 2008).

3.1. Rolle der hepatischen Sternzellen in der Leberfibrose

Vieles deutet darauf hin, dass die Aktivierung der ruhenden HSC eine der Hauptursachen für die Produktion von fibrogenem Narbengewebe bei der chronischen Leberschädigung ist (Friedman *et al.* 1985, Maher & McGuire 1990). Spezifische Marker für HSC erlauben deren Identifizierung in gereinigten Zellproben wie auch in histologischen Schnitten. So konnte gezeigt werden, dass sowohl bei der tierexperimentellen als auch der humanen Leberschädigung eine höhere Anzahl an HSCs als bei gesunden Lebern vorliegt (Ballardini *et al.* 1983, Enzan 1985, Enzan *et al.* 1994).

Die ruhenden HSCs sind reich an Vitamin A, was in Form von Retinyl-Ester in Fetttröpfchen im Zytoplasma gespeichert wird (Wake 1980, Hendriks *et al.* 1987). Die Identifizierung und Isolation der HSCs war ein großer Schritt in dem Verständnis der Leberfibrose (Bissel *et al.* 1990). Frisch isolierte und kultivierte ruhende HSC zeigen eine niedrige Proliferationsrate, ein sehr beschränktes fibrogenes Potenzial, wenig Zytokinsekretion und keine kontraktile Eigenschaften (Blomhoff 1991, Rockey *et al.* 1993, Maher *et al.* 1994, Abb. 1/3.A). Wenn die HSCs aktiviert werden, verlieren sie die Retinoide und exprimieren neue Rezeptoren wie den PDGF-Rezeptor und den TGF β -Rezeptor (Friedman *et al.* 1994, Friedman 2008, Gressner

1996, Kawada *et al.* 1999, Pinzani 2002, Melton und Yee 2007). Außerdem exprimieren die aktivierten Zellen neue Proteine, wie z.B. α SMA, proliferieren und synthetisieren extrazelluläre Matrix-Proteine (z.B. Kollagen-I, Kollagen-III und Kollagen-IV), die Narbengewebe produzieren (Schwabe *et al.* 2003, Bataller & Brenner 2005, Rockey 2006, Abb. I/3.B). HSCs, die aus fibrotischen Lebern isoliert wurden, weisen eine Überexpression der Gene auf, die für die ECM-Proteine kodieren, was in keinen anderen Zelltypen beobachtet werden konnte (Milani *et al.* 1995). HSCs können aber auch kontrahieren und so die portalen Hypertension durch Erhöhung des intrahepatischen Widerstandes verstärken (Trebicka *et al.* 2007, Trebicka *et al.* 2009, Hennenberg *et al.* 2011, Klein *et al.* 2012). Über die Produktion der Matrix-Metalloproteinase MMP2 tragen die HSCs zudem auch zum Abbau der normalen ECM bei (Friedman *et al.* 1985, Ramadori *et al.* 1987, Schafer *et al.* 1987, Arenson *et al.* 1988, Maher *et al.* 1988, Mak & Lieber 1988, Takahara *et al.* 1988, Milani *et al.* 1989, Milani *et al.* 1990a, Milani *et al.* 1990b, Friedman 1993). Außerdem sind die HSCs an der Entstehung des oxidativen Stresses durch die Produktion von ROS über die NADPH-Oxidase und an der Chemotaxis durch die Produktion von Chemokinen und Zytokinen beteiligt (Siegmond *et al.* 2005, Szuster-Ciesielska *et al.* 2009).

In der Zellkultur können primäre HSC durch die Kultivierung auf unbeschichteten Plastikoberflächen aktiviert werden. So konnte auch gezeigt werden, dass die aktivierten HSCs die Hauptquelle der Matrix-Proteine sind (Friedman *et al.* 1985, Ramadori *et al.* 1987, Schafer *et al.* 1987, Arenson *et al.* 1988, Maher *et al.* 1988).

Die Auslöser für die Aktivierung der HSCs, die zu deren Proliferation und ihren synthetisierenden Eigenschaften führen, sind mitunter TGF β , das unter anderem von den Kupfferzellen sezerniert wird (Maher 1989, Matsuoka & Tsukamoto 1990, Nakatsukasa *et al.* 1990, Bachem *et al.* 2002), PDGF (Friedman & Arthur 1989), IGF (Pinzani *et al.* 1990, Gressner & Bachem 1995) und FGF (Pinzani *et al.* 1989).

Die HSCs entwickeln während ihrer Aktivierung auch kontraktile Eigenschaften. Diese werden stark von der Rho-GTPase reguliert, die wiederum durch die sezernierten Zytokine aktiviert wird (Yee 1998, Charest & Firtel 2007). Die Rho-Kinase ist der am intensivsten untersuchte Mediator der Rho-GTPase (Wettchureck & Offermanns 2002, Riento & Ridley 2004, Kitamura *et al.* 2007) und reguliert z.B. die Myosin-leichte-Kette durch Phosphorylierung, was einen direkten oder indirekten Effekt auf die Kontraktion haben kann (Pellegrin & Mellor, 2007). Sorafenib und Atorvastatin inhibieren die kontraktile Signalwege der HSCs bei der Leberzirrhose

und senken damit den intrahepatischen Widerstand (Trebicka *et al.* 2007, Trebicka *et al.* 2008).

Die Wirkung der HSCs wird vorwiegend durch Apoptose oder Seneszenz eliminiert (Brenner 2009). Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene endogene Mediatoren in HSCs Apoptose induzieren können (Salle *et al.* 1997, Lang *et al.* 2000, Trim *et al.* 2000). Allerdings werden diese Mediatoren auch auf anderen hepatischen Zellen wie Hepatozyten exprimiert und stellen daher kein geeignetes Ziel für die Therapie der Leberfibrose dar.

Daher ist die Forschung bestrebt, bestimmte Effektoren zellspezifisch hemmen zu können oder aber Proteine zu finden, die spezifisch in HSCs zu deren Aktivierung und somit zur Leberfibrose beitragen.

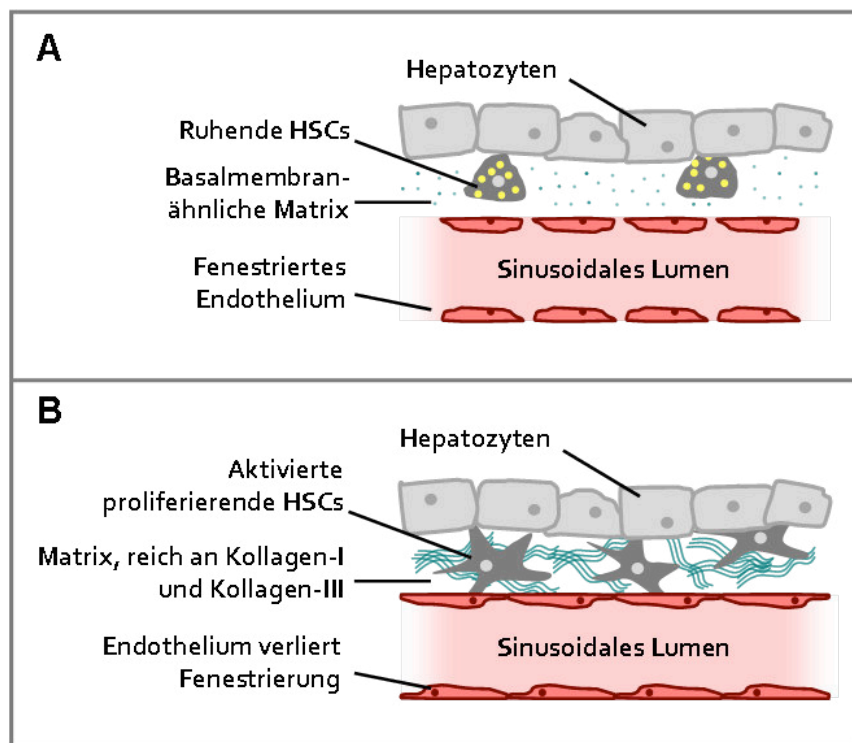


Abb. I/3. Schematischer Überblick über die HSC-Aktivierung und Leberfibrose [eigene Darstellung, modifiziert nach Iredale 1997]

A: Die ruhenden HSCs mit ihren Lipidtröpfchen liegen im Dissé-Raum, der mit Kollagen-IV und anderen Basalmembrankomponenten gefüllt ist. Das Endothelium ist fenestriert.

B: In der fibrotischen Leber aktivieren sich die HSCs und transdifferenzieren zu einem Myofibroblasten-ähnlichen Phänotyp, der proliferiert und im Dissé-Raum Kollagen und Matrix synthetisiert. Außerdem verlieren die Endothelzellen ihre Fenestrierung und werden undurchlässig.

4. Das Renin-Angiotensin-System (RAS)

Das Renin-Angiotensin-System (RAS), das schon über 100 Jahre bekannt ist, spielt eine zentrale Rolle in der Regulation der kardiovaskulären Funktionen (Skeggs *et al.* 1952, Hall 2003). Trotz der ausgedehnten Forschung auf diesem Gebiet werden immer wieder neue Komponenten entdeckt, die das System zunehmend komplexer machen (Schindler *et al.* 2007, Santos *et al.* 2008). Die Hauptkomponente des RAS ist das, ursprünglich bekannt als zirkulierendes endokrines Hormon, Oktapeptid Angiotensin II (Ang II) (Unger *et al.* 1996, Csikos *et al.* 1997).

Das klassische RAS beschreibt die C-terminale Spaltung des Vorläuferpeptids Angiotensinogen, das in der Leber gebildet wird, durch das aus der Niere stammende zirkulierende Enzym Renin zum Dekapeptid Angiotensin I (Ang I). Schließlich entsteht Ang II durch die Abspaltung zweier Aminosäuren, welche von *dem Angiotensin-converting Enzyme* (ACE) katalysiert wird. In einem geringeren Maße kann Ang I aber auch direkt durch Endopeptidasen zu Angiotensin(1-7) (Ang(1-7)) konvertiert werden (Ferrario *et al.* 1997). Außerdem kann Ang I bzw. Ang II durch das *Angiotensin-converting Enzyme 2* (ACE2) zu Angiotensin(1-9) bzw. Ang(1-7) abgebaut werden. Ang(1-7) ist der endogene Ligand des Mas-Rezeptors (MasR), welcher kardiovaskuläre Wirkungen hat, indem er den AT1R antagonisiert (Santos *et al.* 2003, Pinheiro *et al.* 2004).

Ang II dagegen ist der Agonist zweier gut untersuchter Rezeptoren, nämlich des Angiotensin II-Typ 1-Rezeptors (AT1R) und des Angiotensin II-Typ 2-Rezeptors (AT2R), die Ang II mit unterschiedlicher Affinität binden (Timmermans *et al.* 1997, de Gasparo *et al.* 2000, Kaschina & Unger 2003, Abb. I/4.). Im kardiovaskulären Bereich sind diese Rezeptoren vor allem bei der Blutdruckregulation beteiligt, wobei der AT1R zur Vasokontraktion und kardiovaskulären Hypertrophie führt, während der AT2R gegenregulatorisch wirkt und bei der Vasodilatation eine Rolle spielt (Widdop *et al.* 2008). Neben dem zirkulierenden RAS wurde das lokale RAS in einer Reihe von Organen, wie Herz, Niere, Lunge, Pankreas und Leber beschrieben (Bataller *et al.* 2003, Leung & Chappell 2003, Leung 2004). In der Leber konnte beobachtet werden, dass die Expression von Angiotensinogen, Renin, ACE, Ang II und AT1R bei einer Erkrankung verändert ist (Sakata *et al.* 1991, Paizis *et al.* 2002, Bataller *et al.* 2003). Angiotensinogen wurde sowohl in Hepatozyten (Morris *et al.* 1979, Paizis *et al.* 2002), als auch in geringem Maße in Kupferzellen und im Gal-

lengangsepithelium gefunden (Sawa 1990). Zudem konnte im Plasma von Menschen und Nagern mit Leberzirrhose ein erhöhter Spiegel von Renin, eine stärkere Renin-Aktivität und mehr Angiotensinogen nachgewiesen werden (Morris *et al.* 1979, Richoux *et al.* 1983, Kojima *et al.* 1998, Rincon-Sanchez *et al.* 2005). In der Leber ist in fibrotischen Septen, mesenchymalen Zellen wie HSCs und Kupfferzellen eine erhöhte ACE- und AT1R-Expression zu finden (Paizis *et al.* 2002, Leung *et al.* 2003, Ikura *et al.* 2005). Der AT1R kommt vermehrt in der Leber vor, während der AT2R jedoch nur sehr schwach in der gesunden oder erkrankten Leber exprimiert (Bataller *et al.* 2002, Nabeshima *et al.* 2006) oder gar nicht detektierbar ist (Paizis *et al.* 2002). Diese Arbeit konzentriert sich daher vor allem auf den AT1R.

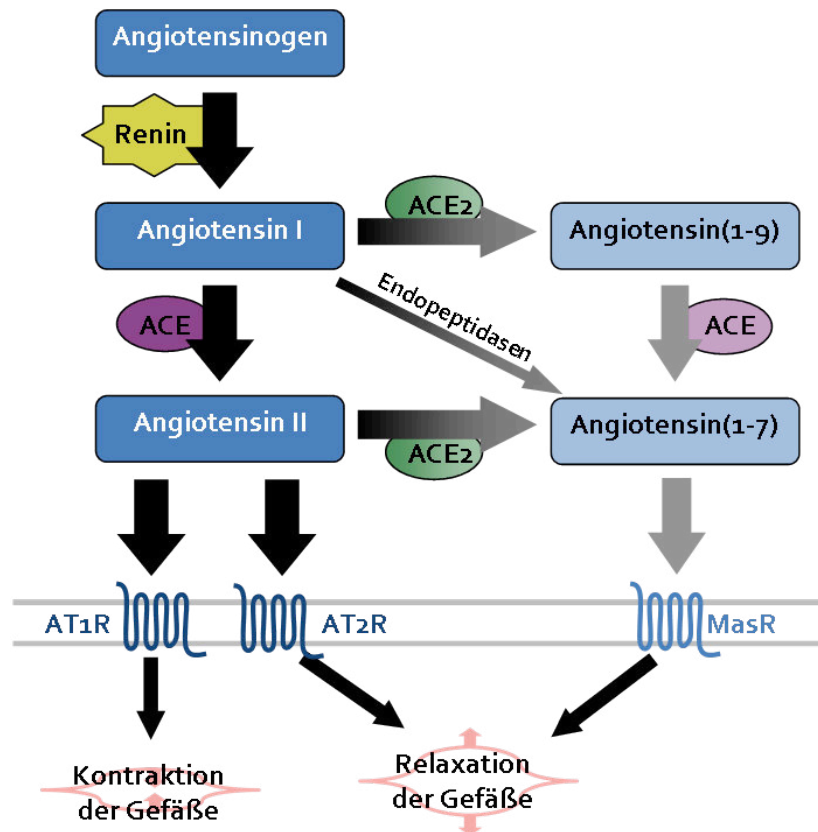


Abb. I/4. Schematisches Diagramm über das RAS [eigene Darstellung, modifiziert nach Taal & Brenner 2000, Kurdi *et al.* 2005, Elton *et al.* 2010]

Angiotensinogen wird durch Renin zu Ang I gespalten, was wiederum entweder zu Angiotensin II durch ACE (der Hauptweg) oder durch ACE2 zu Angiotensin(1-9) gespalten wird. Angiotensin II ist der Agonist des AT1R und des AT2R. Der Agonist des MasR Angiotensin(1-7) wird durch Spaltung von Angiotensin II durch ACE2 oder durch Spaltung von Angiotensin(1-9) durch ACE gebildet. Endopeptidasen können Angiotensin(1-7) direkt aus Angiotensin I katalysieren.

Abkürzungen: ACE = Angiotensin-converting Enzyme; ACE2 = Angiotensin-converting-Enzyme 2; AT1R = Angiotensin II-Typ 1-Rezeptor; AT2R = Angiotensin II-Typ 2-Rezeptor; MasR = Mas-Rezeptor

5. Der Angiotensin II-Typ 1-Rezeptor (AT1R)

Der AT1R gehört zu den Sieben-Transmembrandomänen-Rezeptoren (7TMR). Diese Rezeptoren regulieren nahezu jeden bekannten physiologischen Prozess in Säugetieren und repräsentieren die größte Klasse der Zelloberflächenrezeptoren, weshalb sie das Zielmolekül von bis zu 40% der derzeitigen Medikamente sind (Ma & Zimmel 2002). Klassischerweise wird die Signalweiterleitung bei den 7TMRs durch die Ankopplung eines heterotrimeren G-Proteins eingeleitet, das nachfolgend eine Vielzahl von Effektoren, einschließlich sekundärer Botenstoffe und der Mitogen-aktivierten Protein-Kinase (MAPK)-Kaskaden, aktiviert (Reiter & Lefkowitz 2006).

Viele Merkmale des AT1R wurden zuerst in Studien der Leber und Nebenniere identifiziert (Saltman *et al.* 1975, Campanile *et al.* 1982). Die G-Proteine $G_{\alpha_{q/11}}$ und $G_{\alpha_{12/13}}$, die an den Rezeptor koppeln, sind für die meisten AT1R-abhängigen Prozesse verantwortlich (Mehta *et al.* 2007).

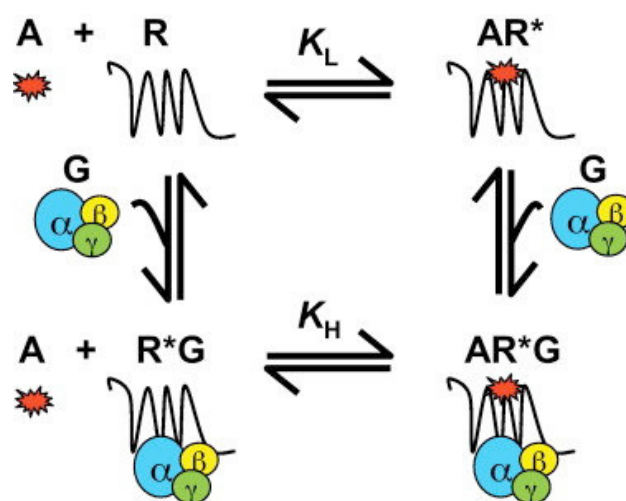


Abb. I/5. Schema des ternären Komplexmodells für die Bindung von Agonisten und G-Proteinen an GPCRs [aus Cottingham & Wang 2012]

Der Rezeptor liegt in aktiver und inaktiver Form vor. Beide aktiven Konformationen erlauben eine Komplexbildung mit G-Proteinen. Der Agonist kann an freie inaktive Rezeptoren und aktive Rezeptoren, an die G-Proteine gebunden sind, mit verschiedenen Affinitäten binden. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren haben dabei eine höhere Bindungsaffinität zu Agonisten als freie Rezeptoren.

Abkürzungen: A = Agonist; G = G-Protein; R = freier Rezeptor; AR* = Agonist-gebundener Rezeptor; R*G = G-Protein-gebundener Rezeptor; AR*G = Agonist/G-Protein/Rezeptor-Komplex; K_H = Hohe Bindungsaffinität; K_L = niedrige Bindungsaffinität

Wie andere G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) ist der AT1R der spontanen Isomerisierung zwischen seinem inaktiven (R) und aktiven (R*) Zustand ausgesetzt. Der inaktive R liegt in der Abwesenheit von Agonisten vor und hält ein Gleichgewicht mit einem geringen Anteil aktiven R* Zustandes ohne Ligandenbindung. In Anwesenheit von Ang II wird die aktive R* Form durch die Agonistenbindung, verbunden mit einer strukturellen Veränderung, induziert (Cottingham & Wang 2012, Abb. I/5.). Die aktive Form des Rezeptors erlaubt die Ankopplung eines oder mehrerer G-Proteine, die intrazelluläre Signalkaskaden über nachgeschaltete Effektoren vermitteln (Thomas *et al.* 2000).

Die Agonisten-induzierte Aktivierung des AT1-Rezeptors wird durch eine Interaktion in der dritten Transmembrandomäne zwischen dem Tyrosin4-Rest (Tyr4) von Ang II und dem Asparagin111-Rest und durch die Interaktion von Phenylalanin8 des Angiotensin-Moleküls mit Histidin256 in der sechsten Transmembrandomäne des Rezeptors eingeleitet (Noda *et al.* 1995, Noda *et al.* 1996). Nach der Aktivierung und Dissoziation des G-Proteins von dem Rezeptor wird dieser durch G-Protein gekoppelte Rezeptor-Kinasen (GRKs) an spezifischen Serin/Threonin-Resten phosphoryliert, so dass β -Arrestin 2 (bArr2) an den Rezeptor binden kann. Diese Interaktion veranlasst die Internalisierung des Rezeptors, die in Abschnitt I/5.3. genauer erläutert wird (Dale *et al.* 2004).

Ang II ruft viele intrazelluläre Signalantworten hervor, die üblicherweise mit der Aktivierung von Wachstumsfaktoren assoziiert sind (TGF β , PDGF, IGF, VEGF, EGF, usw.). Diese beinhalten auch die Tyrosin-Phosphorylierung von Phospholipase C (PLC) und anderen Effektor-Enzymen (Bernstein & Marrero 1996).

Außerdem befürworten mehrere Studien die Annahme, dass der AT1R die inflammatorischen, proliferativen und vaskulären Effekte von Ang II in der Leber vermittelt (Yoshiji *et al.* 2001, Bataller *et al.* 2003, Kanno *et al.* 2003). Darüber hinaus korreliert die AT1R-Expression in MFBs mit dem Ausmaß der Fibrose und dem Grad der portalen Hypertension (Ikura *et al.* 2005).

5.1. Klassischer kontraktile Signalweg des AT1R

Schon früh wurde entdeckt, dass der AT1R das Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat über die PLC in glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) hydrolysiert (Alexander *et al.* 1985). Dies resultiert in einer rapiden Produktion von 1,4,5-Inositol-Triphosphat (IP₃) und einem Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration, sowie in einer anhaltenden Freisetzung von Diazylglyzerol (DAG), die die Proteinkinase C

(PKC) stimuliert (Ushio-Fukai *et al.* 1998). Die erhöhten Ca^{2+} -Spiegel führen zu einer VSMC-Kontraktion, während die PKC-Aktivierung den intrazellulären pH-Wert über Na^+/H^+ -Austauscher reguliert (Alexander *et al.* 1985, Ushio-Fukai *et al.* 1998). Die Kontraktion der VSMCs erfolgt Ca^{2+} -abhängig über die Calmodulin (CaM)-aktivierte Phosphorylierung der Myosin-leichten-Ketten (MLC) (Gusev 2001, Berri-dge 2008, Abb. I/5).

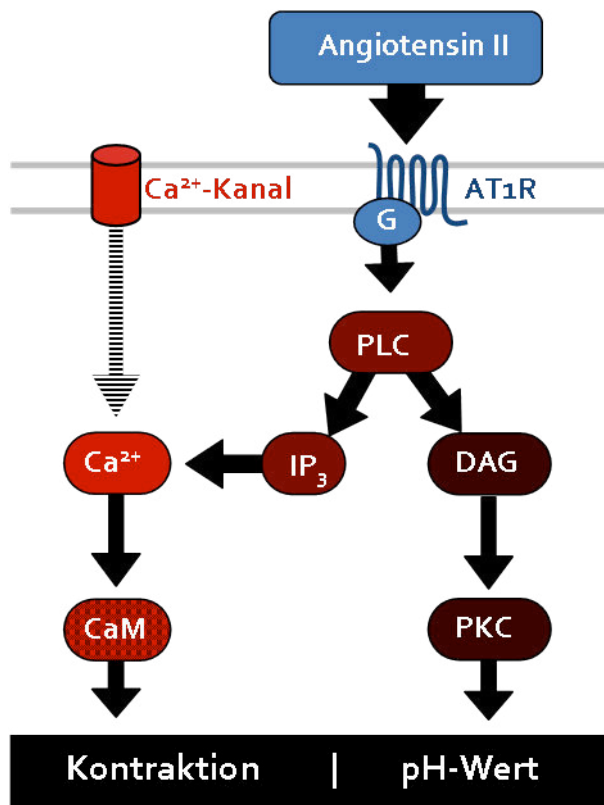


Abb. I/6.

Schematischer Überblick über den klassischen kontraktile Signalweg des AT1R [eigene Darstellung, modifiziert nach Touyz & Berry 2002]

Nach der Stimulation des AT1R durch seinen Agonisten Ang II kommt es G-Protein-abhängig zur Aktivierung der PLC. Diese wiederum katalysiert die Abspaltung von DAG von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, wodurch IP_3 entsteht. IP_3 veranlasst daraufhin die Freisetzung von Ca^{2+} , was über CaM und der anschließenden MLC-Phosphorylierung zur Kontraktion führt. Die Aktivierung von PKC durch DAG führt ebenso zur Kontraktion, reguliert aber auch den pH-Wert über Ionenaustauscher.

Abkürzungen: AT1R = Angiotensin II Typ 1-Rezeptor; PLC = Phospholipase C; IP_3 = Inositoltriphosphat; DAG = Diacylglycerol; Ca^{2+} = Kalzium; PKC = Proteinkinase C; CaM = Calmodulin; MLC = Myosinleichte-Kette

5.2. Kontraktile Signalweg über Janus-Kinase-2 (JAK2)-Aktivierung

JAK2 gehört zu der Janus-Kinase Familie, die ebenso JAK1, JAK3 und TYK2 beinhaltet (Harpur *et al.* 1992, Jones *et al.* 2005, Steensma *et al.* 2005) und wurde erstmals bei der Beschreibung neuer Protein-Tyrosin-Kinasen identifiziert (Wilks 1989, Fimbach-Kraft 1990). Der Name „JAK“ stand zuerst für die Abkürzung „Just Another Kinase“ („Nur eine andere Kinase“), wurde aber später in JANUS Kinase umbenannt, da die zwei sich wiederholenden homologen Kinase-ähnlichen Domä-

nen des Proteins mit den zwei Gesichtern des römischen Gottes Janus verglichen wurden (Rane & Reddy 2000).

Normalerweise ist JAK2 in den Signalwegen von Zytokinen, Hormonen und Wachstumsfaktoren involviert (Rane & Reddy 2002). Dabei bindet JAK2 an die zytoplasmatischen Bereiche von Zytokin- oder Hormonrezeptoren. Die Liganden-induzierte neue Konformation des Rezeptors erleichtert die JAK2 *trans*-Phosphorylierung an der Aktivierungsseite in der Tyrosin-Kinase-Domäne an Tyr1007 und Tyr1008, was zur JAK2-Aktivierung führt. Weitere Phosphorylierungen an Tyrosinresten in den Rezeptoren schaffen Bindungsstellen für SH2-enthaltende Signalproteine, wie z.B. STAT(*Signal Transducers and Activators of Transcription*)-Proteine (Silvennoinen *et al.* 1993, Yamaoka *et al.* 2004). Nach ihrer Aktivierung dimerisieren die STATs und translozieren in den Zellkern, wo sie die Transkription bestimmter Zielgene induzieren (Kerr *et al.* 2003, Saharinen *et al.* 2003).

Allerdings konnte kürzlich gezeigt werden, dass JAK2 auch eine zentrale Rolle in der Ang II-vermittelten Kontraktion in VSMCs über RhoA/Rho-Kinase spielt (Guilluy *et al.* 2010, Abb. I/6.).

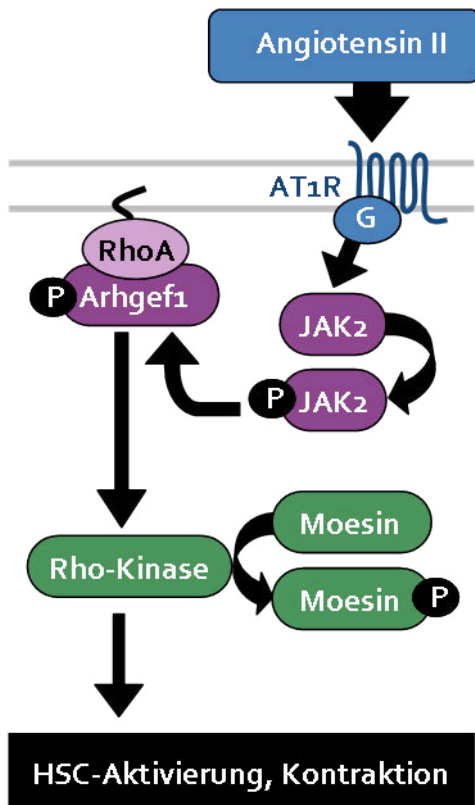


Abb. I/7.

Schematischer Überblick über den kontraktiven JAK2/Rho-Kinase-Signalweg des AT1R [eigene Darstellung, modifiziert nach Trebicka *et al.* 2007, Guilluy *et al.* 2010, Klein *et al.* 2012]

Nach der Stimulation des AT1R durch seinen Agonisten Ang II kommt es G-Protein-abhängig zur Aktivierung von JAK2. Das phosphorylierte JAK2 aktiviert daraufhin Arhgef1, wodurch wiederum RhoA-GDP zu RhoA-GTP phosphoryliert wird. Das aktivierte RhoA kann nachfolgend die Rho-Kinase aktivieren, die für die HSC-Aktivierung und Zellkontraktion verantwortlich ist, indem sie die MLCP hemmt. Ein weiteres Substrat der Rho-Kinase ist das Moesin, dessen phosphorylierte Form daher als Marker der Rho-Kinase-Aktivierung verwendet wird.

Abkürzungen: AT1R = Angiotensin II Typ 1-Rezeptor; JAK2 = Janus-Kinase 2; Arhgef1 = anti-Rho Guanin-Austauschfaktor 1; HSC = hepatische Sternzelle

Die Überaktivierung des monomeren G-Proteins RhoA ist eine entscheidende Komponente in der Pathogenese der Hypertension in vielen Krankheitsmodellen (Uehata *et al.* 1997, Chrissobolis & Sobey 2001, Mukai *et al.* 2001, Seko *et al.* 2003) und im Menschen (Masumoto *et al.* 2001). Die inaktive Form ist das GDP-gebundene RhoA, das durch Phosphorylierung zu GTP-RhoA aktiviert wird (Jaffe & Hall 2005). Das aktive RhoA aktiviert wiederum die Rho-Kinase, die die Myosin-leichte-Ketten Phosphatase (MLCP) hemmt. Dadurch kommt es zu einer Ca^{2+} -Sensibilisierung der kontraktilen Proteine und schlussendlich zur tonischen VSMC-Kontraktion (Somlyo & Somlyo 2003).

Da die Aktivierung von RhoA eine bedeutende Rolle in diesem Signalweg spielt, liegt besonderes Augenmerk auf den Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (GEFs), die GDP gegen GTP austauschen (Rossman *et al.* 2005, Bos *et al.* 2007). Bei dem Ang II-vermittelten Signalweg über den AT1R konnte der anti-Rho-Guanin-Austauschfaktor 1 (Arhgef1) als GEF identifiziert werden, das zur RhoA-Aktivierung führt (Guilluy *et al.* 2010). GEFs selber werden aber auch aktiviert. Anhand pharmakologischer Analysen unter Verwendung von Tyrosin-Kinase Inhibitoren konnte die Tyrosin-Kinase JAK2 als potenzielles Enzym identifiziert werden, das Ang II-induziert Arhgef1 phosphoryliert und dadurch aktiviert (Guilluy *et al.* 2010).

Da auch schon gezeigt wurde, dass die Rho-Kinase-Aktivierung HSCs aktiviert und zu deren Kontraktion führt (Zhou *et al.* 2006, Trebicka *et al.* 2007, Trebicka *et al.* 2009, Klein *et al.* 2012), ist eine Untersuchung von JAK2 und dessen Rolle in der Leberfibrose aufgrund dieser neuen Erkenntnisse sehr interessant.

5.3. Rezeptor-Internalisierung über β -Arrestin 2 (bArr2)

Die G-Protein-Ankopplung an den Rezeptor wird durch einen zweistufigen Prozess beendet, der mit der Phosphorylierung des Agonisten-gebundenen Rezeptors durch GPCR-Kinasen (GRKs) eingeleitet wird (Lefkowitz 1998). Daraufhin werden β -Arrestine (bArr) zum GRK-phosphorylierten Rezeptor rekrutiert, die Schlüsselfunktionen in der Rezeptor-Desensibilisierung und Internalisierung besitzen (Goodman *et al.* 1996, Lefkowitz 1998, Ferguson 2001). Die bArr entkoppeln den Rezeptor von dem G-Protein und beenden dadurch die Signalweiterleitung. Die G-Proteine dissoziieren vom Rezeptor, was zur Entkopplung der nachfolgenden Signalwege und Desensibilisierung des Rezeptors führt (Böhm *et al.* 1997, Bünemann

& Hosey 1999, Ferguson 2001, Luttrell & Lefkowitz 2002, Shenoy & Lefkowitz 2003, Thomas & Qian 2003, Willets *et al.* 2003).

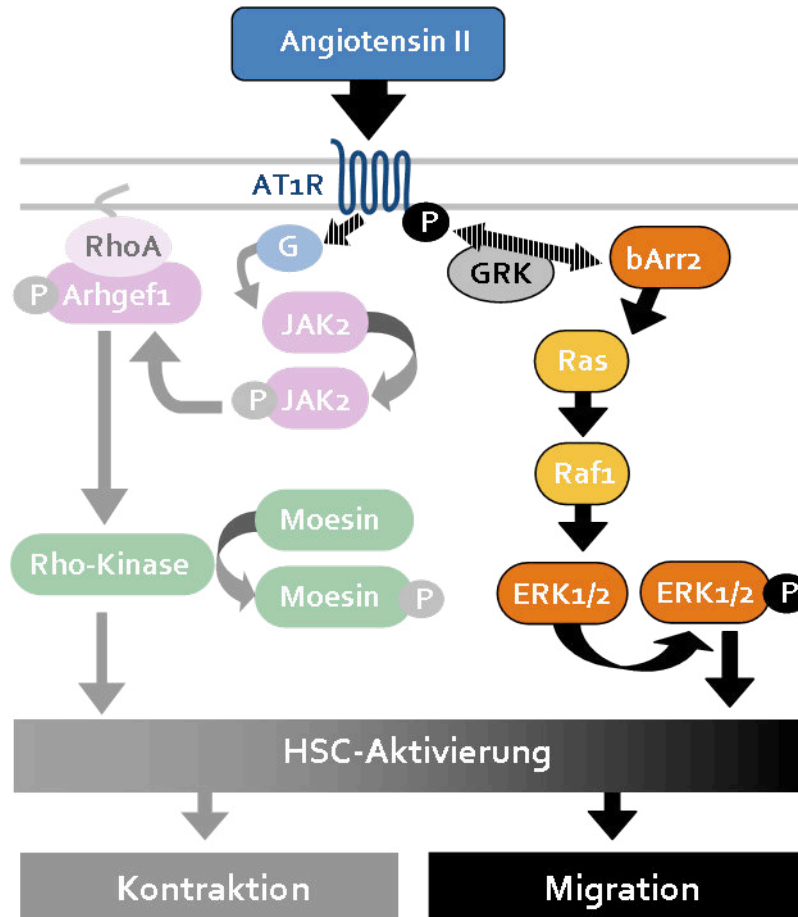


Abb. I/8. Schematischer Überblick über die Entkopplung des AT1R durch bArr2 nach G-Protein-Bindung [eigene Darstellung, modifiziert nach Luttrell *et al.* 2001, Ge *et al.* 2004, Trebicka *et al.* 2007, Hennenberg 2009, Guilluy *et al.* 2010, Klein *et al.* 2012]

Der aktivierte Zustand des Rezeptors, der durch das gebundene G-Protein charakterisiert ist, wird durch die Phosphorylierung von GRK beendet. Daraufhin kann bArr2 an den AT1R binden, wodurch der G-Protein-abhängige Signalweg vollkommen entkoppelt ist. bArr2 selbst kann die GTPasen Ras und Raf1 aktivieren, die ihrerseits wiederum über MEK-Aktivierung zur ERK-Phosphorylierung führen. Dies resultiert schließlich in einer HSC-Aktivierung mit vermehrter Zellmigration.

Abkürzungen: AT1R = Angiotensin II Typ 1-Rezeptor; bArr2 = β -Arrestin 2; Ras = *Rat sarcoma*; Raf1 = *Rat fibrosarcoma*; ERK1/2 = Extrazellulär regulierte Kinase 1/2; HSC = hepatische Sternzelle

Der AT1R gehört zu den sogenannten Klasse B-Rezeptoren und formt mit β -Arrestin 2 (bArr2) stabile Komplexe (Oakley *et al.* 2005), was schließlich zur Clathrin- oder Dynamin-abhängigen Internalisierung führt (Zhang *et al.* 1996, McDonald 1999, Gáborik *et al.* 2001). Die Ang II-induzierte AT1R-Phosphorylierung, bArr2-Rekrutierung und Rezeptor-Internalisierung wird hauptsächlich von GRK2/3 vermittelt. Die Aktivierung des bArr2-vermittelten ERK-Signalwegs ist allerdings GRK5- und GRK6-abhängig (Kim *et al.* 2005). Neueste Studien zeigen, dass GRK2 einen starken negativen Effekt auf die bArr2-abhängige Signalweiterleitung durch den Wettbewerb mit GRK5 und GRK6 bei der Rezeptorphosphorylierung ausübt (Heitzler *et al.* 2012).

Der am besten charakterisierte Mechanismus, der durch bArr stimuliert wird, ist der ERK-Signalweg. Über kleine Kinasen, wie Ras und Raf1, hat bArr Einfluss auf die Signalweiterleitung (DeFea *et al.* 2000, Luttrell *et al.* 2001, Holloway *et al.* 2002, Seta *et al.* 2002, Ahn *et al.* 2003, Hines *et al.* 2003). Eine Hemmung von bArr2 durch die Verwendung spezifischer kleiner interferierender RNAs (siRNA), behindert den AT1R-stimulierten ERK-Signalweg, während eine Depletion von bArr1 die AT1R-vermittelte ERK-Aktivierung erhöht (Ahn *et al.* 2004b). Es gibt eine klare räumliche Verteilung von ERK, je nachdem ob es vom G-Protein- oder bArr2-abhängigen Mechanismus aktiviert wird: Der G-Protein-abhängige Signalweg veranlasst die Translokation von pERK in den Nukleus, während das durch bArr2 aktivierte ERK im Zytoplasma bleibt (DeFea *et al.* 2000, Luttrell *et al.* 2001, Ahn *et al.* 2004a).

Es wurde gezeigt, dass MAPK in der HSC-Aktivierung involviert sind. bArr2 kann selber als sogenanntes Gerüstprotein fungieren. Es vermittelt die Komplexierung von Kinasen wie Ras und Raf1, die zur ERK1/2-Aktivierung führen (Marshall 1995, Marra *et al.* 1999, Pinzani *et al.* 1998, DeFea *et al.* 2000, Gentilini *et al.* 2000, Luttrell *et al.* 2001, Abb. I/7.). Somit kann ERK1/2 entweder G-Protein-vermittelt oder aber G-Protein-unabhängig über bArr2 aktiviert werden (Wei *et al.* 2003, Shenoy & Lefkowitz 2005). Pharmakologische ERK-Hemmer vermindern merklich die Zellproliferation in Fibroblasten und deuten so auf die Bedeutung dieses Signalweges in der HSC-Proliferation hin (Pages *et al.* 1993).

Die extrahepatischen Gefäße von Menschen und Tieren mit Leberzirrhose sind hyporeaktiv auf Ang II ohne Veränderung der Expression des AT1R oder der G-Proteine (Schepke *et al.* 2001, Heller *et al.* 2003, Heller *et al.* 2005, Hennenberg *et al.* 2006). Das deutet darauf hin, dass in der Zirrhose-induzierten Vasodilatation der AT1R desensibilisiert wird und die darunter liegenden Signalkaskaden sich verän-

dem. Unter anderem findet man ein verändertes Muster von phosphorylierten Ca^{2+} -sensibilisierten Proteinen, wodurch die Ca^{2+} -Empfindlichkeit erhöht wird und zur Hypokontraktilität führt. Als eine Folge der Rezeptor-Komplexierung mit bArr2 ist die Agonisten-Aktivierung von RhoA und Rho-Kinase in extrahepatischen Gefäßen von Patienten und Tieren mit Leberzirrhose beeinträchtigt (Hennenberg *et al.* 2006, Hennenberg *et al.* 2007).

6. Therapeutische Strategien zur Behandlung der Leberfibrose

Während es für die Spätfolgen einer Leberfibrose, der Leberzirrhose mit ihren Komplikationen, seit Jahren getestete Behandlungsmöglichkeiten gibt (Ahmed & Keeffe 2001, Sauerbruch *et al.* 2013), ist die Unterbrechung oder Reversion einer Leberfibrose schwieriger. Schon die rechtzeitige Diagnose ist meist schwer zu stellen, da die Erkrankung anfangs asymptomatisch verläuft und kaum Auswirkungen auf die Lebensqualität des Patienten hat. Die Leberbiopsie wird als Goldstandard zur Bestimmung der Fibrose und des Fibrosegrades eingesetzt (Afdhal & Nunes 2004), aber aufgrund ihrer invasiven Messtechnik nur bei weiteren systemischen Erkrankungen oder des konkreten Verdachts auf eine Leberfibrose angewendet. Da die Fibrose prinzipiell ein reversibler Prozess ist (Arthur 2002, Issa *et al.* 2004), kann die Behandlung der zugrunde liegenden Krankheit die hepatische Fibrose aufhalten oder heilen. Diese Beobachtungen konnten in Patienten mit Eisen- oder Kupferspeicherkrankheit, der Alkohol-induzierten Leberschädigung, HBV, HCV, Hepatitis D, sekundär biliärer Zirrhose und NASH gemacht werden (Pares *et al.* 1986, Hammel *et al.* 2001, Kweon *et al.* 2001, Arthur 2002, Czeja & Carpenter 2004, Dixon *et al.* 2004). Am Besten untersucht ist die HCV-Infektion und deren Behandlung. Eine Interferon- α -Therapie, kombiniert mit einer Ribavirin-Gabe, führt zu einem Stillstand oder sogar Rückgang der Fibrose, wenn die Hepatitis C-Virämie unterbrochen wird (Davie *et al.* 1998, Poynard *et al.* 1999, Poynard *et al.* 2000).

Die Zielzellen bei der Behandlung einer hepatischen Fibrose sind die hepatischen Sternzellen. Daher ist eine Therapie, die darauf abzielt die Aktivierung der HSCs zu hemmen, vielversprechend. Da einige Zellen Lipid-Peroxide produzieren, die zu oxidativem Stress und dadurch zur HSC-Aktivierung führen (Britton & Bacon 2000, Poli 2000), können Antioxidantien die Leberfibrogenese verlangsamen (Kawada *et al.* 2008). Ein weiteres Therapieziel ist die Apoptose der Zellen. Es wurde gezeigt,

dass die Apoptose aktivierter HSCs, die dem Kollagenabbau vorausgeht, bei der spontanen Erholung der Leber in der experimentellen Fibrose in Nagern eine wichtige Rolle spielt (Iredale *et al.* 1998, Isse *et al.* 2001). Daher können eine Stimulation der Todesrezeptoren von HSCs und eine Verminderung von Überlebensfaktoren zur HSC-Apoptose und somit zur Heilung beitragen (Iredale 2001). Kürzlich wurde entdeckt, dass *Tanshinone IIA* durch die Förderung des ERK/Bax/Caspase-Signalwegs über den C-Raf/Prohibitin-Komplex zur Apoptose der HSCs beiträgt (Pan & Wang 2012). Auch die Seneszenz aktivierter HSCs ist ebenfalls ein wichtiger Schritt beim Fibroserückgang (Schnabl *et al.* 2003, Krizhanovsky *et al.* 2008). Neueste Daten lassen vermuten, dass Interleukin-22 über die Aktivierung von STAT3, SOCS3 und p53 zur Seneszenz der HSCs und damit zur Hemmung der Fibrose beiträgt (Kong *et al.* 2012).

