

Nepriylsin und seine Rolle in der Fibrogenese und portalen Hypertension

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

**Winfried Heinrich Reul
aus Würzburg
2018**

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Jonel Trebicka
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Ivar von Kügelgen

Tag der Mündlichen Prüfung: 15.03.2018

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I - Allgemeine Innere Medizin
Direktor: Prof. Dr. med. Christian P. Strassburg

Inhaltsverzeichnis

1.	Abkürzungsverzeichnis	6
2.	Einleitung	9
2.1	Ätiologie und Epidemiologie der Leberzirrhose	9
2.2	Komplikationen	10
2.3	Pathogenese der Portalen Hypertension	10
2.4	Diagnostik und Therapiemöglichkeiten	13
2.5	Anatomische Grundlagen	15
2.6	Pathogenese der Leberfibrose	17
2.7	Hepatische Sternzellen (HSC)	17
2.8	Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAS)	21
2.8.1	Der Angiotensin-II-Rezeptor Subtyp 1 (AT1R)	22
2.8.2	Der Mas Rezeptor (MasR)	24
2.8.3	Nepriylsin (NEP) und seine Rolle im RAS	27
2.8.4	Das Neuropeptid Y (NPY)	30
3.	Fragestellung	33
4.	Material und Methoden	34
4.1	Material	34
4.1.1	Antikörper	34
4.1.2	Oligonukleotide	35
4.1.3	Kits	35
4.1.4	Software	36
4.1.5	Versuchstiere	36
4.1.5.1	Nepriylsin Knock-Out Mäuse	37
4.2	<i>In vivo</i> Methoden	37
4.2.1	Narkosetechnik	37
4.2.2	Induktion der Fibrose mittels Tetrachlorkohlenstoff (CCl ₄)-Intoxikation	37
4.2.3	Hämodynamische Messung und Organentnahme	38

4.2.4	Isolierung primärer muriner HSC	38
4.3	Molekularbiologische Methoden	39
4.3.1	Isolierung und Reinigung von DNA	40
4.3.2	Isolierung und Reinigung von RNA	40
4.3.3	Horizontale Gelelektrophorese – Auftrennung von DNA	40
4.3.4	Polymerasekettenreaktion (PCR)	41
4.3.4.1	Standard PCR	41
4.3.4.2	Reverse Transkription	41
4.3.4.3	Relative Echtzeit-PCR (rtPCR)	41
4.4	Biochemische Methoden	42
4.4.1	Homogenisierung von Leberproben	42
4.4.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	42
4.4.3	Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	43
4.4.4	Transfer von Proteinen auf eine Membran (Western Blot)	43
4.4.5	Immunologische Detektion von Proteinen mittels Chemilumineszenz	44
4.4.6	Densitometrische Quantifizierung der Proteinmenge	44
4.4.7	Hydroxyprolinmessung	44
4.5	Zellbiologische Methoden	45
4.5.1	Zellzahlbestimmung	45
4.5.2	Zellkultivierung	46
4.5.3	NPY Inkubation der Zellen	46
4.5.4	Ernten der Zellen für DNA- oder RNA-Isolation	46
4.5.5	HSC Kontraktionsassay	46
4.6	Immunhistochemie	47
4.6.1	α -smooth muscle actin (α -SMA)-Färbung	47
4.6.2	Sirius-Rot Färbung	47
4.6.3	Auswertung der Immunhistochemie	48
4.7	Statistische Auswertung	48
5.	Ergebnisse	49
5.1	Allgemeine Charakteristika des Tiermodells	49

5.2	Hydroxyprolingehalt	50
5.3	Sirius-Rot Färbung	51
5.4	Portaldruck	53
5.5	α -SMA Färbung	54
5.6	Hepatische mRNA Expression von Bestandteilen des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems	56
5.7	NPY Proteinexpression	57
5.8	mRNA Expression in aktivierten HSC	58
5.9	HSC Kontraktionsversuche	60
5.10	Proteinspiegel der AT1R-Signalkaskade in aktivierten HSC	61
6.	Diskussion	62
6.1	Auswirkungen der Neprilysin Defizienz auf den hepatischen Phänotyp	62
6.2	NPY als mögliches Schlüsselprotein zwischen Kontraktion und Fibrose	64
6.3	Ausblick und mögliche therapeutische Relevanz	66
7.	Zusammenfassung	68
8.	Literaturverzeichnis	70
9.	Danksagung	85

1. Abkürzungsverzeichnis

α -SMA	Alpha-smooth muscle actin
ACE	Angiotensin converting enzyme
ACE2	Angiotensin converting enzyme 2
Akt	Protein Kinase B
ANG I	Angiotensin I
ANG 1-7	Angiotensin 1-7
ANG 1-9	Angiotensin 1-9
ANG II	Angiotensin II
ANP	Atriales Natriuretisches Peptid
ARHGEF	Rho guanine nucleotide exchange factor
AT1R	Angiotensin-II-Rezeptor Subtyp 1
BSA	Bovines Serumalbumin
BTA	Biologisch-technische Assistenten
BW	Körpergewicht
CCl ₄	Tetrachlorkohlenstoff
Col1 α 1	Kollagen 1 α 1
Ctr.	Kontrolle
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
ECM	Extrazelluläre Matrix
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
eNOS	Endothelial nitric oxide synthase
Erk 1/2	Extracellular-signal regulated kinase 1/2
ET1	Endothelin 1
FCS	Fetal calf serum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HCl	Chlorwasserstoff
HP	Hydroxyprolin
HSC	Hepatische Sternzellen
HVPG	Hepatic venous pressure gradient
IGFR	Insulin-like-growth-factor-receptor
Jak2	Janus-Kinase-2

LDL	Low density Lipoproteine
LSEC	Liver sinusoidal endothelial cells
LW	Lebergewicht
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MasR	Mas Rezeptor
MLC	Myosin Leichtketten
MLCK	Myosin Leichtketten Kinase
MLCP	Myosin Leichtketten Phosphatase
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MMP	Matrix Metalloproteasen
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NASH	Nichtalkoholische Steatohepatitis
NEP	Neprilysin
NO	Stickstoffmonoxid
NPY	Neuropeptid Y
NPYR	NPY Rezeptor
PBS	Phosphate buffered saline
PBST	Phosphate buffered saline with Tween-20
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	Platelet derived growth factor
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
RAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RhoA	Ras homolog gene family, member A
ROCK	Rho-Kinase
ROS	Freie Sauerstoffradikale
rt-PCR	Relative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese
s.e.m.	Standard error of the mean
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
TGF- β 1	Transforming growth factor- β 1
TIPSS	Transjugulärer intrahepatischer portosystemischer Stent-Shunt

VEGF	Vascular endothelial growth factor
VSMC	Vascular smooth muscle cells
WB	Western Blot
wt	Wildtyp

2. Einleitung

2.1 Ätiologie und Epidemiologie der Leberzirrhose

Chronische Lebererkrankungen und ihr gemeinsames Endstadium der Leberzirrhose stellen ein Gesundheitsproblem globalen Ausmaßes dar. Sie gelten als zunehmende Ursache von Morbidität und Mortalität in industrialisierten Staaten und stehen an vierzehnter Stelle der Todesursachen weltweit, in westeuropäischen Staaten sogar an vierter Stelle (Tsochatzis et al., 2014). Somit ergeben sich etwa 1,03 Mio. Todesfälle weltweit pro Jahr (Lozano et al., 2012). Für Europa wird die Zahl auf 170.000 geschätzt. Aufgrund dieser Fallzahlen gilt die Leberzirrhose weiterhin als Hauptindikation für eine Lebertransplantation in Europa mit etwa 5.500 Eingriffen pro Jahr (Blachier et al., 2013).

Die Leberzirrhose entsteht unter Einwirkung chronisch-pathologischer Stimuli auf das Lebergewebe. Nekrotische, inflammatorische und fibrogene Prozesse resultieren in einer fortschreitenden Vernarbung der Leber und enden in der Leberzirrhose (Tsochatzis et al., 2014). Aufgrund der initial schleichenden Symptomatik ist bei einer hohen Dunkelziffer von einer tatsächlich höheren Fallzahl auszugehen. Dieser langsame Verlauf der Fibrosierung wird dem enormen Regenerationspotenzial der Leber zugeschrieben, dem sogenannten Prometheus Effekt (Friedman, 2008).

Wohingegen die Leberzirrhose zunächst als irreversibles Endstadium mit letalem Ausgang galt, hat sich in den letzten Jahrzehnten eine Ansicht durchgesetzt, die die Fibrosierung als dynamischen und durchaus reversiblen Wundheilungsprozess versteht (Friedman, 2015). Diese Position wird dadurch gestützt, dass die Ein-Jahres-Mortalität bei zirrhotischen Patienten zwischen 1-57% schwankt, sich also sehr uneinheitlich darstellt. Sie zeigt sich dabei weniger abhängig vom tatsächlichen Zirrhosegrad als vielmehr von begleitenden klinischen Komplikationen (D'Amico et al., 2006).

Aufgrund der zentralen Position der Leber im Stoffwechsel des Menschen kann eine Vielzahl an Ursachen eine chronische Schädigung der Leber bewirken. Weltweit betrachtet, spielen die chronischen Hepatitiden die größte Rolle (Friedman, 2010). Die WHO geht global von 200 Mio. betroffenen Menschen für die chronische Hepatitis C und etwa 400 Mio. Menschen für die chronische Hepatitis B aus (Wallace et al., 2008). In Nationen mit einem westlichen Lebensstil stellen die Hepatitiden eine an ihrer Häufigkeit

abnehmende Ursache dar. Dies ist den erfolgreichen Impfprogrammen gegen die Hepatitis B und den deutlich gebesserten Therapiemöglichkeiten beider Erkrankungen zuzuschreiben (European Association for Study of Liver, 2014; European Association For The Study Of The Liver, 2012). Einen quantitativ höheren Stellenwert bildet hier die äthyltoxische Leberzirrhose als Folge eines chronischen Alkoholabusus und die Nichtalkoholische Steatohepatitis (NASH) im Rahmen eines, an Inzidenz und Prävalenz zunehmenden, Metabolischen Syndroms (European Association for the Study of Liver, 2012).

2.2 Komplikationen

Das Endstadium einer Lebererkrankung geht mit einem Funktionsverlust des Lebergewebes einher. Als weitere schwerwiegende Komplikationen sind zu nennen: Portale Hypertonie, Varizenblutung, Aszites, Nierenversagen, hepatische Enzephalopathie und das Hepatozelluläre Karzinom (Davis et al., 2003). Die hohe Mortalität ist dabei vor allem dem pathologisch erhöhten Portaldruck zuzuschreiben, der weiterhin die Haupttodesursache in dieser Patientengruppe darstellt (Bosch et al., 2015).

2.3 Pathogenese der Portalen Hypertension

Die Portale Hypertension ist eine Begleitpathologie von Lebererkrankungen (Sauerbruch und Trebicka, 2014). In westlich geprägten Gesellschaften ist mit über 90% der Fälle die Leberzirrhose die Hauptursache einer Portalen Hypertension (Bosch et al., 2008). Die Definition erfolgt mittels des Hepatic venous pressure gradient (HVPG), dem Blutdruckgradient zwischen den hepatischen Sinusoiden und den hepatischen Venen. Übersteigt dieser Gradienten einen Wert von 5 Millimeter Quecksilbersäule (mmHg), was einem Portaldruck von etwa 10 mmHg entspricht, ist das Stadium eines Portalen Hypertonus erreicht (Vorobioff, 2007). Eine zusätzliche Komponente der hämodynamischen Definition beinhaltet die Ausbildung porto-systemischer Shunts. Diese ermöglichen einen Blutfluss unter Umgehung der Leber.

Eine signifikante Druckerhöhung liegt vor, sobald diese sich klinisch manifestiert bzw. ab einem HVPG von 10 mmHg (Bosch et al., 2008). Die häufigsten klinischen Manifestationen sind die Varizenblutung, die hepatische Enzephalopathie, das

hepatorenale Syndrom, die Ausbildung eines Aszites und, im Rahmen dessen, die spontan bakterielle Peritonitis (Cárdenas und Ginès, 2009).

Nach dem Ohm'schen Gesetz für Flüssigkeiten gilt der Zusammenhang: Druckdifferenz = Flusswiderstand • Blutfluss ($U = R \cdot I$). Rein theoretisch kann der erhöhte Pfortaderdruck also bedingt sein durch einen erhöhten Flusswiderstand und/oder durch einen gestiegenen Blutfluss (Bosch et al., 2015).

Zunächst wurde allein der erhöhte intrahepatische Widerstand einer zirrhotisch veränderten Leber als Ursache für eine portale Hypertonie angesehen. Dieses Modell der „Backward Flow Theory“ hielt sich bis in das 20. Jahrhundert und postulierte eine hypodyname Zirkulation im splanchnischen Gefäßsystem (Bosch et al., 2015). Scheinbar gestützt wurde diese Theorie durch experimentelle Ergebnisse, die einen verringerten Blutfluss am Hiatus der Leber nachwiesen (Moreno et al., 1967). Die Schwachstelle dieser Theorie lag in der Tatsache, dass die stark ausgebildeten Kollateralen und der Blutfluss in diesen nicht in die hämodynamischen Überlegungen eingegangen sind (Bosch et al., 2015).

Erst als *Groszmann* in den 70er Jahren eine hyperdynamische Zirkulation in zirrhotischen Patienten nachwies, änderte sich das Verständnis der Pathogenese (Groszmann und Abraldes, 2005). So konnte in Tiermodellen nach einer kurzen hypodynamen Phase ein Umschwung in eine hyperdynamische Zirkulation festgestellt werden (Sikuler et al., 1985). Zunächst scheint der erhöhte Portaldruck tatsächlich mit einer Abflussstörung im Lebergewebe assoziiert zu sein. Diese mündet in einer Minderdurchblutung und einem Blutstau der Mesenterialgefäße. Die sich ausbildende Hypoxämie in diesem Stromgebiet stimuliert die Ausbildung von Kollateralen, die dann den vermehrten Blutfluss nach sich ziehen. Diese Überlegungen begründeten die „Forward Flow Theory“ (Bosch et al., 2015).

Auf molekularer Ebene ist der vermehrte Blutfluss in den Mesenterialgefäßen vor allem durch ein Überangebot an Vasodilatoren, hauptsächlich Stickstoffmonoxid (NO), und eine abgeschwächte Antwort auf Vasokonstriktoren bedingt. Einer der Hauptproduzenten von zirkulierendem NO ist die Endothelial nitric oxide synthase (eNOS), die in Gefäßendothelzellen exprimiert wird. Die Aktivierung dieses Signalweges

erfolgt mittels verschiedener Stimuli: durch Scherkräfte, die bei einer Blutstase an den Gefäßwänden auftreten, und durch ein Entzündungsgeschehen (Mehta et al., 2014). Auch der Vascular endothelial growth factor (VEGF), der als Antwort auf eine Hypoxie sezerniert wird, stimuliert die eNOS-Signalkaskade. Zusätzlich induziert VEGF die Neuf ormation von Blutgefäßen und damit die Ausbildung von Kollateralen - bedingt also über zwei Mechanismen den verstärkten Blutfluss im Portalgebiet (Fernandez et al., 2004). Auch das Angiotensin 1-7 (ANG 1-7) kann eNOS aktiviert. ANG 1-7 ist ein Signalpeptid des Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAS), das somit auch Einfluss auf die splanchnische Durchblutung nimmt (Grace et al., 2013).

Die ursprünglichen Überlegungen wurden durch diese Erkenntnisse jedoch nicht komplett überworf en. Sie wurden weiterentwickelt durch die Entdeckung, dass der Flusswiderstand nur zum Teil durch eine statische Komponente bedingt ist. Bis zu 30% des Gesamtwiderstandes im Leberstromgebiet macht demnach eine dynamische Komponente aus, ein gesteigerter hepatischer Gefäßtonus (Bosch et al., 2015).

Eine wesentliche Rolle spielen dabei die sinusoidalen Endothelzellen der Leber, Liver sinusoidal endothelial cells (LSEC). Im physiologischen Zustand bilden sie aufgrund ihrer zelltypischen Fenestrierung eine diskontinuierliche Begrenzung der Sinus (Elvevold et al., 2008). So kann ein großzügiger Stoffaustausch zwischen Sinuslumen und Subsinusoidalraum stattfinden. Diese Fenestrierung geht im Rahmen einer Leberfibrose zurück (Iwakiri et al., 2014). Dies wird als „Sinusoidales Remodelling“ bezeichnet. Ein weiterer Bestandteil dieses „Sinusoidalen Remodellings“ beinhaltet auf molekularer Ebene die verringerte Produktion von Vasodilatoren, auch hier ist wieder NO als potentester Vasodilatator von herausragender Bedeutung (Gupta et al., 1998). Wesentlich beteiligt an diesen Prozessen sind die Hepatischen Sternzellen (HSC). Diese werden im Verlauf ausführlicher beschrieben.

Zusammenfassend lässt sich für die Pathogenese der Portalen Hypertension also feststellen, dass Flusswiderstand und Blutfluss beide maßgeblich ausschlaggebend sind. Die Komplexität dieser Zusammenhänge lässt sich leicht an der folgenden Tatsache erkennen: Während im mesenterialen Stromgebiet ein Überangebot an Vasodialatatoren mit Verlust der Kontraktilität vorliegt, zeigt sich im Leberstromgebiet

das genaue Gegenteil mit einem Verlust an Vasodilatoren und einer übermäßig gesteigerten Kontraktilität (Sauerbruch und Trebicka, 2014).

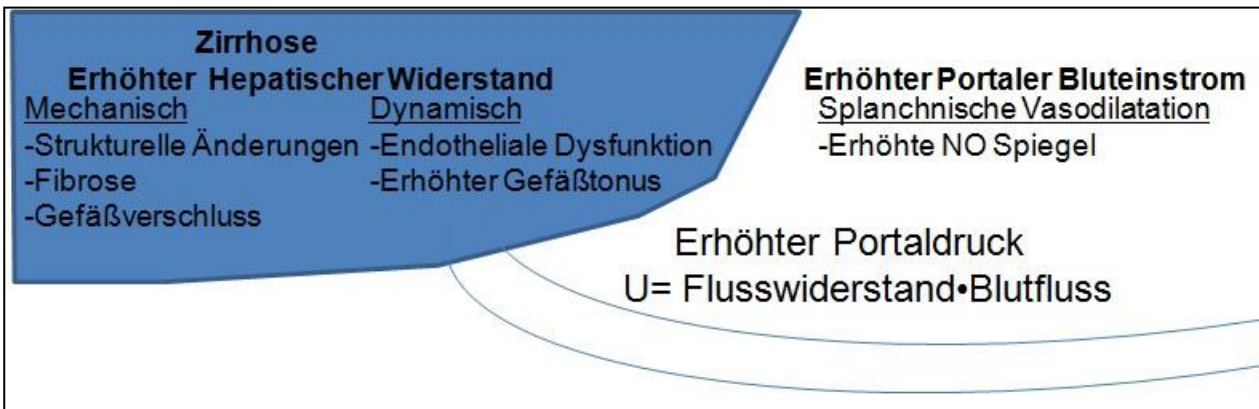


Abb. 1: Übersicht der Pathogenese der Portalen Hypertension mit den wesentlichen auslösenden Faktoren, modifiziert nach Bosch et al., 2008

2.4 Diagnostik und Therapiemöglichkeiten

Auch heute noch gilt für alle Entitäten einer Lebererkrankung, dass eine Elimination des auslösenden Faktors die bestmögliche Therapieform darstellt (Arthur, 2002; Dixon et al., 2004; Hammel et al., 2001; Parés et al., 1986). Demzufolge stellen Prävention und Früherkennung eine wesentliche Säule in der Therapie hepatischer Pathologien. Eine Schwierigkeit stellt dabei die Tatsache dar, dass Lebererkrankungen lange unerkant bleiben und häufig erst nach der Ausbildung einer Zirrhose, nach durchschnittlich 15-20 Jahren, symptomatisch werden (Bataller und Brenner, 2005).