Der erhöhte Kollagenabbau ist ein Hauptmechanismus während der Regression der Fibrose (Arthur 2002, Issa *et al.* 2004) und daher ebenso interessant für die antifibrotische Therapie. Die Prolyl-4 Hydroxylase katalysiert die Synthese vom Hydroxyprolin des Prolins, was zur Stabilität der Kollagenhelix beiträgt. Im Rattenmodell, in dem die hepatische Fibrose durch eine L-Aminosäuren-definierte Diät, CCl₄ oder Schweineserum induziert wurde, führte die Gabe des Prolyl-4 Hydroxylase-Hemmers HOE077 zu einer verminderten Hydroxyprolin-Akkumulation und histologisch nachweisbaren Leberfibrose (Sakaida *et al.* 1996, Wang *et al.* 1998, Sakaida *et al.* 1999). Zudem hemmt HOE077 die HSC-Aktivierung in der Zellkultur und *in vivo* (Matsumura *et al.* 1997). Auch die veränderte ECM selber trägt zum Fortschreiten der Leberfibrose bei. Integrine, deren Liganden Matrix-Moleküle sind, die von den HSCs exprimiert werden, übertragen ihre extrazellulären Signale in die Zellen (Carloni *et al.* 1996). Daher könnte eine pharmakologische Modulation der Interaktion zwischen den HSCs und dem umgebenden ECM die Fibrose einschränken. In der experimentellen Leberfibrose wurden bereits sogenannte RGD-Antagonisten verwendet, um die Integrin-vermittelten Signalwege zu hemmen (Bruck *et al.* 1996). Da die HSCs die Zellen sind, die nach ihrer Aktivierung alle grundlegenden Komponenten für einen Matrix-Abbau (Banyon *et al.* 1999), wie auch die Gewebeinhibitoren der MMPs (TIMP) produzieren (Knittel *et al.* 1999), ist dies auch ein Angriffspunkt für eine pharmakologische Modulation. Anhand transgener Mäuse, die TIMP überexprimieren, konnte gezeigt werden, dass diese Tiere nach einer Leberschädigung sehr schnell eine hepatisch Fibrose entwickeln (Yoshiji *et al.* 2000). Zudem wurde uPA, ein Initiator der Matrix Proteolyse Kaskade, in zirrhotischen Ratten untersucht. Eine vermehrte Expression dieses Proteins führte

dabei zu einer gesteigerten Kollagenase-Expression und einem Rückgang der Fibrose (Salgado *et al.* 2000).

Über GPCRs können auch vasoaktive Substanzen die HSC-Aktivierung regulieren. Wie schon beschrieben, haben Vasokonstriktoren einen mitogenen Effekt auf aktivierte HSCs, während Vasodilatoren die Zellproliferation eher hemmen. Einer dieser Vasokonstriktoren ist Ang II (Bataller *et al.* 2000). Daher können auch Inhibitoren, die auf das RAS wirken, wie z.B. ACE-Hemmer oder AT1R-Blocker, eingesetzt werden. Bisher konnte allerdings nur bei lebertransplantierten Patienten ein positiver Effekt auf die hepatische Fibrogenese beobachtet werden (Ahmed & Keeffe 2001). Auch der Einsatz von Statinen führt zu einer Hemmung des RhoA/Rho-Kinase-Signalwegs und somit *in vitro* zu einer Relaxation der HSC mit gleichzeitig weniger Fibrose in der geschädigten Leber (Trebicka *et al.* 2007). Weitere intrazelluläre Signalkaskaden, wie der Ras/ERK/MAPK-Weg, tragen auch zur HSC-Aktivierung und Zellproliferation bei. Daher zielen einige Therapien darauf ab, diese intrazellulären Signalwege zu blockieren (Bataller & Brenner 2001, Trebicka *et al.* 2010).

Da viele Substanzen systemisch zu Nebenwirkungen führen können, ist man bestrebt Komponenten zu finden, die ihre spezifische Wirkung nur in der Zielzelle erlauben. Es wurde bereits ein Trägermolekül mit einem angekoppelten Wirkstoff entwickelt, das nur an die HSC-Rezeptoren bindet und somit kaum Nebenwirkungen hat (Beljaars *et al.* 1999, Beljaars *et al.* 2000, Prakash *et al.* 2006, Gonzalo *et al.* 2007, Klein *et al.* 2012). Allerdings kann nicht jede Substanz aufgrund ihrer stereometrischen Konformation an das Trägermolekül gekoppelt werden.

II. ZIELSETZUNG

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der intrazellulären kontraktiven Signalwege des AT1R und deren Bedeutung in der Leberfibrose. Dabei soll vor allem die Rolle von JAK2 bestimmt werden. Bisher wurde JAK2 nur in VSMCs mit dem RhoA/Rho-Kinase-Signalweg in Verbindung gebracht (Guilluy *et al.* 2010). Interessant ist daher, wie JAK2 in der hepatischen Fibrose exprimiert und dadurch ebenfalls AT1R-abhängig der RhoA/Rho-Kinase Signalweg aktiviert wird.

Folgende Fragen sollen in dieser Arbeit geklärt werden:

- Wie verändert sich die Expression des AT1R und dessen Effektoren des JAK2/Rho-Kinase Signalwegs im zirrhotischen oder fibrotischen Lebergewebe im Vergleich zur gesunden Leber?
- Wie sind JAK2 und dessen aktivierte Form pJAK2 im Lebergewebe verteilt?
- In welchen hepatischen Zellen (HSCs, Hepatozyten, Kupfferzellen) werden Proteine des JAK2/Rho-Kinase Signalwegs exprimiert?
- Findet die JAK2-Aktivierung AT1R-vermittelt statt?
- Welche Auswirkung hat eine JAK2-Hemmung auf den intrahepatischen Widerstand?
- Wird der bArr2/ERK-Signalweg im fibrotischen Lebergewebe exprimiert?
- Ist die ERK1/2-Aktivierung in der Leberfibrose AT1R-abhängig?
- Enkoppelt bArr2 die JAK2/Rho-Kinase Signalkaskade vom AT1R?
- Welchen Effekt hat eine AT1R-Stimulation und JAK2-Hemmung auf die hepatische Fibrose bei bArr2^{-/-} Mäusen?

Diese Studie zielt auf ein besseres Verständnis der AT1R-abhängigen Signalkaskaden sowie deren Regulation ab. Aufgrund der neuen Erkenntnisse sollen Angriffspunkte und Zielproteine zur hepatischen Fibrotherapie gefunden werden.

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Material

1.1 Chemikalien

Aceton	Merck, Darmstadt
Acrylamid/Bisacrylamid	AppliChem, Darmstadt
AEC-Lösung	DakoCytomation, Hamburg
AG490	Calbiochem, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	AppliChem, Darmstadt
Angiotensin II	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Aquatex [®]	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Chloramin-T	AppliChem, Darmstadt
Coomassie-Blue R-250	Serva, Heidelberg
Dexamethason	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dimethylaminobenzaldehyd	Merck, Darmstadt
Dimethylformamid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol absolut	AppliChem, Darmstadt
Ethidiumbromid	Invitrogen, Groningen, NL
Fetales Kälberserum (FKS)	PAA, Pasching, AU
Formaldehyd 37% (v/v)	Merck, Darmstadt
Formamid 99% p.a.	Roth, Karlsruhe
Glucose	AppliChem, Darmstadt
Glycerin 87% (v/v)	Roth, Karlsruhe
Glycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hämatoxilin	DakoCytomation, Hamburg
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure (HEPES)	Roth, Karlsruhe

Hoechst 33258	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Hydroxyprolin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Insulin	Invitrogen, Groningen, NL
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumacetat	Fluka, Neu-Ulm
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Ketamin	Medistar, Ascheberg
L-Glutamin	Gibco, Darmstadt
Lipofectamin	Invitrogen, Groningen, NL
Losartan	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	AppliChem, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Methanol p.a.	AppliChem, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
NGS (<i>normal goat serum</i>)	Dako, Glostrup, DK
Nycodenz	Nycomed, Singen
Orthovanadat	Merck, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Darmstadt
Perchlorsäure	AppliChem, Darmstadt
Percoll	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Phenobarbital (Luminal)	Desitin, Hamburg
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
n-Propylgallat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Roti [®] -Load 1, 4x konzentriert	Roth, Karlsruhe
Rinderserumalbumin (BSA)	Roth, Karlsruhe
Salzsäure 37% (v/v)	Roth, Karlsruhe
Tetrachlorkohlenstoff (CCl ₄)	Merck, Darmstadt
Tetramethyldiamin (TEMED)	AppliChem, Darmstadt
Transferrin/Selenium Mix	Invitrogen, Groningen, NL

Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	AppliChem, Darmstadt
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tween 20	Merck, Darmstadt
Ultra Pure™ Agarose	Invitrogen, Groningen, NL
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	AppliChem, Darmstadt
Xylazin	Alvetra, Neumünster

1.2. Enzyme

Accutase	PAA, Pasching, AU
Kollagenase D	Roche, Mannheim
DNase I	Roche, Mannheim
REDTaq® ReadyMix™	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
RNase Inhibitor (RNasin)	Promega, Madison, USA
rDNase	Macherey-Nagel, Düren
Pronase E	Merck, Darmstadt
Proteinase K	Peqlab, Erlangen
Streptavidin-HRP	DakoCytomation, Glostrup, DK

1.3. Antikörper

Tab. III/1. : Primäre Antikörper

Antigen / Herkunft	Anwendung	Hersteller / Kat.Nr.	Verdünnung
αSMA aus Maus IgG	WB	Sigma-Aldrich, Taufkirchen Kat.Nr. A2547	1:200
αSMA aus Maus IgG	IF	Sigma-Aldrich, Taufkirchen Kat.Nr. A2547	1:100
Arhgef1 aus Kaninchen IgG	WB	Cell Signaling, Beverly, USA Kat.Nr. #3771	1:1000
AT1-Rezeptor aus Kaninchen IgG	WB	Santa Cruz, Santa Cruz, USA Kat.Nr. sc-1173	1:200
β-Aktin aus Maus IgG	WB	Sigma-Aldrich, Taufkirchen Kat.Nr. A1978	1:20.000
β-Arrestin2 aus Maus IgG	WB	Santa Cruz, Santa Cruz, USA Kat.Nr. sc-13140	1:200

III. MATERIAL UND METHODEN

ERK1/2 aus Kaninchen IgG	WB	Santa Cruz, Santa Cruz, USA Kat.Nr. sc-93	1:200
pERK1/2 aus Kaninchen IgG	WB	Cell Signaling, Beverly, USA Kat.Nr. #4370	1:2000
GAPDH aus Kaninchen IgG	WB	Santa Cruz, Santa Cruz, USA Kat.Nr. sc-54848	1:200
JAK2 aus Kaninchen IgG	WB	Cell Signaling, Beverly, USA Kat.Nr. #3230	1:1000
JAK2 aus Kaninchen IgG	IHC	Cell Signaling, Beverly, USA Kat.Nr. #3230	1:50
pJAK2 aus Kaninchen IgG	WB	Cell Signaling, Beverly, USA Kat.Nr. #3771	1:1000
pJAK2 aus Kaninchen IgG	IHC	Abcam, Cambridge, UK Kat.Nr. ab32101	1:50
pJAK2 aus Kaninchen IgG	IF	Abcam, Cambridge, UK Kat.Nr. ab32101	1:50
MAS-Rezeptor aus Kaninchen IgG	WB	Alomone Labs, Jerusalem, IL Kat.Nr. #AAR-013	1:200
pMoesin aus Kaninchen IgG	WB	Santa Cruz, Santa Cruz, USA Kat.Nr. sc-12895	1:200
RhoA aus Maus IgG	WB	Santa Cruz, Santa Cruz, USA Kat.Nr. sc-418	1:200
Rho-Kinase aus Kaninchen IgG	WB	Santa Cruz, Santa Cruz, USA Kat.Nr. sc-5561	1:200

WB = Western Blot; IF = Immunfluoreszenz; IHC = Immunhistochemie

Tab. III/2.: Sekundäre Antikörper, gekoppelt an ein Konjugat

Antikörper	Antigen	Konjugat	Hersteller	Verdünnung
Anti-Rabbit-IgG aus Ziege	Kaninchen IgG	Peroxidase	Calbiochem Kat.Nr. 401315	1:20.000
Anti-Maus-IgG aus Ziege	Maus IgG	Peroxidase	Calbiochem Kat.Nr. 401315	1:20.000
Anti-Rabbit-IgG aus Ziege	Kaninchen IgG	Dylight 488	Jackson, Kat.Nr. #111-485-144	1:400
Anti-Maus-IgG aus Ziege	Maus IgG	Dylight 594	Jackson, Kat.Nr. #115-585-207	1:400

1.4. Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Biomers.net (Ulm) bezogen. Zur Ermittlung der Schmelztemperatur wurden pro GC-Paar 4 °C und pro AT-Paar 2 °C berechnet. Die Oligonukleotide wurden in einer Konzentration von 100 pmol/μl in H₂O bidest. gelöst, aus der eine Gebrauchslösung mit einer Konzentration von 10 pmol/μl in H₂O bidest. hergestellt wurde.

Die Sequenzen der Oligonukleotide sind in 5'→3'-Richtung angegeben.

Oligonukleotide zur Genotypisierung der AT1-Rezeptor Knock-out Mäuse:

AT1-Ko-murin-3	(0738)	TGA GAA CAC CAA TAT CAC TG
AT1-Ko-murin-4	(0739)	TTC GTA GAC AGG CTT GAG
AT16218		CCT TCT ATC GCC TTC TTG ACG

Oligonukleotide zur Genotypisierung der β-Arrestin2 Knock-out Mäuse:

BARR2CIN	(bArr2-a)	GAT CAA AGC CCT CGA TGA TC
BARR2FLAG22	(bArr2-b)	ACA GGG TCC ACT TTG TCC A
BARR2FLAG23	(bArr2-c)	GCT AAA GCG CAT GCT CCA GA

Sonden von Applied Biosystems für die relative Echtzeit-PCR von Mensch:

Gen	Bestellnummer
Arhgef1	Hs00180327_m1
AT1a-Rezeptor	Hs01096942_m1
JAK2	Hs00234567_m1
RhoA	Hs01051295_m1
Rho-Kinase	Hs00153074_m1

1.5. Laborgeräte

Analysenwaage 770	KERN, Forchtenberg
Analysenwaage ALS 120-4N	KERN, Forchtenberg
AxioCam MR R3	Carl Zeiss Jena, Jena

Axioobserver Z1	Carl Zeiss Jena, Jena
Brutschrank MCO-18AIC (UV)	Sanyo, Moriguchi, Japan
Centrifuge 5430	Eppendorf, Hamburg
Centrifuge 5804R	Eppendorf, Hamburg
ChemiSmart	Peqlab, Erlangen
Cryostat	SLEE, Mainz
DNAEngine Peltier Thermal Cycler	Bio-Rad, München
Electrophoresis Power Supply EPS301	Amersham, Freiburg
Fettstift, PAP-Pen	Kisker Biotech, Steinfurt
FlexCycler	Analyticjena, Jena
Gefrierschrank, -80°C	Thermo Scientific, Schwerte
Heizbad	Köttermann Labortechnik, Uetze
Heizblock	VWR, Darmstadt
Heizschrank	Binder, Hebertshausen
Heizspirale XATHERM U3 electronic	Julabo, Seelbach
Inkubator SI60D	Stuart, Staffordshire, UK
konfokales Mikroskop LSM-710	Carl Zeiss Jena, Jena
M3 Lauda	Hugo Sachs, March-Hugstetten
Magnetrührer	Cenco, Buffalo, USA
Membranpumpe Typ 420312	ILMVAC GmbH, Ilmenau
Microplate Reader MRX	Dynatech Laboratories, Delaware, USA
Mikroskop H550S	Nikon, Düsseldorf
Mikroskop Typ 120	Nikon, Düsseldorf
Mini-PROTEAN® Tetra System	Bio-Rad, München
miniSpin	Eppendorf, Hamburg
MP 100 Pulse Transducer	ADInstruments, Spechheim
ND-1000 Spectrophotometer	Nanodrop Tech., Rockland, USA
Pasteurpipette	Brand, Wertheim
Peristaltische Pumpe Peri-Star	WPI, Berlin
pH-Meter FiveEasy	Mettler, Gießen
pH-Meter HI 8314	HANNA Instruments, Kehl am Rhein
Pipette 0,1 - 2,5 µl Research	Eppendorf, Hamburg
Pipette 0,5 - 10 µl Research	Eppendorf, Hamburg
Pipette 10 - 100 µl Reference	Eppendorf, Hamburg
Pipette 20 - 200 µl Research	Eppendorf, Hamburg
Pipette 100 - 1000 µl Reference	Eppendorf, Hamburg

Pipette 500 - 5000 µl Research	Eppendorf, Hamburg
Potter S	Braun Biotech, Melsungen
Power Lab 8/35	ADInstruments, Spechheim
Power Pac 200	Bio-Rad, München
Power Pac Basic	Bio-Rad, München
Real Time PCR System 7300	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
Retsch Schüttler	Retsch, Haan
Scanner Panoramic Midi	3DHitech, Budapest, H
Schüttler	Edmund Bühler, Hechingen
Syringe Pumpe, Model 22	Hugo Sachs, March-Hugstetten
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Trockenschrank	Memmert, Schwabach
Vortexer 444-1372	VWR, Darmstadt
Waage KB	KERN, Forchtenberg
Waage TE1502S	Sartorius, Göttingen
Werkbank MSC-Advantage	Thermo Scientific, Schwerte
Zentrifuge GS-6KR	Beckman Coulter, Krefeld

1.6. Verbrauchsmaterialien

ES-Kompresse	Hartmann, Heidenheim
Gel-Blotting-Papier GB003	Whatman, Dassel
Handschuhe, Nitril Micro-Touch, S	Ansell, Brüssel, Belgien
Kanüle Neolus	Terumo, Leuven, Belgien
Kulturröhrchen	VWR, Darmstadt
Küvetten Macro PS, 4ml	VWR, Darmstadt
Marsilene, 0, nicht resorbierbar	Ethicon, Norderstedt
Mikrotiterplate 96-well, Flachboden	Sarstedt, Nümbrecht
Monocryl, 5/0, resorbierbar	Ethicon, Norderstedt
Nadel 0,4 mm x 19 mm	BD Microlance™3, Heidelberg
Nitrozellulosemembran Protan BA83, 0,2 µm	Whatman, Dassel
Nucleopore Polycarbonate	Whatman, Madison, UK
Optical clear film	Peqlab, Erlangen
Papierfilter	Whatman, Dassel
Pasteurpipetten Plastik	Copan, Murrieta, USA

PCR-Platte, 96-well	Peqlab, Erlangen
PCR-Reaktionsgefäß, flacher Deckel, 0,2 ml	Axygen, Union City, USA
PCR-Reaktionsgefäß, flacher Deckel, 0,5 ml	Axygen, Union City, USA
PE-50 Katheter 0,28x0,61	Everhardts, Meckenheim
Pipettenspitzen, weiß, 10 µl	Axygen, Union City, USA
Pipettenspitzen, gelb, 200 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen, blau, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen, weiß, 5000 µl	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäß, safe lock, 0,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäß, safe lock, 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäß, safe lock, 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Retsch-Kugeln, # 22.455.0002	Retsch, Haan
Seide, 3/0, nicht resorbierbar	Resorba, Nürnberg
Serologische Pipetten (5 ml / 10 ml / 25 ml)	Corning B.V., Corning, USA
Spritze, 20 ml	BD Discardit™ II, Heidelberg
Tuberkulinspritze, 1 ml	BD Plastipak™, Heidelberg
Whatman Filter, 0,2 µm Nylon	BD, Heidelberg
Zellkulturflaschen 25 cm ²	Greiner bio one, Frickenhausen
Zellkulturflaschen 75 cm ²	BD Falcon™, Heidelberg
Zellschaber	TPP, Trasadingen, CH
Zentrifugenröhrchen (15 ml / 50 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen

1.7. Größenstandards

DNA-Größenstandard

MassRuler™ DNA Ladder, Kat.Nr. #SM0403	Fermentas, St. Leon-Rot
--	-------------------------

Protein-Größenstandard

peqGOLD Protein-Marker V, Kat.Nr. 27-2210	Peqlab, Erlangen
---	------------------

1.8. Kits

Ace Glow™ Solution	Kat.Nr. 37-3420	Peqlab, Erlangen
DC Protein Assay Kit		
Reagent A	Kat.Nr. 500-0113	Bio-Rad, München
Reagent B	Kat.Nr. 500-0114	Bio-Rad, München
Reagent S	Kat.Nr. 500-0115	Bio-Rad, München
Protein Standard	Kat.Nr. 500-0007	Bio-Rad, München
ImProm-II™ Reverse Transcription System		
	Kat.Nr. #A3800	Promega, Madison, USA
Mikrosphären rot	Kat.Nr. #155-0531	FMI, Seeheim
Mikrosphären weiß	Kat.Nr. #155-0370	FMI, Seeheim
Mikrosphären gelb	Kat.Nr. #155-0448	FMI, Seeheim
Mikrosphären blau	Kat.Nr. #155-0672	FMI, Seeheim
NucleoBond Xtra Maxi-Kit	Kat.Nr. 740414.10	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin® RNAII	Kat.Nr. 740955.50	Macherey-Nagel, Düren
Protease Inhibitor Cocktail	Kat Nr.	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
REDTaq® ReadyMix™	Kat.Nr. R2523	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
TaqMan Gene Expression Master Mix		Applied Biosystems, Carlsbad,
	Kat.Nr. 4369016	USA
TaqMan Ribosomal RNA Control Reagents		Applied Biosystems, Carlsbad,
	Kat.Nr. 4308329	USA

1.9. SoftwareComputer-Programme

Bio1D	Peqlab, Erlangen
ChemiSmart	Peqlab, Erlangen
Clone Manager Suite 7, Version 7.01	Scientific & Educational Software
GraphPad Prism 4	GraphPad Software, USA
Lab Chart 7 Pro v7.2.1 2011	ADInstruments, Spechbach
Microsoft Excel	Microsoft Corporation, USA
Pannoramic Viewer	3DHistech, Budapest, H
7300 System SDS Software, Version 1.3	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
Triton 5, Triton Technology	Föhr Medical Instruments, Seeheim
Zen 2009	Carl Zeiss Jena, Jena

1.10. Versuchstiere

Die Haltung und Aufzucht der Tiere erfolgte nach tierschutzrechtlichen Bestimmungen und dem internationalen Standard entsprechend im Haus für Experimentelle Therapie (HET) an der Universitätsklinik Bonn. Dabei stand den Tieren autoklaviertes Futter und Wasser *ad libitum* zur Verfügung. Die Käfige aus Polycarbonat (Tecniplast, Hohenpeißenberg) waren in ein Regalsystem integriert, das die Käfige einzeln belüftet und konstante Umweltbedingungen sicherstellt (20-22 °C Temperatur, 50% relative Luftfeuchtigkeit, 12 Stunden Tag/Nacht-Rhythmus). Wildtyp-Ratten mit einem *Sprague-Dawley* Ursprung und Mäuse mit einem *C57BL/6J* Ursprung wurden von der Firma Charles River über das HET bezogen. Im Alter von vier bis sechs Wochen wurden die Tiere zu den Versuchen herangezogen.

Die Tierversuche wurden vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen genehmigt (LANUV NRW, 9.93.2.10.35.07.035).

1.10.1. AT1a-Rezeptor *knock out* Mäuse

Zur Generierung der AT1a-Rezeptor *knock out* Mäuse (*AT1R^{-/-}*) wurde das *Agtr1A*-Gen in embryonalen Stammzellen deletiert. Durch Einbringen der mutierten Stammzellen in die Keimbahn wurden zunächst Chimäre und durch Rückkreuzungen mit dem *C57BL/6J*-Wildtyp heterozygote Mäuse erstellt. Durch weitere Verkreuzungen der heterozygoten Tiere erhielt man schließlich den vollständigen Knock-out des *Agtr1A*-Gens. Diese Mäuse wiesen einen erniedrigten Blutdruck (89 ± 4 mmHg, Normalwerte 113 ± 2) auf, zeigten aber keine merklichen Beeinträchtigungen in ihrer Entwicklung und ihrem Überleben (Ito *et al.* 1995, Sugaya *et al.* 1995, Chen *et al.* 1997).

1.10.2. β -Arrestin2 *knock out* Mäuse

Zur Generierung der β -Arrestin2 *knock out* Mäuse (*bArr2^{-/-}*) wurde das *bArr2*-Gen in embryonalen Stammzellen deletiert. Durch Einbringen der mutierten Stammzellen in die Keimbahn wurden zunächst Chimäre und durch Rückkreuzungen mit dem *C57BL/6J*-Wildtyp heterozygote Mäuse erstellt. Durch weitere Verkreuzungen der heterozygoten Tiere erhielt man schließlich den vollständigen Knock-out des *bArr2*-Gens. Diese Mäuse zeigten eine deutliche Potenzierung und Verlängerung

der analgetischen Effekte von Morphin, was auf eine verhinderte Desensibilisierung des μ -Opioid-Rezeptors deutete (Bohn *et al.* 1999).

1.11. Gewinnung humaner Leberproben

Die humanen Leberproben stammen aus Lebertransplantationen, die zwischen 1996 und 2005 durchgeführt wurden. Alle Proben wurden unmittelbar nach der Entnahme in Probenröhrchen (Falcon 50 ml, BD, USA) überführt, schockgefroren und anschließend bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur Verwendung gelagert. Die zirrhotischen Leberproben stammen von Patienten, die aufgrund einer alkoholbedingten Lebererkrankung transplantiert wurden. Als Kontrolle dienten Gewebeproben aus nichtzirrhotischen Lebersegmenten, die bei Leberresektionen gewonnen wurden. Es wurde sichergestellt, dass die Patienten zuvor weder mit Katecholaminen, *Angiotensin-converting-Enzyme*-Inhibitoren oder AT1-Rezeptor-Antagonisten behandelt wurden. Die Versuche wurden von der Ethikkommission der Universität Bonn genehmigt (Ethikkommission der Universität Bonn 202/01 und 128/08).

2. *in vivo* Methoden

2.1. Anästhesie

Zur Anästhesie der Tiere wurde ein Ketamin/Xylazin-Gemisch verwendet, das in 0,9%igem sterilem NaCl verdünnt wurde. Für die Ratten wurde 100 mg Ketamin und 10 mg Xylazin pro kg Körpergewicht, bei Mäusen 100 mg Ketamin und 6 mg Xylazin pro kg Körpergewicht eingesetzt.

2.2. Isolierung primärer hepatischer Sternzellen

2.2.1. Lösungen

Gekaufte Puffer und Lösungen:

HBSS(+Ca²⁺+Mg²⁺) Kat.Nr. 140025-050

Gibco, Darmstadt

PBS, pH 7,4 Kat.Nr. 10010-015

Gibco, Darmstadt

Alle folgenden Lösungen wurden durch einen 22 μM -Filter sterilfiltriert.

10x Stock-Lösung

Komponente	Endkonzentration	Menge
NaCl	1,37 M	80 g
KCl	53,7 mM	4 g
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	5,47 mM	0,882 g
Na ₂ HPO ₄	8,45 mM	1,2 g
HEPES	10,1 mM	2,4 g
NaHCO ₃	41,7 mM	3,5 g
		ad 1000 ml H ₂ O bidest.

Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert.

GBSS (Gey's balanced salt solution)

Komponente	Endkonzentration	Menge
KCl	5 mM	370 mg
MgCl ₂ x 6H ₂ O	1 mM	210 mg
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,28 mM	70 mg
Na ₂ HPO ₄	0,42 mM	59,6 mg
KH ₂ PO ₄	0,22 mM	30 mg
Glucose	5,5 mM	991 mg
NaHCO ₃	2,7 mM	227 mg
CaCl ₂ x 2H ₂ O	1,53 mM	225 mg
		ad 1000 ml H ₂ O bidest.

Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert.

EGTA-Lösung

Komponente	Endkonzentration	Menge
10x Stock-Lösung	1x	100 ml
EGTA	0,5 mM	190 mg
Glucose	5 mM	900 mg
		ad 1000 ml H ₂ O bidest.

Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert.

Enzym-Lösung

Komponente	Endkonzentration	Menge
10x Stock-Lösung	1x	100 ml
CaCl ₂ x 2H ₂ O	3,81 mM	560 mg
		ad 1000 ml H ₂ O bidest.

Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert.

HBSS (*Hank's balanced salt solution*)

Komponente	Endkonzentration	Menge
KCl	5,37 mM	400 mg
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,81 mM	200 mg
Na ₂ HPO ₄	0,63 mM	90 mg
KH ₂ PO ₄	0,44 mM	60 mg
Glucose	5,55 mM	1 g
NaHCO ₃	4,17 mM	350 mg
CaCl ₂ x 2H ₂ O	1,26 mM	185 mg
		ad 1000 ml H ₂ O bidest.

Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert.

2.2.1.1. HSC-spezifische Lösungen**Pronase-Lösung**

40 mg Pronase in 80 ml Enzym-Lösung

Kollagenase-Lösung

36 mg Kollagenase in 120 ml Enzym-Lösung

DNase-Lösung

30 mg Pronase, 30 mg Kollagenase und 10 mg DNase I
in 100 ml Enzym-Lösung

Nycodenz-Stock-Lösung

8 g Nycodenz in 27,5 ml GBSS

2.2.1.2. Hepatozyten-spezifische Lösungen**Kollagenase-Lösung**

45 mg Kollagenase in 120 ml Enzym-Lösung

Percoll-Lösung

50% (v/v) Percoll in HBSS/B + 10% FKS

2.2.1.3. Kupfferzell-spezifische Lösungen

Lösung I

50 mg Kollagenase in 10 ml HBSS/B

Kollagenase-Lösung

40 mg Kollagenase in 10 ml Enzym-Lösung

Percoll-Lösung 25%

5 ml Percoll und 15 ml HBSS

Percoll-Lösung 50%

7,5 ml Percoll und 7,5 ml HBSS

MACS-Puffer

PBS; 1% FKS; 2 mM EDTA

2.2.2. Isolierung primärer muriner HSCs

Die Isolation der hepatischen Sternzellen wurde durch einen *in situ*-Verdau durchgeführt, gefolgt von einer Dichtegradientenzentrifugation, die auf der spezifischen Dichte der Vitamin A-reichen HSCs beruht (Friedman und Roll, 1987; Friedman *et al.* 1985; Knook *et al.*, 1982). Diese Methode benötigt einen hohen Vitamin A-Gehalt in den Zellen. Da bekannt ist, dass die Größe und Anzahl der Vitamin A-speichernden Lipidtropfen im Alter ansteigt, wurden Mäuse, die älter als 240 Tage alt waren, verwendet.

Nach der Anästhesie durch eine intraperitoneale Injektion wurde die Maus auf einer Styroporunterlage mit dem Abdomen nach oben fixiert. Das Abdomen wurde geöffnet und die Eingeweide nach rechts geschoben. Nach Freilegen der Pfortader wurde eine 27G-Venenverweilkanüle in die Vene eingeführt. Sofort danach wurde oberhalb die *posterior vene cava* durchtrennt.

Drei verschiedene Perfusionsschritte, die mit einer Flussrate von 4,9 ml/min durchgeführt wurden, sind nötig, um die HSCs aus dem Lebergewebe herauszulösen. Durch Waschen mit der EGTA-Lösung für 3 min wurden die überschüssigen Blutzellen aus den Lebersinusoiden gespült. Um die Desmosomen der Zell-Zell-Komplexe zu öffnen, wurde die Leber zuerst mit der Pronase-Lösung und danach mit der Kollagenase-Lösung für etwa 2 bis 4 min perfundiert. Während dieser Schritte entfärbt sich die Leber und wechselt von einer dunkelroten zu einer gelblich-beigen Farbe. Die behandelte Leber wurde aus der Maus herauspräpariert,

unter der Werkbank in der DNase-Lösung zerkleinert und für 5 bis 10 min bei 37 °C unter konstantem Rühren inkubiert. Die entstandene Suspension wurde durch ein Nylon-Gewebe (150 µm Durchmesser) in 50 ml Zentrifugenröhrchen gefiltert und für 7 min bei 500 x g bei 4 °C zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden anschließend zweimal mit HBSS(+Ca²⁺+Mg²⁺) + 1% FKS gewaschen. Danach wurde das Pellet in 34 ml HBSS(+Ca²⁺+Mg²⁺) + 10% FKS gelöst und 13,5 ml der Nycodenz-Stock-Lösung hinzugefügt (Endkonzentration 8,2%). Nach Zentrifugation für 24 min bei 1400 x g bei 4 °C ohne Bremse konnte man eine weißliche Sternzellangereicherte Bande erkennen. Diese wurde abgenommen, mit HBSS(+Ca²⁺+Mg²⁺) + 10% FKS gewaschen, bei 500 x g für 7 min bei 4 °C zentrifugiert und im Zellmedium resuspendiert.

Die HSCs wurden auf unbeschichteten Plastikoberflächen aktiviert und an Tag sieben ohne Passagierung verwendet.

2.2.3. Isolierung primärer muriner Hepatozyten

Die Isolierung primärer Maus Hepatozyten wurde zuerst durch Howard *et al.* 1967 beschrieben und 1976 von Seglen *et al.* optimiert. Die Anästhesie, Fixierung und das Einführen der Nadel erfolgte wie zuvor in Abschnitt III./2.2.2. beschrieben. Die Isolation der parenchymalen Zellen basiert auf einem zweistufigen Prozess, der aus dem Spülen der Leber mit der EGTA-Lösung und der darauffolgenden Perfusion mit der Kollagenase-Lösung besteht. Beide Schritte wurden mit einer Flussrate von 8 ml/min für jeweils 5 und 10 min durchgeführt. Danach wurde die Leber vorsichtig aus der Maus präpariert und in eine Petrischale gelegt. Nach Zerkleinerung der Leber in 40 ml GBSS/B + 10% FKS wurde die entstandene Suspension durch ein Nylon-Gewebe (150 µm) in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gefiltert. Anschließend wurde die Hepatozyten-Suspension bei 28 x g für 5 min zentrifugiert. Nach Wiederholung des Waschschritts mit 40 ml GBSS/B + 10% FKS wurde das Zellsediment in der Percoll-Lösung resuspendiert und bei 50 x g bei 4 °C für 10 min zentrifugiert. Dadurch werden die lebenden Zellen sedimentiert, während die toten Zellen an die Oberfläche steigen. Das Zellsediment wurde zuletzt mit Medium gewaschen, bei 28 x g für 5 min bei 4 °C abzentrifugiert und in Waymouth Medium (siehe III./5.1.) resuspendiert.

2.2.4. Isolierung primärer muriner Kupfferzellen

Die Kupfferzellisolierung erfolgte am getöteten Tier. Dazu wurde eine zervikale Dislokation durchgeführt. Die Maus wurde fixiert und deren Leber wie in III/2.2.2. beschrieben zur Perfusion vorbereitet. Die Perfusion selber wurde mit der Lösung I und einer Perfusionsrate von 4 ml/min für 30 sec durchgeführt. Danach wurde die Leber aus dem Tier entnommen und in ein 50 ml-Röhrchen mit Lösung II überführt. Dies wurde mit zwei weiteren Mäusen wiederholt, so dass am Ende drei Lebern in dem Röhrchen lagen. Die Leberzellen wurden danach mechanisch in der Lösung II gelöst, in ein 50 ml Röhrchen überführt und für 17 min unter ständigem Schütteln bei 250 Upm inkubiert. Die Suspension wurde anschließend durch einen Filter (250 µm) filtriert. 40 ml HBSS/B wurde zugegeben und bei 50 x g für 2 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde gesammelt und bei 800 x g für 10 min und 4 °C abzentrifugiert. Das entstandene Zellsediment wurde durch Wiederholung des Zentrifugationsschritts nach Zugabe von 40 ml HBSS/B gewaschen. Die Zellen wurden in 10 ml PBS resuspendiert, auf einen zweistufigen Percoll-Gradienten (25% vs. 50%, 15 ml und 20 ml jeweils) geschichtet und bei 1350 x g für 30 min bei 4 °C abzentrifugiert. Die Grenzschicht zwischen der unteren und oberen Bande wurde gesammelt, mit MACS-Puffer gewaschen und bei 800 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Danach wurden die Zellen gezählt, mit CD11b Mikrokügelchen (10 µl Kügelchen / 1×10^7 Zellen) und für 20 min bei 4 °C inkubiert. Nach der Zentrifugation bei 300 x g für 10 min wurden die Zellen in MACS-Puffer resuspendiert (bis zu 1×10^8 Zellen/ml) und durch ein Nylongewebe (30 µm) filtriert. Anschließend wurden die Zellen magnetisch durch autoMACS sortiert. Dies wurde von Frank A. Schildberg, Institut der Molekularen Medizin und Experimentellen Immunologie, Universität Bonn, durchgeführt.

2.3. Induktion der Fibrose in Maus und Ratte

2.3.1. Gallengangsligatur

Durch Ligatur des Gallengangs (BDL) entwickeln die operierten Tiere eine sekundär biliäre Leberzirrhose. Da dies bei Mäusen schneller geschieht, wurde die BDL bei Mäusen zwei Wochen und bei Ratten vier Wochen vor der Organentnahme durchgeführt. Die hämodynamische Messungen wurden an Ratten durchgeführt,

die so lange BDL hatten, bis sich Aszites gebildet hatte. Dazu wurde nach der Anästhesie der Tiere das abdominale und substernale Fell mittels Rasur entfernt und das Abdomen durch einen medianen Schnitt geöffnet. Der *Ductus hepaticus communis* wurde vorsichtig isoliert, zweifach ligiert und zwischen den Ligaturen durchtrennt. Scheinoperierte Tiere, deren Abdomen geöffnet und der Gallengang isoliert wurde, danach aber keine Ligatur stattfand, dienten als Kontrollen. Die abdominale Muskulatur und die Haut-Inzision wurden mit einer absorbierenden Wundnaht vernäht. Die Tiere blieben bis zum Aufwachen aus der Narkose unter Beobachtung, wurden gegebenenfalls mittels Rotlicht vor dem Auskühlen bewahrt und danach wieder in den Haltungsbereich überführt.

2.3.2. Tetrachlorkohlenstoff(CCl_4)-Intoxikation

Die nichtinvasive Leberschädigung durch CCl_4 -Inhalation wurde im HET bei Mäusen und Ratten unter einem Abzug durchgeführt. Dabei wurde je nach Tiermodell ein unterschiedliches Intoxikationssprotokoll angewandt:

Tab. III/3.: Intoxikationsschema

Zeitraum	Inhalationsdauer (sec)	
	Maus	Ratte
Woche 1	60	30
Woche 2	90	60
Woche 3	120	120
Woche 4	2x 120	180
Woche 5	-	240
ab Woche 6	-	300

Zur Intoxikation wurden die Tiere in den Käfigen belassen. Über einen Schlauch, der an einen Glaskolben angeschlossen war, in dem sich der Tetrachlorkohlenstoff befand, wurde das Gasgemisch durch Druckluft in die Käfige geleitet. Das Durchflussvolumen der Druckluft betrug bei den Ratten 1 l/min und den Mäusen 2 l/min. Nachdem die Begasungszeit laut Protokoll verstrichen war, blieben die Tiere bei geschlossenem Deckel noch einmal die gleiche Zeit der CCl_4 -angereicherten Luft ausgesetzt, bevor der Käfigdeckel geöffnet wurde und das Gasgemisch entweichen

konnte. Zusätzlich wurde den Tieren im Trinkwasser Phenobarbital (Luminol, 0,5 g/l) verabreicht. Dies erhöht zusätzlich die CCl₄-Toxizität und führt dadurch zu einer beschleunigten Leberschädigung. Die Begasung der Mäuse wurde bis zum Ende der vierten Woche durchgeführt. Die Behandlung der Ratten erstreckte sich von 12 bis 16 Wochen und wurde bei Auftreten von sichtbarem Aszites beendet.

2.4. *In situ* Leberperfusion

Krebs-Henseleit-Lösung

Komponente	Menge
Krebs-Henseleit-Puffer (Sigma Aldrich)	9,55 g
NaHCO ₃	2,1 g
CaCl x H ₂ O	373 mg
Heparin	2000 IU
	ad 1000 ml H ₂ O bidest.

Die Lösung wird auf den pH-Wert 7,4 eingestellt.

Zum Gebrauch wird die Lösung auf 37 °C erwärmt und 20 min mit Carbogen-Gas (Zusammensetzung: 95% O₂, 5% CO₂) präoxygeniert.

Die Leberperfusion wurde an Ratten durchgeführt, um die Auswirkungen verschiedener Inhibitoren auf die Durchblutung der Leber zu untersuchen.

Dazu wurde nach der Anästhesie und Fixierung der Tiere das abdominale und substernale Fell mittels Rasur entfernt und das Abdomen durch einen medianen Schnitt geöffnet. Nach der Erweiterung des Schnitts in lateraler Richtung wurde der Darm auf der linken Seite ausgelagert. Die *Vena cava inferior* wurde suprarenal präpariert und die *Vena lienalis* ligiert. Danach wurden zwei lose Ligaturen an die *Vena portae* angelegt und eine 14G-Venenverweilkanüle in die Pfortader geschoben. Zur Fixierung des Katheters wurde die proximale Ligatur zugezogen. Nachdem künstlich eine Pneumothorax herbeigeführt wurde, wurde die *Vena cava superior* aufgesucht und der Abflusskatheter angeschlossen. Der Perfusionskreislauf wurde mit einer Flussrate von 30 ml/min Krebs-Henseleit-Lösung hergestellt und die Messung des Pfortaderdrucks gestartet. Dazu wurde der Druckkanal des Druckmessers (Power Lab 8/35, ADInstruments, Spechbach) auf 0 mmHg und 30 mmHg geeicht. Der Druckaufnehmer wurde auf Herzebene eingestellt. Die Messungen wurden mit der Software AcqKnowledge, MP100, aufgezeichnet. Der hepatische Gefäßwiderstand ist dabei nach dem Ohmschen Gesetz als Druckgradient

geteilt durch den Fluss definiert. Nach einer 20 minütigen Ruhephase, die zur Stabilisierung der Perfusionsverhältnisse dient, wurde dem Perfusat 5 mM des AT1R-Agonisten Ang II zugefügt, um einen Anstieg des intrahepatischen Gefäßwiderstandes zu erreichen. Nachdem der Perfusionsdruck ein Plateau erreicht hatte, wurde dem Perfusat alle 20 min der JAK2-Inhibitor AG490 in steigenden Konzentrationen (1 μ M, 10 μ M, 100 μ M, 1mM) zugegeben. Die Veränderung des hepatischen Widerstands wurde in Bezug auf die Dosierung des Agonisten bestimmt. Um die AT1R-Abhängigkeit zu untersuchen, wurde in einem weiteren Versuch nach Vorkontraktion mit Ang II der AT1R-Blocker Losartan in einer Dosis von 10 mg/kg Körpergewicht zugefügt und danach wie zuvor mit AG490 in ansteigenden Konzentrationen (1 μ M, 10 μ M, 100 μ M) perfundiert.

2.5. Hämodynamische Messungen

Um Druckmessungen an der Ratte vornehmen zu können, die dem Zustand der Tiere bei vollem Bewusstsein am nächsten kommen, wurde intramuskulär eine Narkose mit 60 mg/kg Körpergewicht Ketamin vorgenommen (Seyde & Longnecker 1984). Diese Narkosemethode wird häufig bei Tiermodellen verwendet, die auf die Hämodynamik bei Vorhandensein eines portalen Hypertonus untersucht werden (Kojima *et al.* 2000, Van de Casteele *et al.* 2001).

Die Messungen selber wurden von Sabine Klein durchgeführt.

2.5.1. Messung von Blut- und Pfortaderdruck

Um den Druck zu messen, wurde die Ratte zunächst narkotisiert, fixiert und das Fell über der linken Leiste durch einen longitudinalen Schnitt geöffnet. Die Femoralarterie und die Femoralvene wurden freipräpariert und mit einem PE-50 Katheter kanüliert.

Danach wurde das abdominale und substernale Fell mittels Rasur entfernt und das Abdomen durch einen medianen Schnitt geöffnet. Die Eingeweide wurden herausluxiert. Ein weiterer PE-50 Katheter wurde in die kleine ileocoecale Vene eingeführt, bis zur *Vena portae* vorgeschoben und am Eingang in das mesenteriale Gefäßbett fixiert. Die Eingeweide wurden wieder zurück in die Bauchhöhle gelegt und Bauchwand sowie Fell mit einer Naht verschlossen.

Die Katheter wurden in der Pfortader und Femoralarterie über Druckaufnehmer (MP 100 Pulse Transducer, ADInstruments, Spechbach) an den Druckmesser (Power Lab 8/35, ADInstruments, Spechbach) angeschlossen. Der Nullpunkt wurde 1 cm über dem Operationstisch geeicht und der mittlere arterielle Druck, der Portaldruck und die Herzfrequenz über einen Zeitraum von 20 min kontinuierlich aufgenommen.

2.5.2. Messung der Durchblutung mittels kolorierter Mikrosphären

Durch die Verwendung von kolorierten Mikrosphären ist es möglich, das Herzauswurfvolumen und die regionale Durchblutung zu messen. Die Anwendung radioaktiver Mikrosphären bestätigt diese Technik (Hakkinen *et al.* 1995).