Die Diagnostik wird mittels Ultraschall- oder MRT-Untersuchungen und einheitlicher Scores wie dem MELD Score (Model for End-Stage Liver Disease) und den Child-Pugh-Kriterien durchgeführt. Neuere Scores schlagen vor, eine Einteilung anhand standardmäßiger oder spezifischer Blutwerte vorzunehmen (Fontana und Lok, 2002; Forns et al., 2002). Allen diesen Scores ist jedoch gemein, dass die Stärke vor allem in der Erkennung fortgeschrittener Erkrankungen liegt. Des Weiteren spielt die Leberbiopsie eine wichtige Rolle (Afdhal und Nunes, 2004). Mit ihr gelingt eine gute Einteilung der Entzündung. Zusätzlich können Erkenntnisse über die auslösende Ursache gewonnen werden (Bataller und Brenner, 2005). Die Invasivität der Untersuchung stellt den größten Nachteil dar. Sie ist verbunden mit Schmerzen bei etwa

40% und schwerwiegenden Komplikationen bei etwa 0,5% der untersuchten Patienten (Thampanitchawong und Piratvisuth, 1999). Zudem kann es zu Fehlern bei der Probeentnahme kommen und die histologische Untersuchung der Präparate ist als untersucherabhängige Methode fehleranfällig (Bataller und Brenner, 2005). Aufgrund dessen ist sie bei der Klassifikation der Fibrose verdrängt worden durch modernere nicht invasive Methoden wie z.B. die Elastographie (European Association for Study of Liver and Asociacion Latinoamericana para el Estudio del Hgado, 2015).

Vor allem die antivirale Therapie hat in den letzten Jahrzehnten große Erfolge hervorgebracht. Durch Impfprogramme gegen Hepatitis B kann die Infektionsrate nachweislich gesenkt werden (Abara et al., 2017). Und auch bei chronischen Hepatitis B Infektionen mit einem positiven HBs Antigen kann mittels antiviraler Therapie eine Suppression der Virusreplikation erreicht werden. Durch die Senkung der Viruslast im Blut kann das Auftreten von Komplikationen verhindert werden (Liaw et al., 2004) und der fibrotische Umbau der Leber zeigt sich reversibel (Marcellin et al., 2013). Die Hepatitis C Infektion kann mit neu entwickelten antiviralen Substanzen bei vielen Patienten zur Heilung gebracht werden (Chung und Baumert, 2014). Unter diesen Vorzeichen ist davon auszugehen, dass die viralen Hepatitiden und die durch sie verursachten Komplikationen in der westlich geprägten Welt an Bedeutung verlieren werden.

Zunehmen wird weiterhin der Anteil der NASH. Eng verbunden mit der „Wohlstandserkrankung“ des Metabolischen Syndroms spielt sie in industrialisierten Nationen eine zunehmende Rolle bei der Entwicklung von Lebererkrankungen (Bataller und Brenner, 2005). Bei dieser Erkrankung besitzen Primärprävention und Lifestyle Änderungen ein enormes Potenzial, das bei Weitem noch nicht ausgeschöpft ist (Promrat et al., 2010). Auch ein chirurgischer Ansatz mittels bariatrischer Intervention zeigt sich vielversprechend (Chavez-Tapia et al., 2010).

Bei Stoffwechselerkrankungen wie dem Morbus Wilson oder der Hämochromatose ist das vordergründige Ziel die Senkung der Kupfer- bzw. Eisenbelastung (European Association for Study of Liver, 2012; Liver, 2010). Bei Lebererkrankungen, ausgelöst durch einen chronischen Gallestau (z.B. die Primär Billiäre Zirrhose), besteht keine kausale Therapiemöglichkeit. Der Einsatz von Ursodesoxycholsäure bringt eine

Besserung der Symptomatik. Ein positiver Einfluss auf Morbidität, Mortalität oder die Ausprägung der Fibrose ist jedoch nicht nachgewiesen (Mitchell et al., 2001).

Wie oben ausgeführt, stellen die Komplikationen der Portalen Hypertension die Haupttodesursache bei fibrotischen Erkrankungen der Leber dar. Für alle Patienten mit nachgewiesener Leberzirrhose empfiehlt sich also ein Screening auf Varizen (de Franchis, 2015). Bei nachgewiesenen Varizen zeigen der Einsatz von nicht selektiven β -Blockern und die endoskopische Gummibandligatur nahezu gleichwertige Ergebnisse in Bezug auf Verhinderung einer Blutung und Mortalität (Gluud et al., 2007). Kommt es dennoch zu einer aktiven Blutung, wird eine kombinierte Therapie angestrebt. Diese setzt sich zusammen aus intravenös applizierten vasoaktiven Substanzen wie z.B. Terlipressin und einer endoskopischen Blutungsstillung, bestenfalls innerhalb von 12 Stunden (Bañares et al., 2002). Bei refraktären Blutungen besteht die Indikation einer Shunt Anlage zur Senkung des Portaldrucks. Die häufigste Technik ist hier der Transjuguläre intrahepatische portosystemische Stent-Shunt (TIPSS) (Trebicka, 2017).

Als letzte Option besteht bei dekompensierter Zirrhose die Möglichkeit einer Lebertransplantation, die in fortgeschrittenen Stadien die einzige kurative Therapie darstellt (Ahmed und Keeffe, 2001).

Die Tatsache, dass bisher lediglich die Bekämpfung der auslösenden Noxen klinisch etabliert ist, verdeutlicht die Dringlichkeit der weiteren Erforschung der beteiligten Prozesse. Vor allem die Erkenntnis, dass Leberfibrose und zum Teil auch Leberzirrhose reversibel sind, hat dabei neue Hoffnung geweckt.

2.5 Anatomische Grundlagen

Die Leber des Menschen stellt mit einem Durchschnittsgewicht von 1500-2000g die größte Drüse des menschlichen Körpers dar. Den Hauptbestandteil des Leberparenchyms machen mit etwa 80% die epithelial differenzierten Hepatozyten aus. Weitere Zellentypen sind Endothelzellen, HSC und leberspezifische Makrophagen (Kmieć, 2001). Bei der Blutversorgung findet sich eine organspezifische Besonderheit, da sie sich aus zwei Hauptgefäßen speist. Über die Arteria hepatica propria, ein arterielles Gefäß aus der Aorta, gelangt arterielles Blut zur Leber. Die Pfortader sammelt das venöse Blut der Gastrointestinalen Organe und führt es ebenfalls der Leber zu.

Beide Gefäße treten am Leberhilus in das Organ ein. Die sich im Weiteren verzweigenden Blutgefäße verlaufen parallel in der Leber, bis sie die Leberläppchen als anatomische Grundstruktur der Leber erreichen. Hier vermischt sich das Blut in den Sinusoiden und strömt zur mittig gelegenen Zentralvene (Abdel-Misih und Bloomston, 2010). Auf seinem Weg durch die Sinus der Leberläppchen gelangt das Blut durch die durchlässigen Epithelzellen in den Subsinusoidalraum und umströmt dort die Fortläufer der Hepatozyten, die in Balken angeordnet nebeneinanderliegen. Hier findet die Sekretion synthetisierter Bestandteile ins Blut und die Aufnahme von zu prozessierenden Bestandteilen aus dem Blut heraus statt (Elvevold et al., 2008).

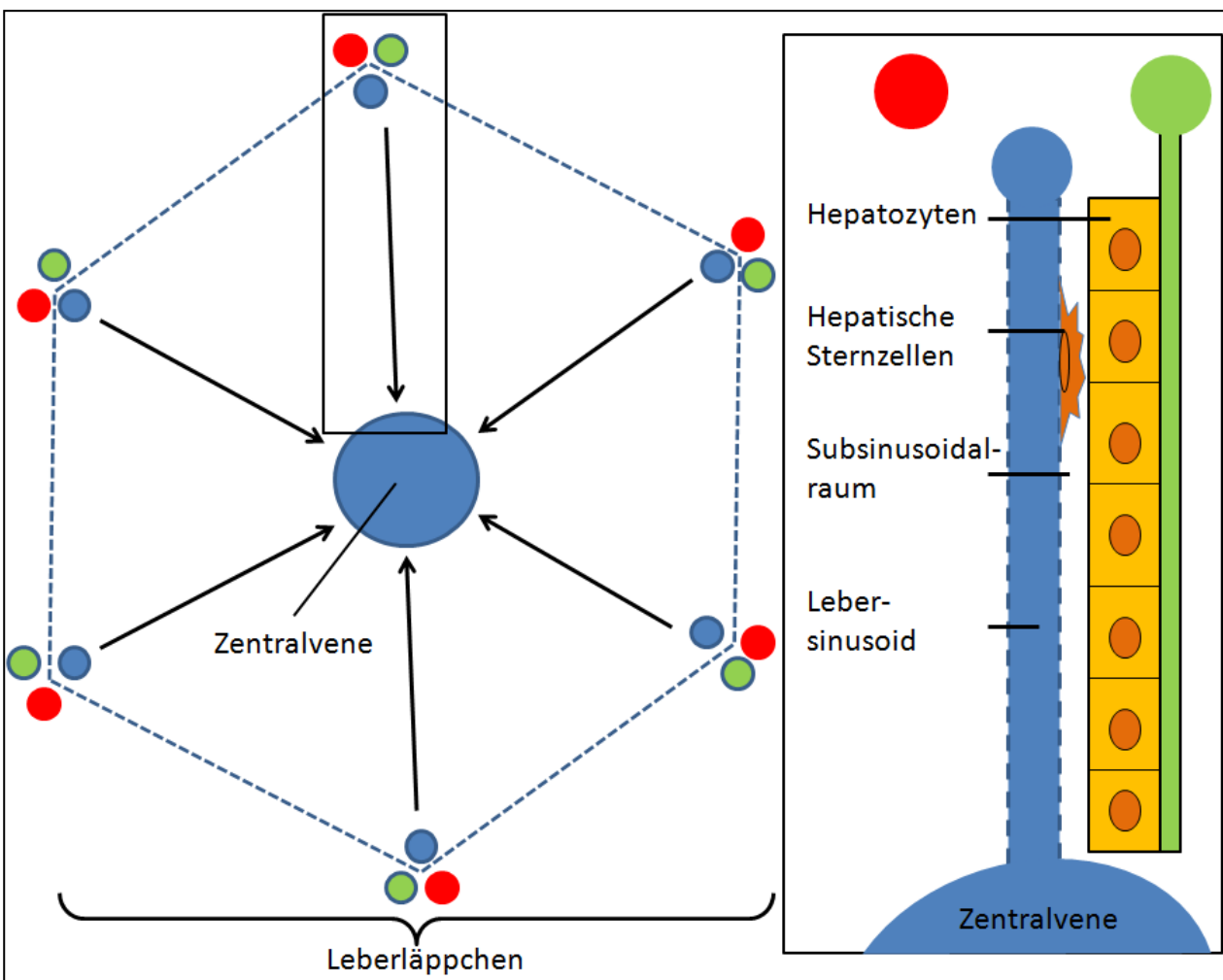


Abb. 2: Schematische Darstellung eines Leberläppchens und der beteiligten anatomischen Strukturen, modifiziert nach Goessling und Sadler, 2015

2.6 Pathogenese der Leberfibrose

Eine akute Leberschädigung geht mit einer Entzündungsreaktion ohne wesentliche Narbenbildung einher. Die Leberfibrose hingegen entwickelt sich als Resultat eines chronisch-pathologischen Reizes auf das Lebergewebe (Hernandez-Gea und Friedman, 2011). Dieser andauernde Stimulus führt zu einer unverhältnismäßig gesteigerten Synthese Extrazellulärer Matrix (ECM). Diese Netto-Überproduktion wird verstärkt durch einen verringerten Abbau der anfallenden ECM (Arthur, 2000). Zusätzlich ändert sich die Zusammensetzung der produzierten ECM zu stabileren Endprodukten, was wiederum den Abbau behindert (Benyon und Iredale, 2000). Des Weiteren kommt es zu einer Umstrukturierung des anatomischen Aufbaues. Narbengewebe zieht in Bindegewebszügen durch das Organ und bei zusätzlich auftretenden Regenerationsknoten sind die Kriterien einer Leberzirrhose erfüllt (Tsochatzis et al., 2014). Das Ausmaß der Umbauprozesse zeigt bei gleicher Pathologie starke interpersonelle Unterschiede. Dies ist auf zahlreiche genetische und umweltbedingte Einflüsse zurückzuführen (Bataller et al., 2003b).

Auf zellulärer Ebene konnten einige Zelltypen bestimmt werden, die maßgeblich an den oben beschriebenen Umbauprozessen beteiligt sind. Zu nennen sind portale Fibroblasten und Myofibroblasten, die aus dem Knochenmark einwandern (Bataller und Brenner, 2005). Als Schlüsselement konnten jedoch HSC identifiziert werden (Friedman et al., 1985; Mederacke et al., 2013).

2.7 Hepatische Sternzellen (HSC)

HSC wurden zuerst von *von Kupffer* im Jahr 1876 beschrieben. Embryologisch scheinen sie aus der Neuralleiste zu entspringen. So exprimieren sie typische neurale Markerproteine wie das Saure Gliafaserprotein und Nestin (Niki et al., 1999). Für Zellen der Neuralleiste wiederum konnte gezeigt werden, dass sie zu Myofibroblasten differenzieren können und dann Alpha-smooth muscle actin (α -SMA) exprimieren, den typischen Marker aktivierter HSC (Morrison et al., 1999). In der Leber machen sie etwa 15% der residenten Leberzellen aus (Friedman, 2000). Untersuchungen zu ihrer Funktion ergaben zunächst eine wichtige Rolle im Stoffwechsel fettlöslicher Vitamine (Bataller und Brenner, 2005). Des Weiteren steuern sie den Umsatz der ECM, indem sie

diese einerseits selbst produzieren und andererseits Matrix Metalloproteasen (MMP) zu deren Abbau synthetisieren. Durch ihre Lage im Subsinusoidalraum können sie durch Veränderung des Gefäßtonus Einfluss nehmen auf die Durchblutung der Sinus und sind somit auch unmittelbar an der Entstehung der Portalen Hypertension beteiligt (Rockey, 2006). Aufgrund dieser Stellung wurde vermutet, dass die HSC wesentlich an der Ausbildung der Leberfibrose und ihrer Komplikationen beteiligt sind.

Das konnte 1985 schließlich von Friedman und Mitarbeitern bewiesen werden. Der Vergleich zwischen HSC, Hepatozyten und LSEC erbrachte den Nachweis einer signifikant höheren Produktion von ECM, verglichen mit den beiden anderen Zelltypen (Friedman et al., 1985).

Ruhende HSC exprimieren vor allem Adipozytenmarker als Zeichen ihrer wichtigen Stellung im Stoffwechsel fettlöslicher Vitamine (Bataller und Brenner, 2005). Ein chronisch-pathologischer Stimulus führt zu einer Aktivierung der HSC. Die Aktivierung der HSC wird verstanden als ein Übergang der ruhenden HSC in einen produktiveren Zustand (Friedman, 2008). Die Änderung des Phänotyps spiegelt sich in einem geänderten Spektrum der exprimierten Zellmarker wider (Bataller und Brenner, 2005).

Dieser Prozess verläuft über komplexe inter- und intrazelluläre Mechanismen und wird in zwei Abschnitte gegliedert: die Initiations- und die Perpetuationsphase (Friedman, 2000).

Hepatozyten stellen den primären Schädigungsort bei einer chronischen Pathologie dar (Higuchi und Gores, 2003). Ihre Apoptose nach einer Schädigung stimuliert fibrogene Eigenschaften von Lebermyofibroblasten (Canbay et al., 2004) und leitet somit die Initiationsphase ein. Vor allem durch das Freisetzen von Freien Sauerstoffradikalen (ROS) gebildet von der Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-Oxidase entfalten Hepatozyten ihre Wirkung auf die HSC (Maher, 1999). Die parakrine Stimulation wird zusätzlich verstärkt durch den Abbau von Antioxidantien, der bei einem Leberschaden ebenfalls auftritt (Friedman, 2000). Einen weiteren wesentlichen Faktor stellt die Umwandlung des Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) in seine aktive Form durch geschädigte Endothelzellen dar (Friedman, 1999). Dieses Zytokin scheint ein Schlüsselement in der humanen Leberfibrose zu sein, da es einerseits einen

vermehrten Aufbau von ECM stimuliert und andererseits den Abbau hemmt (Gressner et al., 2002). Weiterhin spielen Änderungen auf transkriptioneller Ebene eine wichtige Rolle. So konnte die Hochregulierung zahlreicher Gene nachgewiesen werden, die vor allem in einer erhöhten ECM Produktion resultieren (Chen und Davis, 1999; Kim et al., 1998). Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass im Stadium der Initiation vor allem parakrine Effekte und transkriptionelle Änderungen zur Aktivierung der HSC beitragen, die dann wiederum in ersten Änderungen der ECM resultieren.

Die Aufrechterhaltung dieser Aktivierung, Perpetuation, wird vor allem durch eine Maximierung der Zytokineffekte auf die HSC und durch die veränderte ECM-Zusammensetzung selbst verursacht. So konnte gezeigt werden, dass entsprechende Zellmembranrezeptoren hoch reguliert werden und somit eine verstärkte Antwort auf ausgeschüttete Zytokine ermöglichen (Ankoma-Sey et al., 1998). Mittels Integrinen und verschiedener anderer Rezeptoren wiederum wirkt die neu gebildete fibrilläre ECM selbst direkt auf die HSC und hält die Aktivierung aufrecht (Shrivastava et al., 1997; Vogel, 1999).