Um diese Methodik durchführen zu können wurde zunächst das Fell am rechten lateralen Halsdreieck durch einen longitudinalen Schnitt geöffnet. Nach Freipräparation der rechten *A. Carotis communis* in der *Vagina carotica* wurde ein weiterer PE-50 Katheter in die *A. Carotis communis* gelegt und bis zum linken Herzventrikel geschoben. Die Lage des Katheters wurde an der Pulskurve validiert und post mortem überprüft.

Mit einer Pumpe wurde eine Blutprobe, die als Referenz dient, aus der *A. Femoralis* 1 min lang entnommen (0,65 ml/min). Über den Katheter des linken Ventrikels wurden gleichzeitig 300 µl rote Mikrosphären (15 µM Durchmesser) injiziert. Dies geschah 10 sec nachdem die Referenzblutentnahme begonnen hatte und dauerte 20 sec an. Die Verteilung der roten Mikrosphären entspricht somit der Durchblutung der einzelnen Organe. Die geleerte Blutspritze wurde dann mit NaCl gespült und der Inhalt aufbewahrt. Innerhalb von 30 sec wurden danach 200 µl weiße Mikrosphären über den Mesenterialvenenkatheter in die Pfortader injiziert. Die weißen Mikrosphären dienen zur Bestimmung des porto-systemischen Shunts. Danach wurden beide Katheter mit NaCl und Heparin gespült, so dass keine Mikrosphären mehr in den Kathetern verbleiben. Durch den Femoralisvenenkatheter wurden danach der JAK2-Inhibitor AG490 injiziert und für 60 min der mittlere arterielle Druck, der Portaldruck und die Herzfrequenz aufgezeichnet. Danach wurde die Prozedur wie zuvor wiederholt: Eine Referenzblutprobe wurde entnommen und Mikrosphären in den Karotis- und Mesenterialkatheter gespritzt. Allerdings wurden für die zweite Messung zuerst 300 µl gelbe Mikrosphären und danach 200 µl blaue Mikrosphären verwendet.

10 min nach Gabe der letzten Mikrosphären wurde die Ratte durch Injektion von 1 ml 10x Ketamin getötet und Lungen, Leber, Nieren, Milz, Verdauungstrakt sowie Pankreas entnommen. Nach dem Wiegen der Organe wurde das Gewebe in 4 M KOH + 2% Tween 80 in einer Konzentration von 14 ml/g Gewebe aufgenommen, während die Referenzblutprobe in 3,8 ml 5,3 M KOH + 11,6% Tween 80 gelöst wurde. Zum Zersetzen des Gewebes wurden alle Proben 1 Std bei 60 °C inkubiert, gevortext und anschließend durch spezielle Filter (Nucleopore Polycarbonate) filtriert.

Die Filter mit den anhaftenden Mikrosphären wurden in jeweils 200 µl Dimethylformamid überführt. Dabei löst sich die Farbe der Mikrosphärenkügelchen in dem Lösungsmittel. Nach Zentrifugation der Proben bei 3000 x g für 5 min wurde ein Absorptionsspektrum (300 - 800 nm) aufgenommen. Mit Hilfe des Softwareprogramms Triton 5 wurde aus den Messdaten die Anzahl der Mikrosphären in den jeweiligen Organen, die Organdurchblutung, das Herzauswurfvolumen und der portosystemische Shunt errechnet. Dabei wird das Herzauswurfvolumen pro 100 g Körpergewicht angegeben.

Zur Berechnung des portosystemischen Shunts wird die Anzahl der Mikrosphären in der Lunge mit 100 multipliziert und dieser Wert durch die Anzahl der Mikrosphären in der Lunge und der Leber dividiert.

Die Summe der Durchblutungen in Magen, Milz, Darm, Mesenterien und Pankreas stellt den portalvenösen Einstrom dar, während der kollaterale Blutfluss das Produkt des portosystemischen Shunts und des portalvenösen Einstroms geteilt durch 100 ist und in ml/min x 100 g angegeben wird.

Der Gefäßwiderstand bezeichnet den Quotienten aus Blutfluss der entsprechenden Gefäßregion und Perfusionsdruck. Zur Berechnung des systemischen Gefäßwiderstands wird der mittlere arterielle Druck durch den kardialen Index geteilt, während der portalvenöse Widerstand der Quotient aus portalvenösem Einfluss und Pfortaderdruck ist.

2.6. Pharmakologische Modifikation von Maus und Ratte

2.6.1. Implantation osmotischer Minipumpen

Zur Stimulation des AT1-Rezeptors wurden osmotische Minipumpen in die Tiere implantiert. Diese osmotischen Minipumpen gewährleisteten eine kontinuierliche Abgabe des AT1-Rezeptor-Agonisten Angiotensin II über einen Zeitraum von 14 Tagen sowohl in Mäusen (ALZET, Modell 2002, Füllvolumen 200 µl, Durchfluss 0,5 µl/h) als auch in Ratten (ALZET, Modell 2ML2, Füllvolumen 2 ml, Durchfluss 5 µl/h). Nach Anästhesie der Tiere wurde hinter dem Schulterblatt subkutan eine Tasche präpariert, in die die befüllte Pumpe eingesetzt werden konnte. Scheinoperierte Tiere, die auch narkotisiert und operiert wurden, aber keine Pumpe erhielten, dienten als Kontrolle. Nach 14 Tagen wurden die Tiere getötet und deren Organe entnommen.

2.6.2. Injektion von AG490

Da der JAK2-Inhibitor AG490 bei 37 °C Körpertemperatur über sieben Tage nicht stabil ist und gekühlt gelagert werden muss, konnte keine Administration über die osmotische Minipumpe erfolgen und wurde daher den Ratten subkutan gespritzt. Für einen Zeitraum von sieben Tagen wurde täglich 1 mg/kg Körpergewicht AG490 injiziert.

2.7. Organentnahme

Die Organentnahme erfolgte am getöteten Tier. Dazu wurde bei den Mäusen eine zervikale Dislokation durchgeführt. Die Ratten erhielten eine tödliche Überdosis des Ketamin/Xylazin-Gemisches. Durch eine mediane Laparotomie wurde erst das Abdomen und schließlich durch Entlastungsschnitte die gesamte Bauchhöhle geöffnet. Die Leber wurde entnommen, in eine sterile Petrischale überführt und in einzelne Stücke zerteilt. Ein Leberlappen wurde für die Histologie in 4% Formaldehyd überführt. Die restlichen Stücke wurden in mehrere Reaktionsgefäße gegeben, in Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Benutzung bei -80 °C gelagert.

3. Molekularbiologische Methoden

3.1. Isolierung und Reinigung von DNA

Lysepuffer:

Komponente	Endkonzentration	Menge
5 M NaCl	200 mM	4 ml
1 M Tris/HCl-Lösung, pH 8	100 mM	10 ml
5 mM EDTA-Lösung, pH 8	5 mM	1 ml
20%(w/v) SDS-Lösung	0,2% (w/v)	1 ml

ad 100 ml H₂O bidest.

Der Lysepuffer wurde in 15 ml-Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Der verwendete Lysepuffer wurde bei RT gelagert.

Pro Schwanzspitze wurde in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß 200 µl Lysispuffer und 20 mg Proteinase K gegeben. Über Nacht wurde der Ansatz bei 55 °C und 800 Upm verdaut. Danach wurde die Probe bei 18.000 x g für 15 min bei RT sedimentiert. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das gleiche Volumen Isopropanol wurde zu der Probe gegeben und diese anschließend invertiert, so dass die an der Phasengrenze ausfallende genomische DNA sichtbar wurde. Danach wurde die Probe für 15 min bei 18.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde dann mit 500 µl 70%igen Ethanol (v/v) gewaschen und anschließend wieder 15 min bei 18.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Nach Abnehmen des Überstandes wurden der Waschschrift und die Zentrifugation nochmals wiederholt. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bei 50 °C auf dem Heizblock getrocknet. Zuletzt wurde das Pellet in 100 µl H₂O bidest. für 30 min bei 50 °C gelöst und anschließend die Konzentration und Reinheit der DNA photometrisch bestimmt.

3.2. Isolierung und Reinigung von RNA

Zur Isolierung und Aufreinigung von RNA wurde das NucleoSpin® RNAII-Kit verwendet. Die Leberproben wurden zuvor in den vom Kit mitgelieferten Puffer, der mit β-Mercaptoethanol versetzt wurde, in 2 ml-Reaktionsgefäße gegeben. Außerdem

wurde pro Ansatz noch eine Retsch-Kugel hinzugefügt und die Leber dann im Retsch-Schüttler für 4 min bei einer Frequenz von 30 hertz/sec zerkleinert. Danach wurde nach dem Protokoll des Kits weiter verfahren und die Konzentration und Reinheit der RNA anschließend photometrisch bestimmt.

3.3. Horizontale Gelelektrophorese - Auftrennung von DNA

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese wurde die DNA ihrer Größe nach aufgetrennt (modifiziert nach Sambrook und Russell, 2004).

Die Agarosekonzentration betrug, je nach Größe der aufzutrennenden DNA, zwischen 1% und 2% (w/v).

50x TAE-Puffer

Komponente	Endkonzentration	Menge
Tris	2 M	242 g
Essigsäure	1 M	120 g
EDTA	50 mM	14,6 g
		ad 1000 ml H ₂ O bidest.

Die Lagerung erfolgte bei RT. Zum Gebrauch wurde eine 1:50 Verdünnung (1x TAE-Puffer) hergestellt.

In einem 500 ml Becherglas wurden 200 ml TAE-Puffer mit der benötigten Agarosemenge bis zum Sieden in der Mikrowelle erhitzt. Anschließend wurde das Gel in einer Gießkammer luftblasenfrei gegossen, 10 µl Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,05%) hinzugemischt und abgekühlt.

Die DNA-Probe wurde zur Auftrennung in TBE-Puffer bei 10-12 V/cm 1-2 Stunden aufgetrennt. Zur Dokumentation wurde die DNA durch Fluoreszenzanregung des interkalierten Ethidiumbromids mit UV-Licht der Wellenlänge 302 nm visualisiert.

3.4. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR wird eingesetzt, um eine bestimmte Sequenz der DNA *in vitro* zu vervielfältigen. Dabei dienen die Produkte vorheriger Zyklen, die durch flankierende Oligonukleotide bestimmt werden, wiederum der DNA-Polymerase als Vorlage, so dass eine exponentielle Vervielfältigung der Sequenz in einer Art „Kettenreaktion“ erfolgen kann (Mullis 1983).

3.4.1. Standard-PCR

Standard-PCR-Ansatz

Komponente	Endkonzentration	Menge
2x REDTaq® ReadyMix™	1x	12,5 µl
10 pmol/µl Oligonukleotid 1	0,4 mM	1µl
10 pmol/µl Oligonukleotid 2	0,4 mM	1µl
DNA-Matrize	50 - 100 ng chromosomale DNA	ad 25 µl H ₂ O bidest.

Tab. III/4.: Standard-PCR-Programm

	5 min	96°C	initiale Denaturierung
35 x	30 sec	96°C	Denaturierung
	30 sec	5-10°C unter T _m	Annealing
	1 min/kb synthetisierter DNA	72°C	Elongation
	7 min	72°C	abschließende Elongation
	∞	4°C	

T_m bezeichnet die Schmelztemperatur der Oligonukleotide, die durch Annäherung, wie in III.1.4. beschrieben, ermittelt wird.

3.4.2. Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription wird die RNA in cDNA umgeschrieben. Dazu wurde das ImProm-II™ Reverse Transcription System verwendet.

<u>Komponente</u>	<u>Menge</u>
RNA	1 pg - 1 µg
0,5 µg/µl Random Primer	1 µl
	ad 5 µl H ₂ O bidest.

Der Ansatz wird im Thermocycler für 5 min bei 70 °C erhitzt und anschließend für mindestens 5 min auf Eis gestellt. Danach wird der Reverse Transkriptions-Mix zugegeben.

Reverse Transkriptions-Mix:

<u>Komponente</u>	<u>Menge</u>
5x RT-Puffer	4 µl
dNTP-Mix	1 µl
25 mM MgCl ₂	2,5 µl
Rnasin	0,5 µl
Reverse Transkriptase	1 µl
	ad 15 µl H ₂ O bidest.

Die Proben werden dann zuerst 5 min bei 25 °C, danach 60 min bei 42 °C und zuletzt 15 min bei 70 °C im Thermocycler erhitzt.

Die fertige cDNA wird 1:10 zu einer Gebrauchslösung verdünnt, die in die quantitative Echtzeit-PCR eingesetzt wird.

3.4.3. Relative Echtzeit-PCR

Die Echtzeit-PCR wird verwendet, um die Expression bestimmter Gene zu quantifizieren. Die TaqMan-Methode verwendet Oligonukleotide, an deren 5'-Ende ein fluoreszierender Farbstoff (FAM oder VIC) und am 3'-Ende ein sogenannter „Quencher“ (TAMRA) gekoppelt ist. Wenn die Quencher-Gruppe und die fluoreszierende Gruppe nah zusammen sind, absorbiert TAMRA die Emission des FAM- oder VIC-Farbstoffes. Bindet das Oligonukleotid an die cDNA, spaltet die DNA-Polymerase durch ihre 5'→3' Exonuklease Aktivität die fluoreszierende Gruppe ab, so dass die Fluoreszenz gemessen werden kann. Dabei ist die Menge der synthetisierten DNA proportional zu der Intensität der detektierten Fluoreszenz (Russel 2001).

Ansatz für die 18S-RNA, zur Normierung:

Komponente	Menge
2x Gen Expression Master Mix	12,5 µl
Oligonukleotid forward	0,25 µl
Oligonukleotid reverse	0,25 µl
Sonde VIC	0,25 µl
cDNA	2 µl
	ad 25 µl H ₂ O bidest.

Ansatz für die Gensonden:

Komponente	Menge
2x Gen Expression Master Mix	12,5 µl
Gen Sonde (FAM)	1,25 µl
cDNA	2 µl
	ad 25 µl H ₂ O bidest.

Von der cDNA einer Probe wurden die 18S-RNA und das gewünschte Gen jeweils in Doppelbestimmung mittels Echtzeit-PCR gemessen. Der messbare Grenzbe-
reich wurde von der 7300 System SDS Software festgelegt. Zur Normierung wurde
danach der 18S-RNA-Wert von dem Wert des Zielgens subtrahiert (Δct). Um alle
Proben miteinander vergleichen zu können, wurde jeweils der Mittelwert einer Be-
handlungsgruppe gebildet. Die erste Gruppe (Kontrollgruppe) wurde gleich eins
und die restlichen Behandlungsgruppen dazu in Relation gesetzt ($\Delta\Delta\text{ct}$).

4. Biochemische Methoden

4.1. Homogenisierung von Leberproben

Homogenisationspuffer

Komponente	Endkonzentration	Menge
Tris-HCl	25 mM	1,5 g
EDTA	5 mM	0,73 g
		ad 500 ml H ₂ O bidest.

Der Puffer wird auf den pH-Wert 7,5 eingestellt und bei 4 °C gelagert.

Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt.

Zur Homogenisierung von Lebern wurde ein Stück der noch gefrorenen Leber mit einem sterilen Einmalskalpell abgeschnitten. Der Homogenisationspuffer wurde mit dem Protease Inhibitor Cocktail (1% v/v) und Orthovanadat (1% v/v) versetzt und 1 ml des Gemischs mit einem Stück Leber in den Homogenisator (Potter S) überführt. Bei Zellproben wurde das Pellet mit 50 µl des Gemischs versetzt. Nach dem Homogenisieren (Leberstückchen im Potter, Zellpellet durch Scheren mit einer Spritze) wurde das erhaltene Lysat bei 18.000 x g für 5 min bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in einem neuen Reaktionsgefäß bei -20 °C gelagert.

4.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das Detergent Compatible (DC) Protein Assay Kit verwendet. Die DC-Methode ist ein empfindlicher Proteinnachweis und beruht auf der Lowry-Bestimmungsmethode durch Bildung von Cu⁺ aus Cu²⁺ im alkalischen Milieu. Diese Reaktion bewirkt zusammen mit den Aminosäureresten eine Farbentwicklung, die eine maximale Absorption bei 750 nm aufweist. Zur Proteinbestimmung wurde eine Eichreihe von 0 - 1,47 mg/ml Rinderserumalbumin (BSA) mit 8 Verdünnungen angefertigt. Die Proteinproben wurden wie folgt verdünnt: Bei Leberlysaten wurden 1:25 und 1:50 Verdünnungen gewählt, bei Zelllysaten 1:16 und 1:32 Verdünnungen. Jeweils 5 µl Proteinlösung wurden in Dreifachbestimmung in eine Flachboden-Mikrotiterplatte pipettiert.

Das Nachweisreagenz A/S wurde hergestellt, indem Reagenz S im Verhältnis 1:50 im Reagenz A verdünnt wurde. 25 µl des A/S-Gemischs wurden auf die Proben gegeben. Danach wurde 200 µl Reagenz B auf jede Probe pipettiert und 15 min bei

RT inkubiert. Anschließend wurde die Absorption der Proben bei 700 nm im ELISA-Reader bestimmt und mit dem Programm Excel ausgewertet.

4.3. Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht erfolgte im elektrischen Feld unter denaturierenden Bedingungen (Laemmli 1970).

Durch die diskontinuierliche SDS-PAGE (Ornstein & Davis 1964) mit unterschiedlichen pH-Werten und Porengrößen in Sammel- und Trenngel werden eine hohe Bandenschärfe und eine große Trennleistung erreicht. Die Konzentration des Acrylamids im Trenngel richtet sich nach der Größe der aufzutrennenden Proteine.

Trenngelpuffer

Komponente	Endkonzentration	Menge
Tris-Base	1,5 M	181,71 g
20 % (w/v) SDS-Lösung	0,4% (w/v)	20 ml
		ad 1000 ml H ₂ O bidest.

Mit HCl wurde pH 8,8 eingestellt und die Lösung bei RT gelagert.

Sammelgelpuffer

Komponente	Endkonzentration	Menge
Tris-Säure	0,5 M	78,8 g
20 % (w/v) SDS-Lösung	0,4% (w/v)	20 ml
		ad 1000 ml H ₂ O bidest.

Mit HCl wurde pH 6,8 eingestellt und die Lösung bei RT gelagert.

APS-Lösung

Komponente	Endkonzentration	Menge
APS	10% (w/v)	0,1 g
		ad 1000 ml H ₂ O bidest.

Die Lösung wurde für einen längeren Zeitraum bei -20 °C und für einen kürzeren Zeitraum bei 4 °C gelagert.

10x Laufpuffer

Komponente	Endkonzentration	Menge
Tris	0,25 M	30,3 g
20 % (w/v) SDS-Lösung	1 % (w/v)	50 ml
Glycin	1,92 M	144 g
		ad 1000 ml H ₂ O demin.

Der Puffer wurde bei RT gelagert. Zum Gebrauch wurde 1x Laufpuffer hergestellt.

Coomassie-Färbelösung

Komponente	Endkonzentration	Menge
Coomassie-Blue R-250	0,25% (w/v)	1,25 g
Methanol	50% (v/v)	250 ml
Eisessig	10% (v/v)	50 ml
		ad 500 ml H ₂ O demin.

Die Lösung wurde bei RT gelagert.

Entfärbelösung

Komponente	Endkonzentration	Menge
Methanol	5% (v/v)	50 ml
Eisessig	10% (v/v)	100 ml
		ad 1000 ml H ₂ O demin.

Die Lösung wurde bei RT gelagert.

Zur Auftrennung der Proteine wurden je nach deren Größe Gele mit 8, 10 und 15% Polyacrylamid (v/v) verwendet.

Trenngel (8, 10 und 15%ig)		Sammelgel	
Komponente	Menge	Komponente	Menge
Trenngelpuffer	0,9375 ml	Sammelgelpuffer	0,469 ml
Acrylamidlösung	1,4 / 1,75 / 2,625 ml	Acrylamidlösung	0,405 ml
APS-Lösung	12,5 µl	APS-Lösung	9,4 µl
TEMED	2,5 µl	TEMED	1,875 µl
	ad 3,75 ml H ₂ O bidest.		ad 2,5725 ml H ₂ O bidest.

APS und TEMED leiten die Polymerisierung ein und wurden daher zuletzt zugegeben. Nach Mischen der Lösung wurde das Trenngel mit der Pipette in die Gießkammer gegeben bis diese etwa zu 2/3 gefüllt war, anschließend mit Isopropanol überschichtet und ca. 30 min zur Polymerisierung inkubiert. Das Isopropanol wurde abgegossen und das Sammelgel mit der Pipette auf das Trenngel gegeben.

Die Proteinproben wurden mit ¼ Volumen 4x Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert. Anschließend wurden die Proben mit einer Pipette in die Gel-taschen gegeben.

Die Elektrophorese erfolgte bei 14-20 V/cm. Als Marker wurde ein vorgefärbter Größenstandard verwendet.

4.4. Transfer von Proteinen auf eine Membran (Western Blot)

10x Transferpuffer

Komponente	Endkonzentration	Menge
Tris-Base	25 mM	30 g
Glycin	192 mM	144 g
		ad 1000 ml H ₂ O demin.

Mit HCl wurde pH 8,3 eingestellt und die Lösung bei RT gelagert.

Zum Gebrauch wurde 1 Liter 1x Laufpuffer hergestellt und 50 ml Methanol (5% v/v) zugegeben.

Die zuvor aufgetrennten Proteine wurden mittels Western Blot auf eine Nitrozellulosemembran transferiert.

Dazu wurden zuerst zwei Gel-Blotting-Papiere mit den Abmessungen 10 x 7,5 cm in Transferpuffer äquilibriert und zwei Papiere auf die schwarze Seite der Kassette gelegt. Das Polyacrylamidgel mit den zu transferierenden Proteinen wurde kurz in Transferpuffer gewaschen und auf die Blotting-Papiere geschichtet. Darauf wurde die Membran (9 x 6 cm) luftblasenfrei gelegt, nachdem sie ebenfalls in Transferpuffer äquilibriert wurde. Zuletzt wurden weitere in Transferpuffer äquilibrierte zwei Blatt Blotting-Papiere darauf geschichtet. Mit einem Reagenzglas wurden Luftblasen herausgewalzt.

Der Blot erfolgte 75 min - 90 min bei 1-3 mA/cm².

Um zu überprüfen, ob die Proteine vollständig auf die Membran transferiert wurden, wurde das Gel anschließend in Coomassie-Färbelösung 1-2 Std gefärbt und über Nacht in Entfärbelösung gewaschen.

Zur Schnelldetektion der geblotteten Proteine wurde auf die Membran die Ponceau S-Lösung gegeben und kurz inkubiert. Die Farbe haftet reversibel an den Proteinen und markiert deren Lage rot auf der Membran.

4.5. Immunologische Detektion von Proteinen mittels Chemilumineszenz

Waschpuffer:

20x PBS

Komponente	Endkonzentration	Menge
NaCl	2,73 M	160 g
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	34,3 mM	5,52 g
Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	160 mM	57,28 g
		ad 1000 ml H ₂ O bidest.

Zum Gebrauch wurde 1x PBS hergestellt. Die Lösung wurde bei RT gelagert.

PBST

Komponente	Endkonzentration	Menge
20x PBS	1x	50 ml
Tween 20	0,1 % (v/v)	1 ml
		ad 1000 ml H ₂ O bidest.

Die Lösung wurde bei RT gelagert.

Blockierungslösungen:

Magermilchlösung

Komponente	Endkonzentration	Menge
Magermilchpulver	5% (w/v)	5 g
		ad 100 ml PBST

Die Lösung wurde frisch angesetzt und bei 4°C gelagert.

BSA-Lösung

Komponente	Endkonzentration	Menge
BSA	2,5% (w/v)	0,5 g ad 20 ml PBST

Die Lösung wurde frisch angesetzt und sofort verwendet.

Um unspezifische Reaktionen der Antikörper mit der Membran zu verhindern, wurde die Oberfläche der Membran zunächst auf dem Schüttler in 5% Magermilchlösung oder 2,5% BSA-Lösung bei RT geblockt. Danach wurde kurz mit PBST gewaschen, der Antikörper in verschiedenen Blockierungslösungen verdünnt auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde ungebundener primärer Antikörper durch viermaliges Waschen für je 5 min in PBST entfernt. Die Inkubation mit dem jeweiligen sekundären Antikörper, Anti-Kaninchen-IGg oder Anti-Maus-IGg, erfolgte 1 Stunde in den Lösungen, mit denen anfangs geblockt wurde. Ungebundener sekundärer Antikörper wurde ebenfalls durch viermaliges Waschen für je 5 min in PBST entfernt. Da der sekundäre Antikörper mit einer Peroxidase gekoppelt ist, kann die proteinspezifische Bande durch eine Lichtreaktion sichtbar gemacht werden. Dazu wurde das Ace Glow™ Solution-Kit verwendet: Unmittelbar vor dem Gebrauch wurden Solution A und Solution B im Verhältnis 1:1 zusammengegeben und gemischt. Diese Lösung wurde auf die Membran pipettiert. Dabei oxidiert die Peroxidase das Luminal, wodurch Licht abgestrahlt wird. Die feuchte Membran wurde unter einer durchsichtigen Folie in die Entwicklermaschine (ChemiSmart) gelegt. Am Objektiv der Kamera wurde die Schärfe eingestellt und danach die Membran je nach Stärke des Signals unterschiedlich lange belichtet. Das erhaltene Bild wurde dann auf dem Computer abgespeichert.

4.6. Densitometrische Quantifizierung der Proteinmenge

Die Bestimmung der Proteinmenge auf dem Western Blot erfolgte mit der Auswertungssoftware „Bio-1D“. Dazu wurden die zu quantifizierenden Signale zuerst automatisch von dem Programm oder manuell markiert. Danach wurde die Stärke des Signals anhand der Tiefenschwarzfärbung bestimmt. Die Werte wurden in einer Excel-Datei gespeichert und konnten anschließend weiter bearbeitet werden.

4.7. Hydroxyprolinmessung

Hydroxyprolin ist eine bestimmte α -Aminosäure, die im Kollagen vorkommt. Da die Leberfibrose mit einem erhöhten Kollagengehalt einhergeht, kann Hydroxyprolin als Maß für den Fibrosegrad herangezogen werden. Die Messung erfolgte enzymatisch (Jamall *et al.* 1981, Boigk *et al.* 1997).

Chloramin-T-Puffer

Komponente	Endkonzentration	Menge
1 M Natriumacetat	42 mM	8,4 ml
1 M Zitronensäure	2,6 mM	520 μ l

ad 200 ml H₂O bidest.

Die Lösung wurde auf pH 6 eingestellt und bei 4 °C gelagert.

Chloramin-T-Lösung

Komponente	Endkonzentration	Menge
Chloramin-T	37,3 mM	170 mg
Chloramin-T-Puffer	60,5% (v/v)	12,1 ml
Isopropanol	39,5% (v/v)	7,9 ml

Die Lösung wurde frisch angesetzt und sofort verwendet.

Ehrlich's Reagenz-Lösung (für 1 Probe)

Komponente	Endkonzentration	Menge
Dimethylaminobenzaldehyd	1,66 M	248 mg
60%(v/v) Perchlorsäure	16,2% (v/v)	270 μ l
Isopropanol	73% (v/v)	730 μ l

Die Lösung wurde frisch angesetzt und sofort verwendet.

50 bis 100 mg Leber wurden abgewogen und in der entsprechenden Menge 6 N HCl aufgenommen (20 μ l HCl / 1 mg Leber). Nach 30 min Inkubation in einem Heizschrank bei 110 °C wurde das Gemisch homogenisiert und für weitere 16 Std im Heizschrank bei 110 °C inkubiert. Danach wurde das Gemisch durch einen Papierfilter filtriert. Um alle Reste aus dem Filter zu erhalten, wurden diese für 2 min bei 200 x g zentrifugiert. Danach wurde in 2 ml-Reaktionsgefäße 30 μ l Methanol vorgelegt. Dazu wurden 30 μ l der Probe jeweils in Doppelbestimmung in Reaktionsgefäße pipettiert. Über Nacht wurden die Proben im Heizschrank getrocknet.

Aus einer Stammlösung (1 mg/µl Hydroxyprolin in 50%(v/v) Isopropanol) wurde eine Arbeitslösung hergestellt, indem die Stammlösung 1:100 verdünnt wurde. Daraus wurde eine Standardreihe (0 - 2,6 µg Hydroxyprolin) mit 10 Verdünnungen pipettiert, indem zu der entsprechenden Menge an Arbeitslösung 50%(v/v) Isopropanol zugefügt wurde. Das Kristallat der getrockneten Proben wurde in 1 ml 50%(v/v) Isopropanol gelöst. Zum Standard und zu den Proben wurde danach die Chloramin-T-Lösung pipettiert und 10 min bei RT inkubiert. Dann wurde 1 ml Ehrlich's Reagenz-Lösung zugegeben, alles gemischt und bei 50 °C im Heizschrank 90 min inkubiert. Das Hydroxyprolin in den Proben geht dabei eine Farbreaktion mit dem Dimethylaminobenzaldehyd ein und verfärbt sich ins Rötliche, wobei die Intensität der Färbung proportional zur Hydroxyprolinkonzentration ist. Die Proben wurden zuletzt im Photometer bei 558 nm gegen den Leerwert gemessen und anhand der Standardgerade im Excel-Programm mit folgender Formel berechnet:
Absorption / Koeffizient der Standardgerade x 666,7 = µg/g Leber

5. Zellbiologische Methoden

Alle zellbiologischen Methoden wurden unter der Werkbank bei sterilen Bedingungen durchgeführt.

5.1. Zellkulturmedien

Waymouth Medium	Gibco, Kat.Nr. 11220
+ 10% (v/v) FKS	
+ 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin	
+ 2 mM L-Glutamin	
+ 1 mM Insulin	
+ 100 µM Dexamethason	
RPMI-Medium	Gibco, Kat.Nr. 12633
+ 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin	
+ 2 mM L-Glutamin	
+ 1,5 mM Insulin	
+ 1% (v/v) Transferrin/Selenium Mix	

DMEM (*Dulbecco modified Eagle Medium*) Gibco, Kat.Nr. 11960
+ 10% (v/v) FKS
+ 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin
+ 2 mM L-Glutamin

5.2. Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wurde mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dazu wurde Trypanblau mit einer Endkonzentration 0,1% (v/v) zu der Zellsuspension gegeben, um die lebenden von den toten Zellen unterscheiden zu können. Das Trypanblau wird von Zellen mit intakter Zellmembran nicht aufgenommen und vitale Zellen daher nicht angefärbt. Jedes große Quadrat der Zählkammer besteht aus 16 kleinen Quadraten, hat eine Größe von 1 mm² und eine Tiefe von 0,1 mm, was ein definiertes Volumen von 0,1 mm³ ergibt. Mit folgender Formel kann daher die Zellzahl pro ml errechnet werden:

Durchschnittliche Zellzahl / Großquadrat x Verdünnungsfaktor x 10⁴ = Zellzahl/ml

5.3. Zellkultivierung

Die Zellen wurden in einem 37 °C Brutschrank mit 5% CO₂ inkubiert.

5.3.1. LX2-Zelllinie (human)

Die humane LX2-Zelllinie wurde in Plastikkulturflaschen in DMEM kultiviert (Bataller *et al.* 1997). Das Medium wurde alle 48 Std erneuert.

5.3.2. primäre hepatische Sternzellen

Nach der Isolation wurden die primären HSCs in Plastikkulturflaschen in DMEM kultiviert (Bataller *et al.* 1997). Das Medium wurde alle 48 Std erneuert.

5.3.3. primäre Hepatozyten

Zur Beschichtung der Plastikkulturflaschen wurde das Rattenschwanzkollagen Typ I verwendet. Dazu wurde es 1:50 in 1%(v/v) Essigsäure verdünnt. Die Oberflä-

che der Zellkulturflaschen wurde mit der Kollagen-Lösung beschichtet und für 30 min bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Nach dem dreimaligen Waschen der Flaschen mit HBSS konnten die Zellkulturflaschen verwendet oder bis zu vier Wochen bei 4 °C gelagert werden.

Nach der Isolation wurden die Hepatozyten für 4 Std im Waymouth Medium kultiviert. Danach wurden die Zellen dreimal in HBSS gewaschen, dann im RPMI Medium bis zu drei Tage kultiviert und zuletzt zur Proteinisolierung geerntet.

5.4. Inkubation der Zellen

5.4.1. Angiotensin II-Inkubation

Das pulverförmige Angiotensin II (Sigma, Kat.Nr. A9525-5MG) wurde mit PBS zu einer Stammlösung angesetzt (1 mg/ml). Von der Stammlösung wurde 512,5 µl in 50 ml Medium gegeben (Endkonzentration 10^{-5} M). Die Zellen wurden für die Versuche drei Tage in diesem Medium inkubiert.

5.4.2. AG490-Inkubation

Der JAK2-Inhibitor AG490 wurde in DMSO gelöst von der Firma Calbiochem (Kat.Nr. # 658411) mit einer Konzentration von 100 mM bezogen. Zur Herstellung der Medien wurden 7,36 µl AG490 auf 500 ml Medium (Endkonzentration 1,47 µM) oder 2,5 µl AG490 auf 50 ml Medium (Endkonzentration 5 µM) gegeben. Die Zellen wurden für die Versuche drei Tage in diesem Medium inkubiert.

5.5. Ernten der Zellen für DNA- oder RNA-Isolation

Zum Ernten der Zellen wurde nach Absaugen des Mediums 40 µl/cm² Accutase auf die Zellen gegeben und für 10 min im Brutschrank inkubiert. Falls sich danach die Zellen nicht vollständig von der Plastikschale gelöst hatten, wurden sie zusätzlich mit einem sterilen Schaber abgekratzt. Zum Stoppen der Accutase wurde nach dem Lösen der Zellen vom Boden Medium hinzugegeben. Die Zellsuspension wurde dann 5 min bei 350 x g und 4 °C abzentrifugiert, anschließend das Zellpellet mit sterilem PBS gewaschen und nochmals 5 min bei 350 x g und 4 °C abzentrifugiert. Dann wurde das Pellet in 1 ml PBS gelöst und in 1,5 ml Reaktionsgefäßen 5 min

bei 10.000 x g und 4 °C abzentrifugiert. Zuletzt wurde der Überstand verworfen und das erhaltene Pellet bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

6. Immunhistochemie

Mit Hilfe der Immunhistochemie lassen sich bestimmte Proteine in Gewebeschnitten anfärben. Dadurch erhält man Aufschluss darüber, in welchen Zellen sich die Proteine befinden und in welchen Zellkompartimenten sie vorkommen.

6.1. Immunhistochemische Färbung

Die immunhistochemischen Färbungen wurden entweder an Kryoschnitten (JAK2/pJAK2-Färbung) oder mit Formalin-fixierten, in Paraffin-eingebetteten Lebern (α SMA- und Sirius-Rot Färbung) durchgeführt. Die JAK2/pJAK2-Färbung, sowie die indirekte Immunfluoreszenzmarkierung, wurden unter meiner Anleitung von Robert Schierwagen im Rahmen seiner Diplomarbeit angefertigt.

6.1.1. Janus-Kinase-2 (JAK2) / pJAK2-Färbung

Zunächst wurden die Gefrierschnitte bei RT 3 min angetaut und anschließend 10 min in Aceton bei -20 °C inkubiert. Danach wurden die Schnitte 30 min getrocknet und die Probe auf dem Objektträger mit einem Fettstift umrandet, um ein Zerlaufen der Antikörper, Puffer und Lösungen im weiteren Hergang zu verhindern. Zur Rehydrierung wurden die Schnitte zweimal für 5 min mit PBS gewaschen.

Alle nun folgenden Schritte wurden zum Schutz vor Austrocknung in einer feuchten Kammer durchgeführt. Um die Aktivität der endogenen Peroxidasen zu blockieren wurden die Schnitte 15 min in einem Gemisch aus Wasserstoffperoxid und Methanol inkubiert und danach wieder zweimal für 5 min mit PBS gewaschen. Der Primärantikörper (JAK2 oder pJAK2) wurde in PBS mit 1% BSA verdünnt, auf die Schnitte gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS für 5 min wurde der Sekundärantikörper in PBS mit 1% BSA verdünnt und im Dunkeln 120 min bei RT inkubiert. Der Antikörper wurde durch erneutes zweimaliges Waschen für 5 min mit PBS entfernt und mit Streptavidin-HRP 30 min bei RT inkubiert. Danach folgte eine Inkubation mit der AEC-Substratlösung für 10 min und ein erneutes Auswaschen mit PBS. Für 35 sec wurden die Schnitte mit Hämatoxylin gegengefärbt und anschließend 10 min unter fließendem Wasser gebläut.

Zuletzt wurden die Färbungen zweimal für 3 min mit H₂O bidest. gewaschen und mit Aquatex[®] eingedeckelt. Die Aushärtung erfolgte im Dunkeln bei RT.

6.1.2. α -smooth muscle Aktin (α SMA)-Färbung

Die α SMA-Färbung in Leberschnitten wurde von der Plattform Q1 im Institut für Pathologie an der Uniklinik Bonn unter der Leitung von Prof. Dr. H.-P. Fischer durchgeführt. Diese wurden im Rahmen des transregionalen Sonderforschungsbereichs 57: "Organfibrose: Von den Mechanismen der Schädigung zur Beeinflussung der Erkrankung" angeboten.

6.1.3. Sirius-Rot Färbung

Die Sirius-Rot Färbung in Leberschnitten wurde von der Plattform Q1 im Institut für Pathologie an der Uniklinik Bonn unter der Leitung von Prof. Dr. H.-P. Fischer durchgeführt. Diese wurden im Rahmen des transregionalen Sonderforschungsbereichs 57: "Organfibrose: Von den Mechanismen der Schädigung zur Beeinflussung der Erkrankung" angeboten.

6.2. Indirekte Immunfluoreszenzmarkierung

Die indirekte Immunfluoreszenzmarkierung diente zur Kolo-kalisierung von pJAK2 und α SMA in Leberproben.

Zuerst wurde eine Fixierung der Gewebestruktur vorgenommen. Dazu wurde der Kryoschnitt 2 min in -20 °C kaltem Methanol inkubiert und anschließend in -20 °C kaltem Aceton fixiert, wodurch die Probe vollständig dehydriert wurde. Danach wurde mit den Schnitten wie in Abschnitt III/6.1.1. beschrieben bis zur endgültigen Rehydrierung fortgefahren.

Alle nachfolgenden Schritte wurden zum Schutz vor Austrocknung in einer feuchten Kammer durchgeführt. Die unspezifischen Bindungen wurden mit Ziegen Serum (NGS) in 1% (w/v) BSA in PBS für 45 min bei 37 °C im Wärmeschrank blockiert. Danach wurden beide Primärantikörper in 1% (w/v) BSA in PBS gemischt, auf den Schnitt aufgetragen und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Anschließend wurde der Schnitt zweimal mit 0,1% (v/v) PBST und einmal mit PBS für jeweils 5 min gewaschen. Um ein Ausbleichen der Fluorochrome zu verhindern, wurden die folgenden Schritte lichtgeschützt durchgeführt. Die Sekundärantikörper wurden ebenfalls in

1% (w/v) BSA in PBS gemischt, auf den Schnitt aufgetragen und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde der Schnitt zweimal mit 0,1% (v/v) PBST und einmal mit PBS für jeweils 5 min gewaschen. Zur Zellkernfärbung wurde der Farbstoff Hoechst 33258, der bevorzugt an die AT-reichen Sequenzen der DNA bindet, 1:10.000 in PBS verdünnt und damit der letzte Waschschrift durchgeführt. Schließlich wurden die gefärbten Schnitte mit Mowiol mit Bleichschutz (n-Propylgallat) eingedeckelt und bis zur Aushärtung lichtgeschützt bei RT gelagert.

6.3. Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (LSM)

Die immunfluoreszenzmarkierten Leberschnitte wurden an einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop (LSM-710) ausgewertet. Das vollmotorisierte inverse Forschungsmikroskop (Axioobserver Z1) wurde mit einem 63x Plan-Apochromat DIC-Objektiv betrieben und war mit einem Argon-Laser (488 nm) und einem Helium-Neon-Laser (594 nm) zur Anregung der Fluorochrome ausgestattet. Mit einem 34-Kanal Meta-Detektor wurde die emittierte Strahlung detektiert. Die Steuerung des Mikroskops und die Bilderfassung erfolgten mit der Software Zen 2009. Für die Doppelimmunfluoreszenzmarkierung wurden die einzelnen Fluorochrome separat mit den spezifischen Wellenlängen angeregt.

6.4. Auswertung der Immunhistochemie

Zur quantitativen Auswertung der immunhistochemischen Färbungen wurden die Schnitte zuerst eingescannt und somit digitalisiert. Nach Anlegen eines Profils wurde die quantitative Messung durchgeführt. Zudem wurden von jedem Schnitt repräsentative Bilder mit dem Programm Panoramic Viewer erstellt und in verschiedenen Vergrößerungen abgespeichert.

6.4.1. Digitalisierung der Färbungen

Die Schnitte wurden mit dem Scanner Panoramic Midi digitalisiert. Mittels der Software Panoramic Viewer konnten die Färbungen auf dem Computer gespeichert werden. Die notwendigen Parameter wurden anhand eines repräsentativen Schnittes als Profil gespeichert. Dieses Profil wurde auf alle weiteren Schnitte angewendet und gegebenenfalls je nach Qualität der Färbung manuell angepasst. Die Aufnahmen wurden mit der AxioCam MR R3 angefertigt.

6.4.2. Auswertung mittels spezieller Software

Die quantitative Messung der Färbungen wurde mit dem Histoquant, einem Modul des Programms Panoramic Viewer, durchgeführt. Dazu wurde zuerst ein repräsentativer Bereich ausgewählt, der etwa eine Fläche von 2 mm² besaß. Innerhalb dieser Fläche wurde ein kleiner Bereich markiert, der alle vorkommenden Farbtöne der Positivfärbung enthielt und anhand dessen das Profil für die Messung erstellt wurde. Dazu wurde zunächst ein Gaußfilter auf den Bereich angewandt, der Unregelmäßigkeiten des Fokusbereichs ausglich. Nach manueller Markierung der positiv gefärbten Bereiche konnten das Programm anschließend anhand der RGB-Werte alle Bereiche, die den gleichen RGB-Wert besaßen, markieren. Das erstellte Profil wurde gespeichert und auf die große Fläche übertragen. Der Messwert stellt die prozentuale Positivfärbung im markierten Bereich im Vergleich zur Gesamtfläche des großen Bereichs dar.

7. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism. Zur Untersuchung der statistischen Signifikanz wurde ein parameterfreier statistischer Test, der sogenannte Mann-Whitney-U-Test, durchgeführt.

p-Werte von < 0,05 (*) wurden als signifikant erachtet, p-Werte von < 0,005 (**) und < 0,001 (***) als hoch signifikant. Falls nicht anders angegeben, zeigen die p-Werte die Signifikanz der unterschiedlichen Gruppe zur Kontrollgruppe an.

IV. ERGEBNISSE

1. Rolle von JAK2 in der AT1R-vermittelten Fibrose

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit dem kontraktiven AT1R-vermittelten Signalweg über die JAK2/Rho-Kinase-Achse in der Leberfibrose. JAK2 wurde AT1R-abhängig in den glatten Gefäßmuskelzellen identifiziert, wobei die Aktivierung von JAK2 durch die Phosphorylierung an den Aminosäureresten Tyr1007/1008 zur Zellkontraktion über RhoA und die Rho-Kinase führt. In der Leberfibrose ist der RhoA/Rho-Kinase Signalweg auch maßgeblich an der Ausbildung des Krankheitsbildes beteiligt (Klein *et al.* 2012). Dabei stehen vor allem die hepatischen Sternzellen (HSCs) im Fokus, da diese nach ihrer Aktivierung Myofibroblasten-ähnliche Eigenschaften entwickeln, wozu auch die Fähigkeit zur Kontraktion zählt. Diese ist Rho-Kinase-vermittelt und verstärkt die portale Hypertonie. Letztere ist ein entscheidendes Moment für die Entstehung der Komplikationen der Leberzirrhose (Klein *et al.* 2012). Da die Beteiligung von JAK2 in der hepatischen Fibrose bisher nicht untersucht wurde, sollte die Funktion und Lokalisation dieses Proteins in der Leber bestimmt werden.

1.1. Hepatische Expression von AT1R und dessen Effektoren

Um die Relevanz des untersuchten JAK2/Rho-Kinase Signalwegs in der Leberfibrose zu evaluieren, wurde die Expression des AT1-Rezeptors und dessen Effektoren untersucht. Dazu wurden humane gesunde Leberproben mit zirrhotischen Leberproben verglichen. In den Tiermodellen Ratte und Maus wurde eine experimentelle Fibrose durch Gallengangsligatur sowie durch CCl₄-Intoxikation induziert und die Proteinexpression des Lebergewebes mit der Expression der Leberproben der entsprechenden Kontrollen verglichen.

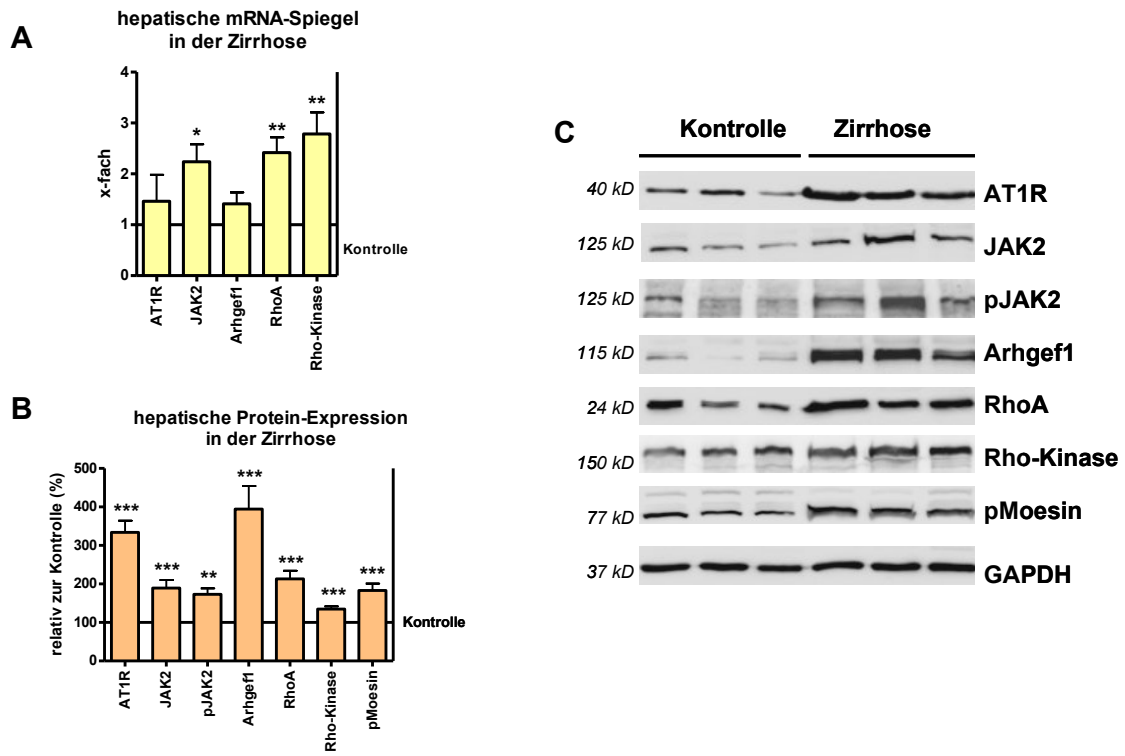


Abb. IV/1. Hepatische Expression des AT1R und dessen Effektoren in der humanen Zirrhose

A: mRNA-Expression von AT1R, JAK2, Arhgef1, RhoA und Rho-Kinase bei zirrhatischen humanen Leberproben im Vergleich zu gesunden Proben. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte \pm SEM.

B: Quantifizierung der Protein-Spiegel durch Densitometrie von AT1R, JAK2, pJAK2, Arhgef1, RhoA, Rho-Kinase und pMoesin bei zirrhatischen humanen Leberproben im Vergleich zu gesunden Proben. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte \pm SEM.

C: Repräsentative Western Blots von AT1R, JAK2, pJAK2, Arhgef1, RhoA, Rho-Kinase und pMoesin bei zirrhatischen humanen Leberproben im Vergleich zu gesunden Proben. Von jedem Leberhomogenat wurde jeweils 40 μ g Protein aufgetragen. Als endogene Kontrolle wurde GAPDH verwendet.

1.1.1. Expression in der humanen Zirrhose

Im zirrhötischen humanen Lebergewebe sind die mRNA-Spiegel des AT1R und dessen Effektoren der JAK2/Rho-Kinase Achse hochreguliert. Während der AT1R und sein Effektor Arhgef1 zwar nur einen leichten Anstieg in der Transkription zeigen, ist die Expression von JAK2, RhoA und Rho-Kinase im Vergleich zur gesunden Leber jedoch signifikant erhöht (Abb. IV/1.A). Dies lässt vermuten, dass dieser Signalweg in der hepatischen Fibrose und Zirrhose aktiviert ist.

Auf der Proteinebene sieht man schließlich, dass alle AT1R-Effektoren sowie der AT1R selber signifikant in der hepatischen Zirrhose beim Menschen ansteigen (Abb. IV/1.B,C). JAK2 und Rho-Kinase sind verstärkt aktiviert, was anhand der Phosphorylierung von JAK2 (pJAK2) und der Phosphorylierung von Moesin, einem Substrat der Rho-Kinase, gezeigt wird.

Somit weist dies auf eine Beteiligung und eine posttranskriptionelle Regulation des JAK2/Rho-Kinase-Signalwegs bei der Leberzirrhose und dessen Komplikationen hin.

1.1.2. Expression im Rattenmodell

Zur genaueren Untersuchung der Leberfibrose im Tiermodell wurde bei Ratten eine vierwöchige Gallengangsligatur (BDL) oder eine 12-wöchige CCl₄-Intoxikation durchgeführt. Auch hier sieht man einen sehr deutlichen Anstieg der Proteinexpression nach der Fibroseinduktion. Sowohl die Expression des AT1Rs, als auch die Expression der Effektoren JAK2, Arhgef1, RhoA und Rho-Kinase sind signifikant erhöht. Die Aktivierung des JAK2/Rho-Kinase Signalweges wurde durch die Phosphorylierung von JAK2 und Moesin, dem Substrat der Rho-Kinase, untersucht. Dabei zeigt sich, dass neben der vermehrten Expression des gesamten JAK2/Rho-Kinase-Signalweges auch eine verstärkte Aktivierung stattfindet (Abb. IV/2). Die Proteinexpression des hepatischen AT1R und der JAK2/Rho-Kinase Signalkaskade im Rattenmodell ist somit mit den Ergebnissen der humanen Leberproben vergleichbar.

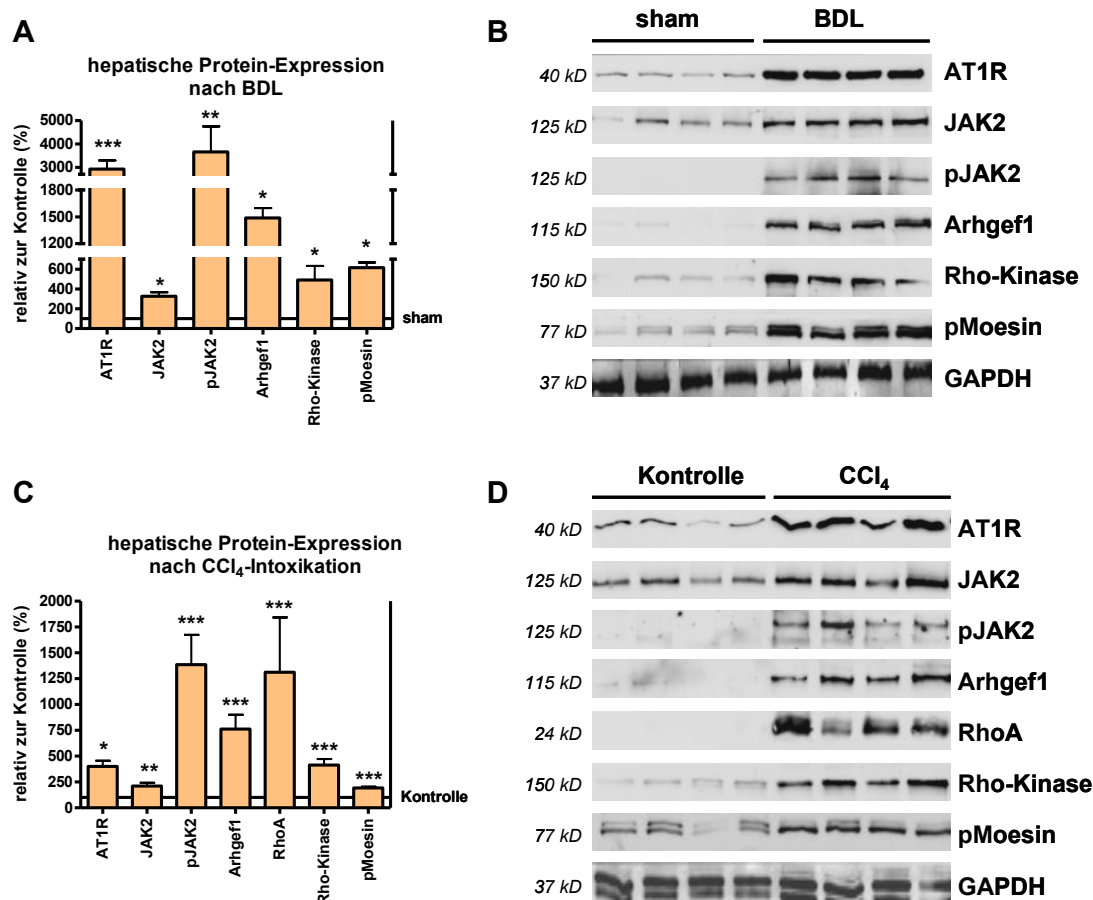


Abb. IV/2. Hepatische Expression vom AT1R und dessen Effektoren in der experimentellen Fibrose im Rattenmodell

A: Quantifizierung der Protein-Spiegel durch Densitometrie von AT1R, JAK2, pJAK2, Arhgef1, Rho-Kinase und pMoesin bei Leberproben von gallengangsligierten Ratten im Vergleich zu Proben von scheinoperierten (sham) Tieren. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte \pm SEM.

B: Repräsentative Western Blots von AT1R, JAK2, pJAK2, Arhgef1, Rho-Kinase und pMoesin bei Leberproben von gallengangsligierten Ratten im Vergleich zu Proben von sham Tieren. Von jedem Leberhomogenat wurde jeweils 50 μ g Protein aufgetragen. Als endogene Kontrolle wurde GAPDH verwendet.

C: Quantifizierung der Protein-Spiegel durch Densitometrie von AT1R, JAK2, pJAK2, Arhgef1, RhoA, Rho-Kinase und pMoesin bei Leberproben von Ratten nach CCl₄-Intoxikation im Vergleich zu Proben von unbehandelten Tieren. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte \pm SEM.

D: Repräsentative Western Blots von AT1R, JAK2, pJAK2, Arhgef1, RhoA, Rho-Kinase und pMoesin bei Leberproben von Ratten nach CCl₄-Intoxikation im Vergleich zu Proben von unbehandelten Tieren. Von jedem Leberhomogenat wurde jeweils 50 μ g Protein aufgetragen. Als endogene Kontrolle wurde GAPDH verwendet.

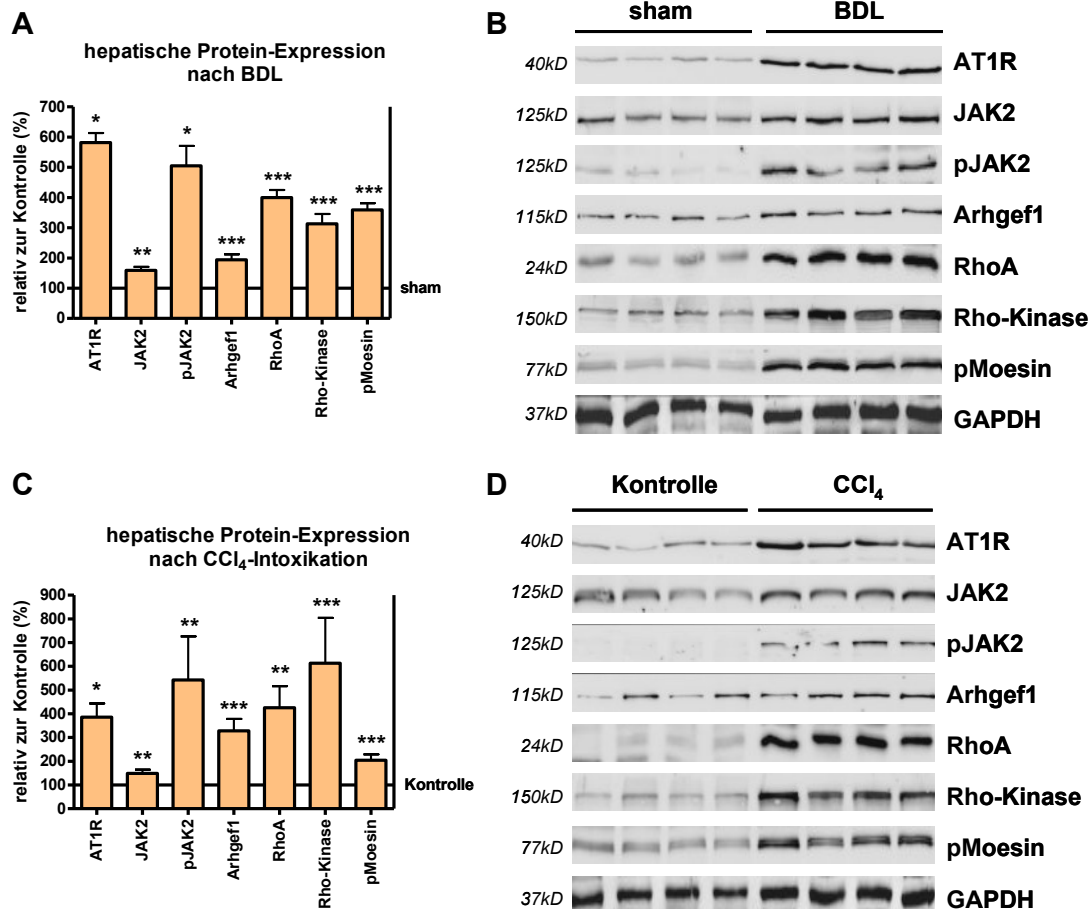


Abb. IV/3. Hepatische Expression vom AT1R und dessen Effektoren in der experimentellen Fibrose im Mausmodell

A: Quantifizierung der Protein-Spiegel durch Densitometrie von AT1R, JAK2, pJAK2, Arhgef1, RhoA, Rho-Kinase und pMoesin bei Leberproben von gallengangsligierten Mäusen im Vergleich zu Proben von scheinoperierten (sham) Tieren. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte \pm SEM.

B: Repräsentative Western Blots von AT1R, JAK2, pJAK2, Arhgef1, RhoA, Rho-Kinase und pMoesin bei Leberproben von gallengangsligierten Mäusen im Vergleich zu Proben von scheinoperierten (sham) Tieren. Von jedem Leberhomogenat wurde jeweils 50 μ g Protein aufgetragen. Als endogene Kontrolle wurde GAPDH verwendet.

C: Quantifizierung der Protein-Spiegel durch Densitometrie von AT1R, JAK2, pJAK2, Arhgef1, RhoA, Rho-Kinase und pMoesin bei Leberproben von Mäusen nach CCl₄-Intoxikation im Vergleich zu Proben von unbehandelten Tieren. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte \pm SEM.

D: Repräsentative Western Blots von AT1R, JAK2, pJAK2, Arhgef1, RhoA, Rho-Kinase und pMoesin bei Leberproben von Mäusen nach CCl₄-Intoxikation im Vergleich zu Proben von unbehandelten Tieren. Von jedem Leberhomogenat wurde jeweils 50 μ g Protein aufgetragen. Als endogene Kontrolle wurde GAPDH verwendet.

1.1.3. Expression im Mausmodell

Ein weiteres Tiermodell ist die Maus. Bei den Mäusen wurde durch eine zweiwöchige Gallengangsligatur (BDL) oder eine vierwöchige CCl₄-Intoxikation die Fibrose herbeigeführt. Wie bei den Ratten sieht man einen sehr deutlichen Anstieg der Proteinexpression der AT1R-Effektoren und des AT1R nach der Fibroseinduktion. Wieder ist eine deutliche Aktivierung von JAK2 sowie der Rho-Kinase in den fibrotischen Leberproben anhand der JAK2- und Moesin-Phosphorylierung erkennbar (Abb. IV/3.).

Zusammenfassend kann man sagen, dass im Menschen, als auch in Ratte und Maus, der JAK2/Rho-Kinase-Signalweg eine wichtige Rolle in der hepatischen Fibrose und Zirrhose zu spielen scheint. Daher stellte sich die Frage, in welchen Bereichen der erkrankten Leber dieser Signalweg hochreguliert ist. Dazu wurden histologische Schnitte angefertigt.

1.2. Zelluläre Verteilung von JAK2 und pJAK2 in gesundem und fibrotischem Lebergewebe

Einen wichtigen Schritt im JAK2/Rho-Kinase Signalweg stellt die Aktivierung von JAK2 durch dessen Phosphorylierung dar. Durch die Detektion von pJAK2 kann das Vorkommen des Signalwegs in der Leber bestimmt werden. Daher wurde zur Bestimmung der zellulären Verteilung von aktiviertem (pJAK2) und nicht aktiviertem JAK2 das Protein mit spezifischen Antikörpern immunhistochemisch auf Gefrierschnitten von Lebergewebe angefärbt. Hier wurde wieder gesundes hepatisches Gewebe von Mensch, Ratte und Maus mit krankem Lebergewebe verglichen.

Im Rattenmodell ist nach BDL eine stärkere JAK2-Expression im Vergleich zur Kontrolle vorhanden, die allerdings nicht signifikant erhöht ist (Abb. IV/4,B). Sonst sieht man in allen drei Spezies und allen Fibrosemodellen, dass sowohl JAK2 als auch seine aktivierte Form pJAK2, die hier als Protein mit Phosphatresten an den Aminosäuren Tyr1007/1008 vorliegt, in der Zirrhose und Fibrose vermehrt in fibrotischen Septen vorkommt (Abb. IV/4.). Dies weist nochmals auf eine Beteiligung von JAK2 in der Leberfibrose hin.

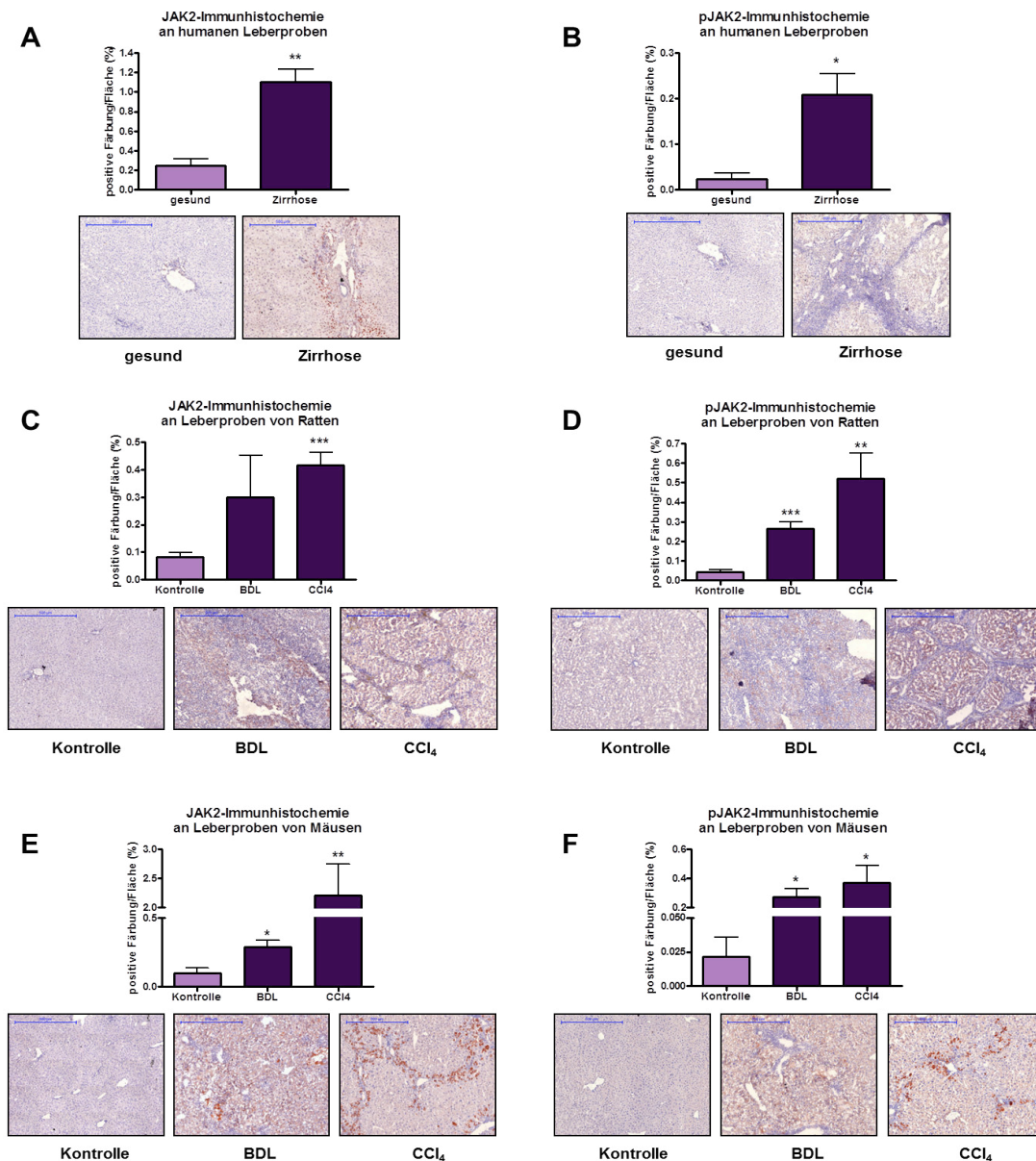


Abb. IV/4. JAK2- und pJAK2-Immunhistochemie in gesundem und fibrotischem Lebergewebe

A: Quantifizierung der JAK2-Immunhistochemie sowie repräsentative Färbungen bei zirrhatischen humanen Leberproben im Vergleich zu gesunden Proben.

B: Quantifizierung der pJAK2-Immunhistochemie sowie repräsentative Färbungen bei zirrhatischen humanen Leberproben im Vergleich zu gesunden Proben.

C: Quantifizierung der JAK2-Immunhistochemie sowie repräsentative Färbungen bei fibrotischen Leberproben nach Gallengangsligatur (BDL) oder CCl₄-Intoxikation bei Ratten im Vergleich zu gesunden Proben.

D: Quantifizierung der pJAK2-Immunhistochemie sowie repräsentative Färbungen bei fibrotischen Leberproben nach Gallengangsligatur (BDL) oder CCl₄-Intoxikation bei Ratten im Vergleich zu gesunden Proben.

E: Quantifizierung der JAK2-Immunhistochemie sowie repräsentative Färbungen bei fibrotischen Leberproben nach Gallengangsligatur (BDL) oder CCl₄-Intoxikation bei Mäusen im Vergleich zu gesunden Proben.

F: Quantifizierung der pJAK2-Immunhistochemie sowie repräsentative Färbungen bei fibrotischen Leberproben nach Gallengangsligatur (BDL) oder CCl₄-Intoxikation bei Mäusen im Vergleich zu gesunden Proben.

Die Größe des Messbalkens beträgt bei allen Bildern 500 µm.

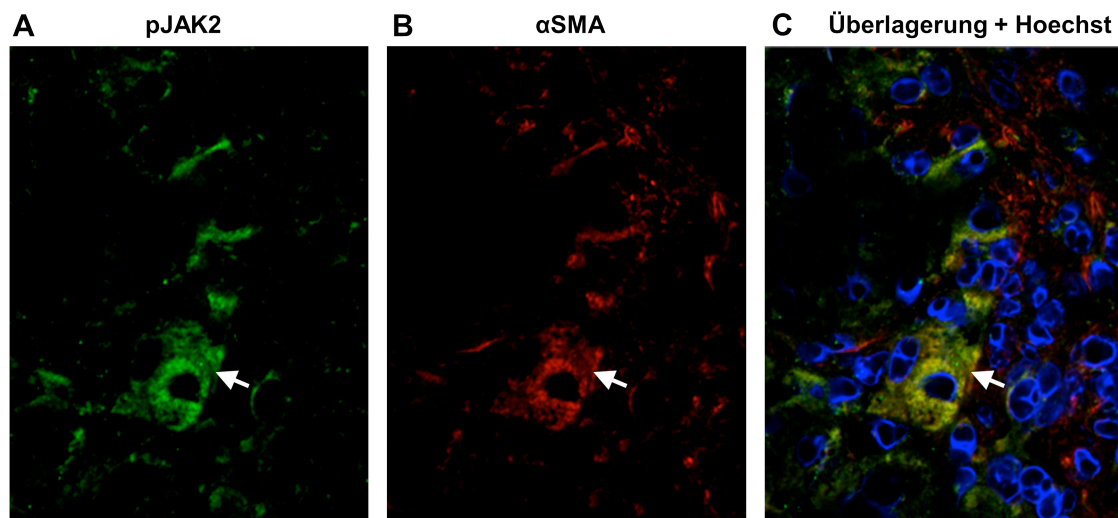


Abb. IV/5. Doppelfärbung von pJAK2 und α SMA in zirrhötischen humanen Leberschnitten

A: In grün angefärbtes pJAK2 in zirrhötischen humanen Leberschnitten wurde bei 488 nm detektiert.

B: In rot angefärbtes α SMA in zirrhötischen humanen Leberschnitten wurde bei 594 nm detektiert.

C: Doppelfärbung von pJAK2 und α SMA inklusive Zellkernfärbung mit dem Farbstoff Hoechst 33258 in zirrhötischen humanen Leberschnitten. Die Größe des weißen Messbalkens beträgt 20 μ m.

1.3. JAK2 wird in aktivierten HSCs phosphoryliert

Aktivierte HSCs sind die Hauptproduzenten der extrazellulären Matrix (ECM) und tragen dadurch am meisten zur Ausbildung der fibrotischen Septen bei. Die Verteilung von JAK2 und pJAK2 in der Nähe dieser Bereiche legt die Vermutung nahe, dass das Protein vermehrt in HSCs exprimiert und aktiviert wird. Um diese Hypothese zu verifizieren wurden Doppelfärbungen an humanen zirrhötischen Leberschnitten angefertigt. In grün ist das phosphorylierte JAK2 angefärbt, das mit einer Wellenlänge von 488 nm detektiert wurde. Das in rot angefärbte α SMA, das mit Licht der Wellenlänge 594 nm angeregt wird, dient als Marker für die aktivierten HSCs, da eine erhöhte Expression mit der Differenzierung von den ruhenden HSCs zu den kontraktiven MFBs einhergeht. Um die Lage der unterschiedlichen Zellen zu markieren, wurden die Zellkerne mit dem Farbstoff Hoechst angefärbt. Dadurch sollen auch hepatische Zellen deutlich gemacht werden, die kein α SMA exprimieren. Eine Überlagerung der drei Färbungen zeigt, dass pJAK2 vor allem in

den α SMA-positiven Zellen, also den aktivierten HSCs, vorkommt (Abb. IV/5.). Somit bestätigt dies die Annahme, dass die Phosphorylierung von JAK2 in hepatischen Sternzellen, welche die Ursprungszellen der Fibrose sind, stattfindet.

1.3.1. Expression von AT1R und dessen Effektoren in primären Leberzellen

Um diese Erkenntnisse *in vitro* zu bestätigen wurden Zellkulturexperimente mit primären Zellen, die aus Mäusen isoliert wurden, durchgeführt. Dazu wurde die Proteinexpression von primären HSCs mit der Proteinexpression von primären Hepatozyten und primären Kupfferzellen verglichen.

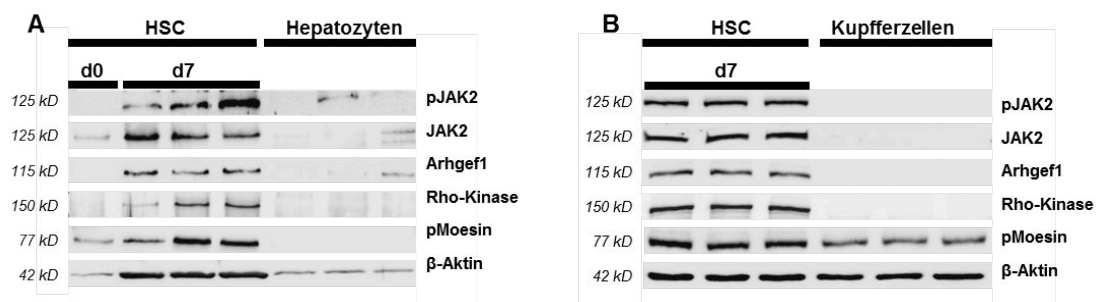


Abb. IV/6. Hepatische Proteinexpression in primären Leberzellen aus der Maus

A: Western Blots von JAK2, pJAK2, Arhgef1, Rho-Kinase und pMoesin von primären HSC und Hepatozyten. Die HSC wurden einmal direkt nach der Isolation ohne Aktivierung und nach einer Kultivierung von sieben Tagen in ihrem aktivierten Zustand gegen Hepatozyten aufgetragen. Von jedem Zellhomogenat wurde jeweils 20 μ g Protein aufgetragen. Als endogene Kontrolle diente β -Aktin.

B: Western Blots von JAK2, pJAK2, Arhgef1, Rho-Kinase und pMoesin von primären HSC und Hepatozyten. Die HSC wurden nach einer Kultivierung von sieben Tagen in ihrem aktivierten Zustand gegen Kupfferzellen aufgetragen. Von jedem Zellhomogenat wurde jeweils 20 μ g Protein aufgetragen. Als endogene Kontrolle diente β -Aktin.

Nach dem siebten Tag Kultivierung und Aktivierung durch die Plastikoberfläche exprimieren HSCs deutlich mehr AT1R-Effektoren als unmittelbar nach deren Isolation an Tag Null (Abb. IV/6.A). Dies weist auf die Bedeutung des JAK2/Rho-Kinase-Signalwegs in den MFBs hin. Außerdem kann man gut sehen, dass im Vergleich weder in den Hepatozyten noch in den Kupfferzellen die Proteine dieses Signalwegs verstärkt exprimiert werden (Abb. IV/6.A,B). Als Ladekontrolle wurde β -Aktin verwendet. Da HSCs, MFBs und Hepatozyten unterschiedliche Expres-

sionsmuster dieses Proteins aufweisen, konnte hier keine einheitliche Expression der Ladekontrolle erreicht werden.

Dieser Versuch ist ein weiterer Hinweis auf die Bedeutung des JAK2/Rho-Kinase Signalwegs in hepatischen Sternzellen.

1.4. Die JAK2-Hemmung oder das Fehlen des AT1R verzögert die hepatische Fibrogenese

Um die Relevanz der JAK2-Inhibierung *in vivo* zu untersuchen, wurde in WT-Ratten mittels Gallengangsligatur eine Leberfibrose induziert und daraufhin der JAK2-Hemmer AG490 injiziert.

Um die Abhängigkeit des JAK2/Rho-Kinase Signalwegs zu untersuchen wurden AT1R^{-/-} Mäuse verwendet. Nach Herbeiführung einer Fibrose durch eine vierwöchige CCl₄-Intoxikation wurde die hepatische Proteinexpression dieser Signalkaskade sowie die Fibrosierung des Lebergewebes dieser Tiere mit ebenfalls fibrotischen WT-Mäusen verglichen.

1.4.1. Hepatische Fibrose, α -SMA- und pJAK2-Immunhistochemie in BDL-Ratten nach JAK2-Hemmung

Zur Fibroseinduktion wurde zunächst eine BDL durchgeführt. Nach einer Woche wurden die Ratten zusätzlich eine Woche lang mit dem JAK2-Inhibitor AG490 behandelt. Nach der zweiwöchigen Gallengangsligatur mit oder ohne JAK2-Hemmung wurden die Ratten getötet. Die Lebern wurden untersucht und mit Leberproben von scheinoperierten Ratten verglichen.

Die Bestimmung der Fibrosierung des Lebergewebes erfolgte über die Messung des Hydroxyprolinegehalts in der Leber. Da die Aminosäure Hydroxyprolin charakteristisch für das Kollagen ist, da es über Wasserstoffbindungen die Quartärstruktur stabilisiert, kann sie als Maß für den Kollagengehalt in einem Gewebe und somit als Marker des Fibrosegrades verwendet werden.

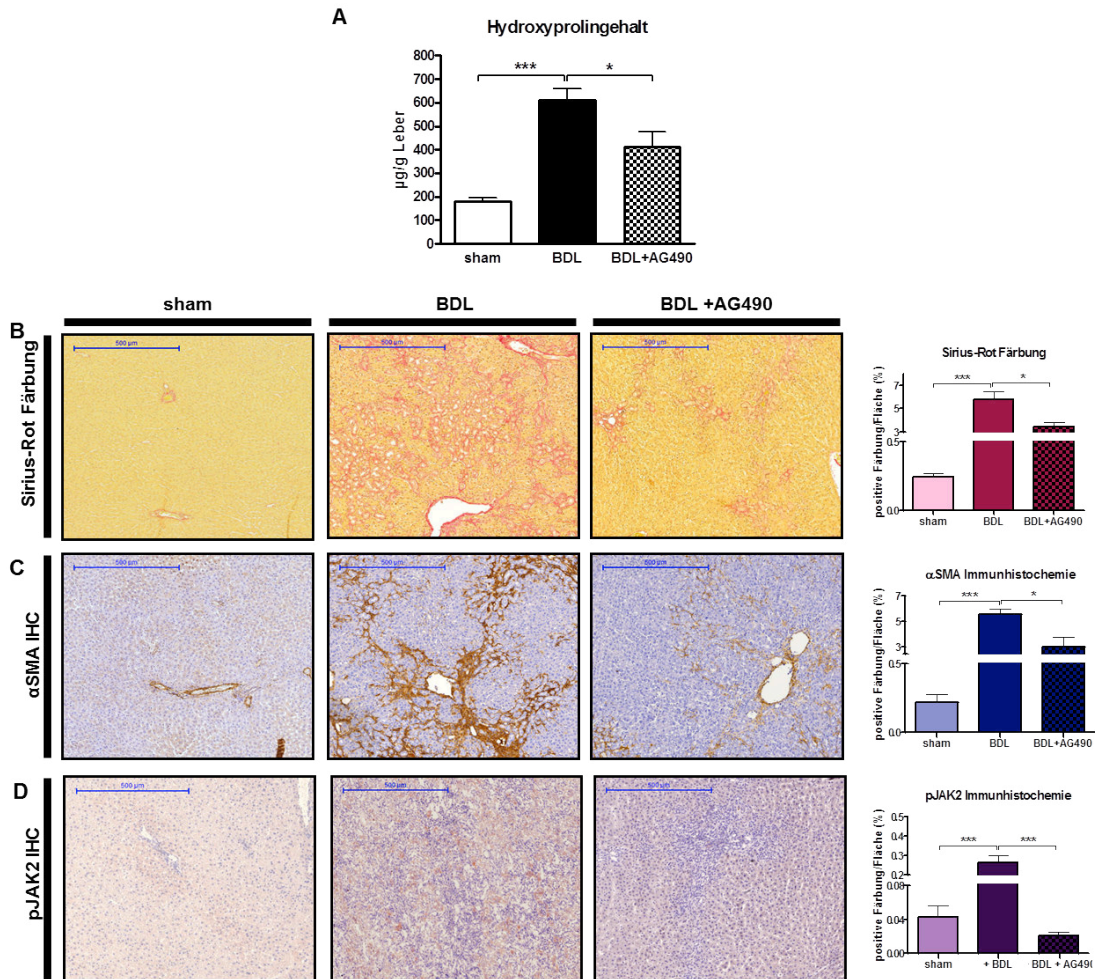


Abb. IV/7. Hepatische Fibrose, α -SMA- und pJAK2-Immunhistochemie in BDL-Ratten nach JAK2-Hemmung

In allen Diagrammen wurden gallengangsligierte (BDL) Ratten mit scheinoperierten (sham) Ratten verglichen sowie mit BDL-Ratten mit zusätzlicher AG490-Behandlung.

A: Hydroxyprolinegehalt im Lebergewebe der jeweiligen Gruppen. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte \pm SEM.

B: Quantitative Auswertung der Sirius-Rot Färbung in histologischen Leberschnitten der jeweiligen Gruppen. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte \pm SEM der positiv angefärbten Fläche. Die Bilder zeigen repräsentative Ausschnitte der Färbungen je Gruppe. Die Größe des Messbalkens beträgt 500 μ m.

C: Quantitative Auswertung der α SMA-Färbung in histologischen Leberschnitten der jeweiligen Gruppen. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte \pm SEM der positiv angefärbten Fläche. Die Bilder zeigen repräsentative Ausschnitte der Färbungen je Gruppe. Die Größe des Messbalkens beträgt 500 μ m.

D: Quantitative Auswertung der pJAK2-Färbung in histologischen Leberschnitten der jeweiligen Gruppen. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte \pm SEM der positiv angefärbten Fläche. Die Bilder zeigen repräsentative Ausschnitte der Färbungen je Gruppe. Die Größe des Messbalkens beträgt 500 μ m.

In den fibrotischen Lebern ist im Vergleich zu den gesunden Lebern scheinoperierter Tiere der Hydroxyprolinegehalt erwartungsgemäß stark signifikant erhöht (Abb. IV/7.A). Nach einwöchiger AG490-Behandlung ist das Lebergewebe signifikant weniger stark fibrosiert.

Mithilfe der Sirius-Rot Färbung wird das Bindegewebe rot angefärbt und daher auch zur Bestimmung der Fibrosierung von Gewebe herangezogen. Anhand der Färbungen sieht man sehr deutlich, dass nach Gallengangsligatur eine starke Fibrosierung der Leber im Vergleich zur Kontrollgruppe stattfindet. Außerdem zeigt sich in der Sirius-Rot Färbung, dass im Vergleich zur BDL-Gruppe die Tiere mit dem JAK2-Hemmer weniger Kollagen in der Leber bilden (Abb. IV/7.B).

Die α SMA-Immunhistochemie dient zur Ermittlung der aktivierten HSCs im Gewebe, da sich bei der Aktivierung der HSCs auch deren Zytoskelett verändert, so dass sie mehr α SMA exprimieren. In der α SMA-Immunhistochemie zeigt sich nach BDL eine verstärkte Färbung, die nach der Behandlung mit AG490 signifikant zurückgeht. Man kann daher annehmen, dass aufgrund der geringeren Anzahl aktivierter HSCs auch weniger Fibrose entsteht (Abb. IV/7.C).

Schließlich zeigt sich in der Immunhistochemie von pJAK2, dass JAK2 vor allem in der Fibrose in seinem aktiven phosphorylierten Zustand vorliegt. Durch die Hemmung der Phosphorylierung von JAK2 durch AG490 wird die JAK2-Aktivierung rückgängig gemacht (Abb. IV./7.D).

Alle diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Hemmung der JAK2-Phosphorylierung zur verminderten Kollagenakkumulation, verzögerten Fibrosierung des Lebergewebes und einer verringerten Aktivierung der HSCs führt.

1.4.2. Hepatische Proteinexpression und Fibrose in AT1R^{-/-} und WT-Mäusen nach CCl₄-Intoxikation

Zur Herbeiführung einer hepatischen Fibrose wurden sowohl WT-Mäuse als auch AT1R^{-/-} Mäuse einen Monat lang einer CCl₄-Intoxikation unterzogen.

Die AT1R^{-/-} Mäuse zeigen im Vergleich zu WT-Tieren eine verringerte Fibroseentwicklung, wie man anhand des Hydroxyprolinegehalts und der Sirius-Rot Färbung sehen kann (Abb. IV/8.A,B). Auch auf Proteinebene sind die Spiegel der AT1R-Effektoren JAK2, Arhgef1, RhoA und Rho-Kinase bei den Knockout-Tieren erniedrigt. Zudem findet weniger Aktivierung von JAK2 und Rho-Kinase, hier gemessen

an der Phosphorylierung von JAK2 (pJAK2) sowie der Phosphorylierung des Rho-Kinase Substrats Moesin (pMoesin), statt (Abb. IV/8.C). Daraus kann man schließen, dass der JAK2/Rho-Kinase Signalweg tatsächlich über den AT1R induziert wird, da bei Fehlen des Rezeptors die Expression der JAK2/Rho-Kinase Signalweg Komponenten in der Leberfibrose in geringerem Maße als bei den WT-Mäusen hochreguliert wird. Die verlangsamte Fibroseentwicklung unterstreicht außerdem die Bedeutung des Rezeptors und dessen abhängigen JAK2/Rho-Kinase Signalwegs im Krankheitsverlauf.

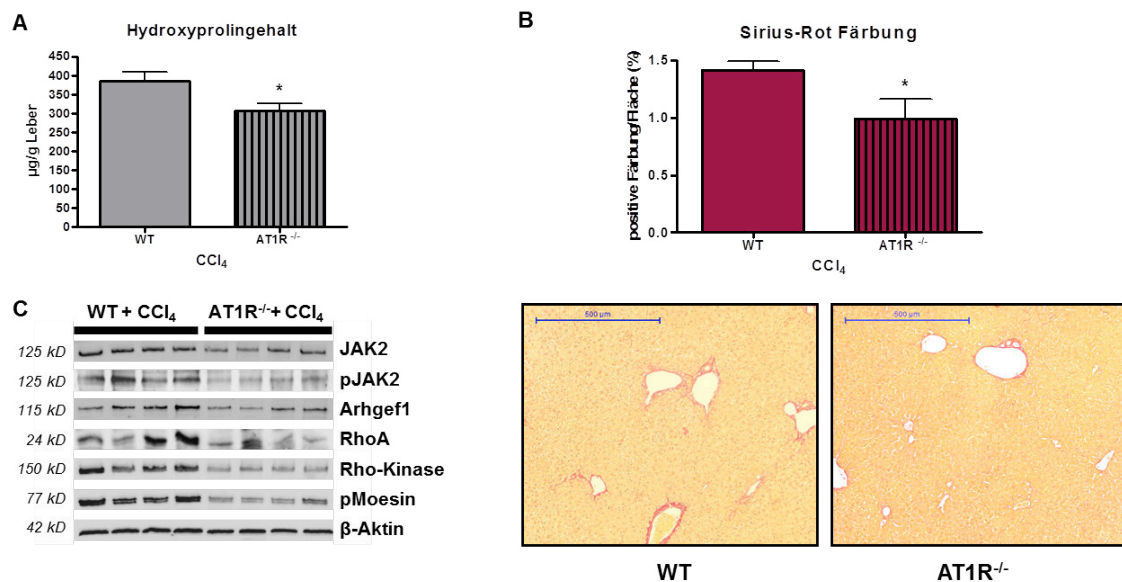


Abb. IV/8. Hepatische Proteinexpression und Fibrose in AT1R^{-/-} und WT-Mäusen nach CCl₄-Intoxikation

A: Hydroxyprolinegehalt im Lebergewebe von WT-Mäusen nach CCl₄-Intoxikation im Vergleich zu AT1R^{-/-} Mäusen nach CCl₄-Intoxikation. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte ± SEM.

B: Quantitative Auswertung der Sirius-Rot Färbung in histologischen Leberschnitten von WT-Mäusen nach CCl₄-Intoxikation im Vergleich zu AT1R^{-/-} Mäusen nach CCl₄-Intoxikation. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte ± SEM der positiv angefärbten Fläche. Die Bilder zeigen repräsentative Ausschnitte der Färbungen je Gruppe. Die Größe des Messbalkens beträgt 500 µm.

C: Western Blots von JAK2, pJAK2, Arhgef1, RhoA, Rho-Kinase und pMoesin bei Leberproben von WT-Mäusen nach CCl₄-Intoxikation im Vergleich zu Proben von AT1R^{-/-} Mäusen nach CCl₄-Intoxikation. Von jedem Leberhomogenat wurde jeweils 50 µg Protein aufgetragen. Als endogene Kontrolle wurde β-Aktin verwendet.