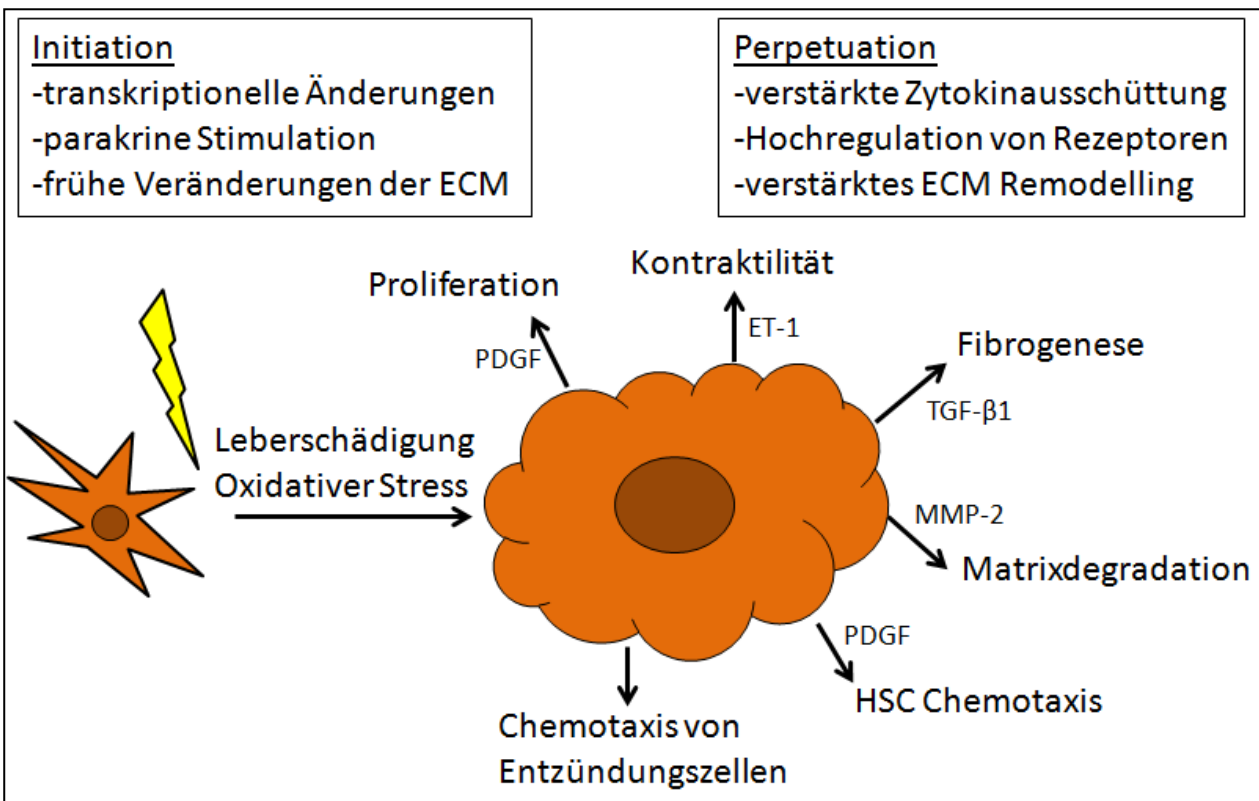


Abb. 3: Wesentliche Charakteristika von Initiation, Perpetuation und schematische Darstellung der daraus resultierenden Änderungen des Phänotyps, modifiziert nach Friedman, 2000

Die Aktivierung der HSC resultiert in einigen gravierenden Änderungen des Phänotyps, die maßgeblich das Bild der Leberfibrose beeinflussen. Zu nennen sind vor allem: Proliferation, Kontraktilität, Fibrogenese, ECM Abbau, HSC Migration, Zytokin Ausschüttung und Leukozyten Chemoattraktion.

Die vermehrte Proliferation wird vermittelt durch den Platelet derived growth factor (PDGF). Verletzung des Lebergewebes führt sowohl zu vermehrter Sekretion als auch zu einer Hochregulation der entsprechenden Rezeptoren und somit zu einer Potenzierung des proliferativen Effekts (Pinzani et al., 1998). Die entsprechenden intrazellulären Prozesse werden ausgelöst mittels der mitogenen Ras-Raf-Extracellulär-signal regulated kinase 1/2 (Erk 1/2)-Signalkaskade (Marra et al., 1999a).

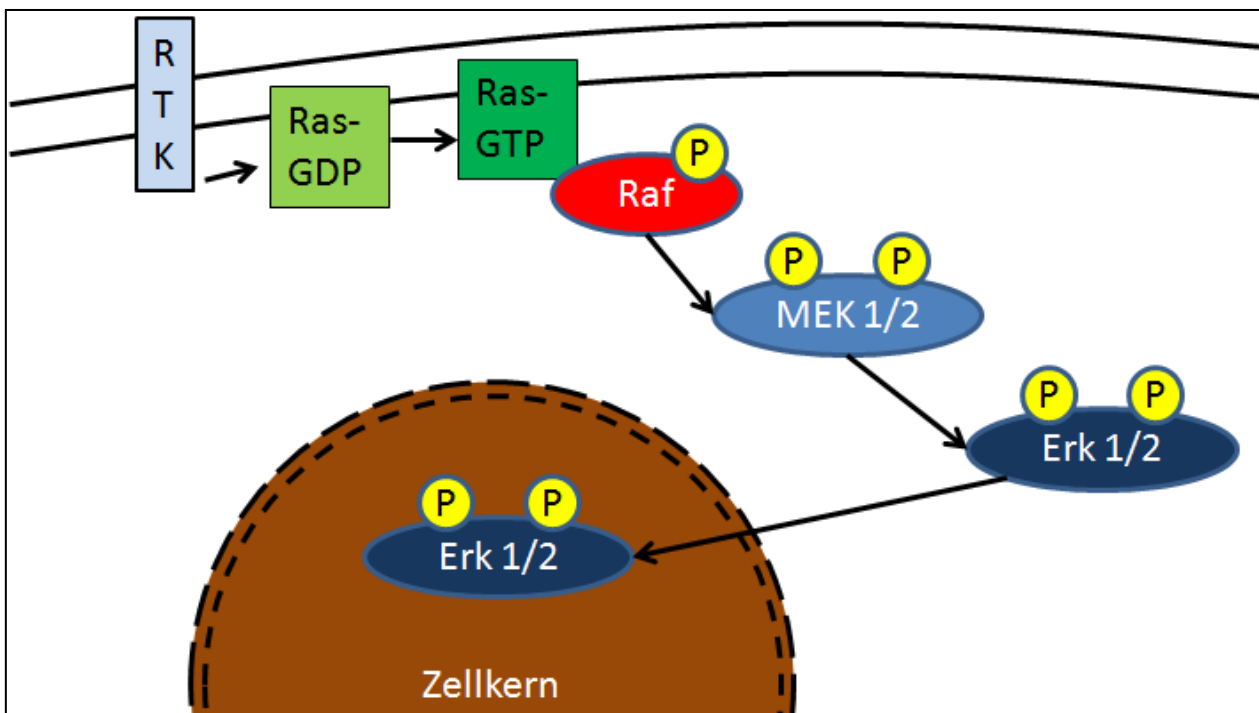


Abb. 4: Schematische Darstellung des Ras-Raf-Erk 1/2-Signalweges, modifiziert nach Matallanas et al., 2011

Der Portale Hypertonus wird wesentlich bedingt durch die erhöhte Kontraktilität aktivierter HSC. Hier konnte Endothelin 1 (ET1) als herausragendes stimulierendes Zytokin identifiziert werden (Rockey, 1997; Rockey et al., 1998). Auch das RAS bildet hier ein Schlüsselsystem (Paizis et al., 2002) und wird im Folgenden weiter beschrieben.

Wie oben erwähnt, spielt TGF- β 1 sowohl bei der Aktivierung der HSC als auch bei der gesteigerten Fibrogenese eine übergeordnete Rolle. Zusätzlich zu dem

transkriptionellen Effekt durch vermehrt TGF- β 1 Ausschüttung kommt es zu einer post-transkriptionellen Veränderung. So konnte gezeigt werden, dass die neu synthetisierte Kollagen 1 α 1 (Col1 α 1) Messenger Ribonukleinsäure (mRNA) eine etwa 20fach erhöhte Stabilität aufweist, verglichen mit der entsprechenden mRNA ruhender HSC (Stefanovic et al., 1997).

Die Netto Überproduktion an Kollagen wird ebenfalls vermittelt durch eine Veränderung der Abbauprozesse. So werden die MMP 2/3 von aktivierten HSC vermehrt produziert. Diese bauen die physiologische ECM ab und beschleunigen so die Ablagerung des steiferen Narbengewebes. Das wiederum wirkt ebenfalls stimulierend auf die HSC und hält somit den Teufelskreis aufrecht. Andere MMP hingegen werden gehemmt und damit auch der Abbau der kumulierenden ECM (Arthur, 2000).

Die Anhäufung aktivierter HSC wird neben der erhöhten Proliferation ebenfalls durch eine gesteigerte Chemotaxis ausgelöst. Hier scheint wiederum PDGF eine wesentliche Rolle zu spielen (K. Ikeda et al., 1999; Marra et al., 1999b). Zuletzt produzieren aktivierte HSC selber inflammatorische Zytokine (Maher, 2001). Somit werden gezielt Neutrophile und Monozyten rekrutiert und der Entzündungsprozess aufrechterhalten.

2.8 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAS)

Das RAS übernimmt eine zentrale Rolle in der Regulation des Kardiovaskulären Systems auf endokriner, parakriner und autokriner Ebene (Mehta und Griendling, 2007). Als primäres Effektorprotein wurde Angiotensin II (ANG II) beschrieben, das eine Wirkung auf nahezu alle Gewebe und Organe des Körpers entfaltet. Eine akute Stimulation führt zur Modulierung des Blutdrucks mittels Regulierung des Salz/Wasser-Haushaltes und Vasokonstriktion (Geisterfer et al., 1988). Eine chronische Stimulierung löst Hyperplasie und Hypertrophie glatter Muskelzellen aus (Mehta und Griendling, 2007).

Das aus 8 Aminosäuren bestehende ANG II entsteht durch mehrere Spaltprozesse: Zunächst wird Angiotensinogen durch die Peptidase Renin in Angiotensin I (ANG I) gespalten. Das wiederum wird mittels des Angiotensin converting enzyme (ACE) in ANG II umgewandelt, das dann u.a. über den Angiotensin-II-Rezeptor Subtyp 1 (AT1R) den Zellstoffwechsel beeinflusst (Mehta und Griendling, 2007).

Das massive Potenzial dieses Systems als Ansatzpunkt pharmazeutischer Therapie zeigen die erfolgreich eingesetzten ACE-Hemmer und Angiotensin-Rezeptor-Blocker, die zu einer signifikanten Senkung von Mortalität und Morbidität bei Diabetes Mellitus, Arterieller Hypertonie, Atherosklerose und Herzinsuffizienz geführt haben (Henriksen et al., 2001; Igarashi et al., 2001; Schiffrin et al., 2000; Yusuf et al., 2000).

2.8.1 Der Angiotensin-II-Rezeptor Subtyp 1 (AT1R)

Der AT1R gehört zur Familie der heptahelikalen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und konnte in allen Organen nachgewiesen werden. Aus 359 Aminosäuren bestehend, hat er ein Molekulargewicht von 40kD. Nach extrazellulärer Bindung des ANG II vermitteln die intrazellulären Schleifen die Interaktion zu den G-Proteinen und erlauben über Phosphorylierungsreste die Modifikation der Rezeptorantwort (Mehta und Griendling, 2007). Bestimmte genetische Polymorphismen des Rezeptors sind eng verknüpft mit kardiovaskulären Erkrankungen wie Arterieller Hypertension (Bonnardeaux et al., 1994) oder Myokardialem Infarkt (Berge et al., 1997). Steigende ANG II Spiegel führen zunächst zu einer erhöhten AT1R Aktivität, eine chronische Stimulation wiederum zu einer Hemmung (Griendling et al., 1987; Lassègue et al., 1995; Touyz et al., 1999). Zahlreiche andere Wachstumsfaktoren und Zytokine wie Low density Lipoproteine (LDL) (Nickenig et al., 1997), Insulin (Takayanagi et al., 1992), Interferon- γ (Y. Ikeda et al., 1999) und NO (Ichiki et al., 1998) können die Aktivität des Rezeptors ebenfalls beeinflussen. Diese Prozesse laufen über die Verschiebung des Rezeptors und komplexe intrazelluläre Mechanismen (Griendling et al., 1987; Mehta und Griendling, 2007).

Grob lassen sich die nachgeschalteten Signalkaskaden des AT1R in G-Protein gekoppelte und Nicht-G-Protein gekoppelte unterscheiden. Zusätzlich konnte ein Cross-Talk zu verschiedenen weiteren Tyrosin Kinasen nachgewiesen werden, was die möglichen Wirkungen einer AT1R Aktivierung umso komplexer macht (Mehta und Griendling, 2007).

Ein klassischer G-Protein gekoppelter Signalweg vermittelt die kontraktile Eigenschaften myogener Zellen. Aktivierung des Rezeptors durch Bindung eines Agonisten führt zur Zusammenlagerung von Rezeptor, $G\alpha_{q/11}$, $G\alpha_{12/13}$ und $G\beta\gamma$ (Ushio-

Fukai et al., 1998). Über verschiedene Phospholipasen und Second-Messenger werden die Myosin Leichtketten (MLC) durch die Myosin Leichtketten Kinase (MLCK) phosphoryliert. Das führt zu einer Verstärkung der Interaktion von Myosin- und Aktin-Filamenten und schließlich zu einer verstärkten Kontraktion (Yan et al., 2003). Wesentlich beteiligt an diesen Prozessen ist zusätzlich der Janus-Kinase-2 (Jak2)-Ras homolog gene family, member A (RhoA)- Rho-Kinase (ROCK)-Signalweg (Klein et al., 2017), der über eine Hemmung der Myosin Leichtketten Phosphatase (MLCP) die Phosphorylierung der MLC und damit die Kontraktion aufrechterhält (Jin et al., 2006; Shin et al., 2002).

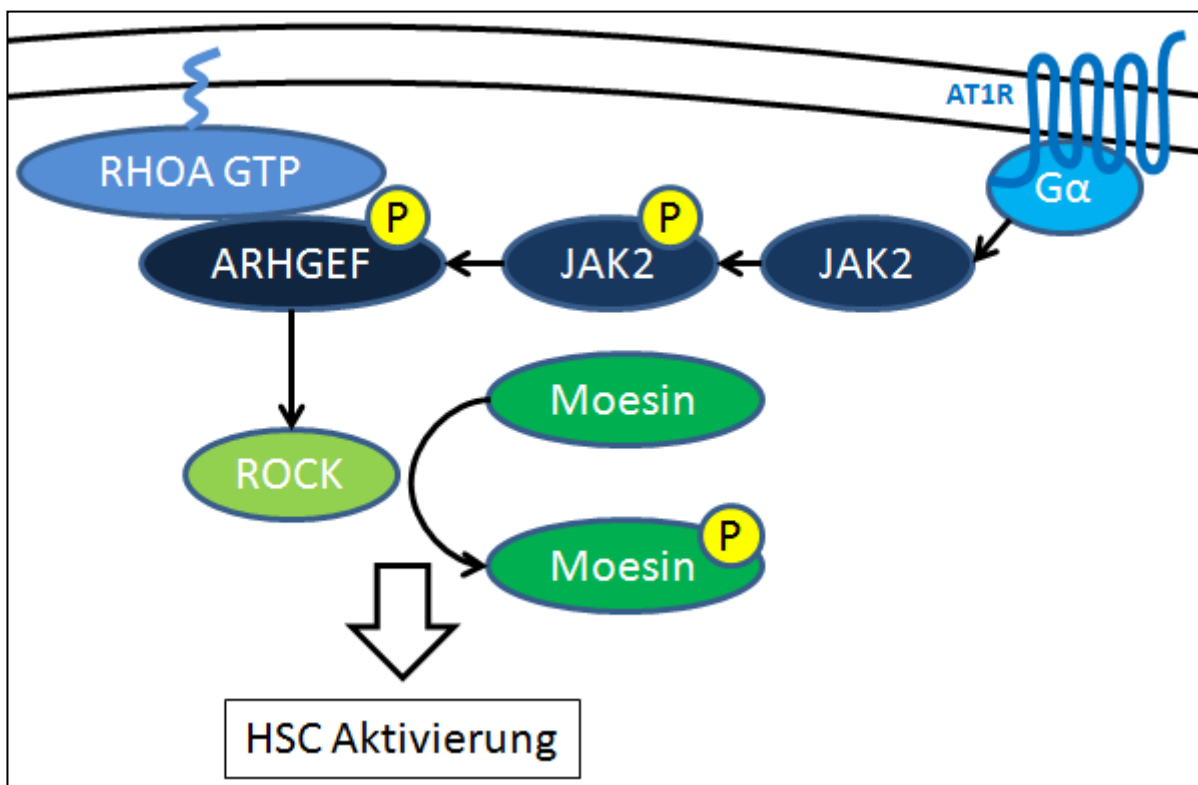


Abb. 5: Schematische Darstellung des Jak2-RhoA-ROCK-Signalweges, modifiziert nach Klein et al., 2017

Ebenfalls G-Protein gekoppelt ist der Einfluss des AT1R auf Mitose, Zellwachstum und Protein Synthese. ANG II kann die Signalkaskade Ras-Raf-Erk 1/2 in Gang setzen (Taniyama et al., 2004). Diese vermittelt über Mitogen-activated protein kinases (MAPK) wesentliche Stimuli für das Zellüberleben und die Proteinproduktion (Sugden und Clerk, 1997).

Moduliert werden beide Signalkaskaden mittels sogenannter „Guanine nucleotide exchange factors“ unter anderem RhoGEF (ARHGEF). Diese Gruppe zytoplasmatischer Proteine steuert den Austausch von GDP und GTP in einer Reihe von GTPasen und ist so maßgeblich an der Signalkaskade G-Protein gekoppelter Rezeptoren beteiligt (Ridley, 2001).

Diese Erkenntnisse wurden zunächst bei der Untersuchung glatter Muskelzellen der Gefäßwand (Vascular smooth muscle cells, VSMC) gewonnen. Bei der genaueren Betrachtung der Wechselwirkungen im Lebergewebe konnten aber übereinstimmende Ergebnisse gezeigt werden. So haben vasodilatatorische Substanzen wie NO antifibrotische, vasokonstriktorische Substanzen hingegen profibrotische Effekte. Vor allem ET1 (Cho et al., 2000) und dem RAS über sein primäres Effektorpeptid ANG II konnte eine herausragende Bedeutung in Ausbildung und Regulation der Leberfibrose nachgewiesen werden. So zeigt ANG II eine proinflammatorische Wirkung in der Leber und wie auch in den VSMC induziert es in HSC die Proliferation, Migration, Produktion proinflammatorischer Zytokine und die Kollagen Synthese (Bataller et al., 2000, 2003a). Eine Schädigung der Leber führt zu einer lokalen Überexpression von Bestandteilen des RAS (Bataller et al., 2003c; Paizis et al., 2002), was die entsprechende Wirkung noch potenziert. Eine medikamentöse Hemmung konnte in verschiedenen Versuchsreihen und Fibrosemodellen eine signifikante Abschwächung der Fibrose bewirken (Jonsson et al., 2001; Kanno et al., 2003).