1.4.3. Hepatische α SMA-, JAK2- und pJAK2-Immunhistochemie in $AT1R^{-/-}$ und WT-Mäusen nach CCl_4 -Intoxikation

Da in den fibrotischen $AT1R^{-/-}$ Mäusen die Proteinexpression des JAK2/Rho-Kinase Signalwegs und die Fibrosierung der Leber im Vergleich zum WT vermindert sind, stellt sich die Frage, welche Rolle dabei die Aktivierung der HSCs spielt. Deshalb wurde dies in den Lebern fibrotischer $AT1R^{-/-}$ Mäuse untersucht und mit Leberproben von WT-Mäusen verglichen.

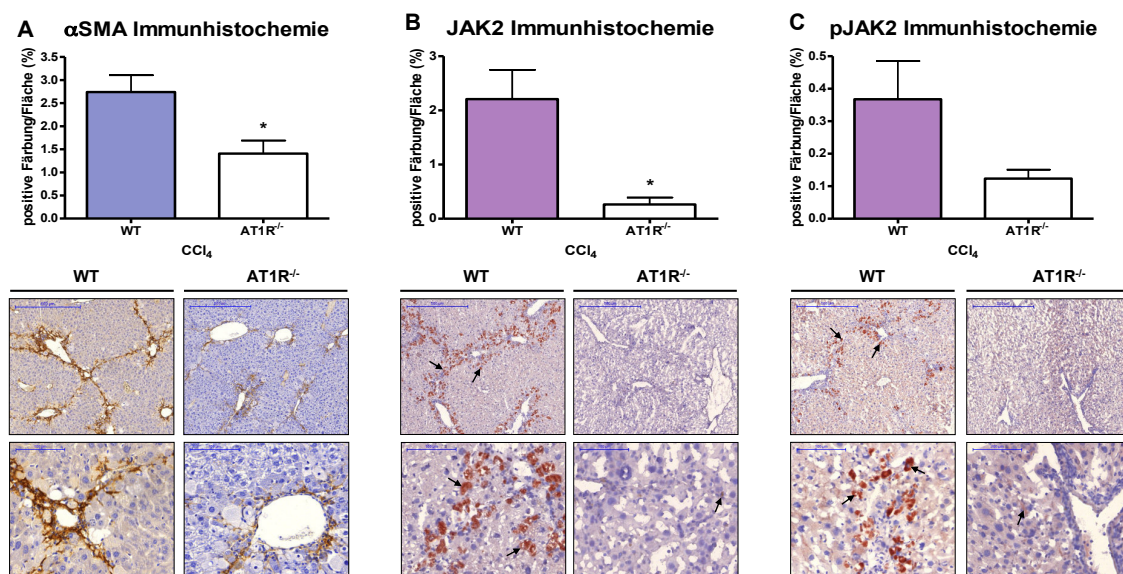


Abb. IV/9. Hepatische α SMA-, JAK2 und pJAK2-Immunhistochemie in $AT1R^{-/-}$ und WT-Mäusen nach CCl_4 -Intoxikation

A: Quantitative Auswertung der α SMA-Färbung in histologischen Leberschnitten von WT-Mäusen nach CCl_4 -Intoxikation im Vergleich zu $AT1R^{-/-}$ Mäusen nach CCl_4 -Intoxikation. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte \pm SEM der positiv angefärbten Fläche. Die Bilder zeigen repräsentative Ausschnitte der Färbungen je Gruppe in zwei Vergrößerungen. Die Größe des Messbalkens der oberen Bilder beträgt $500\ \mu\text{m}$, der Maßbalken der unteren Bilder $100\ \mu\text{m}$.

B: Quantitative Auswertung der JAK2-Färbung in histologischen Leberschnitten von WT-Mäusen nach CCl_4 -Intoxikation im Vergleich zu $AT1R^{-/-}$ Mäusen nach CCl_4 -Intoxikation. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte \pm SEM der positiv angefärbten Fläche. Die Bilder zeigen repräsentative Ausschnitte der Färbungen je Gruppe in zwei Vergrößerungen. Die Größe des Messbalkens der oberen Bilder beträgt $500\ \mu\text{m}$, der Maßbalken der unteren Bilder $100\ \mu\text{m}$.

C: Quantitative Auswertung der pJAK2-Färbung in histologischen Leberschnitten von WT-Mäusen nach CCl_4 -Intoxikation im Vergleich zu $AT1R^{-/-}$ Mäusen nach CCl_4 -Intoxikation. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte \pm SEM der positiv angefärbten Fläche. Die Bilder zeigen repräsentative Ausschnitte der Färbungen je Gruppe in zwei Vergrößerungen. Die Größe des Messbalkens der oberen Bilder beträgt $500\ \mu\text{m}$, der Maßbalken der unteren Bilder $100\ \mu\text{m}$.

Im Lebergewebe der AT1R^{-/-} Mäuse wurden geringere Mengen an α SMA detektiert als im WT (Abb. IV/9.A). Das zeigt, dass in den Lebern der WT-Tiere mehr HSCs vorliegen bzw. stärker aktiviert sind. Weiterhin stellt sich die Frage nach der Bedeutung von JAK2 im Lebergewebe. Auch in der Immunhistochemie von JAK2 und pJAK2 ist eine verminderte Expression und Aktivierung in Mäusen ohne AT1R erkennbar (Abb. IV/9.B,C). All das erhärtet die Theorie, dass die AT1R-vermittelte Aktivierung von JAK2 auch *in vivo* eine bedeutsame Rolle in der hepatischen Fibrogenese spielt.

1.5. Die Stimulation des AT1R aktiviert JAK2 in HSCs *in vivo*

Um den JAK2/Rho-Kinase Signalweg noch genauer zu untersuchen, sollte der AT1R gezielt stimuliert werden. Da Ang II auch über einen längeren Zeitraum und bei Körpertemperatur stabil ist, wurden in Ratten und in Mäusen osmotische Minipumpen eingesetzt, die zwei Wochen lang kontinuierlich den AT1R-Agonisten Ang II abgaben.

1.5.1. Hepatische Proteinexpression nach Ang II-Gabe in Ratten

Die Ang II-Gabe über eine Woche bewirkt eine verstärkte Expression des AT1Rs und dessen nachgeschalteten Signalwegs. Die Expression des AT1R, JAK2, Arhgef1, RhoA und Rho-Kinase sind signifikant erhöht. Zudem sieht man eine sehr deutliche Aktivierung von JAK2 und Rho-Kinase über die Detektion von pJAK2 und dem phosphorylierten Substrat der Rho-Kinase, pMoesin (Abb. IV/10.). Somit scheint die Stimulation des AT1R eine Hochregulierung des JAK2/Rho-Kinase Signalwegs zu bewirken. Dies ist ein weiterer Hinweis auf die AT1R-Abhängigkeit des JAK2/Rho-Kinase Signalwegs.

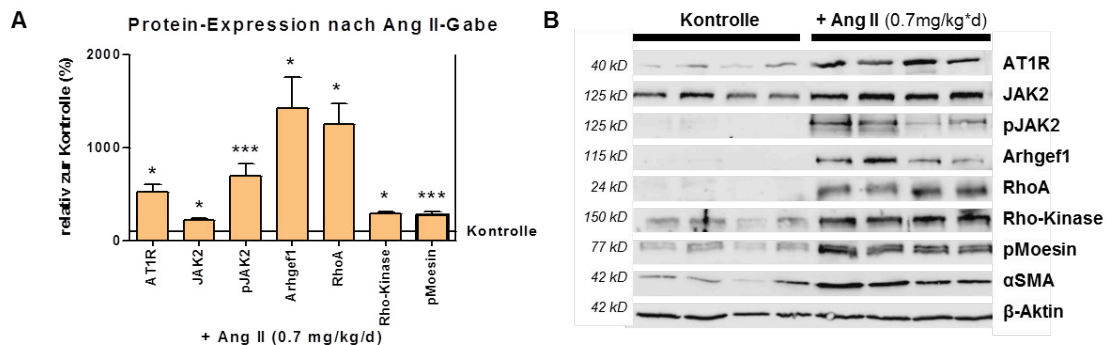


Abb. IV/10. Hepatische Proteinexpression nach Ang II-Gabe in Ratten

A: Quantifizierung der Protein-Spiegel durch Densitometrie von AT1R, JAK2, pJAK2, Arhgef1, RhoA, Rho-Kinase und pMoesin bei Leberproben von Ratten nach zweiwöchiger Ang II-Gabe im Vergleich zu Proben von unbehandelten Tieren. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte \pm SEM.

B: Repräsentative Western Blots von AT1R, JAK2, pJAK2, Arhgef1, RhoA, Rho-Kinase und pMoesin bei Leberproben von Ratten nach zweiwöchiger Ang II-Gabe im Vergleich zu Proben von unbehandelten Tieren. Von jedem Leberhomogenat wurde jeweils 50 μ g Protein aufgetragen. Als endogene Kontrolle wurde β -Aktin verwendet.

1.5.2. Hepatische Fibrose, Protein- und pJAK2-Expression in AT1R^{-/-} und WT-Mäusen nach Ang II-Gabe

Um zu untersuchen, ob wirklich die Ang II-Gabe den AT1R-vermittelten Signalweg reguliert oder die Expression der nachgeschalteten Komponenten über einen anderen Rezeptor erfolgt, wurden AT1R^{-/-} Mäuse mit Ang II behandelt und mit WT-Mäusen verglichen.

Tatsächlich kann man sehen, dass eine Kollagenakkumulation, gemessen an dem Hydroxyprolinegehalt im Lebergewebe, nur in den behandelten WT-Mäusen stattfindet. In den AT1R^{-/-} Mäusen dagegen bleibt der Hydroxyprolinegehalt auch nach Ang II-Infusion unverändert (Abb. IV/11.A). Auf Proteinebene sieht man ebenfalls keine Veränderung der Expression und Aktivierung der nachgeschalteten Effektoren des AT1R (Abb. IV/11.B). Die Auswertung der Immunhistochemie von pJAK2 zeigt darüber hinaus eine verstärkte Aktivierung von JAK2 nur in den WT-Mäusen nach Ang II-Gabe. In den AT1R^{-/-} Mäusen ist keine signifikant erhöhte Phosphorylierung erkennbar (Abb. IV/11.C).

Diese Experimente verdeutlichen die Abhängigkeit der untersuchten Proteine, insbesondere JAK2, von der Stimulation des AT1R. Ohne den Rezeptor erfolgt keine Induktion des JAK2/Rho-Kinase Signalwegs. Während die Gabe von Ang II in den

WT Mäusen eine leichte Fibrosierung des Lebergewebes hervorruft, hat die Ang II Infusion in $AT1R^{-/-}$ Mäusen keinen Effekt auf den Hydroxyprolinegehalt.

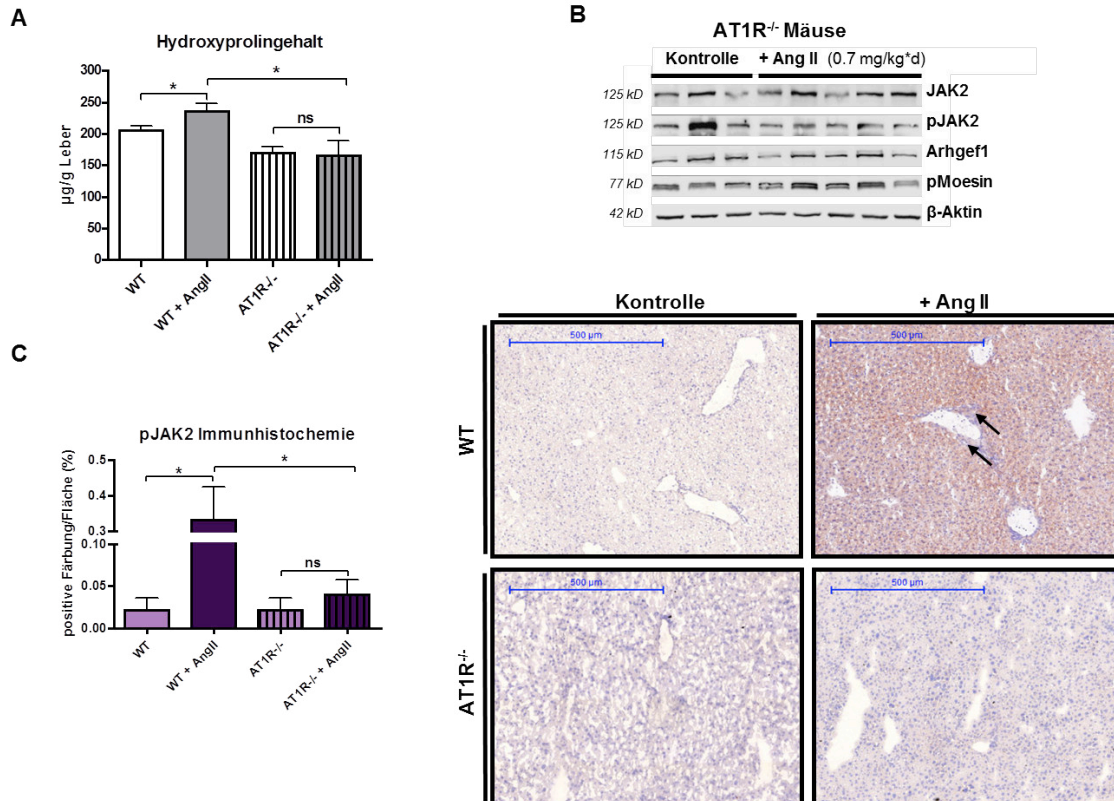


Abb. IV/11. Hepatische Fibrose, Protein- und pJAK2-Expression in $AT1R^{-/-}$ und WT-Mäusen nach Ang II-Gabe

A: Hydroxyprolinegehalt im Lebergewebe von $AT1R^{-/-}$ Mäusen mit und ohne Ang II-Behandlung sowie von WT-Mäusen nach Ang II-Gabe im Vergleich zu WT-Mäusen ohne Behandlung. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte \pm SEM.

B: Western Blots von JAK2, pJAK2, Arhgef1 und pMoesin bei Leberproben von $AT1R^{-/-}$ Mäusen nach zweiwöchiger Ang II-Gabe im Vergleich zu Proben von unbehandelten $AT1R^{-/-}$ Mäusen. Von jedem Leberhomogenat wurde jeweils 50 µg Protein aufgetragen. Als endogene Kontrolle wurde β -Aktin verwendet.

C: Quantitative Auswertung der pJAK2-Färbung in histologischen Leberschnitten der jeweiligen Gruppen. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte \pm SEM der positiv angefärbten Fläche. Die Bilder zeigen repräsentative Ausschnitte der Färbungen je Gruppe. Die Größe des Messbalkens beträgt 500 µm.

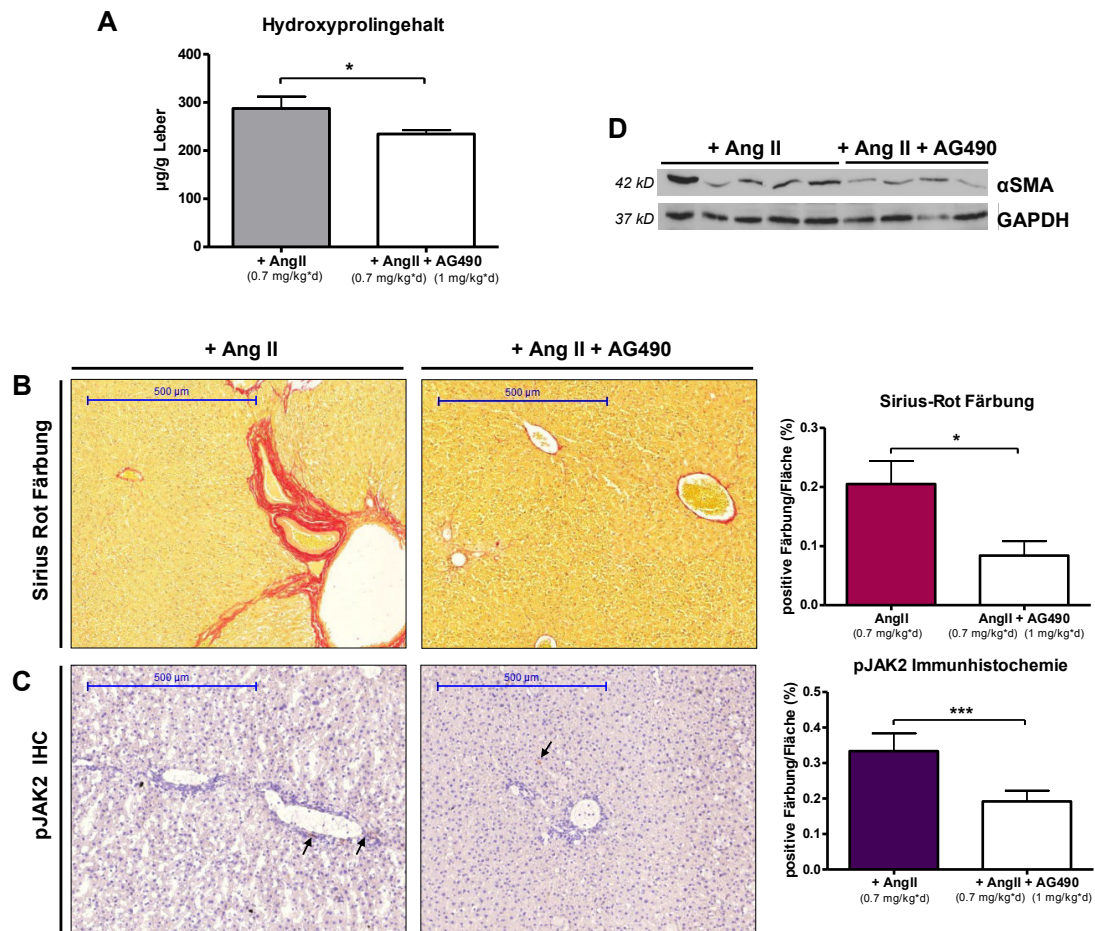


Abb. IV/12. Hepatische Fibrose, αSMA- und Proteinexpression in WT-Ratten nach Ang II-Gabe mit oder ohne JAK2-Hemmung

A: Hydroxyprolinegehalt im Lebergewebe von Ratten, die zwei Wochen lang mit Ang II behandelt wurden, und Ratten, die in der zweiten Woche zusätzlich täglich eine AG490-Injektion erhalten haben. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte \pm SEM.

B: Quantitative Auswertung der Sirius-Rot Färbung in histologischen Leberschnitten von Ratten, die zwei Wochen lang mit Ang II behandelt wurden, und Ratten, die in der zweiten Woche zusätzlich täglich eine AG490-Injektion erhielten. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte \pm SEM der positiv angefärbten Fläche. Die Bilder zeigen repräsentative Ausschnitte der Färbungen je Gruppe. Die Größe des Messbalkens beträgt 500 μ m.

C: Quantitative Auswertung der pJAK2-Färbung in histologischen Leberschnitten von Ratten, die zwei Wochen lang mit Ang II behandelt wurden, und Ratten, die in der zweiten Woche zusätzlich täglich eine AG490-Injektion erhielten. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte \pm SEM der positiv angefärbten Fläche. Die Bilder zeigen repräsentative Ausschnitte der Färbungen je Gruppe. Die Größe des Messbalkens beträgt 500 μ m.

D: Western Blot von αSMA im Lebergewebe von Ratten, die zwei Wochen lang mit Ang II behandelt wurden, und Ratten, die in der zweiten Woche zusätzlich täglich eine AG490-Injektion erhielten. Von jedem Leberhomogenat wurde jeweils 50 μ g Protein aufgetragen. Als endogene Kontrolle wurde GAPDH verwendet.

1.5.3. Hepatische Fibrose, α SMA- und Proteinexpression in WT-Ratten nach Ang II-Gabe mit oder ohne JAK2-Hemmung

Um den Effekt der JAK2-Hemmung in der AT1R-vermittelten Fibrose zu untersuchen, wurde den Ratten zusätzlich zur Ang II-Behandlung der JAK2-Inhibitor AG490 in der zweiten Woche injiziert. Nach dieser Behandlung verringerte sich der hepatische Hydroxyprolinegehalt um 18% im Vergleich zur Gruppe, der ausschließlich Ang II verabreicht wurde (Abb. IV/12.A). Die anhand der Sirius-Rot Färbung gemessene Kollagenakkumulation im Lebergewebe verringert sich sogar um etwa 60% (Abb. IV/12.B). Außerdem ist die Phosphorylierung von JAK2 hoch signifikant gehemmt (Abb. IV/12.C). Auch die hepatische α SMA-Expression ist vermindert, was für eine geringere Aktivierung der HSCs nach der JAK2-Hemmung spricht (Abb. IV/12.D). Dies bezeugt die Abhängigkeit des JAK2/Rho-Kinase Wegs von der Stimulation des AT1R.

1.6. Einfluss der JAK2-Hemmung auf die Hämodynamik

Eine schwere Komplikation in der Leberzirrhose ist die portale Hypertonie. Es sollte untersucht werden, wie eine Hemmung des JAK2/Rho-Kinase Wegs durch den JAK2-Inhibitor AG490 zur Veränderung der Hämodynamik in zirrhotischen Lebern beiträgt. Dazu wurden wieder die Modelle Gallengangsligatur und CCl₄-Inhalation zur Zirrhose-Induktion in Ratten gewählt.

1.6.1. Effekt von AG490 auf die portale Hämodynamik und den mittleren arteriellen Druck in zirrhotischen Ratten *in vivo*

Um den Effekt der JAK2-Hemmung auf die Hämodynamik zirrhotischer Ratten zu untersuchen, wurden vor AG490-Gabe und eine Stunde nach Verabreichung des Inhibitors der Portaldruck und der mittlere arterielle Druck gemessen. Zur Berechnung des hepatischen Widerstandes wurden zu Beginn kolorierte Mikrosphären injiziert, die sich im Organismus verteilen konnten. Nach Gabe von AG490 wurden

60 min die Drücke aufgezeichnet, bis dann erneut Mikrosphären injiziert wurden. Die Unterscheidung der Mikrosphären vor und nach JAK2-Inhibition erfolgte durch die Verwendung verschiedener Farben.

Es zeigt sich, dass der erhöhte Portaldruck in den zirrhotischen WT-Ratten durch die Gabe von AG490 signifikant gesenkt wird (Abb. IV/13.A). Auch der hepatische Gefäßwiderstand nimmt sowohl in BDL- wie auch in CCl₄-Ratten deutlich ab (Abb. IV/13.B). Der mittlere arterielle Druck verändert sich nach JAK2-Hemmung in beiden Fibrosemodellen jedoch nicht (Abb. IV/13.C). Dies bestätigt die Annahme, dass der JAK2/Rho-Kinase Signalweg maßgeblich an der Kontraktion der Sternzellen, die neben der vermehrten Kollagenproduktion verantwortlich für den behinderten Blutfluss durch die Leber ist, beteiligt ist.

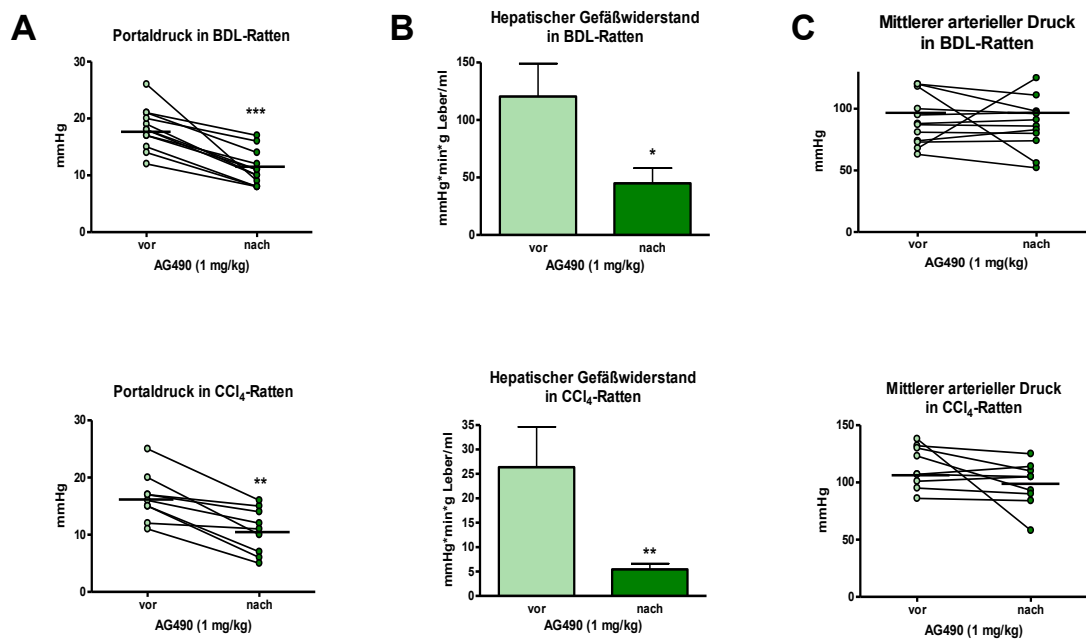


Abb. IV/13. Effekt von AG490 auf die portale und systemische Hämodynamik in zirrhotischen Ratten *in vivo*

A: Portaldruck in zirrhotischen BDL- und CCl₄-Ratten vor und nach JAK2-Hemmung.

B: Hepatischer Gefäßwiderstand in zirrhotischen BDL- und CCl₄-Ratten vor und nach JAK2-Hemmung.

C: Mittlerer arterieller Druck in zirrhotischen BDL- und CCl₄-Ratten vor und nach JAK2-Hemmung.

1.6.2. Effekt von AG490 und AT1R-Blockade auf den hepatischen Widerstand in Ratten *in situ*

Um einen genaueren Einblick auf den Einfluss der JAK2-Hemmung in der Leber zu erhalten, wurde eine *in situ* Leberperfusion durchgeführt. Anhand dieser kann die Durchblutung des Lebergewebes gemessen werden. Zur Vorkontraktion wurde dazu zunächst der AT1R-Agonist Ang II gegeben. Durch die Stimulation des AT1R werden die kontraktile AT1R-abhängigen Signalwege induziert, was schließlich zur Kontraktion der Sternzellen und somit zu einem erhöhten intrahepatischen Widerstand führt. Während bei den unbehandelten WT-Ratten keine Erhöhung des Drucks stattfindet, steigt der Druck der zirrhotischen CCl₄-Ratten von 12 mmHg auf 22 mmHg (Abb. IV/14.A). Dies ist mit den ruhenden Sternzellen in der gesunden Leber zu erklären, die keine kontraktile Eigenschaften besitzen. Die aktivierten Sternzellen in der geschädigten Leber sind allerdings in der Lage durch ihre Kontraktion den schon erhöhten Portaldruck weiter zu steigern. Gibt man nach der Vorkontraktion den JAK2-Inhibitor AG490 in die Leber, so sinkt der Druck abhängig von der verabreichten Dosis in den zirrhotischen Ratten. Somit erhält man eine sigmoidale Dosis-Wirkungskurve des Perfusionsdrucks (Abb. IV/14.B). Dies belegt, dass die Hemmung von JAK2 den intrahepatischen Widerstand in der Zirrhose senken kann. Dagegen zeigt AG490 in der gesunden Leber keine Wirkung. Der Druck bleibt wie schon nach der Vorkontraktion mit Ang II auch nach JAK2-Hemmung unverändert (Abb. IV/14.B). Dies weist ebenfalls auf die Bedeutung des JAK2/Rho-Kinase Signalwegs in aktivierten Sternzellen hin, die nur in der zirrhotischen Leber vorliegen. Um die Bedeutung des AT1R noch genauer zu evaluieren wurde nach der Vorkontraktion mit Ang II in zirrhotische Lebern der AT1R-Blocker Losartan gegeben. Dies bewirkt eine starke Senkung des Portaldrucks von 157% auf 90% des Basaldrucks vor der Vorkontraktion. Der danach verabreichte JAK2-Hemmer AG490 hat danach keinen Einfluss mehr auf den Druck und den intrahepatischen Widerstand (Abb. IV/14.C). Dies belegt, dass der JAK2/Rho-Kinase Signalweg von dem AT1R abhängt. Nach dessen Blockade zeigt eine JAK2-Hemmung keine Wirkung mehr, was dafür spricht, dass diese Signalkaskade durch den stimulierten AT1R aktiviert wird.

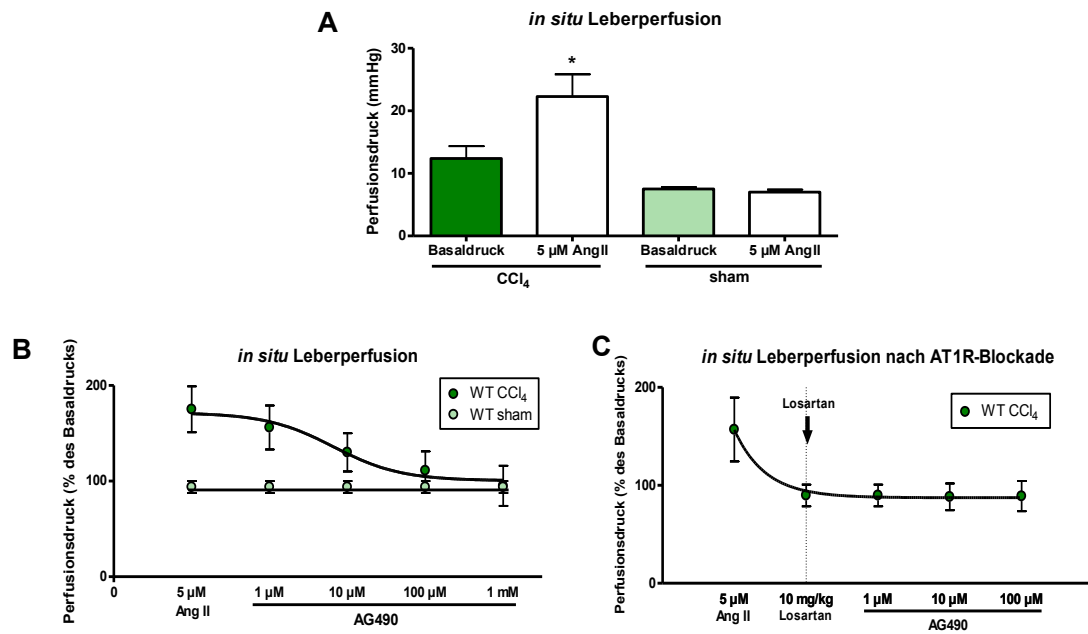


Abb. IV/14. Effekt von AG490 und Losartan auf den hepatischen Widerstand in Ratten *in situ*

A: Perfusionsdruck vor und nach Vorkontraktion mit Ang II in zirrhотischen CCl₄-behandelten und unbehandelten Kontroll-Ratten (sham).

B: Leberperfusion mit ansteigenden Konzentrationen des JAK2-Inhibitors AG490 in zirrhотischen CCl₄-behandelten und unbehandelten Kontroll-Ratten (sham).

C: Leberperfusion mit ansteigenden Konzentrationen des JAK2-Inhibitors AG490 nach AT1R-Blockade mit Losartan in zirrhотischen CCl₄-behandelten Ratten.

2. Rolle von bArr2 in der AT1R-vermittelten Fibrose

Es konnte bereits gezeigt werden, dass bArr2 über GRK2 den AT1R durch Phosphorylierung entkoppelt und dadurch die Signaltransduktion über die nachgeschalteten Proteine, wie z.B. die JAK2/Rho-Kinase-Achse, unterbindet (Lefkowitz 1998). Allerdings ist das an den Rezeptor gebundene bArr2 über die Aktivierung von kleinen Kinasen wie Ras und Raf1 bis hin zur Phosphorylierung von ERK1/2 selber in der Lage eine Fibrose zu induzieren (Kim *et al.* 2005). Wie genau dieser Signalweg reguliert ist und wie er im Gleichgewicht mit der JAK2/Rho-Kinase-Signalkaskade steht sollte hier untersucht werden.

2.1. Expression der bArr2/ERK-Achse im Mausmodell

Die experimentelle Fibrose wurde bei den WT-Mäusen durch eine zweiwöchige Gallengangsligatur (BDL) oder eine vierwöchige CCl₄-Intoxikation herbeigeführt. In den fibrotischen Mäusen sieht man einen signifikanten Anstieg des bArr2-Proteinspiegels sowie eine erhöhte Aktivierung von ERK1/2 sowohl nach Gallengangsligatur als auch nach CCl₄-Intoxikation (Abb. IV/15.). Dies zeigt, dass bArr2 eine Rolle in der Fibrose spielt und der alternative Signalweg über die Aktivierung von ERK hochreguliert wird.

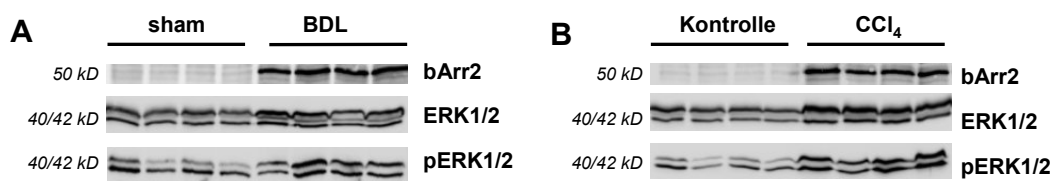


Abb. IV/15. Expression der bArr2/ERK-Achse im Mausmodell

A: Western Blots von bArr2, ERK1/2 und pERK1/2 in Leberproben von Mäusen nach Gallengangsligatur (BDL) im Vergleich zu Proben von scheinoperierten (sham) Tieren. Von jedem Leberhomogenat wurde jeweils 50 µg Protein aufgetragen.

B: Western Blots von bArr2, ERK1/2 und pERK1/2 in Leberproben von Mäusen nach CCl₄-Intoxikation im Vergleich zu Proben von unbehandelten Tieren. Von jedem Leberhomogenat wurde jeweils 50 µg Protein aufgetragen.

2.2. Expression und Aktivierung von ERK1/2 in fibrotischen AT1R^{-/-} Mäusen

Da bArr2 auch andere Rezeptoren, wie z.B. den μ -Opioid-Rezeptor, entkoppeln kann (Kovoor *et al.* 1997), wurde die Abhängigkeit des bArr2/ERK-Signalwegs durch die Untersuchung von AT1R^{-/-} Mäusen bestimmt, die zuvor mit CCl₄ behandelt wurden. Dabei konnte man sehen, dass die Proteinexpression von ERK in der Leber auch nach Fibroseinduktion nur gering erhöht ist. Außerdem fand keine vermehrte ERK1/2-Aktivierung in der Leber statt, was durch die Messung des phosphorylierten Proteins gemessen werden konnte (Abb. IV/16.). Dies deutet darauf hin, dass der bArr2/ERK-Signalweg hauptsächlich AT1R-vermittelt ist, da ohne den AT1R keine vermehrte Aktivierung von ERK1/2 stattfindet.

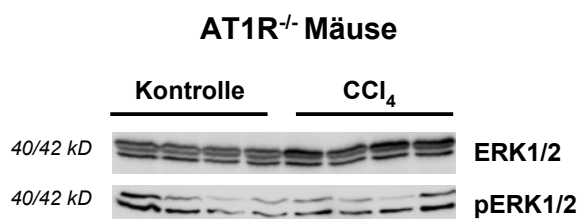


Abb. IV/16. Expression und Aktivierung von ERK1/2 in fibrotischen AT1R^{-/-} Mäusen
Western Blots von ERK1/2 und pERK1/2 in Leberproben von AT1R^{-/-} Mäusen nach CCl₄-Intoxikation im Vergleich zu Proben von unbehandelten AT1R^{-/-} Mäusen. Von jedem Leberhomogenat wurde jeweils 50 μ g Protein aufgetragen.

2.3. Stimulation des AT1R entkoppelt den JAK2/Rho-Kinase-Signalweg vom Rezeptor *in vitro*

Um zu untersuchen, was im JAK2/Rho-Kinase und bArr2/ERK Signalweg geschieht, wenn der AT1R vermehrt stimuliert wird, wurden Zellkulturexperimente mit der humanen HSC-Linie LX2 durchgeführt. Die Zellen wurden mit dem AT1R-Agonisten Ang II in ansteigenden Konzentrationen (10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M) drei Tage lang inkubiert. Wie erwartet, konnte schon bei einer geringen Stimulation des AT1R ein deutlicher Anstieg in der JAK2-Phosphorylierung gemessen werden. Wie schon gezeigt, führt eine Stimulation des AT1R zu einer Aktivierung des JAK2/Rho-Kinase-Signalweges und dadurch auch zu einer erhöhten Phosphorylierung von JAK2.

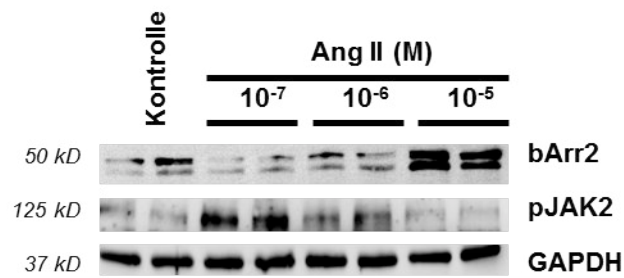


Abb. IV/17. Proteinexpression von bArr2 und pJAK2 in LX2-Zellen nach Ang II-Gabe

Western Blot von bArr2 und pJAK2 in LX2-Zellen. Die Zellen wurden drei Tage lang in Medium inkubiert, das verschiedene Konzentrationen Ang II enthielt (10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M) und mit der unbehandelten Kontrolle verglichen. Von jedem Zellhomogenat wurde jeweils 20 μ g Protein aufgetragen. Als endogene Kontrolle diente GAPDH.

Allerdings sank die Aktivierung von JAK2 mit ansteigender Ang II-Konzentration ab. Im Gegenzug dazu stieg die bArr2-Expression an (Abb. IV/17.). Dies legt die Vermutung nahe, dass eine übermäßige Stimulation des AT1R zu einer Entkopplung des JAK2/Rho-Kinase Signalwegs vom AT1R durch bArr2 führt.

2.4. Ang II-Gabe und JAK2-Hemmung in bArr2^{-/-} Mäusen

Stimuliert man den AT1R in Mäusen, denen bArr2 fehlt, müsste der JAK2/Rho-Kinase Signalweg vermehrt stimuliert werden, ohne dass es zur Entkopplung dieser Signalkaskade vom Rezeptor kommt. Demnach müsste auch eine JAK2-Hemmung eine deutliche Auswirkung auf die hepatische Fibrogenese haben.

Diese Annahme wurde mit einer Ang II-Gabe über osmotische Minipumpen über zwei Wochen und einer einwöchigen AG490-Injektion in bArr2^{-/-} Mäusen untersucht.

2.4.1. Fibrose und HSC-Aktivierung nach AT1R-Stimulation und JAK2-Hemmung

In den $bArr2^{-/-}$ Mäusen ist nach der AT1R-Stimulation durch Ang II-Gabe eine vermehrte Kollagenakkumulation im Lebergewebe und eine signifikante HSC-Aktivierung durch die Detektion des α SMA-Gehalts messbar (Abb. IV/18.). Nach Hemmung der JAK2-Aktivierung mit dem Inhibitor AG490 können diese Effekte wieder rückgängig gemacht werden. Sowohl der Hydroxyprolinegehalt wie auch die Intensität der α SMA-Färbung sinken signifikant auf das Niveau der Kontrollgruppe ohne Behandlung (Abb. IV/18.).

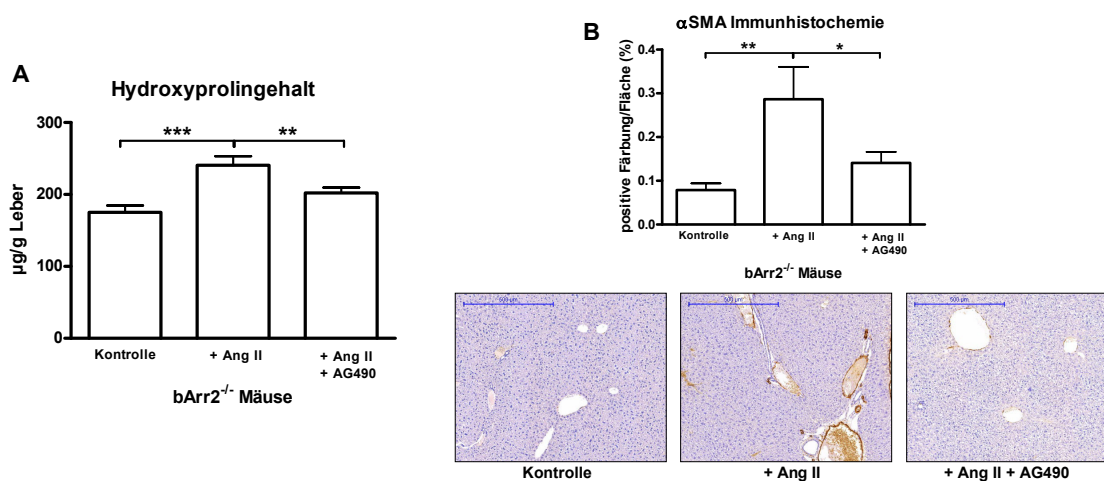


Abb. IV/18. Fibrose und HSC-Aktivierung nach AT1R-Stimulation und JAK2-Hemmung

A: Hydroxyprolinegehalt im Lebergewebe von $bArr2^{-/-}$ Mäusen, die zwei Wochen lang mit Ang II behandelt wurden und $bArr2^{-/-}$ Mäusen, die in der zweiten Woche zusätzlich täglich eine AG490-Injektion erhielten im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte \pm SEM.

B: Quantitative Auswertung der α SMA-Färbung in histologischen Leberschnitten von $bArr2^{-/-}$ Mäusen, die zwei Wochen lang mit Ang II behandelt wurden und $bArr2^{-/-}$ Mäusen, die in der zweiten Woche zusätzlich täglich eine AG490-Injektion erhielten im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte \pm SEM der positiv angefärbten Fläche. Die Bilder zeigen repräsentative Ausschnitte der Färbungen je Gruppe. Die Größe des Messbalkens beträgt 500 µm.

2.4.2. Expression des JAK2/Rho-Kinase-Signalwegs nach AT1R-Stimulation und JAK2-Hemmung

Auch auf der Proteinebene sieht man die Veränderung des Expressionsmusters der nachgeschalteten AT1R-Effektoren. Nach Ang II-Behandlung ist der JAK2/Rho-Kinase Signalweg und vor allem pJAK2 deutlich hochreguliert. Nach der JAK2-Hemmung sinkt die Arhgef1- und Rho-Kinase-Expression (Abb. IV/19.). Das zeigt, dass die Expression dieser Proteine von der JAK2-Phosphorylierung abhängig ist. Außerdem führt das Fehlen von bArr2 zur verstärkten Aktivierung der JAK2/Rho-Kinase-Achse, da keine Entkopplung von dem AT1R stattfinden kann.

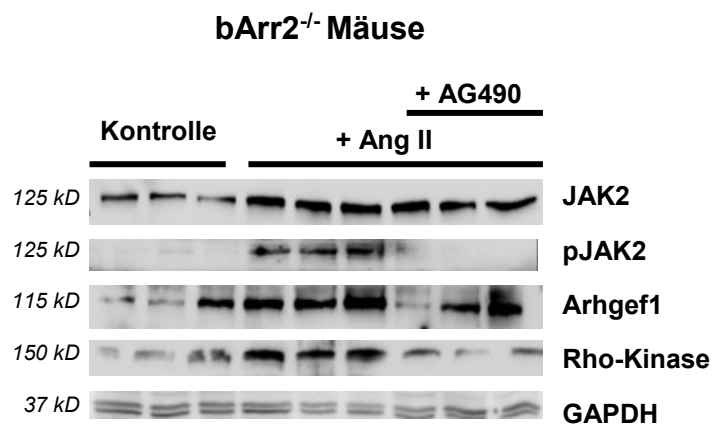


Abb. IV/19. Expression des JAK2/Rho-Kinase-Signalwegs nach AT1R-Stimulation und JAK2-Hemmung in bArr2^{-/-} Mäusen

Western Blots von JAK2, pJAK2, Arhgef1 und Rho-Kinase bei Leberproben von bArr2^{-/-} Mäusen, die zwei Wochen lang mit Ang II behandelt wurden und bArr2^{-/-} Mäusen, die in der zweiten Woche zusätzlich täglich eine AG490-Injektion erhalten haben im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Von jedem Leberhomogenat wurde jeweils 50 µg Protein aufgetragen. Als endogene Kontrolle wurde GAPDH verwendet.

V. DISKUSSION

1. Charakterisierung von JAK2 in der hepatischen Fibrogenese

JAK2 ist ein Protein der Janus-Kinase Familie und als wichtiger Vermittler von Signalwegen von hämatopoetischen Zytokinen und Hormonen bekannt (Imada & Leonard 2000, Gadina *et al.* 2001). Kürzlich wurde gezeigt, dass Ang II seinen AT1R-abhängigen kontraktile Effekt in den vaskulären glatten Gefäßzellen (VSMCs) durch die Phosphorylierung von JAK2 und des Nukleotid austauschfaktors für RhoA, Arhgef1, entfaltet. Dabei führt die Stimulation des AT1R durch Ang II zuerst zur Phosphorylierung von JAK2 und infolgedessen über den Nukleotid austauschfaktor Arhgef1 zur Aktivierung von RhoA, was im weiteren Verlauf über den Rho-Kinase Signalweg schließlich in der Zellkontraktion resultiert (Guilluy *et al.* 2010, Abb. I/7.). In dieser wegweisenden Veröffentlichung beschreiben die Autoren die Verbindung zwischen der AT1R-Stimulation und dem RhoA/Rho-Kinase Signalweg in arteriellen VSMCs als einen potenziellen Mechanismus für die arterielle Hypertension (Guilluy *et al.* 2010).

Die *in vivo* und *in vitro* Ergebnisse dieser Arbeit zeigen die Bedeutung der AT1R-abhängigen JAK2-Aktivierung in der hepatischen Fibrose und Entwicklung der portalen Hypertension im Tiermodell und im Menschen. Diese Entdeckungen werden mittels verschiedener Versuchsansätze durch die Verwendung unterschiedlicher Fibrosemodelle sowie durch pharmakologische und genetische Modulation in den Tiermodellen gestützt.

1.1. JAK2 wird in der Leberfibrose aktiviert

Die hepatische Fibrose ist die Folgeerkrankung einer chronischen Schädigung der Leber. Das Renin-Angiotensin-System (RAS) ist maßgeblich an der Entwicklung der progressiven Fibrose in verschiedenen Geweben, wie z.B. in Herz, Niere, Lunge und in der Leber, hauptsächlich durch die AT1R-Stimulation durch Ang II, involviert (Bataller *et al.* 2003, Ma *et al.* 2010, Wolf 2008, Uhal *et al.* 2012). Im Falle der chronischen Leberschädigung ist die Aktivierung des RAS ein wichtiges Charakteristikum der progressiven Lebererkrankung (Bosch & Garcia-Pangan 2000, Ben-

vegnu *et al.* 2004, Bataller & Brenner 2005, Gressner & Weiskirchen 2006). In dieser Arbeit konnte im Menschen und im Tiermodell eine JAK2-Aktivierung bei der Zirrhose bzw. experimentellen Fibrose nachgewiesen werden. Durch die Verwendung spezifischer Antikörper ließ sich die Phosphorylierung an den Aminosäuren Tyr1007/1008, die genau im Aktivierungsbereich des JAK2-Moleküls lokalisiert sind (Feng *et al.* 1997), detektieren. JAK2 kann jedoch auch an weiteren Aminosäureresten phosphoryliert werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung an Tyr221, Tyr637, Tyr813, Tyr868, Tyr966, Tyr972 und Tyr1007/1008 die Kinasefunktion von JAK2 aktiviert, während eine Phosphorylierung an den Resten Serin523, Tyr119, Tyr317, Tyr570 und Tyr913 die inaktive Konformation begünstigt (Argetsinger *et al.* 2004, Feener *et al.* 2004, Mazurkiewicz-Munoz *et al.* 2006, Robertson *et al.* 2009, Argetsinger *et al.* 2010). Da diese Phosphorylierung von JAK2 wesentlich für dessen Regulation ist, wäre auch eine Untersuchung anderer Phosphorylierungsstellen, welche die Aktivierung von JAK2 hemmen, in den fibrotischen Leberproben interessant. Neben der vermehrten Aktivierung von JAK2 sind jedoch auch alle anderen Komponenten des für die Leber postulierten JAK2/Rho-Kinase Signalweges hochexprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Rho-Kinase vor allem über die Stimulation des AT1R durch Ang II aktiviert wird (Trebicka *et al.* 2007, Hennenberg *et al.* 2007). Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen, dass dieser Mechanismus ebenfalls in der Leber vorliegt. Zusätzlich scheint eine Beteiligung von JAK2 in dieser Signalkaskade vorzuliegen.

1.2. JAK2 wird in Myofibroblasten-ähnlichen HSCs exprimiert und aktiviert

In dieser Arbeit wurde unter anderem die Expression des JAK2/Rho-Kinase-Signalwegs in frisch isolierten und nicht aktivierten, wie auch in Zellkultur-aktivierten HSCs, also MFBs, untersucht. Dabei konnte man sehr deutlich sehen, dass JAK2 und die nachgeschaltete Rho-Kinase nur in MFBs aktiviert wird. Da der Anteil von HSCs nur etwa 15% des Lebergewebes ausmacht (Bataller & Brenner 2001) wurde diese Signalkaskade auch in Hepatozyten, die den Hauptbestandteil der Leber darstellen, überprüft. Zur Bedeutung von JAK2 in Hepatozyten gibt es widersprüchliche Aussagen. Kürzlich wurde gezeigt, dass eine Hepatozyten-spezifische Deletion von JAK2 in Mäusen vor NASH und Glukoseintoleranz schützt (Shi *et al.*

2012). Demnach könnte eine Hemmung von JAK2 auch in Hepatozyten einen positiven Effekt haben und die Pathogenese der Leberfibrose minimieren. Eine andere Arbeit, die ebenfalls mit Mäusen durchgeführt wurde, deren Hepatozyten kein JAK2 exprimieren, zeigt jedoch, dass das Fehlen von JAK2 die Ansammlung von Fett in der Leber induziert (Sos *et al.* 2011). Auch in der vorliegenden Arbeit konnten wir weder eine Expression von JAK2 noch von pJAK2 in Hepatozyten detektieren. Somit scheinen Hepatozyten zumindest in unseren Modellen keine Rolle in der JAK2/Rho-Kinase Signalkaskade zu spielen.

Als weiterer hepatischer Zelltyp wurden Kupfferzellen untersucht. Kupfferzellen sind residente Lebermakrophagen, die in den Lebersinusoiden fremde Partikel phagozytieren und bei inflammatorischen Ereignissen eine Rolle spielen (Adams *et al.* 2010). Ebenso wie Hepatozyten exprimieren auch Kupfferzellen die Komponenten des JAK2/Rho-Kinase Signalwegs nicht. Zudem konnte pJAK2 in den hier gezeigten Tiermodellen nicht in den inflammatorischen Infiltraten von Gewebeschnitten nachgewiesen werden. Folglich findet in der Leber eine JAK2-Phosphorylierung vornehmlich in den aktivierten HSCs und nicht in den anderen Zelltypen statt. Zusätzlich konnte in den *in vivo* Versuchen demonstriert werden, dass die Zellen, in denen JAK2 an Tyr1007/1008 phosphoryliert ist, tatsächlich myofibroblastische HSCs sind, da pJAK2 in immunhistochemischen Färbungen in fibrotischen Septen detektiert wurde. Außerdem bestätigten Kollokalisationsexperimente, dass α SMA-positive Zellen, also HSCs, die aktivierte Form von JAK2 exprimieren, während α SMA-negative Zellen (z.B. Hepatozyten) kein pJAK2 aufweisen. Die Phosphorylierung von JAK2 ist maßgeblich an der Aktivierung der HSCs und somit an der hepatischen Fibroseentwicklung beteiligt. Die Untersuchungen in dieser Arbeit konzentrieren sich somit auf den JAK2/Rho-Kinase Signalweg.

Allerdings können die Effekte, die durch den JAK/STAT Signalweg hervorgerufen werden, auch eine Rolle in der Leberzirrhose spielen. Dies wurde unter anderem für die Transdifferenzierung der HSCs, die Ischämie/Reperfusion in der geschädigten Leber, das hepatozelluläre Karzinom und die Steatohepatitis gezeigt (Freitas *et al.* 2010, Lakner *et al.* 2010, Gu *et al.* 2011, Sos *et al.* 2011, Yu *et al.* 2011, Shi *et al.* 2012). Nach einer Aktivierung der JAK/STAT-Signalkaskade sah man beispielsweise eine verstärkte Migration der Endothelzellen und eine erhöhte Tumorigenese (Zhuang *et al.* 2012). Daher sollten in Zukunft auch die sinusoidalen Endothelzellen auf den JAK2/Rho-Kinase Signalweg untersucht werden, um die Wirkung der JAK2-Hemmung genauer einschätzen zu können.

1.3. Die JAK2-Aktivierung erfolgt AT1R-abhängig

Es konnte gezeigt werden, dass der AT1R viele der physiologischen Prozesse von Ang II vermittelt und vor allem in der Kontrolle der Ang II-induzierten vaskulären Funktionen wichtig ist (Matsusaki & Ichikawa 1997). Die Aktivierung des AT1R trägt aber auch maßgeblich zur Leberfibrose bei (Bataller *et al.* 2003). In den fibrotischen Lebern von AT1R^{-/-} Mäusen konnte neben der verringerten Expression von Arhgef1, RhoA, Rho-Kinase sowie einer verminderten Rho-Kinase Aktivierung auch weniger Phosphorylierung von JAK2 im Vergleich zu WT-Mäusen detektiert werden. Die Aktivierung von JAK2 scheint in der Leberfibrose somit auch AT1R-abhängig zu sein. Bisher konnte jedoch nicht geklärt werden, wie JAK2 durch den AT1R aktiviert wird. Studien zeigten bereits, dass der AT1R einige Eigenschaften von Zytokinrezeptoren besitzt, da er auch die Tyrosin-Phosphorylierung vermitteln kann (Huckle *et al.* 1990, Duff *et al.* 1992, Huckle *et al.* 1992, Tsuda *et al.* 1992, Molloy *et al.* 1993). Die Aktivierung des AT1R durch Ang II führt zur Bindung von JAK2 an den Rezeptor, weshalb angenommen wurde, dass G-Protein gekoppelte Rezeptoren durch die Phosphorylierung verschiedener Proteine auch in der Lage sind, intrazelluläre Signalwege zu induzieren, die sonst von Zytokinrezeptoren genutzt werden (Silvennoinen *et al.* 1993, Watling *et al.* 1993, Marrero *et al.* 1995, Berk & Corson 1997, Luchtefeld *et al.* 2001). Durch Verwendung verschiedenster Agonisten und Inhibitoren wurde in VSMCs gezeigt, dass PLC und dessen Signalmoleküle IP₃/Ca²⁺ sowie DAG/PKC essentiell für die Ang II-induzierte JAK2-Phosphorylierung sind. Außerdem wurde PYK2, eine Ca²⁺/PKC-sensitive Tyrosinkinase, identifiziert, die konstitutiv mit JAK2 assoziiert ist. Daher nimmt man an, dass vor allem Ca²⁺ und PKC über PYK2 zur AT1R-vermittelten JAK2-Aktivierung beitragen (Frank *et al.* 2002, Abb. V/1.). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass in den Myofibroblasten-ähnlichen HSCs ebenfalls eine JAK2-Aktivierung stattfindet. Die aktivierten HSCs besitzen besondere Eigenschaften von kontraktilen Elementen wie αSMA (Rockey *et al.* 1992, Rockey 2003) und Myosin (Saab *et al.* 2002), die Ca²⁺-abhängig wie auch Ca²⁺-unabhängig zur Kontraktion beitragen (Bataller *et al.* 2001, Laleman *et al.* 2001, Yee 2001). Zudem gibt es viele Hinweise darauf, dass Ca²⁺-Signalkaskaden durch die Aktivierung der MLCK die HSC-Kontraktion regulieren (Pinzani *et al.* 1992, Bataller *et al.* 1998, Yee 2001, Reynaert *et al.* 2002): Liganden, wie z.B. Ang II, Thrombin und Endothelin-1, die einen vorübergehenden

Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration verursachen, stimulieren ebenfalls die Sternzellkontraktion (Pinzani *et al.* 1992, Kawada *et al.* 1993, Pinzani *et al.* 1996, Thimgan & Yee 1999, Bataller *et al.* 2000, Saab *et al.* 2002). Darüber hinaus korreliert die Expression der membranständigen Ca^{2+} -Kanäle, der Ca^{2+} -Einstrom und die erhöhte zytosolische Ca^{2+} -Konzentration mit einer Reduktion der HSC-Oberfläche (Bataller *et al.* 1998, Bataller *et al.* 2001, Gasull *et al.* 2001). Zudem können Inhibitoren der Ca^{2+} -abhängigen MLCK das Ausmaß der Kontraktion von Kollagen-Gelen, worauf HSCs kultiviert werden, vermindern (Yanase *et al.* 2003, Laleman *et al.* 2007). Basierend auf diesen Erkenntnissen kommt die Ca^{2+} -abhängige Phosphorylierung von JAK2 in HSCs durchaus in Betracht.

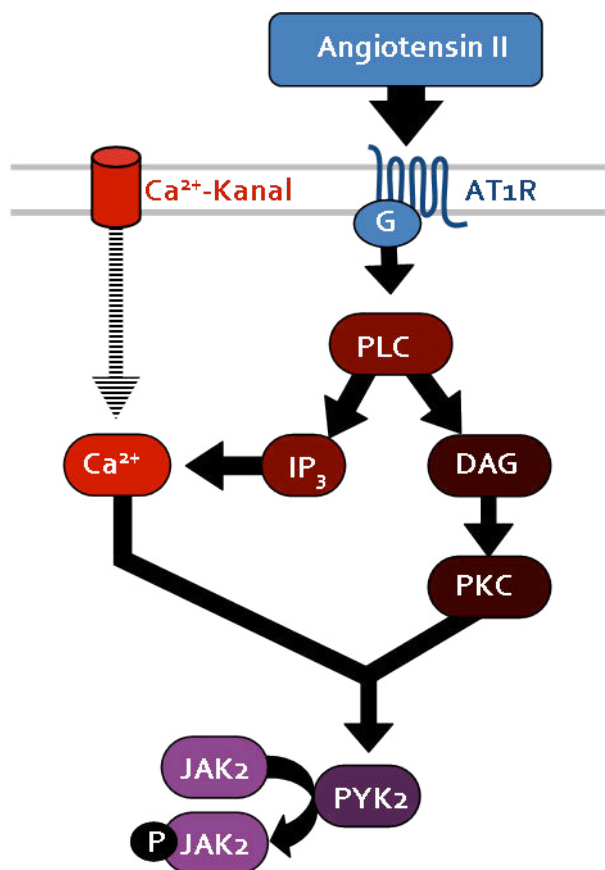


Abb. V/1.

Schematischer Überblick über den hypothetischen AT1R-abhängigen Signalweg der JAK2-Aktivierung [eigene Darstellung, modifiziert nach Frank *et al.* 2002, Bernstein & Fuchs 2010]

Nach der Stimulation des AT1R durch seinen Agonisten Ang II kommt es G-Protein-abhängig zur Aktivierung von PLC. Durch die darauffolgende Freisetzung von DAG und Ca^{2+} wird ein Signal an PYK2 gesendet, was wiederum zur Aktivierung von JAK2 führt.

Abkürzungen: AT1R = Angiotensin II Typ 1-Rezeptor; PLC = Phospholipase C; IP₃ = Inositoltriphosphat; DAG = Diacylglycerol; Ca^{2+} = Kalzium; PKC = Proteinkinase C; PYK2 = Protein Tyrosin Kinase 2

1.4. Eine Hemmung von JAK2 verlangsamt die Fibrogenese

Die systemische Aktivierung des RAS ist ein einheitlicher Befund in der fortgeschrittenen Zirrhose (Bosch & Garcia-Pagan 2000, Benvegna *et al.* 2004, Hennenberg *et al.* 2008). Die RAS-Aktivierung bewirkt eine Natrium-Retention in der Niere, was in späteren Krankheitsstadien zur Bildung von Aszites führt, aber auch zur Einleitung, Aufrechterhaltung und Steigerung der inflammatorischen und fibrogenen Prozesse in der Leber. Dabei kommt den hepatischen Sternzellen eine Schlüsselrolle zu (Friedman 2008). Es ist fraglich, ob, wie hier gezeigt, die systemische RAS-Aktivierung tatsächlich alleine die hepatische JAK2-Aktivierung bedingt. Allerdings muss es einen systemischen Effekt geben, da gezeigt werden konnte, dass eine Ang II-Gabe die hepatische Kollagenakkumulation erhöht und die AT1R-abhängige JAK2/Rho-Kinase Achse in der Leber aktiviert. Dennoch gibt es vermutlich auch parakrine intrahepatische Faktoren, die zu einer Hochregulation der AT1R-Expression auf aktivierten HSCs beitragen und zur Entstehung von lokalem Ang II mit anschließender Phosphorylierung von JAK2 führen, wie es schon für oxidativen Stress und den IKK/RelA Signalweg gezeigt werden konnte (Bataller *et al.* 2003, Oakley *et al.* 2009). In verschiedenen Tiermodellen und im Menschen konnte gezeigt werden, dass die hepatische Fibrose mit einer gesteigerten JAK2-Expression und Aktivierung assoziiert ist. Umgekehrt kann die Entwicklung der Leberfibrose durch die Hemmung von JAK2 durch die Gabe des JAK2-Inhibitors AG490 verzögert werden. Eine stetige exogene Ang II-Infusion (Bataller *et al.* 2005, Moreno *et al.* 2009) erhöht dagegen die Kollagenakkumulation in der Leber und die HSC-Aktivierung. Die vermehrte AT1R-Stimulation mit Ang II führt in dieser Arbeit zu einer verstärkten Expression des hepatischen JAK2/Rho-Kinase-Signalwegs. Zudem entwickelt sich auch eine leichte hepatische Fibrose in den Tiermodellen, wobei dies jedoch in den AT1R^{-/-}-Mäusen nicht der Fall ist. Das unterstreicht erneut die Bedeutung des AT1R für die Pathogenese der Fibrose. Trotzdem wird JAK2 möglicherweise auch noch durch verschiedene Zytokine oder verschiedene begleitende pathologische Bedingungen in der Leber aktiviert (Freitas *et al.* 2010, Gu *et al.* 2011, Sos *et al.* 2011, Yu *et al.* 2011, Shi *et al.* 2012).

Zur JAK2-Hemmung wurde *in vitro* und *in vivo* der JAK2-Inhibitor AG490 verwendet. Er gehört zu den Tyrphostinen, die eine neue Klasse der Protein-Tyrosinkinase-Hemmer darstellen. Normalerweise sind die Moleküle dieser Klasse

gegen die Kinase-Substrate gerichtet (Levitzki & Gilon 1991), wobei einige dieser Komponenten jedoch hoch selektiv wirken (Levitzki & Gazit 1995). *In vivo* zeigten WT-Ratten nach Ang II-Behandlung oder Gallengangsligatur einen Rückgang der Fibrose sowie eine verminderte HSC-Aktivierung. Diese Ergebnisse belegen die Beteiligung von JAK2 an der Fibrogenese. Doch auch hier kann nicht ausgeschlossen werden, dass neben dem postulierten JAK2/Rho-Kinase Signalweg auch die Beeinflussung der JAK/STAT-Kaskade Anteil an der Fibroseregession hat. Die Leber ist die Hauptquelle für zirkulierende Plasmaproteine und daher das primäre Ziel für die Metabolisierung und Wirkung des peripher freigesetzten Zytokins IL-6 (Castell *et al.* 1988, Gabay & Kushner 1999). Zusammen mit Cortisol kann IL-6 die Angiotensinogen- und Fibrogen-Synthese stimulieren (Fuller & Zhang 2001, Ray *et al.* 2002). In Hepatozyten aktiviert IL-6 den JAK/STAT-Signalweg. Die erhöhte Angiotensinogen-Produktion führt wiederum zu mehr Substraten für das aktivierte RAS (Brasier *et al.* 2002). Kürzlich wurde auch gezeigt, dass in MHCC97H, einer humanen HCC-Zelllinie, Ang II die Produktion angiogenetischer Faktoren teilweise über den AT1R/JAK2/STAT3/SOCS3-Signalweg induziert (Ji *et al.* 2012). Daher hat eine JAK2-Hemmung in der Leber möglicherweise auch über andere Signalkaskaden einen Einfluss auf die Lebererkrankung.

1.5. Der erhöhte intrahepatische Widerstand in der Fibrose kann durch eine JAK2-Hemmung vermindert werden

Rund 75% der Leberdurchblutung gelangt durch die Portalvene in das Organ (Reynaert *et al.* 2002). Während die Ca^{2+} -abhängigen Signalwege vor allem in den VSMCs eine Rolle spielen, scheinen die kleinen GTPasen mit ihren Rho-Signalwegen in den myofibroblastischen Zellen einen Einfluss auf deren Kontrolle zu haben (Somlyo & Somlyo 2000, Yee *et al.* 2001). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die JAK2-Expression und Aktivierung hauptsächlich in den HSCs stattfindet, was sowohl bei der Kollagenproduktion als auch der Regulation des intrahepatischen Blutflusses eine zentrale Rolle spielt. Mehrere Gruppen haben gezeigt, dass, im Gegensatz zu der extrahepatischen Situation, die kontraktilen Zellen in der Leber hyperreaktiv sind und dadurch den intrahepatischen Widerstand durch eine dynamische Komponente, die empfänglich für pharmakologische Modulationen ist, erhöht. Die Aktivierung der Rho-Kinase über RhoA ist ausschlaggebend in diesem Zusammenhang und beschränkt sich hauptsächlich auf die HSCs

(Zhou *et al.* 2006, Trebicka *et al.* 2007, Trebicka *et al.* 2009, Trebicka *et al.* 2010, van Beuge *et al.* 2011a, van Beuge *et al.* 2011b, Klein *et al.* 2012). Durch das spezifische Targeting von HSCs mit einem Rho-Kinase-Inhibitor war es möglich die Fibroseentwicklung zu verlangsamen und die Zellkontraktion zu verringern (van Beuge *et al.* 2011a, van Beuge *et al.* 2011b, Klein *et al.* 2012). Diese Arbeit identifiziert JAK2 als eine wichtige Komponente für die Rho-Kinase Aktivierung. Eine JAK2-Hemmung in zirrhatischen Ratten bewirkte einen signifikant erniedrigten Portaldruck sowie einen verminderten Perfusionsdruck in der Leber. Dieser Effekt war augenscheinlich AT1R-abhängig, da Ang II als Stimulus verwendet wurde. In gesunden Ratten sah man dagegen keinen Effekt auf den intrahepatischen Widerstand und auch nach AT1R-Blockade senkte die JAK2-Hemmung den intrahepatischen Widerstand in zirrhatischen Tieren nicht weiter. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass die JAK2-Hemmung AT1R-abhängig erfolgt und der vermittelte Signalweg in der erkrankten Leber zur Erhöhung des intrahepatischen Widerstandes beiträgt. Die Verabreichung des JAK2-Inhibitors ist daher ein möglicher Therapieansatz zur Behandlung der portalen Hypertension und Leberzirrhose.

2. Charakterisierung von bArr2 in der hepatischen Fibrogenese

Bisher wurde die AT1R-Desensibilisierung durch bArr2 nur in Zusammenhang mit einer extrahepatischen Gefäßkontraktion bei einer Leberschädigung untersucht. Dabei konnte bei CCl₄-behandelten Ratten eine verminderte Antwort auf Ang II in Gefäßen beobachtet werden, was der vermehrten Entkopplung der kontraktile Signalkaskaden vom AT1R durch bArr2 zugeschrieben wird (Hennenberg *et al.* 2009). Außerdem fungiert bArr2 durch die Komplexbildung von Ras und Raf1 als Gerüstprotein und führt dadurch zur ERK1/2-Aktivierung (DeFea *et al.* 2000, Luttrell *et al.* 2001, Thomas & Qian 2003, Ahn *et al.* 2009, Kim *et al.* 2009). Diese Arbeit zeigt erstmals, dass bArr2 auch einen Effekt auf die Leberfibrose ausübt und in Verbindung mit der Entkopplung des JAK2/Rho-Kinase-Signalweges vom AT1R steht.

2.1. Die bArr2/ERK-Achse wird in der hepatischen Fibrose größtenteils AT1R-abhängig hochreguliert

In der experimentellen Fibrose sind bArr2 und ERK1/2 sowie dessen aktivierte Form pERK1/2 hochexprimiert. Durch die vermehrte Stimulation des AT1R kommt es zu einer verstärkten Internalisierung des Rezeptors. Die erhöhte bArr2-Expression bei der experimentellen Fibrose weist auf eine AT1R-Desensibilisierung in dieser Situation hin. Auch in AT1R^{-/-}Mäusen ist die ERK1/2-Expression leicht erhöht. Studien an mutierten AT1R, an denen keine G-Proteine ankoppeln können, zeigten, dass die bArr2-vermittelte ERK-Aktivierung auch bei Abwesenheit einer G-Protein-Aktivierung stattfinden kann (Wei *et al.* 2003). Allerdings kann in dieser Arbeit keine vermehrte Phosphorylierung von ERK1/2 in den Lebern von AT1R^{-/-}Mäusen detektiert werden. Das spricht wiederum für einen hauptsächlich AT1R-abhängigen Mechanismus in der hepatischen Fibrose. Mit Hilfe von Untersuchungen der Protease-aktivierten Rezeptoren fand man heraus, dass die bArr-vermittelte MAPK-Aktivierung nicht die DNA-Synthese oder Zellteilung stimuliert, jedoch zur Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts und Chemotaxis führt und auch zur Migration beiträgt. Dazu komplexiert bArr ERK1/2 am leitenden Ende von verschiedenen Zellen während der Zellmigration (DeFea *et al.* 2000, Ge *et al.* 2003, Ge *et al.* 2004). Daher ist eine Beteiligung bei der HSC-Aktivierung, die auch mit einer morphologischen Umwandlung der Zelle einhergeht, wahrscheinlich. Außerdem werden immer mehr 7TMR bekannt, die ERK durch einen G-Protein/bArr-vermittelten Weg phosphorylieren (Kjim *et al.* 2005, Gesty-Palmer *et al.* 2006, Kara *et al.* 2006, Shenoy *et al.* 2006, Luttrell & Gesty-Palmer 2010). Dabei unterscheidet sich jedoch die Rolle von bArr1: Manche 7TMR benötigen beide bArr-Isoformen um ERK zu aktivieren, während bei anderen Rezeptoren, zu denen auch der AT1R gehört, bArr1 die Wirkung von bArr2 antagonisiert (Ahn *et al.* 2004). Daher wäre auch das Expressionslevel von bArr1 in fibrotischen Lebern interessant und sollte untersucht werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit beweisen die Abhängigkeit des bArr2/ERK-Signalweges vom AT1R in der experimentellen Fibrose.

2.2. Nach einer starken AT1R-Stimulation entkoppelt bArr2 den JAK2/Rho-Kinase Signalweg in HSCs

Der AT1R und seine kontraktile Signalwege wurden bisher vor allem in VSMCs näher untersucht. Da er wie bereits gezeigt auch in der Leber vor allem in den HSCs vorkommt und zur Pathogenese der Fibrose beiträgt, wurde der Effekt der AT1R-Stimulation auf die bArr2-Expression *in vitro* untersucht. Ansteigende Konzentrationen des AT1R-Agonisten Ang II führen in der humanen LX2-Zelllinie zu einer ansteigenden Expression von bArr2. Je mehr der Rezeptor stimuliert wird, desto stärker muss er entkoppelt werden und umso mehr bArr2 wird in der Zelle benötigt. Im Gegenzug dazu sinkt die Aktivität von JAK2, wenn die Zellen in höheren Ang II-Konzentrationen inkubiert werden. Somit ist eine enorm starke Rezeptor-Aktivierung mit einer übersteigerten Entkopplung der G-Protein-abhängigen Signalwege verbunden. Andere Arbeiten zeigten, dass bArr2 stark an das Serin-Threonin-Leucin-Motiv im zytoplasmatischen Teil des AT1R bindet (Hunyady *et al.* 1994, Smith *et al.* 1998, Oakley *et al.* 2000, Oakley *et al.* 2001). Diese starke Bindung führt dazu, dass bArr2 mit dem Rezeptor assoziiert bleibt, wenn dieser in Endosomen internalisiert wird (Thomas & Qian 2003). Daher muss vermutlich mehr bArr2 bei einer erhöhten AT1R-Stimulation exprimiert werden. Es ist nicht klar, ob das detektierte bArr2 frei im Zytosol oder am AT1R-gebunden in Endosomen vorliegt. Daher sollten weitere Experimente zur Klärung dieser Frage in Betracht gezogen werden. Insgesamt lässt sich aus diesen Ergebnissen schließen, dass zu Beginn einer Leberfibrose, wenn das RAS noch nicht so stark aktiviert ist, die Aktivierung der HSCs eher durch den JAK2/Rho-Kinase-Signalweg bestimmt ist. Im weiteren Verlauf, wenn das RAS überaktiviert ist und große Mengen an Ang II bildet, wird die Fibrose auch über den bArr2/ERK-Signalweg vermittelt (Abb. V/2.).

2.3. Bei Fehlen von bArr2 führt die AT1R-Stimulation durch eine JAK2-Aktivierung zur hepatischen Fibrose

In *bArr2*^{-/-}-Mäusen, denen zwei Wochen lang über eine osmotische Minipumpe Ang II verabreicht wurde, konnte signifikant eine Kollagenakkumulation beobachtet werden. Noch deutlicher war jedoch der Anstieg in der α SMA-Expression im hepa-

tischen Gewebe. Da in diesen Tieren der AT1R nicht mehr entkoppelt werden kann, führte die starke Stimulation über die G-Protein-abhängigen Signalwege zu einer starken HSC-Aktivierung. Der JAK2/Rho-Kinase-Signalweg war nach Ang II-Gabe deutlich hochexprimiert. Nach der JAK2-Hemmung mit AG490 sanken die Fibrose und die HSC-Aktivierung signifikant. Doch wie bereits diskutiert, ist es durchaus möglich, dass auch der JAK/STAT-Signalweg, der ebenfalls durch AG490 gehemmt wird, einen Effekt auf die Fibrose hat. Im Hinblick auf die Expression von Arhgef1 und Rho-Kinase sowie der Aktivierung von JAK2, die nach JAK2-Hemmung stark vermindert war, kann man allerdings annehmen, dass die anderen G-Protein-vermittelten Signalwege unterhalb des AT1R keine größere Relevanz bei der hepatischen Kollagenproduktion und somit bei der Fibrosierung der Leber haben.

3. Zusammenspiel von pJAK2 und bArr2 in der hepatischen Fibrose

Betrachtet man die Ergebnisse dieser Studie im Zusammenhang, so lässt sich abschließend sagen, dass sowohl der AT1R-abhängige JAK2/Rho-Kinase-Signalweg als auch die bArr2/ERK-Signalkaskade in der Leberfibrose eine Rolle spielen. Dabei werden beide Signalwege bei einer Leberschädigung vermehrt exprimiert (Abb. V/2). Für den JAK2/Rho-Kinase-Signalweg konnte gezeigt werden, dass er nur in den aktivierten HSCs, nicht aber in Hepatozyten oder Kupfferzellen, vorkommt. Da auch der AT1R selbst in der hepatischen Fibrose hochexprimiert ist, werden die fibrogenen Eigenschaften des JAK2/Rho-Kinase-Signalwegs und des bArr2/ERK-Signalwegs verstärkt. Nach erhöhter AT1R-Stimulation kommt es erst zur G-Protein-abhängigen JAK2/Rho-Kinase-Aktivierung. Daraufhin wird der AT1R von GRK2 phosphoryliert, wodurch bArr2 an den Rezeptor binden kann und eine weitere Signalweiterleitung über die G-Proteine verhindert. Die von bArr2 vermittelte Komplexbildung von Kinasen, die schließlich zur ERK1/2-Phosphorylierung führt, wird jedoch von GRK5 und GRK6 vermittelt (Kim *et al.* 2004). Ein möglicher Mechanismus ist, dass die Entkopplung des AT1R und die darauf folgende Induktion des bArr2/ERK-Signalwegs zur Fibrogenese beiträgt. Es ist denkbar, dass in der gesunden Leber die Aktivierung des JAK2/Rho-Kinase-Signalwegs und die Entkopplung dieses G-Protein-abhängigen Signalwegs in einem Gleichgewicht stehen, so dass keine Aktivierung der HSCs stattfindet (Abb. V/2.A,B).

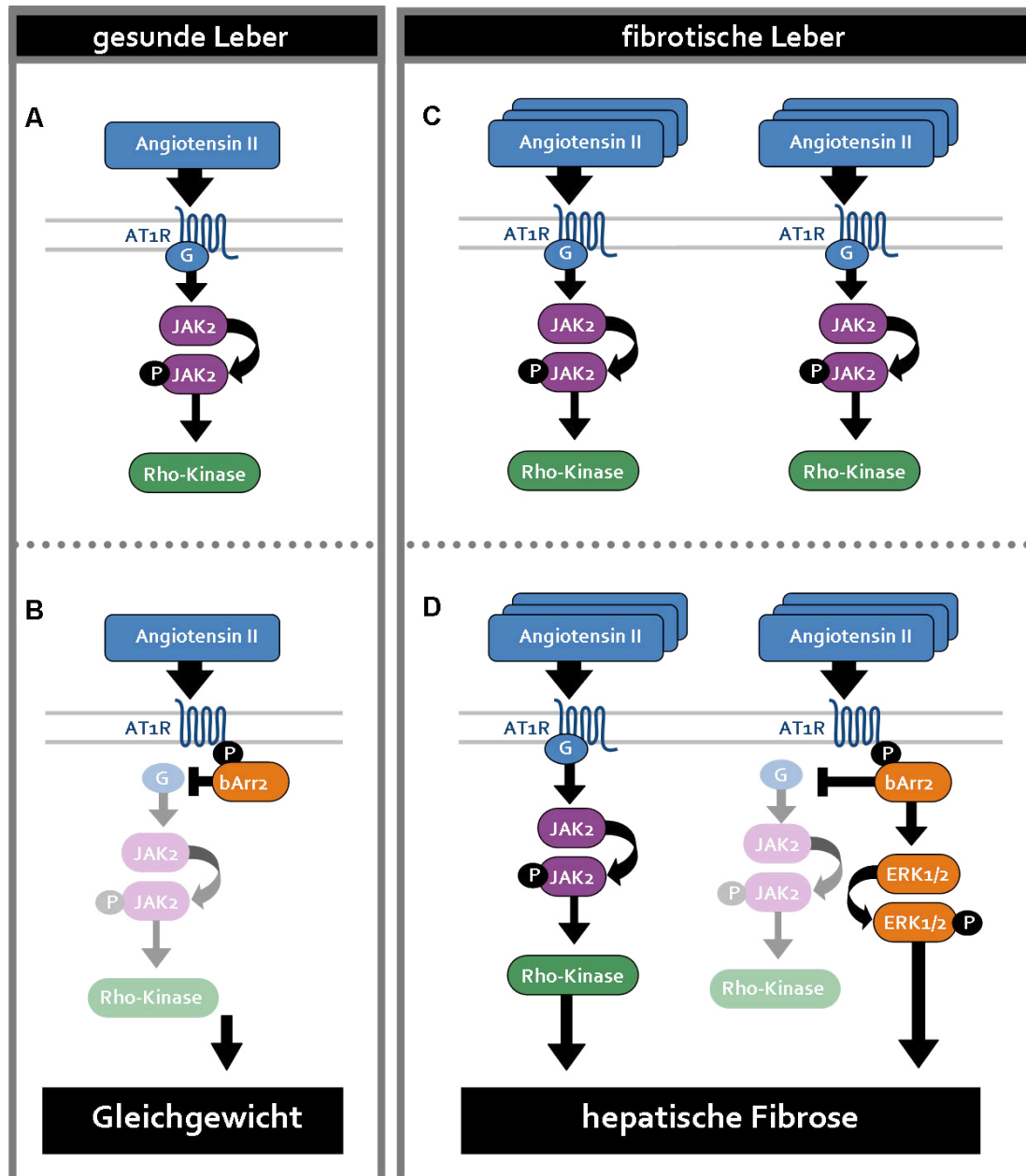


Abb. V/2. Überblick über den hypothetischen JAK2/Rho-Kinase- und bArr2/ERK-Signalweg in der gesunden und fibrotischen Leber [eigene Darstellung]

A: In der gesunden Leber aktiviert Ang II nur in geringem Maße den AT1R, so dass wenig JAK2 phosphoryliert wird, was wiederum die Rho-Kinase aktiviert.

B: Unmittelbar nach der Stimulation wird der AT1R phosphoryliert und durch die bArr2-Anbindung die G-Protein-abhängigen Signalwege entkoppelt.

C: In der fibrotischen Leber liegt der AT1R vermehrt vor. Außerdem führt das überaktive RAS zu einer vermehrten Produktion des Agonisten Ang II. Dadurch wird der JAK2/Rho-Kinase Signalweg in starkem Maße induziert.

D: Der stimulierte Rezeptor wird auch in der geschädigten Leber phosphoryliert. Das an den Rezeptor bindende bArr2 induziert allerdings durch die Komplexbildung verschiedener Kinasen die ERK1/2-Phosphorylierung. Außerdem ist aufgrund der gesteigerten AT1R-Stimulation mit Ang II auch der JAK2/Rho-Kinase-Signalweg weiterhin aktiv. Zusammen mit der ERK1/2-Aktivierung führt dies schließlich zur Aktivierung der Sternzellen, zur Kontraktion und somit zur hepatischen Fibrose.

Bei einer Leberschädigung führen verschiedenste Faktoren, wie beispielsweise auch das überaktivierte RAS, zu einer Veränderung der Expression der JAK2/Rho-Kinase-Komponenten. Dadurch kann bArr2 den AT1R, der in der Fibrose selber auch vermehrt vorliegt, nur noch unvollständig desensibilisieren. Andererseits induziert bArr2 seinerseits über bestimmte GRKs die Phosphorylierung von ERK1/2, was ein weiterer Faktor für die HSC-Aktivierung ist. Zusammen mit dem JAK2/Rho-Kinase-Signalweg führt die bArr2/ERK-Signalweiterleitung schließlich zur Leberfibrose (Abb. V/2.C, D).

4. Fazit

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit, dass die JAK2-Expression und Aktivierung in aktivierten HSCs in der hepatischen Fibrose erhöht ist. Dabei führt eine übermäßig gesteigerte AT1R-Aktivierung durch Ang II zu einer vermehrten Expression von bArr2 und zur Induktion des bArr2/ERK-Signalwegs. Die Hemmung von JAK2 vermindert die Fibrose und den Portaldruck. Des Weiteren sollte die Rolle von JAK2 bei der Aktivierung von Arhgef1 und von bArr2 bei der Entkopplung des AT1R von seinen G-Protein-gekoppelten Signalkaskaden, sowie die Induktion des hepatischen bArr2/ERK-Signalwegs weiter untersucht werden.

VI. AUSBLICK

Zum besseren Verständnis der AT1R-vermittelten kontraktiven Signalwege und deren Rolle in der Leberfibrose und -zirrhose muss in diese Richtung weiter geforscht werden.

Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass in HSCs auch der JAK/STAT-Weg einen Beitrag zur Fibrose leistet, sollte die AT1R-abhängige Aktivierung von Arhgef1 durch JAK2 genauer betrachtet werden. Dazu können Experimente mit siRNA in Erwägung gezogen werden. Auch die Überprüfung der RhoA-Aktivierung durch Arhgef1 würde Aufschluss über diese Signalkaskade geben. Des Weiteren könnte man die Phosphorylierung von STAT-Proteinen *in vivo* und *in vitro* messen, um deren Bedeutung beurteilen zu können.

Auch der bArr2/ERK-Signalweg muss weiter erforscht werden. Da verschiedene GRKs an der Regulation der Rezeptor-Desensibilisierung und dem bArr2/ERK-Signalweg involviert sind, wäre deren Regulation und Expression in der chronischen Leberschädigung sowie in den HSCs sehr interessant. Während GRK2 und GRK3 vor allem an der Rezeptor-Phosphorylierung und der bArr2-Rekrutierung zum AT1R beteiligt sind, hängt die ERK1/2-Aktivierung vor allem von GRK5 und GRK6 ab. GRK2/3 wirken in diesem Prozess sogar eher hemmend (Kim *et al.* 2004). Betrachtet man die Ergebnisse dieser Arbeit, so kann angenommen werden, dass die Initiation durch GRK5/6 der ERK1/2-Aktivierung neben dem JAK2/Rho-Kinase-Signalweg eventuell der Grund für die gesteigerte HSC-Aktivierung ist. Daher sollten *in vitro* die Expressionslevel für die verschiedenen GRKs gemessen werden, um deren Relevanz in der hepatischen Fibrogenese abschätzen zu können.

Obwohl die Leberfibrose meist asymptomatisch verläuft und nicht lebensbedrohlich ist, stellt sie doch eine Krankheit dar, die behandelt werden sollte und muss, da sie die Vorstufe einer Reihe von Lebererkrankungen ist, die ohne Therapie schließlich zur Leberzirrhose mit den bekannten lebensgefährlichen Komplikationen bis hin zum Leberversagen führt.

Daher sollte die HSC-spezifische Hemmung von JAK2 als eine Therapieoption untersucht werden. Da es bereits Moleküle gibt, die spezifisch an die HSCs binden und so einen daran angekoppelten Wirkstoff in die Zellen abgeben können, sollte dies auch mit einem JAK2-Inhibitor versucht werden. Durch die Hemmung von JAK2 ausschließlich in den HSCs können so systemische Nebenwirkungen unterbunden werden, da JAK2 in vielen weiteren Signalwegen im Organismus, vor allem über

Zytokinrezeptoren, eine bedeutsame Rolle spielt. Vor Kurzem wurden neue JAK2-Inhibitoren für die Behandlung verschiedener Krankheiten veröffentlicht (Ramakrishnan *et al.* 2010, Verstovsek *et al.* 2010, Lafave & Levine 2012), die auf Grundlage dieser neuen Erkenntnisse auch für die Behandlung der Fibrose und portalen Hypertension einschließlich eines spezifischen Targetings für HSCs in einem klinischen Umfeld in Erwägung gezogen werden können. Ein großer Schritt wäre auch die Entdeckung eines Inhibitors, der spezifisch die Nukleotidaustausch-Eigenschaften von Arhgef1 hemmt.

Für bArr2 ist bisher kein Inhibitor bekannt. Trotzdem sollte die bArr2/ERK-Achse weiter studiert werden um Zielmoleküle zu identifizieren, die zur Fibrose beitragen und um dann diese Moleküle zellspezifisch zu inhibieren. Zudem sollte auch ein Fokus auf bArr1 gelegt werden, da das Protein bekanntlich bArr2 bei der AT1R-vermittelten Signalweitergabe antagonisiert (Ahn *et al.* 2004).

Da auch das RAS maßgeblich an der Leberfibrose beteiligt ist, wird auch ein Ansatz verfolgt, der dieses System moduliert. Allerdings hat eine ACE-Hemmung zu starke Nebenwirkungen, da eine Komplikation bei der fortgeschrittenen Fibrose die Dysregulation des Blutdrucks im Splanchnikus und in der Leber ist. Besser dagegen erscheint eine AT1R-Blockade mit Sartanen, die allerdings auch HSC-spezifisch erfolgen sollte.