Im physiologischen Zustand scheint ein Gleichgewicht zwischen profibrotischen und antifibrotischen Stimuli zu herrschen, das im pathologischen Zustand aus der Balance gerät. Die Erforschung antagonistisch wirkender Substanzen, Rezeptoren und deren intrazellulären Signalkaskaden ist also von besonderem medizinischen Interesse. Die Entdeckung des Mas Rezeptor (MasR) als Zielrezeptor des ebenfalls antifibrotisch wirkenden ANG 1-7 war dabei eine herausragende Entdeckung.

2.8.2 Der Mas Rezeptor (MasR)

Mit der Entdeckung des Angiotensin converting enzyme 2 (ACE2), ein dem ACE in seiner Struktur ähnelndes Enzym, taten sich neue Erkenntnisse über das RAS auf. Schnell konnte nachgewiesen werden, dass ACE2 als membrangebundene Hydrolase

unter anderem ANG II unter Abspaltung einer Aminosäure in ANG 1-7 umwandelt (Santos et al., 2000). Ebenso kann ANG 1-7 generiert werden, indem ACE2 ANG I in Angiotensin 1-9 (ANG 1-9) umwandelt und dieses dann mittels ACE in ANG 1-7 gespalten wird. Dieser zweite Weg scheint aber physiologisch eine untergeordnete Rolle zu spielen, konnte doch gezeigt werden, dass die Affinität von ACE2 zu ANG II etwa 400-fach höher liegt, verglichen mit der Affinität zu ANG I (Vickers et al., 2002).

Die Überlegung, ob hiermit lediglich der Abbauprozess des ANG II aufgedeckt worden war, wurde schnell überwunden, als mit dem MasR ein potenzielles Effektorprotein des ANG 1-7 entdeckt wurde (Santos et al., 2003).

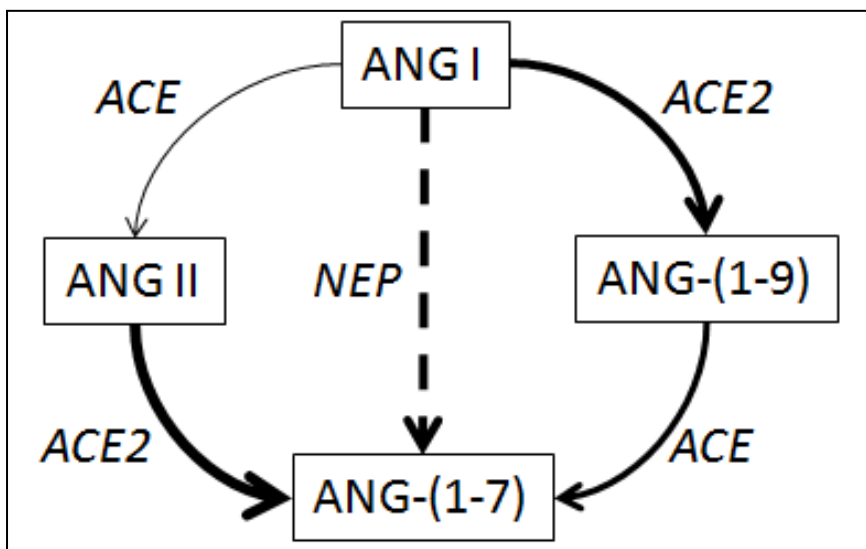


Abb. 6: Schematische Übersicht der Signalpeptide des RAS mit den entsprechenden spaltenden Enzymen, die Dicke der Pfeile symbolisiert dabei den relativen Beitrag der entsprechenden Kaskade modifiziert nach Herath et al., 2009

Ein als Mas oncogen beschriebenes Gen kodiert einen ebenfalls G-Protein gekoppelten Rezeptor, bestehend aus 325 Aminosäuren mit 7 transmembranären Anteilen. Über diesen entfaltet das ANG 1-7 eine dem ANG II entgegengesetzte Wirkung (Klein et al., 2015). So konnte ein vasodilatatorischer (Marangoni et al., 2006), ein antiproliferativer (Tallant et al., 2005) und ein antihypertensiver Effekt nachgewiesen werden (Benter et al., 1995). Vermittelt werden diese Effekte vor allem über eine Aufhebung der Wirkung von ROS, die in einer Situation oxidativen Stresses und einer Zellschädigung synthetisiert werden. Diese initiieren über den Phosphoinositid-3-Kinase/Protein Kinase B (PI3K/Akt) und Ras-Raf-Erk 1/2-Signalweg über MAPK einen positiven Stimulus für Proliferation, Migration und Inflammation, was dementsprechend mittels einer MasR Aktivierung unterbunden werden kann (Zhang et al., 2016). Die therapeutischen Erfolge

einer pharmakologischen Inhibition des RAS werden auch auf diese Achse bezogen. So führt eine medikamentöse ACE-Hemmung bzw. Angiotensin-Rezeptor-Blockade nicht nur zu einer Hemmung der ANG II-Signalkaskaden, sondern zeitgleich zu einem Überangebot des antagonistisch wirkenden ANG 1-7 (Pereira et al., 2007).

Auch im Leberstoffwechsel spielt diese Achse eine wesentliche Rolle. Als integraler Bestandteil dieses Regelkreises konnte ein signifikanter Anstieg von ACE2, ANG 1-7 und MasR bei chronischer Leberschädigung nachgewiesen werden (Herath et al., 2007; Paizis et al., 2005). Die Überlegung, ob diese Aktivierung der Achse ACE2-ANG 1-7-MasR als physiologisches Gegengewicht zu der Achse ACE-ANG II-AT1R zu verstehen ist, wurde unterstützt durch die Erkenntnisse, die bei der Untersuchung des MasR Agonisten AVE0991 gewonnen wurden. Diese Substanz zeigte eine kardioprotektive Wirkung (Ebermann et al., 2008) und hemmt die Aktivierung der HSC und damit effektiv deren Kollagen Produktion (Lubel et al., 2009). Auch eine antiinflammatorische Wirkung konnte nachgewiesen werden (Santos und Ferreira, 2006). Die portale Hämodynamik wird ebenfalls beeinflusst, und zwar in dem Maße, dass der Portaldruck sinkt und der systemische Blutdruck sich nicht ändert. Diese Wirkung wird einerseits ausgelöst durch eine vermehrte Produktion von NO, über den eNOS-Signalweg, andererseits über eine Hemmung des konstriktiven Jak2-RhoA-ROCK-Signalweges (Klein et al., 2015). Letztendlich führen beide Mechanismen zu einer Aktivierung der MLCP und damit zu einer Hemmung des Kontraktionsvorganges in den Lebergefäßen.

Die endgültige Wirkung des RAS auf das Zielorgan wird also entschieden von dem Verhältnis ACE/ACE2 und der zellulären Expression der Effektorproteine AT1R und MasR.

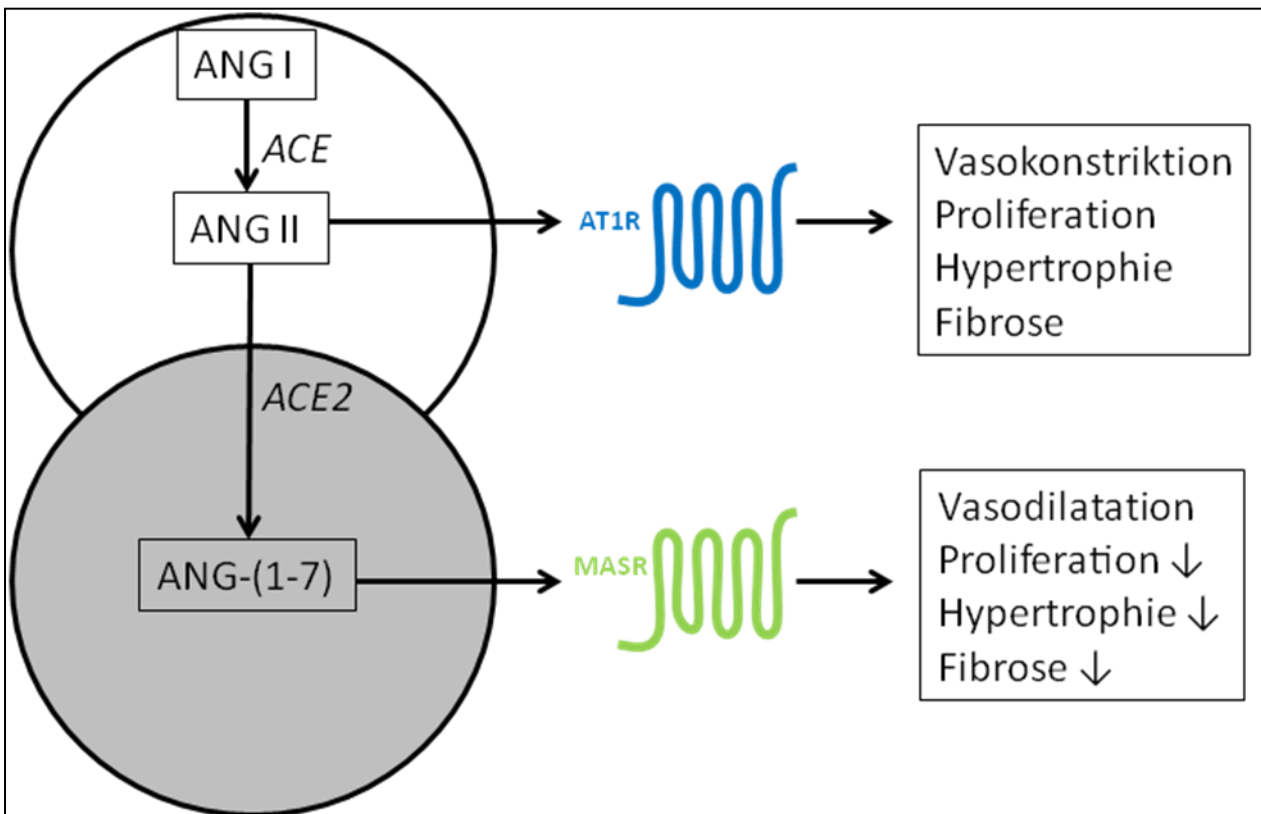


Abb. 7: Schematische Darstellung der beiden Achsen des RAS mit ihren entgegengesetzten Wirkungen, modifiziert nach Pereira et al., 2009

2.8.3 Neprilysin (NEP) und seine Rolle im RAS

Neprilysin (NEP) ist eine Zink-Metalloendopeptidase, die durch ihre Abbaufunktion zahlreiche Peptid Signalwege reguliert. Nachgewiesen ist die Beteiligung an Signalkaskaden des Nerven-, Kardiovaskulären- und Immunsystems (Turner et al., 2001).

NEP ist ein integrales Plasmamembranprotein. An dem extrazellulären Anteil findet sich die als Peptidase aktive Bindestelle, die somit extrazelluläre Signalkaskaden beeinflussen kann (Devault et al., 1987). Auch eine lösliche Form des NEP wurde nachgewiesen, die im Plasma als Peptidase wirkt (Spillantini et al., 1990).

Die ersten untersuchten Substrate von NEP waren Enkephaline und die Substanz P, womit vor allem die neuronale Wirkung im Fokus stand (Turner et al., 2001). Eine interessante Entdeckung in diesem Gebiet war der Nachweis des Abbaus von neurotoxischem β -Amyloid durch NEP. Eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung des Alzheimers scheint also möglich, da diese mit einer Anhäufung von β -Amyloid im

Gehirn einhergeht. Eventuell bewirkt eine wie auch immer geartete Hemmung von NEP eine Akkumulation der toxischen Substanzen, womit sich die therapeutische Möglichkeit der NEP-Stimulation zum verstärkten Abbau ergibt (Howell et al., 1995; Iwata et al., 2000).

Die Beeinflussung der feinregulierten Balance zwischen Aktivität und Inaktivität scheint aber sehr problematisch zu sein. So konnte zusätzlich gezeigt werden, dass eine NEP Defizienz zur Ausbildung eines übergewichtigen Phänotyps führt (Becker et al., 2010). Des Weiteren zeigten NEP^{-/-} VSMC eine verstärkte Migration und Proliferation, vermittelt über die Aktivierung eines PDGF Rezeptors (Karoor et al., 2013), und eine NEP Inhibierung führte zur Vasokonstriktion in menschlichen Widerstandsgefäßen (Ferro et al., 1998).

Therapeutisches Interesse hat in den letzten Jahren aber vor allem die Spaltung und damit die Inaktivierung des Atrialen Natriuretischen Peptids (ANP) geweckt (Volpe et al., 2016). ANP wird bei der Dehnung Kardialer Myozyten als Folge einer Volumenbelastung des Herzens ausgeschüttet. Über eine verstärkte Urinproduktion und eine Hemmung von Renin und Aldosteron wird der Salz- und Wasserhaushalt und über diesen der Blutdruck reguliert (Wong et al., 2017). Die theoretischen Überlegungen gingen von einer verstärkten Wirkung des ANP durch Hemmung des abbauenden Enzyms NEP aus und hofften so auf eine positive Beeinflussung von Hypertonie und Chronischer Herzinsuffizienz.

Tatsächlich zeigten medikamentös eingesetzte NEP-Hemmer vielversprechende Ergebnisse bei ihrem Einsatz. Die alleinige NEP-Hemmung führte allerdings zu einem Wirkungsverlust über die Zeit, vermutlich ausgelöst durch eine adrenerge Gegenregulation oder eine Internalisierung der ANP Rezeptoren (Richards et al., 1993). Daraufhin wurden NEP-Hemmer mit den schon lange bekannten ACE-Hemmern kombiniert, um eine duale Hemmung zu erreichen. Somit sollten die ANG II Spiegel gesenkt (Hemmung der kontraktiven und fibrotischen Wirkung) und zusätzlich die ANP Spiegel gesteigert werden (Stimulation der relaxierenden und antifibrotischen Wirkung) (Johnston et al., 1989).

Tatsächlich zeigte sich Omapatrilat (kombinierter ACE- und NEP-Hemmer) dem Enalapril (ACE-Hemmer) in der OCTAVE Studie überlegen. Es entfaltete eine bessere antihypertensive Wirkung und eine stärkere Reduktion des Ereignisses „Tod durch Kardiovaskuläre Ursache“. Es kam jedoch vermehrt zu Angioödemem, vermutlich ausgelöst durch erhöhte Bradykininspiegel, die ebenfalls mit einer NEP Hemmung einhergehen (Kostis et al., 2004). Die IMPRESS Studie untersuchte die duale Hemmung im Hinblick auf ihre Wirkung bei chronischer Herzinsuffizienz und konnte hier lediglich eine positive Tendenz ohne Signifikanz ausmachen (Rouleau et al., 2000). In der PARADIGM-HF Studie schließlich wurde ein anderer Neprilysin Hemmstoff, das Sacubitril, mit dem AT1R Antagonisten Valsarten kombiniert und mit dem Enalapril verglichen. Hier zeigte sich die duale Hemmung, bezogen auf Todeszeitpunkt und Hospitalisationsrate, der singulären Hemmung mittels Enalapril deutlich überlegen (McMurray et al., 2014).

Den Bogen zur Erforschung des Einflusses von NEP auf Leberfibrose und Portale Hypertension schlugen unter anderem *Sansoè et al.*, die 2005 eine NEP Inhibition mittels Candoxatrilat als ursächlich für einen gesenkten Portaldruck beschrieben. Durch die Blockade der Peptidase sei das vasodilatative ANP länger wirksam und durch die ausbleibende Aktivierung von ET1 bleibe zusätzlich ein wesentlicher kontraktiler Stimulus aus. Die Aktivierung von ET1 erfolgt mittels Abspaltung einer Peptidkette durch NEP (Lebel et al., 1996). Da Zirrhose in den beschriebenen Versuchen zu erhöhten NEP Werten führte, schien eine Inhibition ein vielversprechender therapeutischer Ansatz (*Sansoè et al.*, 2005).

Weiteres Interesse weckte die Entdeckung, dass NEP ebenfalls im RAS eine Rolle spielt, da es die Fähigkeit besitzt, das vasodilatatorische ANG 1-7 unmittelbar aus ANG I zu synthetisieren, also unter Umgehung des vasokonstriktorisches ANG II (*Yamamoto et al.*, 1992). Die tatsächliche Ausprägung dieser Funktion ist jedoch noch nicht endgültig geklärt. Konnten doch *Herath et al.* 2009 zeigen, dass Zirrhose in Lebergewebe von Ratten zu einer Überproduktion von ACE2 führt. ANG 1-7 war hier also primär das Produkt der Spaltung von ANG II durch ACE2. Die übermäßige Produktion von ANG 1-7 direkt aus ANG I durch NEP erfolgte erst nach medikamentöser Hemmung der ACE2 (*Herath et al.*, 2009).

Desweiteren spaltet und inaktiviert NEP das Neuropeptid Y (NPY), einen bekannten Co-Transmitter des sympathischen Nervensystems (Skidgel und Erdös, 2004).

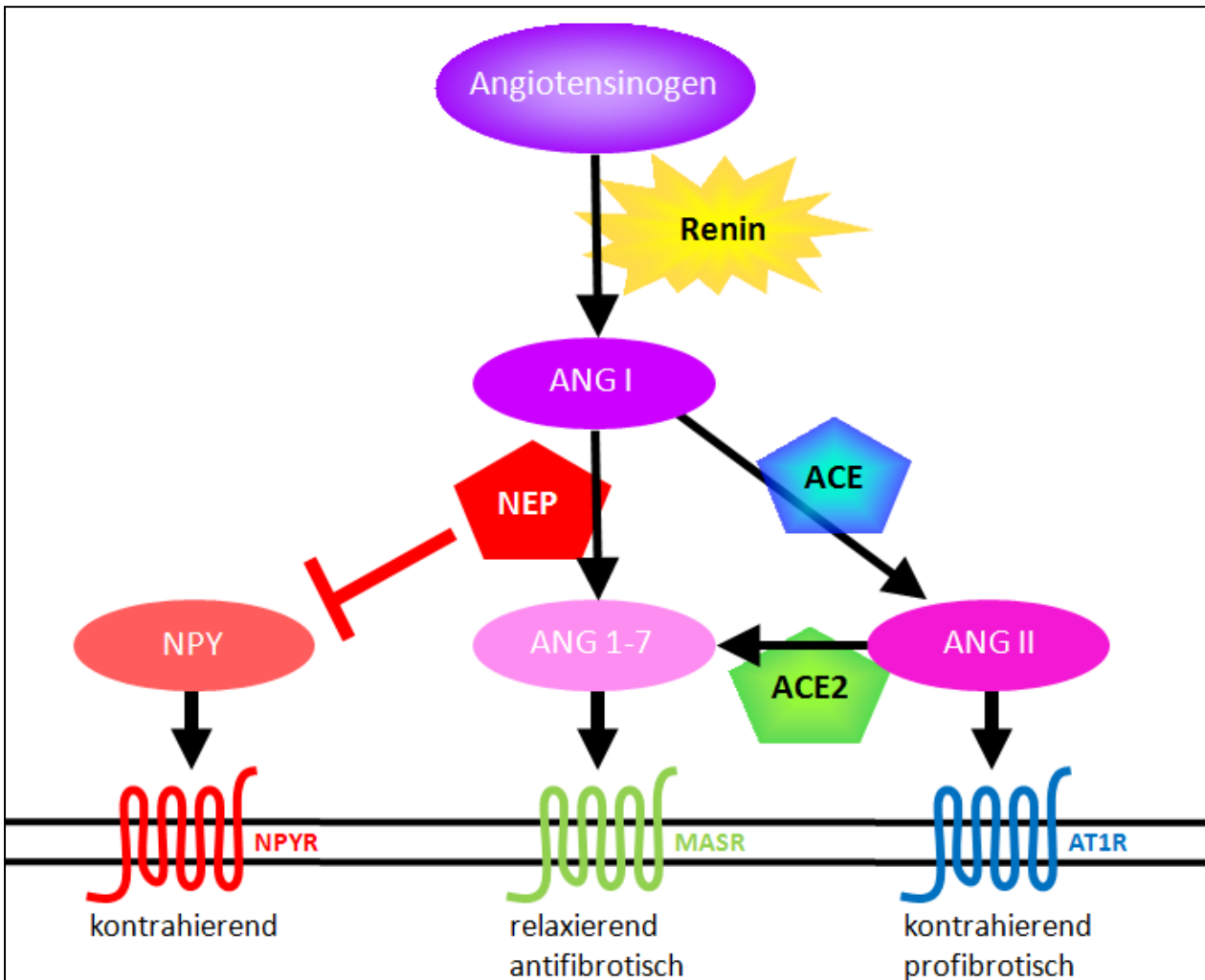


Abb. 8: Stellung von NEP im RAS und NPY Stoffwechsel, modifiziert nach Herath et al., 2009, Bataller et al., 2000, Grace et al., 2013 und Hartl et al., 2015

2.8.4 Das Neuropeptid Y (NPY)

Das autonome Nervensystem setzt sich aus zwei, in etwa gegensätzlich wirkenden Systemen zusammen: dem Sympathischen- und dem Parasympathischen Nervensystem. Eine grobe Einteilung ihrer Wirkung wird wie folgt vorgenommen: Sympathisches Nervensystem-aktivierend „Fight and Flight“; Parasympathisches Nervensystem-dämpfend „Rest and Digest“. Sie steuern die Homöostase zahlreicher lebenswichtiger Funktionen wie Atmung, Kreislauf und Verdauung (Baig et al., 2017).

Die Neurotransmitter des Sympathischen Nervensystems sind die Katecholamine Noradrenalin und Adrenalin. Über ihre Rezeptoren, die α - und β -Adrenozeptoren, wiederum G-Protein gekoppelte Transmembranrezeptoren, bewirken sie unter anderem eine Vasokonstriktion und damit die Ausbildung einer Hypertension (Behar et al., 2016). Der Co Transmitter NPY ist ein aus 36 Aminosäuren bestehendes Polypeptid (Tatemoto, 1982), das in hohen Konzentrationen vor allem im Gehirn, Nebennierenmark (Allen et al., 1983), Sympathischen Nervenzellen (Lundberg et al., 1982) und Endothelzellen zu finden ist (Zukowska-Grojec et al., 1998). Nach Stress oder Gewebsschädigung erhöhen sich die Plasmakonzentrationen von NPY (Pernow et al., 1987). Die Wirkung wird ebenfalls über G-Protein gekoppelte Transmembranrezeptoren entfaltet, sogenannte NPY-Rezeptoren (NPYR), von denen bisher 6 Subtypen bekannt sind (Raimondi et al., 2002; Zukowska et al., 2003). Der NPYR1 bewirkt über eine Potenzierung der Noradrenalin Wirkung auf VSMC eine postsynaptische Vasokonstriktion (Wahlestedt et al., 1990). Interessanterweise scheint diese Wirkung durch eine Testosteron bedingte Hochregulierung des entsprechenden Gens beim Mann stärker auszufallen (Wocial et al., 1995). Der NPYR2 alleine oder in Kombination mit dem NPYR5 wirkt stimulierend auf die Angiogenese durch erhöhte Proliferation und Migration von Endothelzellen (Pons et al., 2003).

Auch HSC exprimieren Adrenozeptoren und NPYR auf ihrer Zelloberfläche, die bei der Ausbildung einer Fibrose hochreguliert werden (Oben et al., 2004; Sancho-Bru et al., 2006). Die wesentlichen NPYR in der Hepatischen Pathologie scheinen die Subtypen 1,4 und 6 zu sein (Sigala et al., 2013). Für die Katecholamine konnte eine direkte profibrotische und proliferative Wirkung auf HSC nachgewiesen werden. Eine alleinige Stimulation mit NPY hingegen bewirkt lediglich eine verstärkte Proliferation und zeigt keinen direkten Einfluss auf die Fibrogenese (Oben et al., 2003). Indem NPY aber die Ausschüttung der Katecholamine selbst moduliert, wirkt es indirekt auch auf die Fibrogenese (Cavadas et al., 2006; Lundberg et al., 1985).

Die genauen intrazellulären Prozesse und beteiligten Signalkaskaden sind noch nicht endgültig verstanden. Via Transaktivierung des Insulin-like-growth-factor-receptor (IGFR) bewirkt NPY über den NPYR1 eine transiente Phosphorylierung der Erk 1/2 und somit einen mitogenen Stimulus. Aber auch der Signal transducer and activator of

transcription 3 (STAT3), der eine wesentliche Rolle für Proliferation, Migration und Apoptose von VSMC spielt (Chen et al., 2014; Lv et al., 2010), scheint im NPY Signaling eine Rolle zu spielen. So zieht NPY eine Phosphorylierung des STAT3 an zwei Stellen nach sich, die mit einer erhöhten nukleären Translokation und einem erhöhten transkriptionellen Potenzial einhergehen (Zhang et al., 2015). Im Zusammenspiel mit Noradrenalin und Adrenalin wird die Proliferation und Fibrogenese der HSC über Aktivierung des PI3K/Akt- und des Ras-Raf-Erk 1/2-Signalweges gesteuert (Sigala et al., 2013). Die gesteigerte Kollagen Produktion wird mittels Aktivierung von TGF- β 1 eingeleitet (Oben et al., 2003).

All diese Mechanismen laufen nach dem Prinzip: „Botenstoff → Rezeptor → Intrazelluläre Wirkung“ ab. Für das NPY konnte aber noch ein zweiter, nicht Rezeptor abhängiger Mechanismus gezeigt werden, der vor allem bei der Portalen Hypertension eine Rolle spielt.

Wie oben ausführlich dargelegt, ist die splanchnische Vasodilatation ein wesentlicher Grund des hyperdynamen Zirkulationssyndroms. In diesem pathologischen Zustand konnte durch NPY eine Maximierung der α 1-adrenergen Vasokonstriktion im portalen Stromgebiet und somit eine signifikante Abschwächung des Portaldrucks erreicht werden. Ursächlich ist hier keine direkt Rezeptor assoziierte Wirkung, sondern vielmehr eine Restitution des vorher gestörten kontraktiven Jak2-RhoA-ROCK-Signalweges und eine Hemmung der NO Überproduktion in mesenterialem Gewebe. Das besondere therapeutische Interesse macht die Tatsache aus, dass NPY die bisher einzige Substanz ist, die diese Wirkung nur im pathologischen - also portal hypertonen - Zustand zeigt (Moleda et al., 2011).

3. Fragestellung

Eine weitere Erforschung der Grundlagen der pathologischen Prozesse in der Leber ist unumgänglich, einerseits um weitere therapeutische Strategien entwickeln zu können, andererseits um Nebenwirkungen bereits etablierter Therapieformen auf den Leberstoffwechsel besser verstehen zu können.

In der folgenden Arbeit sollen die folgenden Fragestellungen erörtert werden:

1. Welche Änderungen in der portalen Hämodynamik und vor allem der hepatischen Fibrogenese resultieren aus einer Neprilysin Defizienz im Vergleich zu Wildtyp-Tieren?
2. Welche Änderungen treten nach Induktion einer Fibrose mittels Tetrachlorkohlenstoff (CCl₄) Intoxikation auf?
3. Welche Regelkreise könnten verantwortlich sein für die eventuell festgestellten Veränderungen?
4. Welche Rolle spielt Neprilysin in diesen Regelkreisen?
5. Gibt es in diesen Regelkreisen Schlüsselenzyme, die als eventuelles therapeutisches Ziel von Interesse sind?

4. Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Antikörper

Tab. I: Primäre Antikörper

Antigen / Herkunft	Anwendung	Hersteller/Kat. Nr.	Verdünnung
ARHGEF aus Kaninchen IgG	WB	Cell Signaling, Beverly, USA Kat. Nr. #3669S	1:1000
GAPDH aus Kaninchen IgG	WB	Santa Cruz, Santa Cruz, USA Kat. Nr. sc-25778	1:2000
NPY aus Kaninchen IgG	WB	Cell Signaling, Beverly, USA Kat. Nr. #11976	1:1000
Jak2 aus Kaninchen IgG	WB	Cell Signaling, Beverly, USA Kat. Nr. #D2E12, Lot#5	1:1000
RhoA aus Maus IgG	WB	Santa Cruz, Santa Cruz, USA Kat. Nr. sc-418, #C3009	1:200
ROCK aus Kaninchen IgG	WB	Santa Cruz, Santa Cruz, USA Kat.Nr. sc-5561, Lot A1510	1:200

Tab. II: Sekundäre Antikörper, gekoppelt an ein Konjugat

Antikörper	Antigen	Konjugat	Hersteller	Verdünnung
Anti-Rabbit-IgG aus Ziege	Kaninchen IgG	Peroxidase	Calbiochem Kat. Nr. 401315	1:10000
Anti.Mouse-IgG aus Ziege	Maus IgG	Peroxidase	Calbiochem Kat. Nr. 401315	1:10000

4.1.2 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden bezogen von der Firma Biomers.net (Ulm). Pro GC-Paar wurden 4 °C, pro AT-Paar 2 °C zur Ermittlung der Schmelztemperatur berechnet. Aus einer Grundlösung der Konzentration 100 pmol/µl in H₂O bidest. wurde eine Gebrauchslösung mit einer Konzentration von 10 pmol/µl in H₂O bidest. hergestellt. Die Sequenzen der Oligonukleotide sind in 5'→3'-Richtung angegeben. Die Genotypisierung wurde durch die Biologisch-technischen Assistenten (BTA) unserer Arbeitsgruppe durchgeführt. Oligonukleotide zur Genotypisierung der NEP^{-/-} Mäuse:

NEP133

CCA TTA TGA ACC TCC AGG AC

NEP125

GAA GTT GTT GTC TAT GCT CC

NEO PVU

GGC AGC GCG GCT ATC GTG G

4.1.3 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
ReliaPrep RNA Tissue Miniprep System		
	Kat.Nr. Z6112	Promega, Madison, USA
Protease Inhibitor Cocktail	Kat.Nr. S8820	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

4.1.4 Software

Bio1D	Peqlab, Erlangen
ChemiSmart	Peqlab, Erlangen
Clone Manager Suite 7, Version 7.01	Scientific & Educational Software
GraphPad Prism 4	GraphPad Software, USA
ImageJ	Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, http://imagej.nih.gov/ij/ , 1997-2016
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

4.1.5 Versuchstiere

Für die im Nachfolgenden beschriebenen Versuche haben wir insgesamt 127 Mäuse genutzt. Diese Gruppe setzte sich zusammen aus einer 80 Tiere zählenden Gruppe C57BL/6J Wildtyp (wt) Mäusen (Firma Charles River) und einer Gruppe mit 47 $NEP^{-/-}$ Tieren. Die $NEP^{-/-}$ Tiere zur eigenen Zucht wurden freundlicherweise bereitgestellt von Thomas Walther (Institute of Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology, Medical Faculty Mannheim, Universität Heidelberg, Mannheim, Germany; Department of Pharmacology and Therapeutics, University College Cork, Cork, Ireland; Departments of Obstetrics and Pediatric Surgery, Division of Women and Child Health, Universität Leipzig, Leipzig, Germany).

Die Tiere wurden im Haus für experimentelle Tierhaltung (HET) der Universität Bonn nach tierschutzrechtlichen Standards aufgezogen und gehalten. Die Haltung erfolgte in Käfigen aus Polycarbonat (Tecniplast, Hohenpeißenberg). Diese waren in ein Regalsystem integriert, das für eine separate Belüftung und konstante Umweltbedingungen sorgte (20-22 °C Temperatur, 50% relative Luftfeuchtigkeit, 12 Stunden Tag/Nacht-Rhythmus). Die Tiere hatten zu jeder Zeit Zugang zu autoklaviertem

Futter und Trinkwasser ad libitum. Die Genehmigung für die Tierversuche erfolgte vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV 84-0204.2014.A137).

4.1.5.1 Neprilysin Knock-Out Mäuse

Durch Rückkreuzung der bereitgestellten $NEP^{-/-}$ Mäuse mit C57BL/6J-Wildtyp Mäusen wurden heterozygote Mäuse erstellt. Durch erneute Verkreuzungen der heterozygoten Tiere erhielten wir weitere Neprilysin defiziente Versuchstiere. Für diese Mäuse sind ein übergewichtiger Phänotyp (Muenzner et al., 2016) und erhöhte neuronale Amyloid- β -Peptid Level (Nilsson et al., 2015) beschrieben. Die Auswirkung eines Neprilysin Knock-Out auf Stoffwechselprozesse in der Leber ist bisher nicht genauer untersucht.

4.2 *In vivo* Methoden

4.2.1 Narkosetechnik

Die Messung der hämodynamischen Parameter und die Operationen zur Organentnahme erfolgten durch mich unter Anästhesie mittels intraperitonealer Ketamin/Xylazin-Injektion. Da Ketamin nur einen sehr geringen kreislaufdepressiven Effekt bei den Versuchstieren zeigt, ist unter dieser Narkoseform eine verlässliche Erhebung der Kreislaufparameter möglich (vergleichbar mit wachen, nicht narkotisierten Tieren). Hierbei handelt es sich um eine sehr häufig angewendete Analgosedierung zur invasiven Untersuchung der Hämodynamik bei Mäusen.

4.2.2 Induktion der Fibrose mittels Tetrachlorkohlenstoff (CCl_4)-Intoxikation

Zur Herbeiführung einer Leberzirrhose wurden 92 Mäuse (54 wt, 38 $NEP^{-/-}$) zweimal wöchentlich für einen Zeitraum von insgesamt 4 Wochen mittels 2l/min CCl_4 begast. Diese Arbeit wurde von einem Kollegen durchgeführt. Die Begasungszeit wurde wochenweise von 60 über 90 auf 120 Sekunden gesteigert. Diese Methode bewirkt im Gegensatz zu einer Gallengangsliaktur eine gleichmäßigere Fibrosierung der Leber und ist somit ein gängiges Modell zur Untersuchung der zugrundeliegenden Pathomechanismen.

Die Intoxikation wurde im HET in den Käfigen durchgeführt. Der Tetrachlorkohlenstoff befand sich in einem Glaskolben. Dieser war über einen Schlauch mit den Käfigen verbunden. Über den Schlauch wurde das Gasgemisch durch Druckluft in die Käfige geleitet. Das Durchflussvolumen des Gasgemisches betrug 2 l/min. Nachdem die Begasungszeit verstrichen war, wurden die Tiere für den gleichen Zeitraum bei geschlossenem Deckel der CCl₄-angereicherten Luft ausgesetzt. Erst dann wurde der Käfigdeckel geöffnet und das Gasgemisch konnte entweichen. Zusätzlich war das Trinkwasser mit Phenobarbital (Luminol, 0,5 g/l) versetzt. Dadurch wird eine erhöhte Toxizität erreicht und die Leberschädigung beschleunigt.

4.2.3 Hämodynamische Messung und Organentnahme

Nach Durchführung der oben beschriebenen Narkose wurden die Mäuse auf einer Styroporunterlage mit nach oben zeigendem Abdomen fixiert. Das Abdomen wurde geöffnet und die Eingeweide nach rechts geschoben. Mittels eines PE-50 Katheters (PE 0,28x0,61; Everhardts, Meckenheim, Deutschland) wurden die Vena Portae und die Milz katheterisiert, um den Portaldruck zu bestimmen. Die Katheter wurden über Druckaufnehmer (Isotec-Pressure Transducer, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland) an den Druckmesser (HRM Typ 669 und TAM-D Typ 705/2 im Plugsys-Minicase Typ 609, Pressure Transducer, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland) angeschlossen und der Nullpunkt 1 cm über dem Operationstisch geeicht. Nach dieser Messung wurden die Tiere mittels cervikaler Disslokation getötet und es erfolgte die Entnahme der relevanten Organe. Die entnommene Leber wurde nach dem Wiegen in eine sterile Petrischale in mehrere Stücke zerteilt. Für die Anfertigung der histologischen Bilder wurde ein Leberlappen in 4% Formaldehyd überführt. Die restlichen Stücke wurden unmittelbar nach der Entnahme bis zur weiteren Verarbeitung in einem -80 °C kalten Kühlschrank gelagert.

4.2.4 Isolierung primärer muriner HSC

Die HSC Isolation wurde von den BTA durchgeführt mittels eines *in situ*-Verdau. Auf diesen folgte eine Dichtegradientenzentrifugation, bei der man sich der spezifischen Dichte der Vitamin A-reichen HSC bedient (Friedman et al., 1985). Es ist bekannt, dass

Größe und Anzahl der Vitamin A speichernden Lipidtropfen im Alter ansteigen. Deswegen wurden nur Mäuse verwendet, die älter als 240 Tage alt waren.

Nach Anästhesie durch die oben beschriebene intraperitoneale Injektion wurde die Maus fixiert. Es folgte die Eröffnung des Abdomens und die Freilegung der Pfortader. In diese wurde eine 27G-Venenverweilkanüle eingeführt und unmittelbar danach oberhalb die posteriore Vena cava durchtrennt. Um die HSC aus dem Gewebe zu lösen, sind drei verschiedene Perfusionsschritte nötig. Diese wurden mit einer Flussrate von 4,9 ml/min durchgeführt.