Abschließend lässt sich festhalten, dass diese Arbeit wichtige Erkenntnisse in der Regulation der HSC-Aktivierung und Anhaltspunkte für die Erforschung weiterer daran beteiligter Signalkaskaden liefert.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

- Adams DH, Ju C, Ramaiah SK, Uetrecht J, Jaeschke H.** Mechanisms of immune-mediated liver injury. *Toxicol Sci.* 2010 Jun;115(2):307-21.
- Afdhal NH, Nunes D.** Evaluation of liver fibrosis: a concise review. *Am J Gastroenterol.* 2004 Jun;99(6):1160-74. Review.
- Agustí AG, Roca J, Bosch J, Rodriguez-Roisin R.** The lung in patients with cirrhosis. *J Hepatol.* 1990 Mar;10(2):251-7. Review.
- Ahmed A, Keeffe EB.** Hepatitis C virus and liver transplantation. *Clin Liver Dis.* 2001 Nov;5(4):1073-90. Review.
- Ahn S, Nelson CD, Garrison TR, Miller WE, Lefkowitz RJ.** Desensitization, internalization, and signaling functions of beta-arrestins demonstrated by RNA interference. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Feb 18;100(4):1740-4.
- Ahn S, Shenoy SK, Wei H, Lefkowitz RJ.** Differential kinetic and spatial patterns of beta-arrestin and G protein-mediated ERK activation by the angiotensin II receptor. *J Biol Chem.* 2004a Aug 20;279(34):35518-25.
- Ahn S, Wei H, Garrison TR, Lefkowitz RJ.** Reciprocal regulation of angiotensin receptor-activated extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestins 1 and 2. *J Biol Chem.* 2004b Feb 27;279(9):7807-11.
- Ahn J, Flamm SL.** Hepatocellular carcinoma. *Dis Mon.* 2004 Oct;50(10):556-73. Review.
- Alexander RW, Brock TA, Gimbrone MA Jr, Rittenhouse SE.** Angiotensin increases inositol trisphosphate and calcium in vascular smooth muscle. *Hypertension.* 1985 May-Jun;7(3 Pt 1):447-51.
- Argetsinger LS, Kouadio JL, Steen H, Stensballe A, Jensen ON, Carter-Su C.** Autophosphorylation of JAK2 on tyrosines 221 and 570 regulates its activity. *Mol Cell Biol.* 2004 Jun;24(11):4955-67.
- Argetsinger LS, Stuckey JA, Robertson SA, Koleva RI, Cline JM, Marto JA, Myers MG Jr, Carter-Su C.** Tyrosines 868, 966, and 972 in the kinase domain of JAK2 are autophosphorylated and required for maximal JAK2 kinase activity. *Mol Endocrinol.* 2010 May;24(5):1062-76.
- Arthur MJ.** Reversibility of liver fibrosis and cirrhosis following treatment for hepatitis C. *Gastroenterology.* 2002 May;122(5):1525-8.
- Asahina K.** Hepatic stellate cell progenitor cells. *J Gastroenterol Hepatol.* 2012 Mar;27 Suppl 2:80-4. Review.
- Bachem MG, Meyer D, Melchior R, Sell KM, Gressner AM.** Activation of rat liver perisinusoidal lipocytes by transforming growth factors derived from myofibroblastlike cells. A potential mechanism of self perpetuation in liver fibrogenesis. *J Clin Invest.* 1992 Jan;89(1):19-27.
- Ballardini G, Degli Esposti S, Bianchi FB, de Giorgi LB, Faccani A, Biolchini L, Busachi CA, Pisi E.** Correlation between Ito cells and fibrogenesis in an experimental model of hepatic fibrosis. A sequential stereological study. *Liver.* 1983 Feb;3(1):58-63.
- Bataller R, Nicolás JM, Gineès P, Görbig MN, Garcia-Ramallo E, Lario S, Tobías E, Pinzani M, Thomas AP, Arroyo V, Rodés J.** Contraction of human hepatic stellate cells activated in culture: a role for voltage-operated calcium channels. *J Hepatol.* 1998 Sep;29(3):398-408.
- Bataller R, Ginès P, Nicolás JM, Görbig MN, Garcia-Ramallo E, Gasull X, Bosch J, Arroyo V, Rodés J.** Angiotensin II induces contraction and proliferation of human hepatic stellate cells. *Gastroenterology.* 2000 Jun;118(6):1149-56.
- Bataller R, Gasull X, Ginès P, Hellemans K, Görbig MN, Nicolás JM, Sancho-Bru P, De Las Heras D, Gual A, Geerts A, Arroyo V, Rodés J.** *In vitro* and *in vivo* activation of rat hepatic stellate cells results in de novo expression of L-type voltage-operated calcium channels. *Hepatology.* 2001 Apr;33(4):956-62.

- Bataller R, Schwabe RF, Choi YH, Yang L, Paik YH, Lindquist J, Qian T, Schoonhoven R, Hagedorn CH, Lemasters JJ, Brenner DA.** NADPH oxidase signal transduces angiotensin II in hepatic stellate cells and is critical in hepatic fibrosis. *J Clin Invest.* 2003 Nov;112(9):1383-94.
- Bataller R, Sancho-Bru P, Ginès P, Lora JM, Al-Garawi A, Solé M, Colmenero J, Nicolás JM, Jiménez W, Weich N, Gutiérrez-Ramos JC, Arroyo V, Rodés J.** Activated human hepatic stellate cells express the renin-angiotensin system and synthesize angiotensin II. *Gastroenterology.* 2003 Jul;125(1):117-25.
- Bataller R, Brenner DA.** Liver fibrosis. *J Clin Invest.* 2005 Feb;115(2):209-18. Review.
- Bataller R, Gäbele E, Parsons CJ, Morris T, Yang L, Schoonhoven R, Brenner DA, Rippe RA.** Systemic infusion of angiotensin II exacerbates liver fibrosis in bile duct-ligated rats. *Hepatology.* 2005 May;41(5):1046-55.
- Bedossa P, Paradis V.** Liver extracellular matrix in health and disease. *J Pathol.* 2003 Jul;200(4):504-15. Review.
- Beljaars L, Molema G, Weert B, Bonnema H, Olinga P, Groothuis GM, Meijer DK, Poelstra K.** Albumin modified with mannose 6-phosphate: A potential carrier for selective delivery of antifibrotic drugs to rat and human hepatic stellate cells. *Hepatology.* 1999 May;29(5):1486-93.
- Beljaars L, Molema G, Schuppan D, Geerts A, De Bleser PJ, Weert B, Meijer DK, Poelstra K.** Successful targeting to rat hepatic stellate cells using albumin modified with cyclic peptides that recognize the collagen type VI receptor. *J Biol Chem.* 2000 Apr 28;275(17):12743-51.
- Benvegnù L, Gios M, Boccato S, Alberti A.** Natural history of compensated viral cirrhosis: a prospective study on the incidence and hierarchy of major complications. *Gut.* 2004 May;53(5):744-9.
- Benyon RC, Hovell CJ, Da Gaça M, Jones EH, Iredale JP, Arthur MJ.** Progelatinase A is produced and activated by rat hepatic stellate cells and promotes their proliferation. *Hepatology.* 1999 Oct;30(4):977-86.
- Berk BC, Corson MA.** Angiotensin II signal transduction in vascular smooth muscle: role of tyrosine kinases. *Circ Res.* 1997 May;80(5):607-16.
- Bernstein KE, Marrero MB.** The Importance of Tyrosine Phosphorylation in Angiotensin II Signaling. *Trends Cardiovasc Med.* 1996 Aug;6(6):179-87.
- Berridge MJ.** Smooth muscle cell calcium activation mechanisms. *J Physiol.* 2008 Nov 1;586(Pt 21):5047-61. Review.
- Bhunchet E, Wake K.** Role of mesenchymal cell populations in porcine serum-induced rat liver fibrosis. *Hepatology.* 1992 Dec;16(6):1452-73.
- Bircher J, Benhamou JP, McIntyre N, Rizzetto M, Rodes J, editors.** Oxford Textbook of Clinical Hepatology. 2nd Edition. *Oxford University Press;* 1999.
- Bissell DM, Friedman SL, Maher JJ, Roll FJ.** Connective tissue biology and hepatic fibrosis: report of a conference. *Hepatology.* 1990 Mar;11(3):488-98. Review.
- Blomhoff R, Wake K.** Perisinusoidal stellate cells of the liver: important roles in retinol metabolism and fibrosis. *FASEB J.* 1991 Mar 1;5(3):271-7. Review.
- Bos JL, Rehmann H, Wittinghofer A.** GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell.* 2007 Jun 1;129(5):865-77. Review.
- Bosch J, García-Pagán JC.** Complications of cirrhosis. I. Portal hypertension. *J Hepatol.* 2000; 32(1 Suppl):141-56. Review.
- Bosch J.** Vascular deterioration in cirrhosis: the big picture. *J Clin Gastroenterol.* 2007 Nov-Dec;41 Suppl 3:S247-53. Review.
- Brasier AR, Recinos A 3rd, Eleдрisi MS.** Vascular inflammation and the renin-angiotensin system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002 Aug 1;22(8):1257-66.
- Brenner DA.** Molecular pathogenesis of liver fibrosis. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 2009;120:361-8. Review.

- Britton RS, Bacon BR.** Intracellular signaling pathways in stellate cell activation. *Alcohol Clin Exp Res.* 1999 May;23(5):922-5. Review.
- Brock TA, Alexander RW, Ekstein LS, Atkinson WJ, Gimbrone MA Jr.** Angiotensin increases cytosolic free calcium in cultured vascular smooth muscle cells. *Hypertension.* 1985 May-Jun;7(3 Pt 2):1105-9.
- Bruix J, Barrera JM, Calvet X, Ercilla G, Costa J, Sanchez-Tapias JM, Ventura M, Vall M, Bruguera M, Bru C, et al.** Prevalence of antibodies to hepatitis C virus in Spanish patients with hepatocellular carcinoma and hepatic cirrhosis. *Lancet.* 1989 Oct 28;2(8670):1004-6.
- Bruix J, Sherman M, Llovet JM, Beaugrand M, Lencioni R, Burroughs AK, Christensen E, Pagliaro L, Colombo M, Rodés J.** EASL Panel of Experts on HCC. Clinical management of hepatocellular carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL conference. European Association for the Study of the Liver. *J Hepatol.* 2001 Sep;35(3):421-30.
- Bünemann M, Hosey MM.** G-protein coupled receptor kinases as modulators of G-protein signalling. *J Physiol.* 1999 May 15;517 (Pt 1):5-23. Review.
- Campanile CP, Crane JK, Peach MJ, Garrison JC.** The hepatic angiotensin II receptor. I. Characterization of the membrane-binding site and correlation with physiological response in hepatocytes. *J Biol Chem.* 1982 May 10;257(9):4951-8.
- Canbay A, Higuchi H, Bronk SF, Taniai M, Sebo TJ, Gores GJ.** Fas enhances fibrogenesis in the bile duct ligated mouse: a link between apoptosis and fibrosis. *Gastroenterology.* 2002 Oct;123(4):1323-30.
- Canbay A, Friedman S, Gores GJ.** Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis. *Hepatology.* 2004 Feb;39(2):273-8. Review.
- Carloni V, Romanelli RG, Pinzani M, Laffi G, Gentilini P.** Expression and function of integrin receptors for collagen and laminin in cultured human hepatic stellate cells. *Gastroenterology.* 1996 Apr;110(4):1127-36.
- Carruthers JS, Kalifat SR, Steiner JW.** The ductular cell reaction of rat liver in extrahepatic cholestasis. II. The proliferation of connective tissue. *Exp Mol Pathol.* 1962 Aug;1:377-96.
- Cassiman D, Libbrecht L, Desmet V, Denef C, Roskams T.** Hepatic stellate cell/myofibroblast subpopulations in fibrotic human and rat livers. *J Hepatol.* 2002 Feb;36(2):200-9.
- Castell JV, Geiger T, Gross V, Andus T, Walter E, Hirano T, Kishimoto T, Heinrich PC.** Plasma clearance, organ distribution and target cells of interleukin-6/hepatocyte-stimulating factor in the rat. *Eur J Biochem.* 1988 Nov 1;177(2):357-61.
- Castillo T, Koop DR, Kamimura S, Triadafilopoulos G, Tsukamoto H.** Role of cytochrome P-450 2E1 in ethanol-, carbon tetrachloride- and iron-dependent microsomal lipid peroxidation. *Hepatology.* 1992 Oct;16(4):992-6.
- Chan-Ling T, Hughes S, Baxter L, Rosinova E, McGregor I, Morcos Y, van Nieuwenhuyzen P, Hu P.** Inflammation and breakdown of the blood-retinal barrier during "physiological aging" in the rat retina: a model for CNS aging. *Microcirculation.* 2007 Jan;14(1):63-76.
- Charest PG, Firtel RA.** Big roles for small GTPases in the control of directed cell movement. *Biochem J.* 2007 Jan 15;401(2):377-90. Review.
- Child CG, Turcotte JG.** Surgery and portal hypertension. *Major Probl Clin Surg.* 1964;1:1-85. Review.
- Chitturi S, Farrell GC.** Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis.* 2001;21(1):27-41. Review.
- Chrissobolis S, Sobey CG.** Evidence that Rho-kinase activity contributes to cerebral vascular tone *in vivo* and is enhanced during chronic hypertension: comparison with protein kinase C. *Circ Res.* 2001 Apr 27;88(8):774-9.
- Colombo M, de Franchis R, Del Ninno E, Sangiovanni A, De Fazio C, Tommasini M, Donato MF, Piva A, Di Carlo V, Dioguardi N.** Hepatocellular carcinoma in Italian patients with cirrhosis. *N Engl J Med.* 1991 Sep 5;325(10):675-80.

- Cottingham C, Wang Q.** α 2 adrenergic receptor dysregulation in depressive disorders: implications for the neurobiology of depression and antidepressant therapy. *Neurosci Biobehav Rev.* 2012 Nov;36(10):2214-25.
- Croquet V, Moal F, Veal N, Wang J, Oberti F, Roux J, Vuillemin E, Gallois Y, Douay O, Chappard D, Calès P.** Hemodynamic and antifibrotic effects of losartan in rats with liver fibrosis and/or portal hypertension. *J Hepatol.* 2002 Dec;37(6):773-80.
- Csikós T, Gallinat S, Unger T.** Extrarenal aspects of angiotensin II function. *Eur J Endocrinol.* 1997 Apr;136(4):349-58. Review.
- Cucchiari M, Kammer AR, Grabscheid B, Diepolder HM, Gerlach TJ, Grüner N, Santantonio T, Reichen J, Pape GR, Cerny A.** Vigorous peripheral blood cytotoxic Tcell response during the acute phase of hepatitis C virus infection. *Cell Immunol.* 2000 Aug 1;203(2):111-23.
- Czaja AJ, Carpenter HA.** Decreased fibrosis during corticosteroid therapy of autoimmune hepatitis. *J Hepatol.* 2004 Apr;40(4):646-52.
- Davis BH, Pratt BM, Madri JA.** Retinol and extracellular collagen matrices modulate hepatic Ito cell collagen phenotype and cellular retinol binding protein levels. *J Biol Chem.* 1987 Jul 25;262(21):10280-6.
- Davis GL, Esteban-Mur R, Rustgi V, Hoefs J, Gordon SC, Trepo C, Shiffman ML, Zeuzem S, Craxi A, Ling MH, Albrecht J.** Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin for the treatment of relapse of chronic hepatitis C. *International Hepatitis Interventional Therapy Group. N Engl J Med.* 1998 Nov 19;339(21):1493-9.
- DeFea KA, Vaughn ZD, O'Bryan EM, Nishijima D, Déry O, Bunnnett NW.** The proliferative and antiapoptotic effects of substance P are facilitated by formation of a beta-arrestin-dependent scaffolding complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Sep 26;97(20):11086-91.
- DeFea KA, Zalevsky J, Thoma MS, Déry O, Mullins RD, Bunnnett NW.** beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. *J Cell Biol.* 2000 Mar 20;148(6):1267-81.
- De Minicis S, Brenner DA.** NOX in liver fibrosis. *Arch Biochem Biophys.* 2007 Jun 15;462(2):266-72. Review.
- Desmet VJ, Roskams T.** Cirrhosis reversal: a duel between dogma and myth. *J Hepatol.* 2004 May;40(5):860-7. Review.
- Dixon JB, Bhathal PS, Hughes NR, O'Brien PE.** Nonalcoholic fatty liver disease: Improvement in liver histological analysis with weight loss. *Hepatology.* 2004 Jun;39(6):1647-54.
- Duff JL, Berk BC, Corson MA.** Angiotensin II stimulates the pp44 and pp42 mitogen-activated protein kinases in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992 Oct 15;188(1):257-64.
- Elton TS, Sansom SE, Martin MM.** Cardiovascular Disease, Single Nucleotide Polymorphisms; and the Renin Angiotensin System: Is There a MicroRNA Connection? *Int J Hypertens.* 2010 Aug 4;2010.
- Enzan H.** Proliferation of Ito cells (fat-storing cells) in acute carbon tetrachloride liver injury. A light and electron microscopic autoradiographic study. *Acta Pathol Jpn.* 1985 Nov;35(6):1301-8.
- Enzan H, Himeno H, Iwamura S, Saibara T, Onishi S, Yamamoto Y, Hara H.** Immunohistochemical identification of Ito cells and their myofibroblastic transformation in adult human liver. *Virchows Arch.* 1994;424(3):249-56.
- Esther CR Jr, Howard TE, Zhou Y, Capecchi MR, Marrero MB, Bernstein KE.** Lessons from angiotensin-converting enzyme-deficient mice. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 1996 Nov;5(6):463-7. Review.
- Feener EP, Rosario F, Dunn SL, Stancheva Z, Myers MG Jr.** Tyrosine phosphorylation of Jak2 in the JH2 domain inhibits cytokine signaling. *Mol Cell Biol.* 2004 Jun;24(11):4968-78.

- Feng J, Witthuhn BA, Matsuda T, Kohlhuber F, Kerr IM, Ihle JN.** Activation of Jak2 catalytic activity requires phosphorylation of Y1007 in the kinase activation loop. *Mol Cell Biol.* 1997 May;17(5):2497-501.
- Ferguson SS.** Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev.* 2001 Mar;53(1):1-24. Review.
- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM.** Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer.* 2010 Dec 15;127(12):2893-917.
- Ferrario CM, Chappell MC, Tallant EA, Brosnihan KB, Diz DI.** Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7). *Hypertension.* 1997 Sep;30(3 Pt 2):535-41. Review.
- Firmbach-Kraft I, Byers M, Shows T, Dalla-Favera R, Krolewski JJ.** tyk2, prototype of a novel class of non-receptor tyrosine kinase genes. *Oncogene.* 1990 Sep;5(9):1329-36.
- François E, García-Pagán JC, Bru C, Feu F, Gilibert R, Escorsell A, Bosch J, Rodés J.** [Effects of percutaneous intrahepatic portosystemic shunt on splanchnic and systemic hemodynamics in patients with portal hypertension]. *Gastroenterol Hepatol.* 1997 Jan;20(1):1-4. Spanish.
- Frank GD, Saito S, Motley ED, Sasaki T, Ohba M, Kuroki T, Inagami T, Eguchi S.** Requirement of Ca²⁺ and PKCdelta for Janus kinase 2 activation by angiotensin II: involvement of PYK2. *Mol Endocrinol.* 2002 Feb;16(2):367-77.
- Freitas MC, Uchida Y, Zhao D, Ke B, Busuttill RW, Kupiec-Weglinski JW.** Blockade of Janus kinase-2 signaling ameliorates mouse liver damage due to ischemia and reperfusion. *Liver Transpl.* 2010 May;16(5):600-10.
- Frevert U, Engelmann S, Zougbedé S, Stange J, Ng B, Matuschewski K, Liebes L, Yee H.** Intravital observation of Plasmodium berghei sporozoite infection of the liver. *PLoS Biol.* 2005 Jun;3(6):e192..
- Friedman SL, Roll FJ, Boyles J, Bissell DM.** Hepatic lipocytes: the principal collagen-producing cells of normal rat liver. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985 Dec;82(24):8681-5.
- Friedman SL, Arthur MJ.** Activation of cultured rat hepatic lipocytes by Kupffer cell conditioned medium. Direct enhancement of matrix synthesis and stimulation of cell proliferation via induction of platelet-derived growth factor receptors. *J Clin Invest.* 1989 Dec;84(6):1780-5.
- Friedman SL.** Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. *N Engl J Med.* 1993 Jun 24;328(25):1828-35. Review.
- Friedman SL, Yamasaki G, Wong L.** Modulation of transforming growth factor beta receptors of rat lipocytes during the hepatic wound healing response. Enhanced binding and reduced gene expression accompany cellular activation in culture and *in vivo*. *J Biol Chem.* 1994 Apr 8;269(14):10551-8.
- Friedman SL, Bansal MB.** Reversal of hepatic fibrosis - fact or fantasy? *Hepatology.* 2006 Feb;43(2 Suppl 1):S82-8. Review.
- Friedman SL.** Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology.* 2008 May;134(6):1655-69. Review.
- Fuller GM, Zhang Z.** Transcriptional control mechanism of fibrinogen gene expression. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;936:469-79.
- Gabay C, Kushner I.** Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med.* 1999 Feb 11;340(6):448-54.
- Gáborik Z, Szaszák M, Szidonya L, Balla B, Paku S, Catt KJ, Clark AJ, Hunyady L.** Beta-arrestin- and dynamin-dependent endocytosis of the AT1 angiotensin receptor. *Mol Pharmacol.* 2001 Feb;59(2):239-47.
- Gadina M, Hilton D, Johnston JA, Morinobu A, Lighvani A, Zhou YJ, Visconti R, O'Shea JJ.** Signaling by type I and II cytokine receptors: ten years after. *Curr Opin Immunol.* 2001 Jun;13(3):363-73. Review.

- de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T.** International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev.* 2000 Sep;52(3):415-72. Review.
- Gasull X, Bataller R, Ginès P, Sancho-Bru P, Nicolás JM, Görbig MN, Ferrer E, Badía E, Gual A, Arroyo V, Rodés J.** Human myofibroblastic hepatic stellate cells express Ca(2+)-activated K(+) channels that modulate the effects of endothelin-1 and nitric oxide. *J Hepatol.* 2001 Dec;35(6):739-48.
- Ge L, Ly Y, Hollenberg M, DeFea K.** A beta-arrestin-dependent scaffold is associated with prolonged MAPK activation in pseudopodia during protease-activated receptor-2-induced chemotaxis. *J Biol Chem.* 2003 Sep 5;278(36):34418-26.
- Ge L, Shenoy SK, Lefkowitz RJ, DeFea K.** Constitutive protease-activated receptor-2-mediated migration of MDA MB-231 breast cancer cells requires both beta-arrestin-1 and -2. *J Biol Chem.* 2004 Dec 31;279(53):55419-24.
- Geerts AM, De Vriese AS, Vanheule E, Van Vlierberghe H, Mortier S, Cheung KJ, Demetter P, Lameire N, De Vos M, Colle I.** Increased angiogenesis and permeability in the mesenteric microvasculature of rats with cirrhosis and portal hypertension: an *in vivo* study. *Liver Int.* 2006 Sep;26(7):889-98.
- Gesty-Palmer D, Chen M, Reiter E, Ahn S, Nelson CD, Wang S, Eckhardt AE, Cowan CL, Spurney RF, Luttrell LM, Lefkowitz RJ.** Distinct beta-arrestin- and G protein-dependent pathways for parathyroid hormone receptor-stimulated ERK1/2 activation. *J Biol Chem.* 2006 Apr 21;281(16):10856-64.
- Gonzalo T, Beljaars L, van de Bovenkamp M, Temming K, van Loenen AM, Reker-Smit C, Meijer DK, Lacombe M, Opdam F, Kéri G, Orfi L, Poelstra K, Kok RJ.** Local inhibition of liver fibrosis by specific delivery of a platelet-derived growth factor kinase inhibitor to hepatic stellate cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007 Jun;321(3):856-65.
- Goodman OB Jr, Krupnick JG, Santini F, Gurevich VV, Penn RB, Gagnon AW, Keen JH, Benovic JL.** Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature.* 1996 Oct 3;383(6599):447-50.
- Graudal N, Leth P, Mårbjerg L, Galløe AM.** Characteristics of cirrhosis undiagnosed during life: a comparative analysis of 73 undiagnosed cases and 149 diagnosed cases of cirrhosis, detected in 4929 consecutive autopsies. *J Intern Med.* 1991 Aug;230(2):165-71.
- Gressner AM, Bachem MG.** Molecular mechanisms of liver fibrogenesis—a homage to the role of activated fat-storing cells. *Digestion.* 1995;56(5):335-46. Review.
- Gressner AM.** Transdifferentiation of hepatic stellate cells (Ito cells) to myofibroblasts: a key event in hepatic fibrogenesis. *Kidney Int Suppl.* 1996 May;54:S39-45. Review.
- Gressner AM, Weiskirchen R.** Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets. *J Cell Mol Med.* 2006 Jan-Mar;10(1):76-99. Review.
- Gu FM, Li QL, Gao Q, Jiang JH, Zhu K, Huang XY, Pan JF, Yan J, Hu JH, Wang Z, Dai Z, Fan J, Zhou J.** IL-17 induces AKT-dependent IL-6/JAK2/STAT3 activation and tumor progression in hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer.* 2011 Dec 15;10:150.
- Guilluy C, Brégeon J, Toumaniantz G, Rolli-Derkinderen M, Retailleau K, Loufrani L, Henrion D, Scalbert E, Bril A, Torres RM, Offermanns S, Pacaud P, Loirand G.** The Rho exchange factor Arhgef1 mediates the effects of angiotensin II on vascular tone and blood pressure. *Nat Med.* 2010 Feb;16(2):183-90.
- Gusev NB.** Some properties of caldesmon and calponin and the participation of these proteins in regulation of smooth muscle contraction and cytoskeleton formation. *Biochemistry (Mosc).* 2001 Oct;66(10):1112-21. Review.
- Guyot C, Lepreux S, Combe C, Doudnikoff E, Bioulac-Sage P, Balabaud C, Desmoulière A.** Hepatic fibrosis and cirrhosis: the (myo)fibroblastic cell subpopulations involved. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006 Feb;38(2):135-51. Review.
- Hakkinen JP, Miller MW, Smith AH, Knight DR.** Measurement of organ blood flow with coloured microspheres in the rat. *Cardiovasc Res.* 1995 Jan;29(1):74-9.

- Hall JE.** Historical perspective of the renin-angiotensin system. *Mol Biotechnol.* 2003 May;24(1):27-39. Review.
- Hammel P, Couvelard A, O'Toole D, Ratouis A, Sauvanet A, Fléjou JF, Degott C, Belghiti J, Bernades P, Valla D, Ruszniewski P, Lévy P.** Regression of liver fibrosis after biliary drainage in patients with chronic pancreatitis and stenosis of the common bile duct. *N Engl J Med.* 2001 Feb 8;344(6):418-23.
- Harpur AG, Andres AC, Ziemiecki A, Aston RR, Wilks AF.** JAK2, a third member of the JAK family of protein tyrosine kinases. *Oncogene.* 1992 Jul;7(7):1347-53.
- Heller J, Shiozawa T, Trebicka J, Hennenberg M, Schepke M, Neef M, Sauerbruch T.** Acute haemodynamic effects of losartan in anaesthetized cirrhotic rats. *Eur J Clin Invest.* 2003 Nov;33(11):1006-12.
- Heller J, Trebicka J, Shiozawa T, Schepke M, Neef M, Hennenberg M, Sauerbruch T.** Vascular, hemodynamic and renal effects of low-dose losartan in rats with secondary biliary cirrhosis. *Liver Int.* 2005 Jun;25(3):657-66.
- Hennenberg M, Biecker E, Trebicka J, Jochem K, Zhou Q, Schmidt M, Jakobs KH, Sauerbruch T, Heller J.** Defective RhoA/Rho-kinase signaling contributes to vascular hypocontractility and vasodilation in cirrhotic rats. *Gastroenterology.* 2006 Mar;130(3):838-54.
- Hennenberg M, Trebicka J, Biecker E, Schepke M, Sauerbruch T, Heller J.** Vascular dysfunction in human and rat cirrhosis: role of receptor-desensitizing and calcium-sensitizing proteins. *Hepatology.* 2007 Feb;45(2):495-506.
- Hennenberg M, Trebicka J, Sauerbruch T, Heller J.** Mechanisms of extrahepatic vasodilation in portal hypertension. *Gut.* 2008 Sep;57(9):1300-14. Review.
- Hennenberg M, Trebicka J, Kohistani AZ, Heller J, Sauerbruch T.** Vascular hyporesponsiveness to angiotensin II in rats with CCl(4)-induced liver cirrhosis. *Eur J Clin Invest.* 2009 Oct;39(10):906-13.
- Hennenberg M, Trebicka J, Kohistani Z, Stark C, Nischalke HD, Krämer B, Körner C, Klein S, Granzow M, Fischer HP, Heller J, Sauerbruch T.** Hepatic and HSC-specific sorafenib effects in rats with established secondary biliary cirrhosis. *Lab Invest.* 2011 Feb;91(2):241-51.
- Henderson NC, Iredale JP.** Liver fibrosis: cellular mechanisms of progression and resolution. *Clin Sci (Lond).* 2007 Mar;112(5):265-80. Review.
- Hendriks HF, Brouwer A, Knook DL.** The role of hepatic fat-storing (stellate) cells in retinoid metabolism. *Hepatology.* 1987 Nov-Dec;7(6):1368-71. Review.
- Hernandez-Gea V, Friedman SL.** Pathogenesis of liver fibrosis. *Annu Rev Pathol.* 2011;6:425-56.
- Hershkoviz R, Bruck R, Aeed H, Shirin H, Halpern Z.** Treatment of concanavalin A-induced hepatitis in mice with low molecular weight heparin. *J Hepatol.* 1999 Nov;31(5):834-40.
- Holloway AC, Qian H, Pipolo L, Ziogas J, Miura S, Karnik S, Southwell BR, Lew MJ, Thomas WG.** Side-chain substitutions within angiotensin II reveal different requirements for signaling, internalization, and phosphorylation of type 1A angiotensin receptors. *Mol Pharmacol.* 2002 Apr;61(4):768-77.
- Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S.** Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol.* 1999 Apr 1;162(7):3749-52.
- Hua J, Qiu de K, Li JQ, Li EL, Chen XY, Peng YS.** Expression of Toll-like receptor 4 in rat liver during the course of carbon tetrachloride-induced liver injury. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007 Jun;22(6):862-9.
- Huckle WR, Prokop CA, Dy RC, Herman B, Earp S.** Angiotensin II stimulates protein-tyrosine phosphorylation in a calcium-dependent manner. *Mol Cell Biol.* 1990 Dec;10(12):6290-8.
- Huckle WR, Dy RC, Earp HS.** Calcium-dependent increase in tyrosine kinase activity stimulated by angiotensin II. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Sep 15;89(18):8837-41.

- Hunyady L, Bor M, Balla T, Catt KJ.** Identification of a cytoplasmic Ser-Thr-Leu motif that determines agonist-induced internalization of the AT1 angiotensin receptor. *J Biol Chem.* 1994 Dec 16;269(50):31378-82.
- Imada K, Leonard WJ.** The Jak-STAT pathway. *Mol Immunol.* 2000 Jan-Feb;37(1-2):1-11. Review.
- Inagami T, Eguchi S, Numaguchi K, Motley ED, Tang H, Matsumoto T, Yamakawa T.** Cross-talk between angiotensin II receptors and the tyrosine kinases and phosphatases. *J Am Soc Nephrol.* 1999 Jan;10 Suppl 11:S57-61.
- Iredale JP.** Tissue inhibitors of metalloproteinases in liver fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol.* 1997 Jan;29(1):43-54. Review.
- Iredale JP, Benyon RC, Pickering J, McCullen M, Northrop M, Pawley S, Hovell C, Arthur MJ.** Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J Clin Invest.* 1998 Aug 1;102(3):538-49.
- Iredale JP.** Hepatic stellate cell behavior during resolution of liver injury. *Semin Liver Dis.* 2001 Aug;21(3):427-36. Review.
- Ikura Y, Ohsawa M, Shirai N, Sugama Y, Fukushima H, Suekane T, Hirayama M, Ehara S, Naruko T, Ueda M.** Expression of angiotensin II type 1 receptor in human cirrhotic livers: Its relation to fibrosis and portal hypertension. *Hepatol Res.* 2005 Jun;32(2):107-16.
- Issa R, Williams E, Trim N, Kendall T, Arthur MJ, Reichen J, Benyon RC, Iredale JP.** Apoptosis of hepatic stellate cells: involvement in resolution of biliary fibrosis and regulation by soluble growth factors. *Gut.* 2001 Apr;48(4):548-57.
- Issa R, Zhou X, Constandinou CM, Fallowfield J, Millward-Sadler H, Gaca MD, Sands E, Suliman I, Trim N, Knorr A, Arthur MJ, Benyon RC, Iredale JP.** Spontaneous recovery from micronodular cirrhosis: evidence for incomplete resolution associated with matrix cross-linking. *Gastroenterology.* 2004 Jun;126(7):1795-808.
- Iwakiri Y, Groszmann RJ.** The hyperdynamic circulation of chronic liver diseases: from the patient to the molecule. *Hepatology.* 2006 Feb;43(2 Suppl 1):S121-31. Review.
- Iwakiri Y, Groszmann RJ.** Vascular endothelial dysfunction in cirrhosis. *J Hepatol.* 2007 May;46(5):927-34. Review.
- Iwakiri Y.** Endothelial dysfunction in the regulation of cirrhosis and portal hypertension. *Liver Int.* 2012 Feb;32(2):199-213.
- Jaeschke H.** Inflammation in response to hepatocellular apoptosis. *Hepatology.* 2002 Apr;35(4):964-6.
- Jaeschke H.** Mechanisms of Liver Injury. II. Mechanisms of neutrophil-induced liver cell injury during hepatic ischemia-reperfusion and other acute inflammatory conditions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006 Jun;290(6):G1083-8. Review.
- Jaffe AB, Hall A.** Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005;21:247-69. Review.
- Ji Y, Wang Z, Li Z, Li K, Le X, Zhang T.** Angiotensin II induces angiogenic factors production partly via AT1/JAK2/STAT3/SOCS3 signaling pathway in MHCC97H cells. *Cell Physiol Biochem.* 2012;29(5-6):863-74.
- Jones AV, Kreil S, Zoi K, Waghorn K, Curtis C, Zhang L, Score J, Seear R, Chase AJ, Grand FH, White H, Zoi C, Loukopoulos D, Terpos E, Vervessou EC, Schultheis B, Emig M, Ernst T, Lengfelder E, Hehlmann R, Hochhaus A, Oscier D, Silver RT, Reiter A, Cross NC.** Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood.* 2005 Sep 15;106(6):2162-8.
- Kalluri R, Neilson EG.** Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest.* 2003 Dec;112(12):1776-84. Review.
- Kanno K, Tazuma S, Chayama K.** AT1A-deficient mice show less severe progression of liver fibrosis induced by CCl(4). *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Aug 15;308(1):177-83.

- Kara E, Crépieux P, Gauthier C, Martinat N, Piketty V, Guillou F, Reiter E.** A phosphorylation cluster of five serine and threonine residues in the C-terminus of the follicle-stimulating hormone receptor is important for desensitization but not for beta-arrestin-mediated ERK activation. *Mol Endocrinol.* 2006 Nov;20(11):3014-26.
- Kaschina E, Unger T.** Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function. *Blood Press.* 2003;12(2):70-88. Review.
- Kawada N, Tran-Thi TA, Klein H, Decker K.** The contraction of hepatic stellate (Ito) cells stimulated with vasoactive substances. Possible involvement of endothelin 1 and nitric oxide in the regulation of the sinusoidal tonus. *Eur J Biochem.* 1993 Apr 15;213(2):815-23.
- Kawada N, Seki S, Inoue M, Kuroki T.** Effect of antioxidants, resveratrol, quercetin, and N-acetylcysteine, on the functions of cultured rat hepatic stellate cells and Kupffer cells. *Hepatology.* 1998 May;27(5):1265-74.
- Kawada N, Seki S, Kuroki T, Kaneda K.** ROCK inhibitor Y-27632 attenuates stellate cell contraction and portal pressure increase induced by endothelin-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 Dec 20;266(2):296-300.
- Kerr IM, Costa-Pereira AP, Lillemeier BF, Strobl B.** Of JAKs, STATs, blind watchmakers, jeeps and trains. *FEBS Lett.* 2003 Jul 3;546(1):1-5. Review.
- Kim J, Ahn S, Ren XR, Whalen EJ, Reiter E, Wei H, Lefkowitz RJ.** Functional antagonism of different G protein-coupled receptor kinases for beta-arrestin-mediated angiotensin II receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Feb 1;102(5):1442-7.
- Kim J, Ahn S, Rajagopal K, Lefkowitz RJ.** Independent beta-arrestin2 and Gq/protein kinase Czeta pathways for ERK stimulated by angiotensin type 1A receptors in vascular smooth muscle cells converge on transactivation of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem.* 2009 May 1;284(18):11953-62.
- Kinman N, Francoz C, Barbu V, Wendum D, Rey C, Hultcrantz R, Poupon R, Housset C.** The myofibroblastic conversion of peribiliary fibrogenic cells distinct from hepatic stellate cells is stimulated by platelet-derived growth factor during liver fibrogenesis. *Lab Invest.* 2003 Feb;83(2):163-73.
- Kitamura K, Tada S, Nakamoto N, Toda K, Horikawa H, Kurita S, Tsunematsu S, Kumagai N, Ishii H, Saito H, Hibi T.** Rho/Rho kinase is a key enzyme system involved in the angiotensin II signaling pathway of liver fibrosis and steatosis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007 Nov;22(11):2022-33. Erratum in: *J Gastroenterol Hepatol.* 2007 Oct;22(10):1697.
- Kisseleva T, Uchinami H, Feirt N, Quintana-Bustamante O, Segovia JC, Schwabe RF, Brenner DA.** Bone marrow-derived fibrocytes participate in pathogenesis of liver fibrosis. *J Hepatol.* 2006 Sep;45(3):429-38.
- Klein S, Van Beuge MM, Granzow M, Beljaars L, Schierwagen R, Kilic S, Heidari I, Huss S, Sauerbruch T, Poelstra K, Trebicka J.** HSC-specific inhibition of Rho-kinase reduces portal pressure in cirrhotic rats without major systemic effects. *J Hepatol.* 2012 Dec;57(6):1220-7.
- Knittel T, Kobold D, Saile B, Grundmann A, Neubauer K, Piscaglia F, Ramadori G.** Rat liver myofibroblasts and hepatic stellate cells: different cell populations of the fibroblast lineage with fibrogenic potential. *Gastroenterology.* 1999 Nov;117(5):1205-21.
- Knittel T, Mehde M, Kobold D, Saile B, Dinter C, Ramadori G.** Expression patterns of matrix metalloproteinases and their inhibitors in parenchymal and non-parenchymal cells of rat liver: regulation by TNF-alpha and TGF-beta1. *J Hepatol.* 1999 Jan;30(1):48-60.
- Kojima H, Tsujimoto T, Uemura M, Takaya A, Okamoto S, Ueda S, Nishio K, Miyamoto S, Kubo A, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H, Fukui H.** Significance of increased plasma adrenomedullin concentration in patients with cirrhosis. *J Hepatol.* 1998 May;28(5):840-6.
- Kojima H, Yamao J, Tsujimoto T, Uemura M, Takaya A, Fukui H.** Mixed endothelin receptor antagonist, SB209670, decreases portal pressure in biliary cirrhotic rats *in vivo* by reducing portal venous system resistance. *J Hepatol.* 2000 Jan;32(1):43-50.

- Kong X, Feng D, Wang H, Hong F, Bertola A, Wang FS, Gao B.** Interleukin-22 induces hepatic stellate cell senescence and restricts liver fibrosis in mice. *Hepatology*. 2012 Sep;56(3):1150-9.
- Kovoor A, Nappey V, Kieffer BL, Chavkin C.** Mu and delta opioid receptors are differentially desensitized by the coexpression of beta-adrenergic receptor kinase 2 and beta-arrestin 2 in xenopus oocytes. *J Biol Chem*. 1997 Oct 31;272(44):27605-11.
- Krizhanovsky V, Yon M, Dickins RA, Hearn S, Simon J, Miething C, Yee H, Zender L, Lowe SW.** Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell*. 2008 Aug 22;134(4):657-67.
- Kurdi M, De Mello WC, Booz GW.** Working outside the system: an update on the unconventional behavior of the renin-angiotensin system components. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005 Jul;37(7):1357-67.
- Kweon YO, Goodman ZD, Dienstag JL, Schiff ER, Brown NA, Burchardt E, Schoonhoven R, Brenner DA, Fried MW.** Decreasing fibrogenesis: an immunohistochemical study of paired liver biopsies following lamivudine therapy for chronic hepatitis B. *J Hepatol*. 2001 Dec;35(6):749-55.
- Laemmli UK.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680-5.
- LaFave LM, Levine RL.** JAK2 the future: therapeutic strategies for JAK-dependent malignancies. *Trends Pharmacol Sci*. 2012 Nov;33(11):574-82. Review.
- Lakner AM, Moore CC, Gullledge AA, Schrum LW.** Daily genetic profiling indicates JAK/STAT signaling promotes early hepatic stellate cell transdifferentiation. *World J Gastroenterol*. 2010 Oct 28;16(40):5047-56.
- Laleman W, Van Landeghem L, Severi T, Vander Elst I, Zeegers M, Bisschops R, Van Pelt J, Roskams T, Cassiman D, Fevery J, Nevens F.** Both Ca²⁺-dependent and -independent pathways are involved in rat hepatic stellate cell contraction and intrahepatic hyperresponsiveness to methoxamine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007 Feb;292(2):G556-64.
- Lang A, Schoonhoven R, Tuvia S, Brenner DA, Rippe RA.** Nuclear factor kappaB in proliferation, activation, and apoptosis in rat hepatic stellate cells. *J Hepatol*. 2000 Jul;33(1):49-58.
- Lee FY, Colombato LA, Albillos A, Groszmann RJ.** Administration of N omega-nitro-L-arginine ameliorates portal-systemic shunting in portal-hypertensive rats. *Gastroenterology*. 1993 Nov;105(5):1464-70.
- Lefkowitz RJ.** G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. *J Biol Chem*. 1998 Jul 24;273(30):18677-80. Review.
- Lefkowitz RJ, Shenoy SK.** Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science*. 2005 Apr 22;308(5721):512-7. Review.
- Levitzki A, Gilon C.** Tyrphostins as molecular tools and potential antiproliferative drugs. *Trends Pharmacol Sci*. 1991 May;12(5):171-4. Review.
- Levitzki A, Gazit A.** Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. *Science*. 1995 Mar 24;267(5205):1782-8. Review.
- Leung PS, Chappell MC.** A local pancreatic renin-angiotensin system: endocrine and exocrine roles. *Int J Biochem Cell Biol*. 2003 Jun;35(6):838-46. Review.
- Leung PS, Suen PM, Ip SP, Yip CK, Chen G, Lai PB.** Expression and localization of AT1 receptors in hepatic Kupffer cells: its potential role in regulating a fibrogenic response. *Regul Pept*. 2003 Nov 15;116(1-3):61-9.
- Leung PS.** The peptide hormone angiotensin II: its new functions in tissues and organs. *Curr Protein Pept Sci*. 2004 Aug;5(4):267-73. Review.
- Llovet JM, Burroughs A, Bruix J.** Hepatocellular carcinoma. *Lancet*. 2003 Dec 6;362(9399):1907-17. Review.

- Luttrell LM, Roudabush FL, Choy EW, Miller WE, Field ME, Pierce KL, Lefkowitz RJ.** Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Feb 27;98(5):2449-54.
- Luttrell LM, Lefkowitz RJ.** The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci.* 2002 Feb 1;115(Pt 3):455-65. Review.
- Luttrell LM, Gesty-Palmer D.** Beyond desensitization: physiological relevance of arrestin-dependent signaling. *Pharmacol Rev.* 2010 Jun;62(2):305-30.
- Ma P, Zimmel R.** Value of novelty? *Nat Rev Drug Discov.* 2002 Aug;1(8):571-2.
- Ma TK, Kam KK, Yan BP, Lam YY, Maher JJ, Bissell DM, Friedman SL, Roll FJ.** Collagen measured in primary cultures of normal rat hepatocytes derives from lipocytes within the monolayer. *J Clin Invest.* 1988 Aug;82(2):450-9. cardiovascular diseases: current status. *Br J Pharmacol.* 2010 Jul;160(6):1273-92. Review.
- Maher JJ.** Fat-storing cells and myofibroblasts: one cell or two? *Hepatology.* 1989 Jun;9(6):903-4.
- Maher JJ, McGuire RF.** Extracellular matrix gene expression increases preferentially in rat lipocytes and sinusoidal endothelial cells during hepatic fibrosis *in vivo*. *J Clin Invest.* 1990 Nov;86(5):1641-8.
- Maher JJ, Zia S, Tzagarakis C.** Acetaldehyde-induced stimulation of collagen synthesis and gene expression is dependent on conditions of cell culture: studies with rat lipocytes and fibroblasts. *Alcohol Clin Exp Res.* 1994 Apr;18(2):403-9.
- Mahl TC, Groszmann RJ.** Pathophysiology of portal hypertension and variceal bleeding. *Surg Clin North Am.* 1990 Apr;70(2):251-66.
- Mak KM, Lieber CS.** Lipocytes and transitional cells in alcoholic liver disease: a morphometric study. *Hepatology.* 1988 Sep-Oct;8(5):1027-33.
- Mallet V, Gilgenkrantz H, Serpaggi J, Verkarre V, Vallet-Pichard A, Fontaine H, Pol S.** Brief communication: the relationship of regression of cirrhosis to outcome in chronic hepatitis C. *Ann Intern Med.* 2008 Sep 16;149(6):399-403.
- Marrero MB, Schieffer B, Paxton WG, Heerdt L, Berk BC, Delafontaine P, Bernstein KE.** Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT1 receptor. *Nature.* 1995 May 18;375(6528):247-50.
- Masumoto A, Hirooka Y, Shimokawa H, Hironaga K, Setoguchi S, Takeshita A.** Possible involvement of Rho-kinase in the pathogenesis of hypertension in humans. *Hypertension.* 2001 Dec 1;38(6):1307-10.
- Matsumura Y, Sakaida I, Uchida K, Kimura T, Ishihara T, Okita K.** Prolyl 4-hydroxylase inhibitor (HOE 077) inhibits pig serum-induced rat liver fibrosis by preventing stellate cell activation. *J Hepatol.* 1997 Jul;27(1):185-92.
- Matsuoka M, Tsukamoto H.** Stimulation of hepatic lipocyte collagen production by Kupffer cell-derived transforming growth factor beta: implication for a pathogenetic role in alcoholic liver fibrogenesis. *Hepatology.* 1990 Apr;11(4):599-605.
- Matsusaka T, Ichikawa I.** Biological functions of angiotensin and its receptors. *Annu Rev Physiol.* 1997;59:395-412.
- Mazurkiewicz-Munoz AM, Argentsinger LS, Kouadio JL, Stensballe A, Jensen ON, Cline JM, Carter-Su C.** Phosphorylation of JAK2 at serine 523: a negative regulator of JAK2 that is stimulated by growth hormone and epidermal growth factor. *Mol Cell Biol.* 2006 Jun;26(11):4052-62.
- McDonald PH, Cote NL, Lin FT, Premont RT, Pitcher JA, Lefkowitz RJ.** Identification of NSF as a beta-arrestin1-binding protein. Implications for beta2-adrenergic receptor regulation. *J Biol Chem.* 1999 Apr 16;274(16):10677-80.
- McDonald PH, Lefkowitz RJ.** Beta-Arrestins: new roles in regulating heptahelical receptors' functions. *Cell Signal.* 2001 Oct;13(10):683-9. Review.