Zunächst wird überschüssiges Blut mit der EGTA-Lösung für 3 Minuten aus den Lebersinusoiden ausgespült. Eine 2- bis 4-minütige Waschung mit Pronase- und Kollagenase-Lösung löst die Desmosomen der Zell-Zell-Komplexe. Diese Perfusion führt zu einem Farbwechsel der Leber von einer dunkelroten zu einer gelblichen Farbe. Die so behandelte Leber wurde herauspräpariert und unter der Werkbank in der DNase-Lösung zerkleinert und anschließend für einige Minuten bei 37 °C unter stetigem Rühren inkubiert. Die so entstandene Suspension wurde durch einen Filter mit 150 µm Porendurchmesser in 50 ml Zentrifugenröhrchen gefiltert und dann für 7 Minuten bei 500 x g bei 4 °C zentrifugiert. Darauf folgte eine zweimalige Waschung mit HBSS(+Ca²⁺+Mg²⁺) + 1% FKS. Dann wurde das Pellet in 34 ml HBSS(+Ca²⁺+Mg²⁺) + 10% FKS aufgelöst. Zu dieser Lösung wurden noch 13,5 ml der Nycodenz-Stock-Lösung hinzugefügt (Endkonzentration 8,2%). Nach einer weiteren Zentrifugation für 24 Minuten bei 1400 x g bei 4 °C ohne Bremse konnte man eine weißliche Bande erkennen, in der die HSC angereichert waren. Diese Bande wurde abgenommen und erneut mit HBSS(+Ca²⁺+Mg²⁺) + 10% FKS gewaschen. Es folgte eine weitere Zentrifugation bei 500 x g für 7 Minuten bei 4 °C. Daraufhin wurden die HSC in Zellmedium resuspendiert. Die HSC Aktivierung erfolgte über den Kontakt zur unbeschichteten Plastikoberflächen. Am siebten Tag ohne Passagierung wurden die Zellen für die entsprechenden Versuche verwendet.

4.3 Molekularbiologische Methoden

Die folgenden molekularbiologischen Arbeitsschritte wurden von den BTA unserer Abteilung durchgeführt, die in Kapitel 4.3.4.3 beschriebene Auswertung von mir.

4.3.1 Isolierung und Reinigung von DNA

Die DNA wurde aus den Schwanzspitzen gewonnen. Dazu wurden diese über Nacht in 250 µl Lysispuffer und 50 µg Proteinase K bei 55 °C und 800 Ump verdaut. Nach Zentrifugation bei 13.000 x g für 15 Minuten bei Raumtemperatur wurde der Überstand abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Da hinzu wurde das gleiche Volumen Isopropanol gegeben. An der Phasengrenze der beiden Flüssigkeiten wurde die ausfallende genomische DNA sichtbar. Es folgte eine zweimalige Zentrifugation bei 13.000 x g für 15 Minuten bei 4 °C mit anschließender Waschung mit 500 µl 70%igen Ethanol (v/v) gefolgt von einer weiteren Zentrifugation bei 13.000 x g für 15 Minuten bei 4 °C. Das so gewonnene Pellet wurde bei 50 °C auf dem Heizblock getrocknet und dann in 100 µl H₂O bidest. für 30 Minuten bei 50 °C gelöst. Konzentration und Reinheit der DNA wurden photometrisch gemessen.

4.3.2 Isolierung und Reinigung von RNA

Die Isolierung und Reinigung der RNA wurde mit dem ReliaPrep RNA Tissue Miniprep System durchgeführt. In einem 2 ml Reaktionsgefäß wurden die Leberproben mit dem mitgelieferten Puffer und 1-Thioglycerol vermischt. Mittels einer Retsch-Kugel wurde die Leber im Retsch-Schüttler für 4 Minuten bei 30 Hertz zerkleinert. Die weiteren Schritte erfolgten nach dem Protokoll des Kits und anschließend wurde die Konzentration und Reinheit der RNA photometrisch bestimmt.

4.3.3 Horizontale Gelelektrophorese – Auftrennung von DNA

Die Auftrennung der DNA nach ihrer Größe erfolgte mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese. Die Konzentration der Agarosegele lag dabei zwischen 1% und 2% (w/v), je nach Größe der aufzutrennenden DNA. In der Mikrowelle wurden in einem 500 ml Becherglas 200 ml TAE-Puffer mit der benötigten Agarosemenge zum Sieden gebracht. Das flüssige Gel wurde dann luftblasenfrei in eine Gießkammer gegossen, mit 10 µl Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,05‰) vermischt und anschließend abgekühlt. Die DNA-Probe wurde in TAE-Puffer bei 10-12 V/cm in 0,5-1 Stunden aufgetrennt. Das interkalierte Ethidiumbromid wurde mit UV-Licht der Wellenlänge 302 nm angeregt und zur Fluoreszenz gebracht. So konnte die DNA visualisiert und dokumentiert werden.

4.3.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR dient der Vervielfältigung einer bestimmten DNA Sequenz *in vitro*. Dabei wird der zu untersuchende Bereich der DNA über flankierende Oligonukleotide bestimmt. Die DNA-Polymerase „kopiert“ diesen Abschnitt. Die dabei entstehenden Produkte dienen im nächsten Zyklus wiederum als Vorlage, so dass sich die entsprechende Sequenz über mehrere Zyklen exponentiell vermehren lässt.

4.3.4.1 Standard PCR

Die Standard PCR wurde über mehrere Zyklen durchgeführt. Auf eine 5-minütige initiale Denaturierung bei 96 °C folgten 35 Mal die drei Arbeitsschritte: 30 Sekunden Denaturierung bei 96 °C, 30 Sekunden Annealing bei 5-10 °C unter der Schmelztemperatur der Oligonukleotide (Berechnung der Schmelztemperatur beschrieben in 4.1.2), pro kb synthetisierter DNA 1 Minute Elongation bei 72 °C. Abschließend folgte eine 7-minütige Elongation bei 72 °C, bevor die Proben auf 4 °C gekühlt wurden.

4.3.4.2 Reverse Transkription

Die reverse Transkription dient der Umschreibung von RNA in cDNA. Verwendet wurde hierzu das ImProm-II™ Reverse Transcription System. Im Thermocycler wurde der Ansatz für 5 min bei 70 °C erhitzt und dann für 5 min auf Eis gekühlt. Anschließend wurde der Reverse Transkriptions-Mix dazugegeben. Die Proben werden danach in drei Stufen im Thermocycler erhitzt: 5 min bei 25 °C, 60 min bei 42 °C, 15 min bei 70 °C. Die so gewonnene cDNA wurde im Verhältnis 1:10 zu einer Gebrauchslösung verdünnt.

4.3.4.3 Relative Echtzeit-PCR (rtPCR)

Die rtPCR findet Anwendung bei der Quantifizierung bestimmter Gene. Bei der TaqMan-Methode werden Oligonukleotide verwendet, die mit einem fluoreszierenden Farbstoff (FAM oder VIC) an ihrem 5'-Ende und einem sogenannter „Quencher“ (TAMRA) an ihrem 3'-Ende gekoppelt sind. Liegen die beiden nah bei einander, wird die Emission der Farbstoffe vom „Quencher“ absorbiert. Bindet das Oligonukleotid jedoch an die cDNA, kann die DNA-Polymerase durch ihre 5'→3' Exonuklease Aktivität die fluoreszierende

Gruppe abspalten. Daraufhin kann die Fluoreszenz gemessen werden und ihre Intensität ist dabei proportional zur Menge der synthetisierten DNA.

Mittels Echtzeit-PCR wurden von der cDNA einer Probe die 18S-RNA und das gewünschte Gen jeweils in Doppelbestimmung gemessen. Die Festlegung des messbaren Grenzbereiches wurde von der 7300 System SDS Software durchgeführt. Danach wurde der 18S-RNA-Wert von dem Wert des Zielgens subtrahiert (Δct). Dieser Arbeitsschritt diente der Normierung. Um einen Vergleich aller Proben miteinander zu ermöglichen, wurde von jeder Behandlungsgruppe jeweils der Mittelwert gebildet. Die wt Kontrollgruppen wurden gleich eins und die NEP^{-/-} Gruppen dazu in Relation gesetzt ($\Delta\Delta\text{ct}$).

4.4 Biochemische Methoden

Folgende biochemische Methoden wurden von mir durchgeführt.

4.4.1 Homogenisierung von Leberproben

Die Homogenisierung von Leberproben wurde auf Eis durchgeführt. Dazu wurde ein Stück des tiefgefrorenen Leberlappens mit einem sterilen Einmalskalpell abgeschnitten. Es wurde ein Arbeitsgemisch aus Homogenisationspuffer, Protease Inhibitor Cocktail (1% v/v) und Orthovanadat (1% v/v) hergestellt. 1 ml dieser Mischung wurde mit dem Stück Leber in den Homogenisator (Potter S) überführt. Das erhaltene Lysat wurde anschließend bei 13.000 x g und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und bei -20 °C gelagert.

4.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration der gewonnenen Lysate wurde mit dem Detergent Compatible (DC) Protein Assay Kit quantifiziert. Diese Methode beruht auf einer Farbentwicklung im alkalischen Milieu mit einer maximalen Absorption bei 750 nm. Zur Eichung wurden 8 Verdünnungen von 0 - 1,47 mg/ml bovinem Serumalbumin (BSA) angefertigt. Bei Leberlysaten wurden 1:25 und 1:50 Verdünnungen gewählt. Für die Dreifachbestimmung wurden jeweils 5 µl Proteinlösung in eine Flachboden-Mikrotiterplatte pipettiert.

Das Nachweisreagenz A/S wurde im Verhältnis 1:50 aus Reagenz S und Reagenz A hergestellt. 25 µl dieses Gemischs und 200 µl des Reagenz B wurden zu den Proben gegeben. Nach einer 15-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die Absorption der Proben bei 750 nm im Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) Reader bestimmt.

4.4.3 Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine können im denaturierten Zustand entsprechend ihrem Molekulargewicht in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden. Die diskontinuierliche SDS-PAGE weist dabei unterschiedliche pH-Werte und Porengrößen in Sammel- und Trenngel auf, was eine höhere Bandenschärfe und eine größere Trennleistung erlaubt. Die Konzentration des Acrylamids im Trenngel konnte dabei je nach der Größe der aufzutrennenden Proteine zwischen 8, 10 und 15% variiert werden.

Zur Stabilisierung wurden die Proteinproben mit 1/4 Volumen 4x Probenpuffer versetzt und anschließend für 5 min bei 95 °C denaturiert. Dann wurden die Proben entsprechend ihrer Proteinkonzentration in die Geltaschen des Sammelgels pipettiert. Die Elektrophorese wurde mit einer Spannung von 14-20 V/cm durchgeführt. Ein vorgefärbter Größenstandard diente als Marker.

4.4.4 Transfer von Proteinen auf eine Membran (Western Blot)

Der Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte mittels Western Blot. Dazu wurden drei Gel-Blotting-Papiere mit einer Abmessung von etwa 10 x 7,5 cm in Transferpuffer getränkt und anschließend auf die schwarze Seite der Kassette gelegt. Das Polyacrylamidgel mit den aufgetrennten Proteinen wurde ebenfalls kurz in Transferpuffer gewaschen und dann auf die Blotting-Papiere geschichtet. Die Membran wurde mit Transferpuffer befeuchtet und auf das Gel gelegt. Zuletzt wurden zwei weitere, in Transferpuffer getränkte, Gel-Blotting-Papiere obenauf geschichtet. Eventuelle Luftblasen wurden mit einer Rolle ausgestrichen. Der Blot erfolgte in einer mit Transferpuffer gefüllten Blottingkammer über einen Zeitraum von 60 Minuten bei 1-3 mA/cm². Zur Schnelldetektion der übertragenen Proteinbanden wurde diese mit der Ponceau S-Lösung reversibel angefärbt.

4.4.5 Immunologische Detektion von Proteinen mittels Chemilumineszenz

Durch eine Blockierung der Membranoberfläche mit 5% Magermilchlösung oder 2,5% BSA-Lösung bei Raumtemperatur auf dem Schüttler können unspezifische Reaktionen der Antikörper mit der Membran verhindert werden. Es folgte eine kurze Waschung mit (Phosphate buffered saline with Tween-20) PBST. Die Antikörper wurden in verschiedenen Blockierungslösungen verdünnt und auf die Membran gegeben. Die Inkubation erfolgte entweder über 60 Minuten bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C. Anschließend noch ungebundener primärer Antikörper wurde durch viermaliges 5-minütiges Waschen in PBST entfernt. Die Inkubation mit dem entsprechenden sekundären Antikörper erfolgte nach den gegebenen Vorschriften über 60 Minuten. Nach dieser Zeit wurde die Membran erneut viermal für 5 Minuten in PBST gewaschen. Der sekundäre Antikörper ist an eine Peroxidase gekoppelt, so dass die spezifische Proteinbande durch eine Lichtreaktion sichtbar gemacht werden kann. Hierzu diente das Ace Glow™ Solution-Kit: Solution A und Solution B wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und auf die Membran pipettiert. Die Peroxidase oxidiert das Luminol, was zu einer Lichtabstrahlung führt, die in der Entwicklungsmaschine (ChemiSmart) detektiert werden kann. Dazu wurde die feuchte Membran unter einer Klarsichtfolie in den ChemiSmart gelegt. Die Membran wurde am Objektiv der Kamera scharf gestellt und je nach Signalstärke unterschiedlich lange belichtet. Das Bild zur weiteren Auswertung wurde auf dem Computer gespeichert.

4.4.6 Densitometrische Quantifizierung der Proteinmenge

Die Proteinmenge auf dem Western Blot wurde mit der Auswertungssoftware „Bio-1D“ bestimmt. Die vom ChemiSmart erkannten Lichtsignale der Proteinbanden wurden maschinell oder manuell markiert. Die Stärke des Signals wurde dann anhand der Tiefenschwarzfärbung gemessen. Die Ergebnisse wurden als Excel-Datei gespeichert und konnten dann weiter bearbeitet und verglichen werden.

4.4.7 Hydroxyprolinmessung

Hydroxyprolin (HP) ist eine Aminosäure, die zahlreich in Kollagenproteinen eingebaut ist. Bei der Leberfibrose kommt es zu einer Akkumulation von Kollagen, so dass der

enzymatisch gemessene Hydroxyprolinegehalt als indirekter Marker des Fibrosegrades dient. Als Substrat dienten 50 bis 100 mg Leber, die mit der entsprechenden Menge 6 N Chlorwasserstoff (HCl) vermischt wurden (20 µl HCl / 1 mg Leber). Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 110 °C wurde das Gemisch homogenisiert und anschließend für weitere 16 Std bei 110 °C inkubiert. Nach Filtration durch einen Papierfilter wurde jeweils 30 µl der Probe in Doppelbestimmung mit 30 µl Methanol vermischt. Diese Proben wurden über Nacht im Heizschrank getrocknet. Aus einer Stammlösung (1 mg/µl Hydroxyprolin in 50%(v/v) Isopropanol) wurde eine Standardreihe mit 10 Verdünnungen (0 - 2,6 µg Hydroxyprolin) hergestellt. Die über Nacht getrockneten Proben wurde in 1 ml 50%(v/v) Isopropanol gelöst. Zu dieser Lösung und den Standardreihen wurde jeweils Chloramin-T-Lösung pipettiert, gefolgt von einer 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur. Zuletzt wurde noch 1 ml Ehrlich's Reagenz-Lösung hinzugegeben. Im Anschluss wurde alles gemischt und 90 Minuten bei 50 °C im Heizschrank inkubiert. Auch hier kommt es zu einer Farbreaktion, die die Lösung rötlich färbt. Die Intensität der Färbung ist dabei proportional zur Hydroxyprolinkonzentration in der Probe. Die photometrische Messung erfolgte bei 558 nm gegen den Leerwert. Mit Hilfe der Standardreihe konnte mit folgender Formel der Hydroxyprolinegehalt bestimmt werden:
Absorption / Koeffizient der Standardgerade x 666,7 = µg/g Leber

4.5 Zellbiologische Methoden

Die im Folgenden aufgeführten zellbiologischen Methoden wurden bei sterilen Bedingungen von mir unter der Werkbank durchgeführt.

4.5.1 Zellzahlbestimmung

Die Anzahl und Konzentration von in Lösung gebrachten Zellen wurde mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Trypanblau mit einer Konzentration von 0,1% (v/v) wurde zu der Zellsuspension gegeben, da damit eine Unterscheidung von lebenden und toten Zellen möglich ist. Tote Zellen werden angefärbt, lebende Zellen mit intakter Zellmembran nehmen den Farbstoff jedoch nicht auf und werden dementsprechend nicht angefärbt. Die Neubauer-Zählkammer besteht aus mehreren kleinen Quadraten mit einem definierten Volumen von 0,1 mm³. Bei bekanntem Volumen und ausgezählten

Zellen in diesem Volumen lässt sich somit ein Rückschluss auf die Zellzahl in der Ursprungssuspension ziehen:

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

4.5.2 Zellkultivierung

In dem Brutschrank war eine konstante Temperatur von 37 °C mit 5% CO₂ gegeben. In diesem Milieu wurden die Zellen inkubiert. Nach ihrer Isolation wurden die HSC in Plastikkulturflaschen in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) kultiviert, das alle 48 Stunden erneuert wurde.

4.5.3 NPY Inkubation der Zellen

Das pulverförmige NPY (Sigma-Aldrich, #N5017) wurde mit Phosphate buffered saline (PBS) zu einer Stammlösung angesetzt (1 mg/ml). Aus der Stammlösung wurde durch weiteres Verdünnen eine Arbeitslösung der Konzentration 10⁻⁷ M angefertigt. Mit dieser wurden die Zellen für drei Tage inkubiert und anschließend für die Versuche verwendet.

4.5.4 Ernten der Zellen für DNA- oder RNA-Isolation

Nach Entfernung des Kulturmediums wurden 40 µl/cm² Accutase zu den Zellen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten im Brutschrank wurde überprüft, ob sich alle Zellen vom Boden der Kulturflasche gelöst hatten. War das nicht der Fall, wurden sie mit einem sterilen Schaber abgelöst. Im Anschluss wurde wieder Medium in die Flasche gegeben, um die Reaktion der Accutase zu stoppen. Die Suspension wurde 5 Minuten bei 350 x g und 4 °C zentrifugiert, das Zellpellet mit sterilem PBS gewaschen und erneut für 5 Minuten bei 350 x g und 4 °C zentrifugiert. Dann wurde das Pellet mit 1 ml PBS in Lösung gebracht und nochmals für 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert, diesmal jedoch bei 10.000 x g. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet bis zum weiteren Gebrauch bei -80 °C gelagert.

4.5.5 HSC Kontraktionsassey

Die Wells wurden mit 0,5 ml BSA gefüllt und für 1h bei 37 °C inkubiert. Anschließend folgte eine zweimalige Waschung mittels 1xPBS, gefolgt von einer 15-minütigen Trocknungsphase. Die Kollagenplättchen wurden nach festem Schema aus NaOH,

10xPBS und H₂O gegossen. Die Zellen wurden aus ihren Wells gelöst, gezählt und auf 50.000/ml in 2% Fetal calf serum (FCS) DMEM (37 °C) verdünnt. 500 µl dieser Verdünnung wurden auf jedes Kollagenplättchen pipettiert und für 3 Stunden inkubiert. Nach dieser Inkubationsphase wurden die Gele zweimal mit 1 ml 1xPBS gewaschen. Daraufhin wurden die Gele mit 0,5 ml Medium bedeckt. Dem Medium war je nach Versuchsreihe NPY in unterschiedlichen Konzentrationen beigefügt. Die Ränder des Gels wurden mit einer Pipettenspitze vom Rand des Wells gelöst. Nach 12 und 24 Stunden wurden die Gele fotografiert. Diese Fotos und die darauf dokumentierte Größenabnahme wurde mit dem Programm Image J analysiert.

4.6 Immunhistochemie

Immunhistochemisch lassen sich gezielt Proteine in Gewebeschnitten anfärben. Somit lassen sich die Proteinmenge und ihre Verteilung in den Organen in den unterschiedlichen Versuchsgruppen vergleichen. Die Färbungen wurden von Mitarbeitern des Institutes für Pathologie an der Uniklinik Bonn an in Paraffin-eingebetteten Lebern durchgeführt, die mit Formalin fixiert worden waren.

4.6.1 α -smooth muscle actin (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.

4.6.2 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.

4.6.3 Auswertung der Immunhistochemie

Um eine quantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbungen zu ermöglichen, wurden diese mit der Software Panoramic Midi eingescannt und digitalisiert. Dieser erste Arbeitsschritt erfolgte durch Mitarbeiter des Institutes für Pathologie an der Uniklinik Bonn. Die weiteren Arbeitsschritte habe ich getätigt. Nach Festlegung des Profils und Definition der zu erfassenden Bereiche wurde die quantitative Messung mittels der Software Panoramic Viewer durchgeführt. Der resultierende Messwert stellt dabei die prozentuale Positivfärbung im markierten Bereich dar. Von den Leberschnitten wurden zudem repräsentative Bilder in unterschiedlichen Vergrößerungen angefertigt und abgespeichert.

4.7 Statistische Auswertung

Die gewonnenen Daten habe ich mit dem Programm GraphPad Prism ausgewertet. Zur Untersuchung der statistischen Signifikanz wurde ein parameterfreier statistischer Test, der 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.

5. Ergebnisse

5.1 Allgemeine Charakteristika des Tiermodells

Tab. III: Gewichtsdaten

	Körpergewicht (BW) (g ± s.e.m.)	Lebergewicht (LW) (g ± s.e.m.)	LW/BW (± s.e.m.)
wt Ctr. (n= 26)	23,21 ± 0,701	1,09 ± 0,076	0,049 ± 0,0012
NEP ^{-/-} Ctr. (n= 8)	26,10 ± 1,282	1,45 ± 0,101 ⁺	0,059 ± 0,0079
wt CCl ₄ (n= 54)	23,35 ± 0,459	2,09 ± 0,156	0,084 ± 0,0024
NEP ^{-/-} CCl ₄ (n= 38)	22,14 ± 0,515	1,73 ± 0,046 ⁺	0,078 ± 0,0012 ⁺

Tabellarische Auflistung der Gewichtsdaten. Aufgeführt wird der Mittelwert mit Standardabweichung. Verglichen wurden jeweils wt und NEP^{-/-} Tiere der Kontroll- (Ctr.) und Zirrhosegruppe (CCl₄). + entspricht einem p-Werte von < 0,05. Die Messdaten wurden in einem Alter von 3 Monaten erhoben.

Das Körpergewicht der untersuchten Tiere zeigte keine signifikanten Unterschiede. Der höhere Durchschnittswert bei NEP^{-/-} Tiere der Kontrollgruppe (Ctr.) zeigte eine höhere Streuweite (26,1 g ± 1,282 zu 23,2 g ± 0,701). Das Körpergewicht der zirrhotischen Tiere war in beiden Tiergruppen nahezu identisch (22,14 g zu 23,35 g).

In der Kontrollgruppe zeigten die NEP^{-/-} Tiere ein signifikant erhöhtes Lebergewicht (1,45 g zu 1,09 g). Die Induktion einer Zirrhose führte zu umgekehrten Verhältnissen mit einem signifikant niedrigeren Lebergewicht bei NEP^{-/-} Tieren (1,73 g zu 2,09 g).

Auch beim Verhältnis LW/BW zeigte sich ein signifikant niedrigeren Wert bei zirrhotischen NEP^{-/-} Tieren (0,078 zu 0,084). In der Kontrollgruppe war kein signifikanter Unterschied nachweisbar (0,059 zu 0,049).

5.2 Hydroxyprolinegehalt

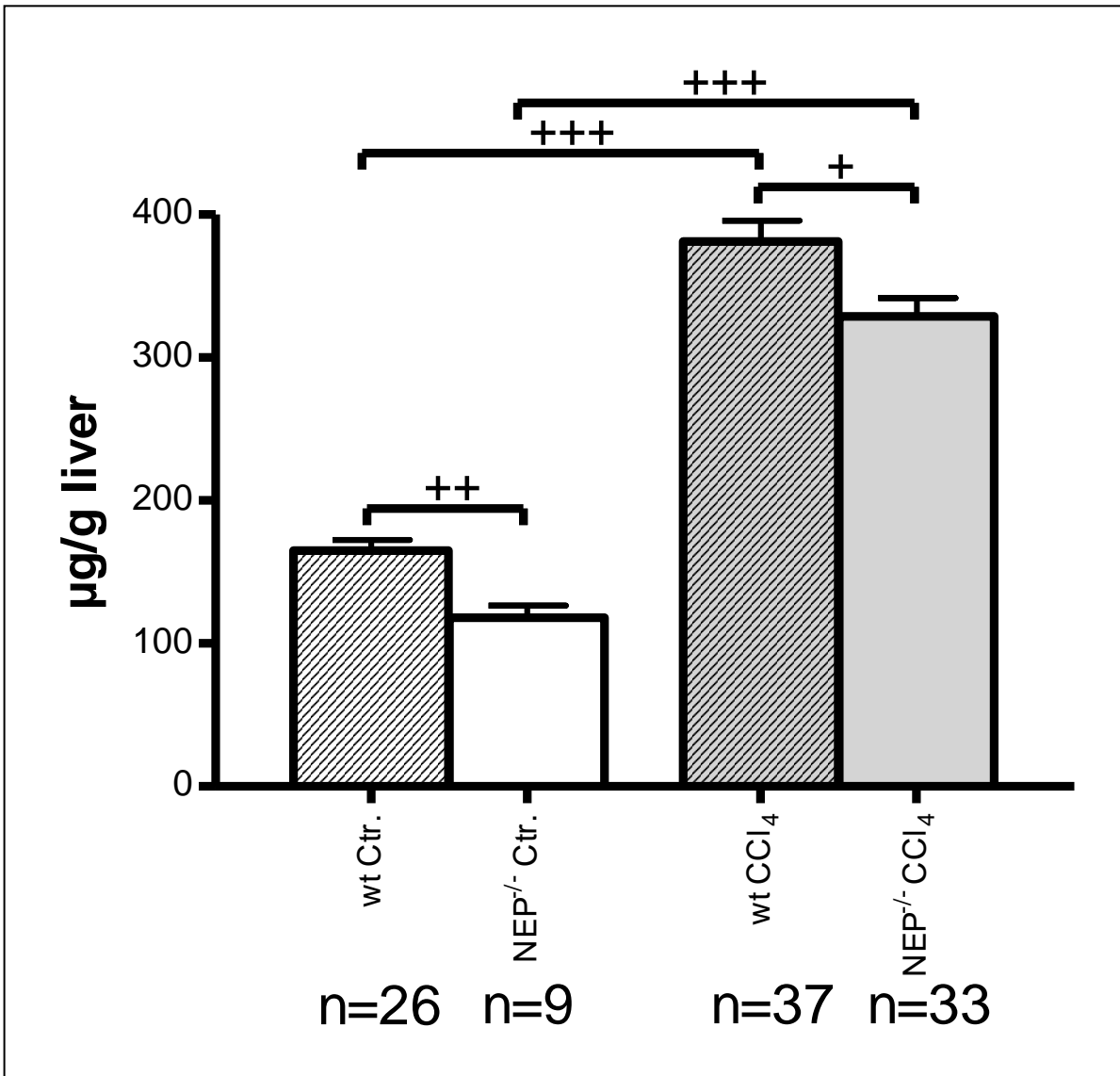


Abb. 9: Hydroxyprolinegehalt in µg/g Lebergewebe von wt und NEP^{-/-} Mäusen (Ctr. und CCl₄). Im Folgenden sind Mittelwert und Standardfehler aufgeführt: wt Ctr.: 165 ± 7 µg/g; NEP^{-/-} Ctr.: 118 ± 9 µg/g; wt CCl₄: 381 ± 14 µg/g; NEP^{-/-} CCl₄: 329 ± 12 µg/g. .+ entspricht einem p-Werte von < 0,05, ++ p< 0,005 und +++ p< 0,001.

In der Kontrollgruppe war im Lebergewebe der NEP^{-/-} Tiere signifikant weniger HP nachzuweisen (118 µg/g Lebergewebe zu 165 µg/g Lebergewebe). Wie zu erwarten, führte die CCl₄ Intoxikation bei beiden Tiergruppen zu einem signifikanten Anstieg des Hydroxyprolinegehaltes mit anschließend mehr als doppelt so hohen Werten. Weiterhin bestand aber auch in der Fibrosegruppe ein signifikant höherer Wert bei den wt Tieren (329 µg/g Lebergewebe zu 381 µg/g Lebergewebe).

5.3 Sirius-Rot Färbung

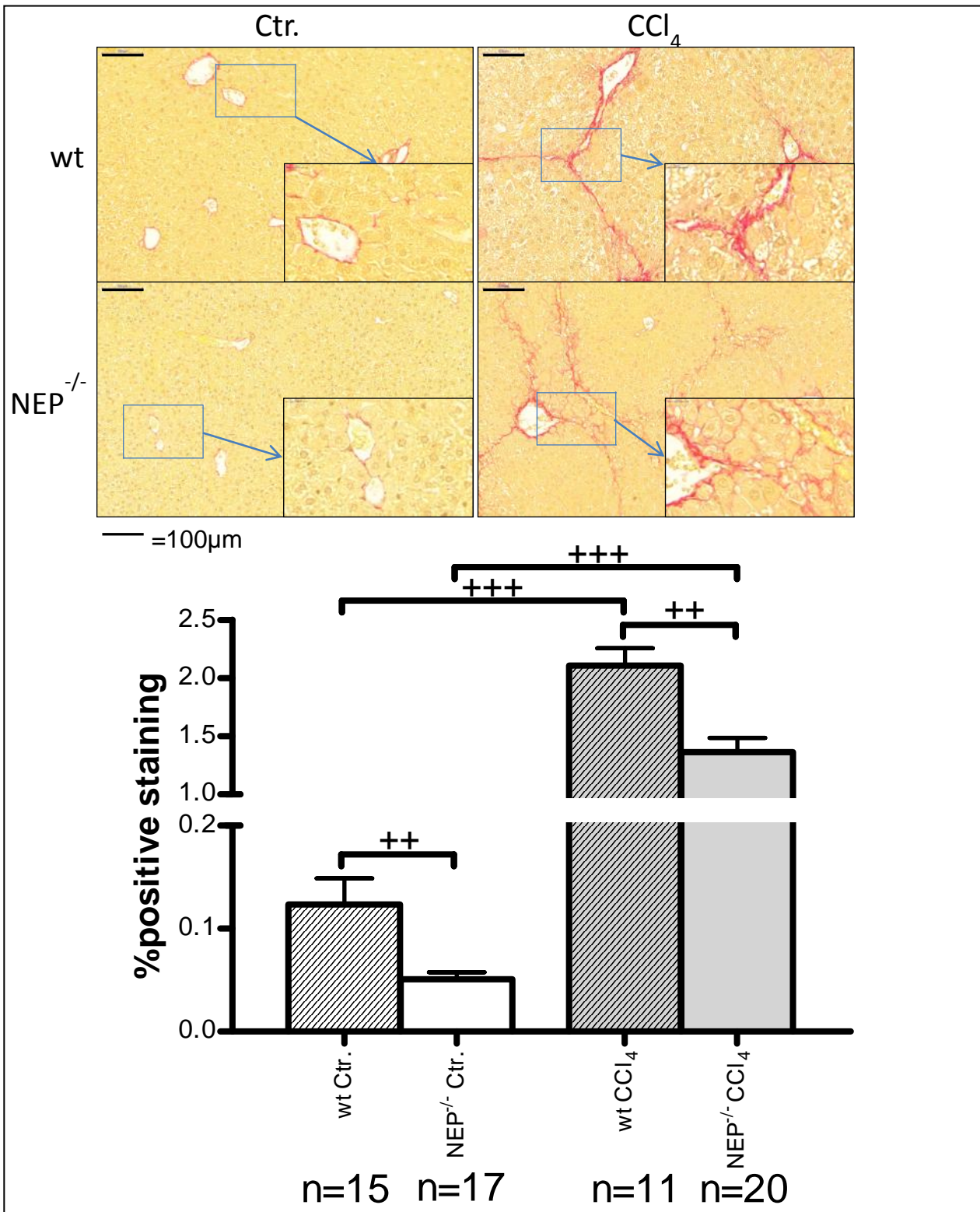


Abb. 10: Exemplarische Abbildungen und Quantifizierung der mittels Sirius-Rot gefärbten Leberschnitte von wt und NEP^{-/-} Mäusen (Ctr. und CCl₄). Im Folgenden sind Mittelwert und Standardfehler aufgeführt: wt Ctr.: 0,12 ± 0,02 %; NEP^{-/-} Ctr.: 0,05 ±

0,006 %; wt CCl₄: 2,1 ± 0,15 %; NEP^{-/-} CCl₄: 1,36 ± 0,12 %.+ entspricht einem p-Werte von < 0,05, ++ p< 0,005 und +++ p< 0,001.

In den Leberschnitten fällt bei der Sirius-Rot Färbung eine insgesamt schwächere Anfärbung in den Organen der NEP^{-/-} Tiere auf. Bezogen auf die Gesamtfläche färbten sich in der Kontrollgruppe 0,05% des Lebergewebes an, verglichen mit 0,12% bei den wt Tieren. Nach der CCl₄ Intoxikation zieht Narbengewebe in gut sichtbaren Strängen durch das Organ. In beiden Gruppen kommt es etwa zu einer Verzehnfachung der angefärbten Areale. Somit besteht auch in dieser Gruppe weiterhin eine stärkere Anfärbung bei den wt Tieren (1,3% zu 2,3% angefärbte Fläche). Dies entspricht in beiden Gruppen einer signifikant stärkeren Anfärbung bei wt Tieren.

5.4 Portaldruck

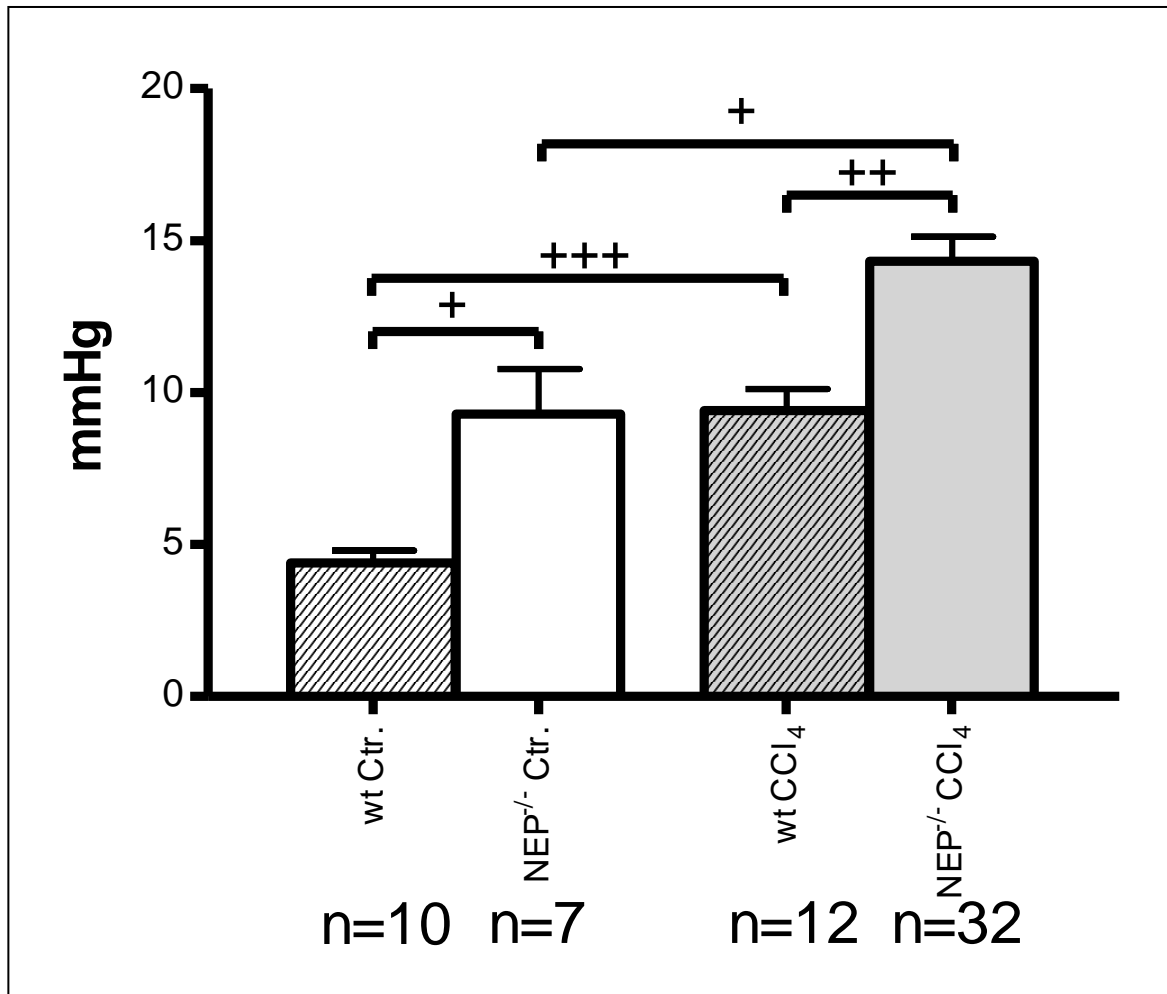


Abb. 11: Portaldruck (in mmHg) von wt und NEP^{-/-} Mäusen (Ctr. und CCl₄). Im Folgenden sind Mittelwert und Standardfehler aufgeführt: wt Ctr.: 4,4 ± 0,4 mmHg; NEP^{-/-} Ctr.: 9,3 ± 1,5 mmHg; wt CCl₄: 9,4 ± 0,7 mmHg; NEP^{-/-} CCl₄: 14,3 ± 0,8 mmHg. + entspricht einem p-Werte von < 0,05, ++ p< 0,005 und +++ p< 0,001.