- Miller WE, Lefkowitz RJ.** Expanding roles for beta-arrestins as scaffolds and adapters in GPCR signaling and trafficking. *Curr Opin Cell Biol.* 2001 Apr;13(2):139-45. Review.
- Mehta PK, Griendling KK.** Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007 Jan;292(1):C82-97. Review.
- Melton AC, Yee HF.** Hepatic stellate cell protrusions couple platelet-derived growth factor-BB to chemotaxis. *Hepatology.* 2007 Jun;45(6):1446-53.
- Milani S, Herbst H, Schuppan D, Hahn EG, Stein H.** *In situ* hybridization for procollagen types I, III and IV mRNA in normal and fibrotic rat liver: evidence for predominant expression in nonparenchymal liver cells. *Hepatology.* 1989 Jul;10(1):84-92.
- Milani S, Herbst H, Schuppan D, Surrenti C, Riecken EO, Stein H.** Cellular localization of type I, III and IV procollagen gene transcripts in normal and fibrotic human liver. *Am J Pathol.* 1990a Jul;137(1):59-70.
- Milani S, Herbst H, Schuppan D, Kim KY, Riecken EO, Stein H.** Procollagen expression by nonparenchymal rat liver cells in experimental biliary fibrosis. *Gastroenterology.* 1990b Jan;98(1):175-84.
- Milani S, Herbst H, Schuppan D, Grappone C, Heinrichs OE.** Cellular sources of extracellular matrix proteins in normal and fibrotic liver. Studies of gene expression by *in situ* hybridization. *J Hepatol.* 1995;22(2 Suppl):71-6. Review.
- Molloy CJ, Taylor DS, Weber H.** Angiotensin II stimulation of rapid protein tyrosine phosphorylation and protein kinase activation in rat aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1993 Apr 5;268(10):7338-45.
- Moreno M, Ramalho LN, Sancho-Bru P, Ruiz-Ortega M, Ramalho F, Abrales JG, Colmenero J, Dominguez M, Egido J, Arroyo V, Ginès P, Bataller R.** Atorvastatin attenuates angiotensin II-induced inflammatory actions in the liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2009 Feb;296(2):G147-56.
- Morris BJ, Iwamoto HS, Reid IA.** Localization of angiotensinogen in rat liver by immunocytochemistry. *Endocrinology.* 1979 Sep;105(3):796-800.
- Mukai Y, Shimokawa H, Matoba T, Kandabashi T, Satoh S, Hiroki J, Kaibuchi K, Takeshita A.** Involvement of Rho-kinase in hypertensive vascular disease: a novel therapeutic target in hypertension. *FASEB J.* 2001 Apr;15(6):1062-4.
- Nabeshima Y, Tazuma S, Kanno K, Hyogo H, Iwai M, Horiuchi M, Chayama K.** Anti-fibrogenic function of angiotensin II type 2 receptor in CCl₄-induced liver fibrosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Aug 4;346(3):658-64.
- Nakatsukasa H, Evarts RP, Hsia CC, Thorgeirsson SS.** Transforming growth factor-beta 1 and type I procollagen transcripts during regeneration and early fibrosis of rat liver. *Lab Invest.* 1990 Aug;63(2):171-80.
- Noda K, Saad Y, Karnik SS.** Interaction of Phe⁸ of angiotensin II with Lys¹⁹⁹ and His²⁵⁶ of AT₁ receptor in agonist activation. *J Biol Chem.* 1995 Dec 1;270(48):28511-4.
- Noda K, Feng YH, Liu XP, Saad Y, Husain A, Karnik SS.** The active state of the AT₁ angiotensin receptor is generated by angiotensin II induction. *Biochemistry.* 1996 Dec 24;35(51):16435-42.
- Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Caron MG, Barak LS.** Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J Biol Chem.* 2000 Jun 2;275(22):17201-10.
- Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Barak LS, Caron MG.** Molecular determinants underlying the formation of stable intracellular G protein-coupled receptor-beta-arrestin complexes after receptor endocytosis*. *J Biol Chem.* 2001 Jun 1;276(22):19452-60.
- Oakley F, Teoh V, Ching-A-Sue G, Bataller R, Colmenero J, Jonsson JR, Eliopoulos AG, Watson MR, Manas D, Mann DA.** Angiotensin II activates I kappaB kinase phosphorylation of RelA at Ser 536 to promote myofibroblast survival and liver fibrosis. *Gastroenterology.* 2009 Jun;136(7):2334-2344.e1.

- Olaso E, Ikeda K, Eng FJ, Xu L, Wang LH, Lin HC, Friedman SL.** DDR2 receptor promotes MMP-2-mediated proliferation and invasion by hepatic stellate cells. *J Clin Invest.* 2001 Nov;108(9):1369-78.
- Ornstein L.** Disk Electrophoresis. I. Background and Theory. *Ann N Y Acad Sci.* 1964 Dec 28;121:321-49.
- Paik YH, Schwabe RF, Bataller R, Russo MP, Jobin C, Brenner DA.** Toll-like receptor 4 mediates inflammatory signaling by bacterial lipopolysaccharide in human hepatic stellate cells. *Hepatology.* 2003 May;37(5):1043-55.
- Paizis G, Cooper ME, Schembri JM, Tikellis C, Burrell LM, Angus PW.** Up-regulation of components of the renin-angiotensin system in the bile duct-ligated rat liver. *Gastroenterology.* 2002 Nov;123(5):1667-76.
- Pagès G, Lenormand P, L'Allemain G, Chambard JC, Meloche S, Pouysségur J.** Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Sep 15;90(18):8319-23.
- Pan TL, Wang PW.** Explore the Molecular Mechanism of Apoptosis Induced by Tanshinone IIA on Activated Rat Hepatic Stellate Cells. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012;2012:734987.
- Parés A, Caballería J, Bruguera M, Torres M, Rodés J.** Histological course of alcoholic hepatitis. Influence of abstinence, sex and extent of hepatic damage. *J Hepatol.* 1986;2(1):33-42.
- Parola M, Bellomo G, Robino G, Barrera G, Dianzani MU.** 4-Hydroxynonenal as a biological signal: molecular basis and pathophysiological implications. *Antioxid Redox Signal.* 1999 Fall;1(3):255-84. Review.
- Parola M, Robino G.** Oxidative stress-related molecules and liver fibrosis. *J Hepatol.* 2001 Aug;35(2):297-306. Review.
- Pellegrin S, Mellor H.** Actin stress fibres. *J Cell Sci.* 2007 Oct 15;120(Pt 20):3491-9. Review.
- Perelló A, García-Pagán JC, Gilabert R, Suárez Y, Moitinho E, Cervantes F, Reverter JC, Escorsell A, Bosch J, Rodés J.** TIPS is a useful long-term derivative therapy for patients with Budd-Chiari syndrome uncontrolled by medical therapy. *Hepatology.* 2002 Jan;35(1):132-9.
- Piera-Velazquez S, Li Z, Jimenez SA.** Role of endothelial-mesenchymal transition (EndoMT) in the pathogenesis of fibrotic disorders. *Am J Pathol.* 2011 Sep;179(3):1074-80.
- Pinzani M, Gesualdo L, Sabbah GM, Abboud HE.** Effects of platelet-derived growth factor and other polypeptide mitogens on DNA synthesis and growth of cultured rat liver fat-storing cells. *J Clin Invest.* 1989 Dec;84(6):1786-93.
- Pinzani M, Abboud HE, Aron DC.** Secretion of insulin-like growth factor-I and binding proteins by rat liver fat-storing cells: regulatory role of platelet-derived growth factor. *Endocrinology.* 1990 Nov;127(5):2343-9.
- Pinzani M, Failli P, Ruocco C, Casini A, Milani S, Baldi E, Giotti A, Gentilini P.** Fat-storing cells as liver-specific pericytes. Spatial dynamics of agonist-stimulated intracellular calcium transients. *J Clin Invest.* 1992 Aug;90(2):642-6.
- Pinzani M, Milani S, De Franco R, Grappone C, Caligiuri A, Gentilini A, Tosti-Guerra C, Maggi M, Failli P, Ruocco C, Gentilini P.** Endothelin 1 is overexpressed in human cirrhotic liver and exerts multiple effects on activated hepatic stellate cells. *Gastroenterology.* 1996 Feb;110(2):534-48.
- Pinzani M.** PDGF and signal transduction in hepatic stellate cells. *Front Biosci.* 2002 Aug 1;7:d1720-6. Review.
- Poli G.** Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress. *Mol Aspects Med.* 2000 Jun;21(3):49-98. Review.
- Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B.** Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science.* 1998 Dec 11;282(5396):2085-8.

- Poynard T, Moussali J, Ratziu V, Regimbeau C, Opolon P.** Effects of interferon therapy in "non responder" patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 1999;31 Suppl 1:178-83. Review.
- Poynard T, McHutchison J, Davis GL, Esteban-Mur R, Goodman Z, Bedossa P, Albrecht J.** Impact of interferon alfa-2b and ribavirin on progression of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2000 Nov;32(5):1131-7.
- Prakash J, Sandovici M, Saluja V, Lacombe M, Schaapveld RQ, de Borst MH, van Goor H, Henning RH, Proost JH, Moolenaar F, Kéri G, Meijer DK, Poelstra K, Kok RJ.** Intracellular delivery of the p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor SB202190 [4-(4-fluorophenyl)-2-(4-hydroxyphenyl)-5-(4-pyridyl)1H-imidazole] in renal tubular cells: a novel strategy to treat renal fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006 Oct;319(1):8-19.
- Pugh RN, Murray-Lyon IM, Dawson JL, Pietroni MC, Williams R.** Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br J Surg.* 1973 Aug;60(8):646-9.
- Rane SG, Reddy EP.** Janus kinases: components of multiple signaling pathways. *Oncogene.* 2000 Nov 20;19(49):5662-79. Review.
- Rane SG, Reddy EP.** JAKs, STATs and Src kinases in hematopoiesis. *Oncogene.* 2002 May 13;21(21):3334-58. Review.
- Ramachandran P, Iredale JP.** Reversibility of liver fibrosis. *Ann Hepatol.* 2009 Oct-Dec;8(4):283-91. Review.
- Ramadori G, Rieder H, Knittel T, Dienes HP, Meyer zum Büschenfelde KH.** Fat storing cells (FSC) of rat liver synthesize and secrete fibronectin. Comparison with hepatocytes. *J Hepatol.* 1987 Apr;4(2):190-7.
- Ramakrishnan V, Kimlinger T, Haug J, Timm M, Wellik L, Halling T, Pardanani A, Tefferi A, Rajkumar SV, Kumar S.** TG101209, a novel JAK2 inhibitor, has significant *in vitro* activity in multiple myeloma and displays preferential cytotoxicity for CD45+ myeloma cells. *Am J Hematol.* 2010 Sep;85(9):675-86.
- Ray S, Sherman CT, Lu M, Brasier AR.** Angiotensinogen gene expression is dependent on signal transducer and activator of transcription 3-mediated p300/cAMP response element binding protein-binding protein coactivator recruitment and histone acetyltransferase activity. *Mol Endocrinol.* 2002 Apr;16(4):824-36.
- Reiter E, Lefkowitz RJ.** GRKs and beta-arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. *Trends Endocrinol Metab.* 2006 May-Jun;17(4):159-65. Epub 2006 Apr 3. Review.
- Reynaert H, Thompson MG, Thomas T, Geerts A.** Hepatic stellate cells: role in microcirculation and pathophysiology of portal hypertension. *Gut.* 2002 Apr;50(4):571-81.
- Richoux JP, Cordonnier JL, Bouhnik J, Clauser E, Corvol P, Menard J, Grignon G.** Immunocytochemical localization of angiotensinogen in rat liver and kidney. *Cell Tissue Res.* 1983;233(2):439-51.
- Riento K, Ridley AJ.** Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003 Jun;4(6):446-56. Review.
- Rincón-Sánchez AR, Covarrubias A, Rivas-Estilla AM, Pedraza-Chaverri J, Cruz C, Islas-Carbajal MC, Panduro A, Estanes A, Armendáriz-Borunda J.** PGE2 alleviates kidney and liver damage, decreases plasma renin activity and acute phase response in cirrhotic rats with acute liver damage. *Exp Toxicol Pathol.* 2005 Mar;56(4-5):291-303.
- Robertson SA, Koleva RI, Argetsinger LS, Carter-Su C, Marto JA, Feener EP, Myers MG Jr.** Regulation of Jak2 function by phosphorylation of Tyr317 and Tyr637 during cytokine signaling. *Mol Cell Biol.* 2009 Jun;29(12):3367-78.
- Robino G, Parola M, Marra F, Caligiuri A, De Franco RM, Zamara E, Bellomo G, Gentilini P, Pinzani M, Dianzani MU.** Interaction between 4-hydroxy-2,3-alkenals and the platelet-derived growth factor-beta receptor. Reduced tyrosine phosphorylation and downstream signaling in hepatic stellate cells. *J Biol Chem.* 2000 Dec 22;275(51):40561-7.

- Robino G, Zamara E, Novo E, Dianzani MU, Parola M.** 4-Hydroxy-2,3-alkenals as signal molecules modulating proliferative and adaptative cell responses. *Biofactors*. 2001;15(2-4):103-6. Review.
- Rockey DC, Boyles JK, Gabbiani G, Friedman SL.** Rat hepatic lipocytes express smooth muscle actin upon activation *in vivo* and in culture. *J Submicrosc Cytol Pathol*. 1992 Apr;24(2):193-203.
- Rockey DC, Housset CN, Friedman SL.** Activation-dependent contractility of rat hepatic lipocytes in culture and *in vivo*. *J Clin Invest*. 1993 Oct;92(4):1795-804.
- Rockey DC.** Hepatic blood flow regulation by stellate cells in normal and injured liver. *Semin Liver Dis*. 2001 Aug;21(3):337-49. Review.
- Rockey DC.** Vascular mediators in the injured liver. *Hepatology*. 2003 Jan;37(1):4-12. Review.
- Rockey DC.** Hepatic fibrosis, stellate cells, and portal hypertension. *Clin Liver Dis*. 2006 Aug;10(3):459-79, vii-viii. Review.
- Rossman KL, Der CJ, Sondak J.** GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005 Feb;6(2):167-80. Review.
- Saab S, Tam S, Tran Bi, Melton A, Tangkijvanich P, Wong H, Yee H Jr.** Myosin mediates contractile force generation by hepatic stellate cells in response to endothelin-1. *J Biomed Sci*. 2002 Nov-Dec;9(6 Pt 2):607-12.
- Saharinen P, Vihinen M, Silvennoinen O.** Autoinhibition of Jak2 tyrosine kinase is dependent on specific regions in its pseudokinase domain. *Mol Biol Cell*. 2003 Apr;14(4):1448-59.
- Saile B, Knittel T, Matthes N, Schott P, Ramadori G.** CD95/CD95L-mediated apoptosis of the hepatic stellate cell. A mechanism terminating uncontrolled hepatic stellate cell proliferation during hepatic tissue repair. *Am J Pathol*. 1997 Nov;151(5):1265-72.
- Sakaida I, Matsumura Y, Kubota M, Kayano K, Takenaka K, Okita K.** The prolyl 4-hydroxylase inhibitor HOE 077 prevents activation of Ito cells, reducing procollagen gene expression in rat liver fibrosis induced by choline-deficient L-amino acid-defined diet. *Hepatology*. 1996 Apr;23(4):755-63.
- Sakaida I, Uchida K, Hironaka K, Okita K.** Prolyl 4-hydroxylase inhibitor (HOE 077) prevents TIMP-1 gene expression in rat liver fibrosis. *J Gastroenterol*. 1999 Jun;34(3):376-7.
- Sakata T, Takenaga N, Endoh T, Wada O, Matsuki K.** Diagnostic significance of serum angiotensin-converting enzyme activity in biochemical tests with special reference of chronic liver diseases. *Jpn J Med*. 1991 Sep-Oct;30(5):402-7.
- Salgado S, Garcia J, Vera J, Siller F, Bueno M, Miranda A, Segura A, Grijalva G, Segura J, Orozco H, Hernandez-Pando R, Fafutis M, Aguilar LK, Aguilar-Cordova E, Armendariz-Borunda J.** Liver cirrhosis is reverted by urokinase-type plasminogen activator gene therapy. *Mol Ther*. 2000 Dec;2(6):545-51.
- Saltman S, Baukal A, Waters S, Bumpus FM, Catt KJ.** Competitive binding activity of angiotensin II analogues in an adrenal cortex radioligand-receptor assay; *Endocrinology*. 1975 Aug;97(2):275-82.
- Sambrook J und Russel DW.** Molecular Cloning – A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001, Cold Spring Harbor, New York.
- Santos RA, Ferreira AJ, Simões E Silva AC.** Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis. *Exp Physiol*. 2008 May;93(5):519-27.
- Sauerbruch T, Appenrodt B, Schmitz V, Spengler U.** Conservative and interventional treatments for liver cirrhosis—part 2 of a series on liver cirrhosis; *Dtsch Arztebl Int* 2013; 110(8): 126-32.
- Savolainen VT, Penttilä A, Karhunen PJ.** Delayed increases in liver cirrhosis mortality and frequency of alcoholic liver cirrhosis following an increment and redistribution of alcohol consumption in Finland: evidence from mortality statistics and autopsy survey covering 8533 cases in 1968-1988. *Alcohol Clin Exp Res*. 1992 Aug;16(4):661-4.

- Sawa H.** Angiotensinogen: gene expression and protein localization in human tissues. *Hokkaido Igaku Zasshi*. 1990 Mar;65(2):189-99. Japanese.
- Schaffner F, Poper H.** Capillarization of hepatic sinusoids in man. *Gastroenterology*. 1963 Mar;44:239-42.
- Schäfer S, Zerbe O, Gressner AM.** The synthesis of proteoglycans in fat-storing cells of rat liver. *Hepatology*. 1987 Jul-Aug;7(4):680-7.
- Shenoy SK, Lefkowitz RJ.** Multifaceted roles of beta-arrestins in the regulation of seven-membrane-spanning receptor trafficking and signalling. *Biochem J*. 2003 Nov 1;375(Pt 3):503-15. Review.
- Shenoy SK, Lefkowitz RJ.** Angiotensin II-stimulated signaling through G proteins and beta-arrestin. *Sci STKE*. 2005 Nov 22;2005(311):cm14.
- Shenoy SK, Drake MT, Nelson CD, Houtz DA, Xiao K, Madabushi S, Reiter E, Premont RT, Lichtarge O, Lefkowitz RJ.** beta-arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the beta2 adrenergic receptor. *J Biol Chem*. 2006 Jan 13;281(2):1261-73.
- Schepke M, Werner E, Biecker E, Schiedermaier P, Heller J, Neef M, Stoffel-Wagner B, Hoffer U, Caselmann WH, Sauerbruch T.** Hemodynamic effects of the angiotensin II receptor antagonist irbesartan in patients with cirrhosis and portal hypertension. *Gastroenterology*. 2001 Aug;121(2):389-95.
- Schiff, ER.; Sorrell, MF.; Maddrey, EC., editors.** Schiff's Diseases of the Liver. 9th Edition. Lippincott, Williams & Wilkins; Philadelphia: 2003.
- Schindler C, Bramlage P, Kirch W, Ferrario CM.** Role of the vasodilator peptide angiotensin-(1-7) in cardiovascular drug therapy. *Vasc Health Risk Manag*. 2007;3(1):125-37. Review.
- Schnabl B, Purbeck CA, Choi YH, Hagedorn CH, Brenner D.** Replicative senescence of activated human hepatic stellate cells is accompanied by a pronounced inflammatory but less fibrogenic phenotype. *Hepatology*. 2003 Mar;37(3):653-64.
- Schuppan D, Afdhal NH.** Liver cirrhosis. *Lancet*. 2008 Mar 8;371(9615):838-51. Review.
- Schürch W, Seemayer TA, Gabbiani G.** The myofibroblast: a quarter century after its discovery. *Am J Surg Pathol*. 1998 Feb;22(2):141-7. Review.
- Schwabe RF, Bataller R, Brenner DA.** Human hepatic stellate cells express CCR5 and RANTES to induce proliferation and migration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2003 Nov;285(5):G949-58.
- Seki E, De Minicis S, Osterreicher CH, Kluwe J, Osawa Y, Brenner DA, Schwabe RF.** TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. *Nat Med*. 2007 Nov;13(11):1324-32.
- Seko T, Ito M, Kureishi Y, Okamoto R, Moriki N, Onishi K, Isaka N, Hartshorne DJ, Nakano T.** Activation of RhoA and inhibition of myosin phosphatase as important components in hypertension in vascular smooth muscle. *Circ Res*. 2003 Mar 7;92(4):411-8.
- Seta K, Nanamori M, Modrall JG, Neubig RR, Sadoshima J.** AT1 receptor mutant lacking heterotrimeric G protein coupling activates the Src-Ras-ERK pathway without nuclear translocation of ERKs. *J Biol Chem*. 2002 Mar 15;277(11):9268-77.
- Seyde WC, Longnecker DE.** Anesthetic influences on regional hemodynamics in normal and hemorrhaged rats. *Anesthesiology*. 1984 Dec;61(6):686-98.
- Sherlock, S.; Dooley, J., editors.** Diseases of the Liver and Biliary System. 11th Edition. Blackwell Science; Oxford, UK; Malden, MA: 2002.
- Sherman M, Klein A.** AASLD single-topic research conference on hepatocellular carcinoma: Conference proceedings. *Hepatology*. 2004 Dec;40(6):1465-73.
- Shi SY, Martin RG, Duncan RE, Choi D, Lu SY, Schroer SA, Cai EP, Luk CT, Hopperton KE, Domenichiello AF, Tang C, Naples M, Dekker MJ, Giacca A, Adeli K, Wagner KU, Bazinet RP, Woo M.** Hepatocyte-specific deletion of Janus kinase 2 (JAK2) protects against diet-induced steatohepatitis and glucose intolerance. *J Biol Chem*. 2012 Mar 23;287(13):10277-88.

- Siegmund SV, Dooley S, Brenner DA.** Molecular mechanisms of alcohol-induced hepatic fibrosis. *Dig Dis.* 2005;23(3-4):264-74. Review.
- Silvennoinen O, Ihle JN, Schlessinger J, Levy DE.** Interferon-induced nuclear signalling by Jak protein tyrosine kinases. *Nature.* 1993 Dec 9;366(6455):583-5.
- Silvennoinen O, Witthuhn BA, Quelle FW, Cleveland JL, Yi T, Ihle JN.** Structure of the murine Jak2 protein-tyrosine kinase and its role in interleukin 3 signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Sep 15;90(18):8429-33.
- Skeggs LT Jr, Kahn JR, Shumway NP.** The isolation and assay of hypertension from blood. *J Exp Med.* 1952 Mar;95(3):241-6.
- Smith RD, Hunyady L, Olivares-Reyes JA, Mihalik B, Jayadev S, Catt KJ.** Agonist-induced phosphorylation of the angiotensin AT1a receptor is localized to a serine/threonine-rich region of its cytoplasmic tail. *Mol Pharmacol.* 1998 Dec;54(6):935-41.
- Somlyo AP, Somlyo AV.** Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J Physiol.* 2000 Jan 15;522 Pt 2:177-85.
- Somlyo AP, Somlyo AV.** Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev.* 2003 Oct;83(4):1325-58. Review.
- Sos BC, Harris C, Nordstrom SM, Tran JL, Balázs M, Caplazi P, Febbraio M, Applegate MA, Wagner KU, Weiss EJ.** Abrogation of growth hormone secretion rescues fatty liver in mice with hepatocyte-specific deletion of JAK2. *J Clin Invest.* 2011 Apr;121(4):1412-23.
- Steensma DP, Dewald GW, Lasho TL, Powell HL, McClure RF, Levine RL, Gilliland DG, Tefferi A.** The JAK2 V617F activating tyrosine kinase mutation is an infrequent event in both "atypical" myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2005 Aug 15;106(4):1207-9.
- Steiner JW, Carruthers JS.** Studies on the fine structure of proliferated bile ductules. II. Changes of the ductule-connective tissue envelope relationship. *Can Med Assoc J.* 1961 Dec 9;85:1275-87.
- Szuster-Ciesielska A, Plewka K, Daniluk J, Kandefer-Szerszeń M.** Zinc supplementation attenuates ethanol- and acetaldehyde-induced liver stellate cell activation by inhibiting reactive oxygen species (ROS) production and by influencing intracellular signaling. *Biochem Pharmacol.* 2009 Aug 1;78(3):301-14.
- Taal MW, Brenner BM.** Renoprotective benefits of RAS inhibition: from ACEI to angiotensin II antagonists. *Kidney Int.* 2000 May;57(5):1803-17.
- Takahara T, Kojima T, Miyabayashi C, Inoue K, Sasaki H, Muragaki Y, Ooshima A.** Collagen production in fat-storing cells after carbon tetrachloride intoxication in the rat. Immunoelectron microscopic observation of type I, type III collagens, and prolyl hydroxylase. *Lab Invest.* 1988 Oct;59(4):509-21.
- Takehara T, Tatsumi T, Suzuki T, Rucker EB 3rd, Hennighausen L, Jinushi M, Miyagi T, Kanazawa Y, Hayashi N.** Hepatocyte-specific disruption of Bcl-xL leads to continuous hepatocyte apoptosis and liver fibrotic responses. *Gastroenterology.* 2004 Oct;127(4):1189-97.
- Thiery JP, Sleeman JP.** Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006 Feb;7(2):131-42. Review.
- Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA.** Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell.* 2009 Nov 25;139(5):871-90. Review.
- Thimman MS, Yee HF Jr.** Quantitation of rat hepatic stellate cell contraction: stellate cells' contribution to sinusoidal resistance. *Am J Physiol.* 1999 Jul;277(1 Pt 1):G137-43.
- Thomas WG, Qian H, Chang CS, Karnik S.** Agonist-induced phosphorylation of the angiotensin II (AT(1A)) receptor requires generation of a conformation that is distinct from the inositol phosphate-signaling state. *J Biol Chem.* 2000 Jan 28;275(4):2893-900.
- Thomas WG, Qian H.** Arresting angiotensin type 1 receptors. *Trends Endocrinol Metab.* 2003 Apr;14(3):130-6. Review.

- Timmermans PB, Chiu AT, Herblin WF, Wong PC, Smith RD.** Angiotensin II receptor subtypes. *Am J Hypertens.* 1992 Jun;5(6 Pt 1):406-10. Review.
- Touyz RM, Berry C.** Recent advances in angiotensin II signaling. *Braz J Med Biol Res.* 2002 Sep;35(9):1001-15.
- Trebicka J, Hennenberg M, Laleman W, Shelest N, Biecker E, Schepke M, Nevens F, Sauerbruch T, Heller J.** Atorvastatin lowers portal pressure in cirrhotic rats by inhibition of RhoA/Rho-kinase and activation of endothelial nitric oxide synthase. *Hepatology.* 2007 Jul;46(1):242-53.
- Trebicka J, Leifeld L, Hennenberg M, Biecker E, Eckhardt A, Fischer N, Pröbsting AS, Clemens C, Lammert F, Sauerbruch T, Heller J.** Hemodynamic effects of urotensin II and its specific receptor antagonist palosuran in cirrhotic rats. *Hepatology.* 2008 Apr;47(4):1264-76.
- Trebicka J, Hennenberg M, Schulze Pröbsting A, Laleman W, Klein S, Granzow M, Nevens F, Zaagsma J, Heller J, Sauerbruch T.** Role of beta3-adrenoceptors for intrahepatic resistance and portal hypertension in liver cirrhosis. *Hepatology.* 2009 Dec;50(6):1924-35.
- Trebicka J, Hennenberg M, Odenthal M, Shir K, Klein S, Granzow M, Vogt A, Dienes HP, Lammert F, Reichen J, Heller J, Sauerbruch T.** Atorvastatin attenuates hepatic fibrosis in rats after bile duct ligation via decreased turnover of hepatic stellate cells. *J Hepatol.* 2010 Oct;53(4):702-12.
- Trim N, Morgan S, Evans M, Issa R, Fine D, Afford S, Wilkins B, Iredale J.** 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 Apr;156(4):1235-43.
- Tsuda T, Kawahara Y, Ishida Y, Koide M, Shii K, Yokoyama M.** Angiotensin II stimulates two myelin basic protein/microtubule-associated protein 2 kinases in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1992 Sep;71(3):620-30.
- Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T, Tamakawa H, Yamagami K, Inui J, Maekawa M, Narumiya S.** Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature.* 1997 Oct 30;389(6654):990-4.
- Uesugi T, Froh M, Arteel GE, Bradford BU, Thurman RG.** Toll-like receptor 4 is involved in the mechanism of early alcohol-induced liver injury in mice. *Hepatology.* 2001 Jul;34(1):101-8.
- Uhal BD, Li X, Piasecki CC, Molina-Molina M.** Angiotensin signalling in pulmonary fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012 Mar;44(3):465-8. Review.
- Unger T, Chung O, Csikos T, Culman J, Gallinat S, Gohlke P, Höhle S, Meffert S, Stoll M, Stroth U, Zhu YZ.** Angiotensin receptors. *J Hypertens Suppl.* 1996 Dec;14(5):S95-103. Review.
- Ushio-Fukai M, Griendling KK, Akers M, Lyons PR, Alexander RW.** Temporal dispersion of activation of phospholipase C-beta1 and -gamma isoforms by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. Role of alphaq/11, alpha12, and beta gamma G protein subunits. *J Biol Chem.* 1998 Jul 31;273(31):19772-7.
- van Beuge MM, Prakash J, Lacombe M, Gosens R, Post E, Reker-Smit C, Beljaars L, Poelstra K.** Reduction of fibrogenesis by selective delivery of a Rho kinase inhibitor to hepatic stellate cells in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011 Jun;337(3):628-35.
- van Beuge MM, Prakash J, Lacombe M, Post E, Reker-Smit C, Beljaars L, Poelstra K.** Increased liver uptake and reduced hepatic stellate cell activation with a cell-specific conjugate of the Rho-kinase inhibitor Y27632. *Pharm Res.* 2011 Aug;28(8):2045-54.
- Van de Casteele M, Sägerser H, Zimmermann H, Reichen J.** Characterisation of portal hypertension models by microspheres in anaesthetised rats: a comparison of liver flow. *Pharmacol Ther.* 2001 Apr;90(1):35-43. Review.
- Verstovsek S, Kantarjian H, Mesa RA, Pardanani AD, Cortes-Franco J, Thomas DA, Estrov Z, Fridman JS, Bradley EC, Erickson-Viitanen S, Vaddi K, Levy R, Tefferi A.** Safety and efficacy of INCB018424, a JAK1 and JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. *N Engl J Med.* 2010 Sep 16;363(12):1117-27.

- Villalonga P, Guasch RM, Riento K, Ridley AJ.** RhoE inhibits cell cycle progression and Ras-induced transformation. *Mol Cell Biol.* 2004 Sep;24(18):7829-40.
- Wagner H, Bauer S.** All is not Toll: new pathways in DNA recognition. *J Exp Med.* 2006 Feb 20;203(2):265-8. Review.
- Wolf G.** Novel aspects of the renin-angiotensin-aldosterone-system. *Front Biosci.* 2008 May 1;13:4993-5005. Review.
- Yee HF Jr.** Ca²⁺ and rho signaling pathways: two paths to hepatic stellate cell contraction. *Hepatology.* 2001 Apr;33(4):1007-8. Review.
- Wake K.** Perisinusoidal stellate cells (fat-storing cells, interstitial cells, lipocytes), their related structure in and around the liver sinusoids, and vitamin A-storing cells in extrahepatic organs. *Int Rev Cytol.* 1980;66:303-53. Review.
- Wang YJ, Wang SS, Bickel M, Guenzler V, Gerl M, Bissell DM.** Two novel antifibrotics, HOE 077 and Safironil, modulate stellate cell activation in rat liver injury: differential effects in males and females. *Am J Pathol.* 1998 Jan;152(1):279-87.
- Wanless IR, Nakashima E, Sherman M.** Regression of human cirrhosis. Morphologic features and the genesis of incomplete septal cirrhosis. *Arch Pathol Lab Med.* 2000 Nov;124(11):1599-607.
- Watling D, Guschin D, Müller M, Silvennoinen O, Witthuhn BA, Quelle FW, Rogers NC, Schindler C, Stark GR, Ihle JN, et al.** Complementation by the protein tyrosine kinase JAK2 of a mutant cell line defective in the interferon-gamma signal transduction pathway. *Nature.* 1993 Nov 11;366(6451):166-70.
- Wei H, Ahn S, Shenoy SK, Karnik SS, Hunyady L, Luttrell LM, Lefkowitz RJ.** Independent beta-arrestin 2 and G protein-mediated pathways for angiotensin II activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Sep 16;100(19):10782-7.
- Wettschureck N, Offermanns S.** Rho/Rho-kinase mediated signaling in physiology and pathophysiology. *J Mol Med (Berl).* 2002 Oct;80(10):629-38. Review.
- Wiest R, Lock G, Schölmerich J.** Portal hypertension. *Internist (Berl).* 2000 Oct;41(10):1077-95; quiz 1095. Review. German.
- Wilks AF.** Two putative protein-tyrosine kinases identified by application of the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Mar;86(5):1603-7.
- Willets JM, Challiss RA, Nahorski SR.** Non-visual GRKs: are we seeing the whole picture? *Trends Pharmacol Sci.* 2003 Dec;24(12):626-33. Review.
- Yamaoka K, Saharinen P, Pesu M, Holt VE 3rd, Silvennoinen O, O'Shea JJ.** The Janus kinases (Jaks). *Genome Biol.* 2004;5(12):253. Review.
- Yanase M, Ikeda H, Ogata I, Matsui A, Noiri E, Tomiya T, Arai M, Inoue Y, Tejima K, Nagashima K, Nishikawa T, Shibata M, Ikebe M, Rojkind M, Fujiwara K.** Functional diversity between Rho-kinase- and MLCK-mediated cytoskeletal actions in a myofibroblast-like hepatic stellate cell line. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 May 30;305(2):223-8.
- Yee HF Jr.** Rho directs activation-associated changes in rat hepatic stellate cell morphology via regulation of the actin cytoskeleton. *Hepatology.* 1998 Sep;28(3):843-50.
- Yee HF Jr, Melton AC, Tran BN.** RhoA/rho-associated kinase mediates fibroblast contractile force generation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 Feb 9;280(5):1340-5.
- Yee HF Jr.** Ca²⁺ and rho signaling pathways: two paths to hepatic stellate cell contraction. *Hepatology.* 2001 Apr;33(4):1007-8.
- Yoshiji H, Kuriyama S, Miyamoto Y, Thorgeirsson UP, Gomez DE, Kawata M, Yoshii J, Ike-naka Y, Noguchi R, Tsujinoue H, Nakatani T, Thorgeirsson SS, Fukui H.** Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promotes liver fibrosis development in a transgenic mouse model. *Hepatology.* 2000 Dec;32(6):1248-54.

- Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Nakatani T, Tsujinoue H, Fukui H.** Angiotensin-II type 1 receptor interaction is a major regulator for liver fibrosis development in rats. *Hepatology*. 2001 Oct;34(4 Pt 1):745-50.
- Yu AS, Ahmed A, Keeffe EB.** Liver transplantation: evolving patient selection criteria. *Can J Gastroenterol*. 2001 Nov;15(11):729-38. Review.
- Yu HC, Qin HY, He F, Wang L, Fu W, Liu D, Guo FC, Liang L, Dou KF, Han H.** Canonical notch pathway protects hepatocytes from ischemia/reperfusion injury in mice by repressing reactive oxygen species production through JAK2/STAT3 signaling. *Hepatology*. 2011 Sep 2;54(3):979-88.
- Zhan SS, Jiang JX, Wu J, Halsted C, Friedman SL, Zern MA, Torok NJ.** Phagocytosis of apoptotic bodies by hepatic stellate cells induces NADPH oxidase and is associated with liver fibrosis *in vivo*. *Hepatology*. 2006 Mar;43(3):435-43.
- Zhang J, Ferguson SS, Barak LS, Ménard L, Caron MG.** Dynamin and beta-arrestin reveal distinct mechanisms for G protein-coupled receptor internalization. *J Biol Chem*. 1996 Aug 2;271(31):18302-5.
- Zhou Q, Hennenberg M, Trebicka J, Jochem K, Leifeld L, Biecker E, Sauerbruch T, Heller J.** Intrahepatic upregulation of RhoA and Rho-kinase signalling contributes to increased hepatic vascular resistance in rats with secondary biliary cirrhosis. *Gut*. 2006 Sep;55(9):1296-305.
- Zhou XD, Tang ZY, Yang BH, Lin ZY, Ma ZC, Ye SL, Wu ZQ, Fan J, Qin LX, Zheng BH.** Experience of 1000 patients who underwent hepatectomy for small hepatocellular carcinoma. *Cancer*. 2001 Apr 15;91(8):1479-86.
- Zhuang G, Wu X, Jiang Z, Kasman I, Yao J, Guan Y, Oeh J, Modrusan Z, Bais C, Sampath D, Ferrara N.** Tumour-secreted miR-9 promotes endothelial cell migration and angiogenesis by activating the JAK-STAT pathway. *EMBO J*. 2012 Aug 29;31(17):3513-23.

VII. ANHANG

1. Publikationen

Klein S, Van Beuge MM, Granzow M, Beljaars L, Schierwagen R, Kilic S, Heidari I, Huss S, Sauerbruch T, Poelstra K, Trebicka J. HSC-specific inhibition of Rho-kinase reduces portal pressure in cirrhotic rats without major systemic effects. *J Hepatol.* 2012 Dec;57(6):1220-7.

Klein S, Klösel J, Schierwagen R, Körner C, Granzow M, Huss S, Mazar IG, Weber S, van den Ven PF, Pieper-Fürst U, Fürst DO, Nattermann J, Lammert F, Sauerbruch T, Trebicka J. Atorvastatin inhibits proliferation and apoptosis, but induces senescence in hepatic myofibroblasts and thereby attenuates hepatic fibrosis in rats. *Lab Invest.* 2012 Oct;92(10):1440-50.

Wojtalla A, Herweck F, Granzow M, Klein S, Trebicka J, Huss S, Lerner R, Lutz B, Schildberg FA, Knolle PA, Sauerbruch T, Singer MV, Zimmer A, Siegmund SV. 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 Apr 15;302(8):G873-87.

Trebicka J, Racz I, Siegmund SV, Cara E, Granzow M, Schierwagen R, Klein S, Wojtalla A, Hennenberg M, Huss S, Fischer HP, Heller J, Zimmer A, Sauerbruch T. 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 Jul;31(6):860-70.

Hennenberg M, Trebicka J, Kohistani Z, Stark C, Nischalke HD, Krämer B, Körner C, Klein S, Granzow M, Fischer HP, Heller J, Sauerbruch T. Hepatic and HSC-specific sorafenib effects in rats with established secondary biliary cirrhosis. *Lab Invest.* 2011 Feb;91(2):241-51.

Trebicka J, Hennenberg M, Odenthal M, Shir K, Klein S, Granzow M, Vogt A, Dienes HP, Lammert F, Reichen J, Heller J, Sauerbruch T. Atorvastatin attenuates hepatic fibrosis in rats after bile duct ligation via decreased turnover of hepatic stellate cells. *J Hepatol.* 2010 Oct;53(4):702-12.

Trebicka J, Hennenberg M, Schulze Pröbsting A, Laleman W, Klein S, Granzow M, Nevens F, Zaagsma J, Heller J, Sauerbruch T. Role of beta3-adrenoceptors for intrahepatic resistance and portal hypertension in liver cirrhosis. *Hepatology.* 2009 Dec;50(6):1924-35.

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Tilman Sauerbruch herzlich für die Betreuung der Doktorarbeit bedanken. Die vielen Gespräche und sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit haben wesentlich zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen.

Außerdem möchte ich Prof. Dr. Dieter Fürst für die Bereitschaft zur Anfertigung des Zweitgutachtens danken sowie für die Bereitstellung des Fluoreszenzmikroskops im Institut für Zellbiologie.

Ein großer Dank geht an Dr. Jonel Trebicka, der mich durch seine engagierte Betreuung und stete Diskussionsbereitschaft mit vielseitigen Denkanstößen bereichert und bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt hat. Durch die zahlreichen Kooperationen, die er im Laufe der Zeit aufgebaut hat, konnte auch ich wertvolle Kontakte knüpfen.

Meiner gesamten Arbeitsgruppe möchte ich für die gute Arbeitsatmosphäre und die Hilfestellungen zu jeder Zeit danken. Mit meinen Kollegen Sabine Klein und Robert Schierwagen hatte ich schöne Jahre im „Denkraum“, den wir nach einigem Nachdenken allerdings wieder in „Büro“ umbenannt haben. Super war auch die Bereitschaft von jedem sofort Kaffee zu kochen, wenn es „verlangt“ wurde. Und Robert: Vielen Dank auch für die ganze Nachtschicht-Immunhistochemie ☺.

Des Weiteren wären noch die zwei fähigsten TA's der Uniklinik zu erwähnen: Gudrun Hack und Silke Bellinghausen. Danke nicht nur für „*excellent technical assistant*“, sondern auch für den Heidenspaß auf diversen Veranstaltungen (Sommerfest, Schiff, Karneval, ...).

Zudem muss ich mich bei einigen Leuten aus der AG Zimmer bedanken: Eva, Ben, Svenja, Irene und Caro... Auf euch konnte man sowohl an der Arbeit als auch nach Feierabend zählen - da ging es regelmäßig um die Wurst!

Ein weiterer Dank richtet sich an Benni. Er hat nicht nur mein verrostetes Herrenrad auf Vordermann gebracht, so dass ich den Venusberg wieder in Rekordgeschwindigkeit hochneugieren konnte, sondern mir auch die Uni-Bibliothek inkl. VPN-Nutzung näher gebracht.

Und dir Alex danke ich neben dem Wurstprogramm vor allem dafür, dass du meine Arbeit mehrmals korrigiert hast und ich immer auf ein Käffchen bei dir vorbeiflanieren und meiner Dysthymie entkommen konnte. Ohne diese Lichtblicke wäre das hier alles nicht zu schaffen gewesen. Denn: Ich raste auch aus... ☺

Dir, meinem lieben Freund Till, kann ich gar nicht genug danken. Du hast mich immer in allem unterstützt, mein Gejammer ertragen und mich auch in schweren Zeiten niemals alleine gelassen. 1000 Dank dafür!

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern danken, die mir durch ihre fortwährende Unterstützung das Studium und diese Arbeit erst ermöglicht haben. Ein besonderer Dank gilt dabei meinem Vater, der meine Promotion leider nicht mehr miterleben kann. Er war es, der mich immer angetrieben und mir die Kraft gegeben hat durchzuhalten. Danke Papa. Ich weiß, du wärst stolz auf mich.