Der mittels Katheterisierung von Milz und Pfortader bestimmte Portaldruck zeigte sich bei NEP^{-/-} Mäusen signifikant erhöht, verglichen mit den entsprechenden wt Mäusen. In der unbehandelten Kontrollgruppe lag der bestimmte Wert der NEP^{-/-} Tiere mit 9,3 mmHg bereits in einem pathologischen Bereich. Der Druck der wt Ctr. Tiere war mit 4,4 mmHg normwertig. Nach Induktion der Fibrose zeigten auch die wt Mäuse einen pathologischen Portaldruck mit jetzt etwa 9,4 mmHg. In der NEP^{-/-} Gruppe stieg der Druck durch CCl₄ Intoxikation ebenfalls weiter an auf schließlich 14,3 mmHg.

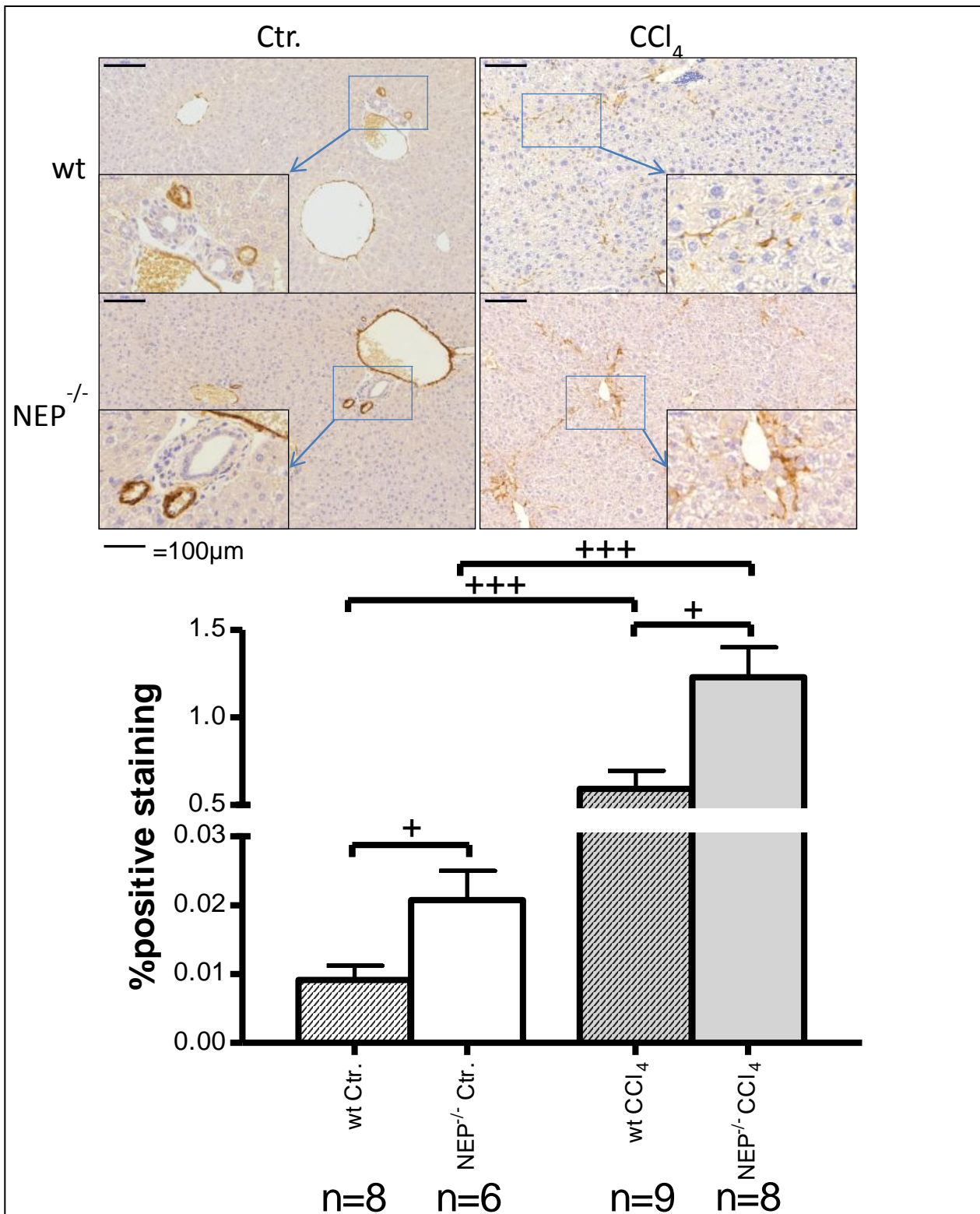
5.5 α -SMA Färbung

Abb.12: Exemplarische Abbildungen und Quantifizierung der mittels α -SMA gefärbten Leberschnitte von wt und $\text{NEP}^{-/-}$ Mäusen (Ctr. und CCl_4). Im Folgenden sind Mittelwert und Standardfehler aufgeführt: wt Ctr.: $0,009 \pm 0,002$ %; $\text{NEP}^{-/-}$ Ctr.: $0,02 \pm 0,004$ %; wt

CCl₄: $0,59 \pm 0,1$ %; NEP^{-/-} CCl₄: $1,23 \pm 0,17$ %. + entspricht einem p-Werte von $< 0,05$, ++ $p < 0,005$ und +++ $p < 0,001$.

In den Leberschnitten fällt bei der α -SMA Färbung eine insgesamt stärkere Anfärbung in den Organen der NEP^{-/-} Tiere auf. Bezogen auf die Gesamtfläche färbten sich in der Kontrollgruppe 0,02% des Lebergewebes an, verglichen mit 0,009% bei den wt Tieren. Nach der CCl₄ Intoxikation treten die Septen der Leberläppchen deutlicher zur Geltung und in beiden Gruppen kommt es zu einem massiven Anstieg der angefärbten Areale. Aber weiterhin besteht in dieser Gruppe eine stärkere Anfärbung bei den NEP^{-/-} Tieren (1,23% zu 0,59% angefärbte Fläche). Dies entspricht in beiden Gruppen einer signifikant stärkeren Anfärbung bei NEP^{-/-} Tieren.

5.6 Hepatische mRNA Expression von Bestandteilen des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems

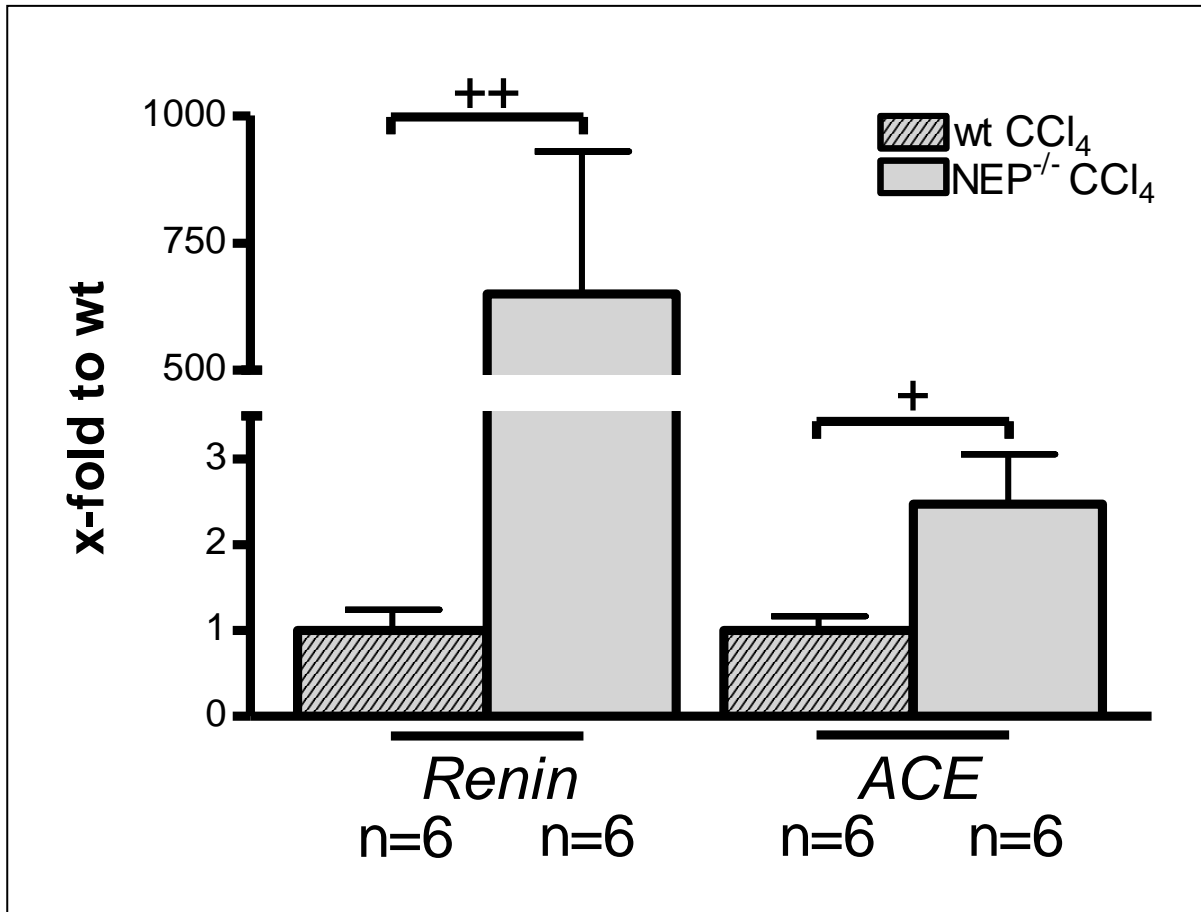


Abb. 13: Renin- und ACE-mRNA Level im Lebergewebe zirrhotischer wt und NEP^{-/-} Mäuse (CCl₄). Der Wert der wt Tiere wurde auf 1 normiert. Im Folgenden sind Mittelwert und Standardfehler aufgeführt: wt CCl₄ Renin: 1 ± 0,24; NEP^{-/-} CCl₄ Renin: 2,5 ± 280; wt CCl₄ ACE: 1 ± 0,17; NEP^{-/-} CCl₄ ACE: 2,5 ± 0,6. + entspricht einem p-Werte von < 0,05 und ++ p < 0,005.

Die mRNA Spiegel von Renin und ACE zeigen sich im Lebergewebe zirrhotischer NEP^{-/-} Mäuse massiv erhöht. Die entsprechenden Werte der wt Tiere wurden auf 1 normiert. Im Vergleich dazu war der Spiegel der Renin mRNA um den Faktor 650 erhöht, der der ACE mRNA etwa um den Faktor 2,5. Dies entspricht in beiden Fällen einer signifikant höheren Expression im geschädigten Lebergewebe Neprilysin defizienter Mäuse.

5.7 NPY Proteinexpression

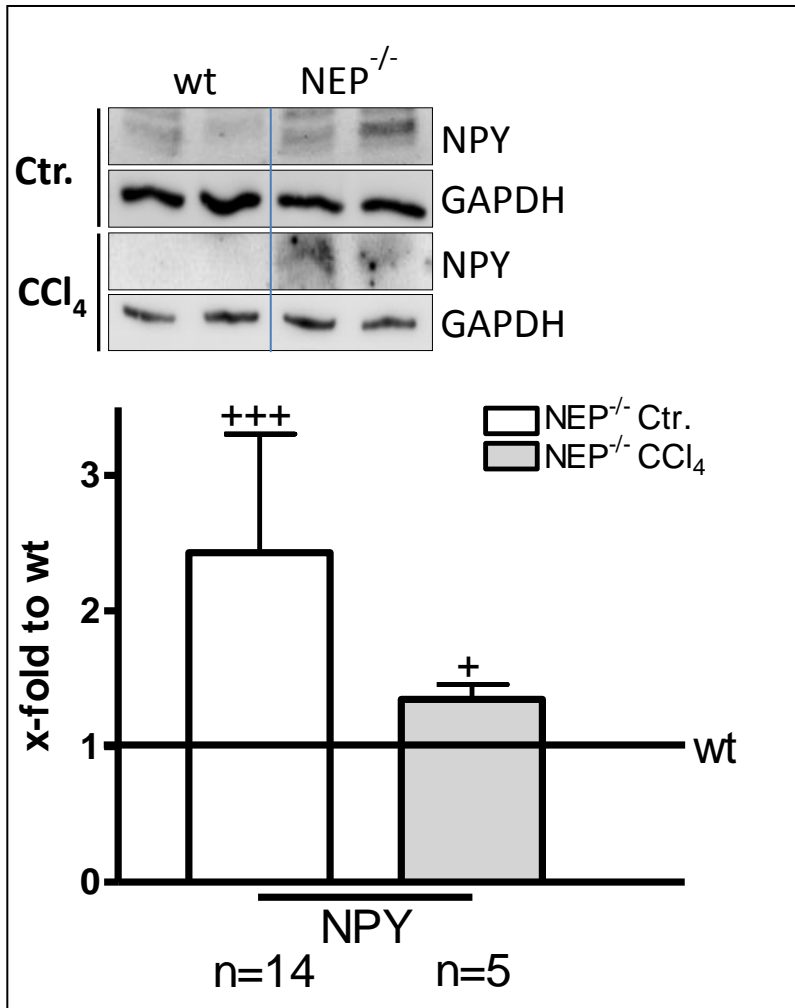


Abb. 14: Exemplarische Westernblots und NPY Proteinspiegel von NEP^{-/-} Mäusen verglichen mit der entsprechenden wt Gruppe, die zu diesem Zweck auf den Wert 1 normiert wurden. Im Folgenden sind Mittelwert und Standardfehler aufgeführt: NEP^{-/-} Ctr.: 2,43 ± 0,87; NEP^{-/-} CCl₄: 1,35 ± 0,1. + entspricht einem p-Werte von < 0,05 und +++ p < 0,001.

Eine Nephrylsin Defizienz führt des Weiteren zu einem signifikanten Anstieg der NPY Proteinspiegel in allen untersuchten NEP^{-/-} Gruppen. Die Werte der wt Proben wurden auf 1 normiert. Im Vergleich dazu zeigte sich NPY in unbehandelten NEP^{-/-} Tieren mehr als verdoppelt (2,43 zu 1). Nach Induktion einer Fibrose fiel der Unterschied nicht mehr so extrem auf, blieb aber weiterhin signifikant (1,35 zu 1). Der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase Wert (GAPDH) diente der endogenen Kontrolle.

5.8 mRNA Expression in aktivierten HSC

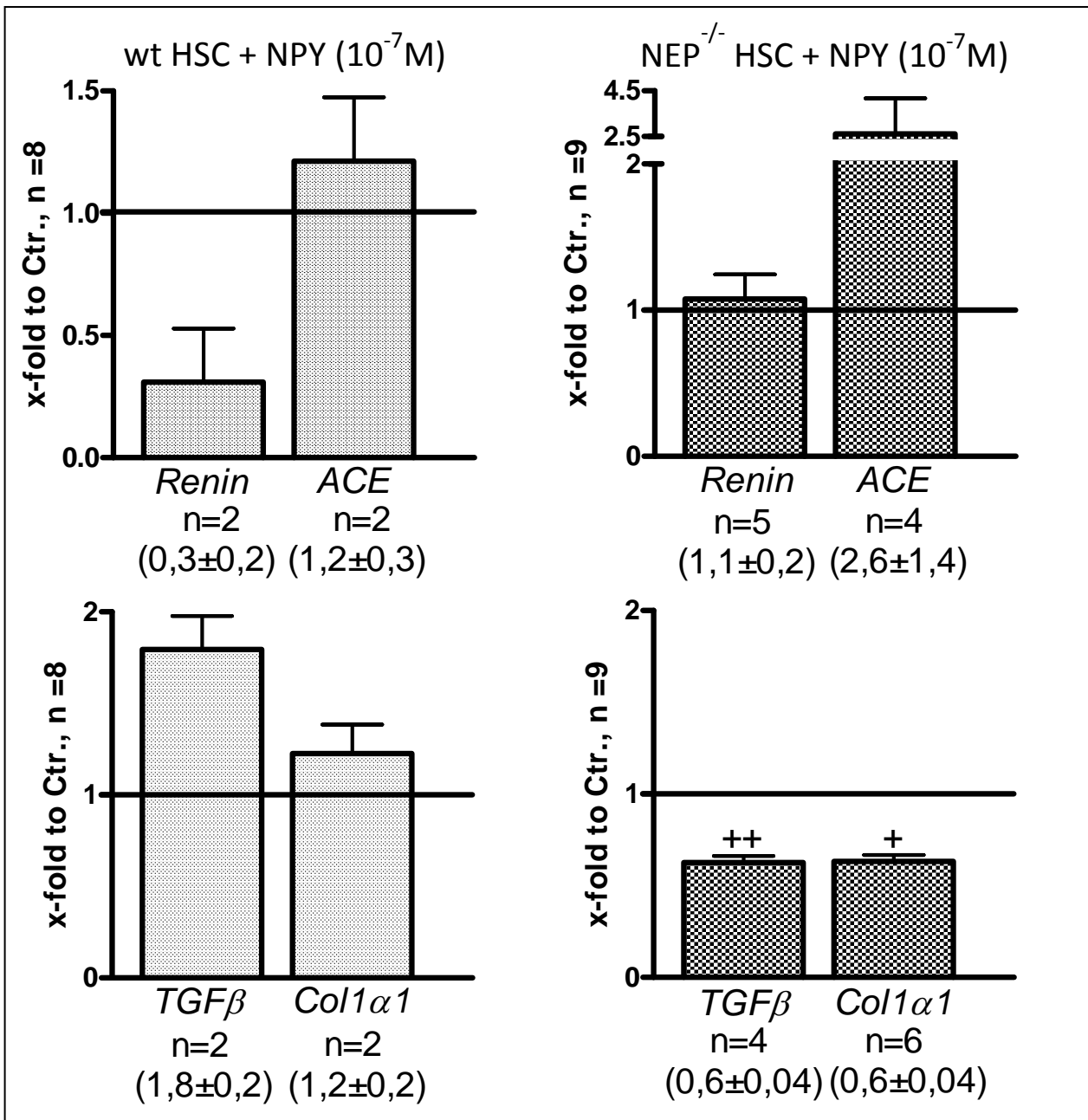


Abb. 15: In vitro Versuche an primär kultivierten HSC zur Bestimmung der mRNA Spiegel nach NPY Inkubation. Die Spiegel wurden jeweils verglichen mit den mRNA Spiegeln in unbehandelten Kontrollgruppen. Zu diesem Zweck wurde der Wert in den Kontrollgruppen auf 1 normiert. In Klammern ist der Mittelwert mit Standardfehler angegeben. + entspricht einem p-Werte von $< 0,05$ und ++ $p < 0,005$.

Eine NPY Inkuabtion führt in wt HSC bei keinem der untersuchten mRNA Spiegel zu einer signifikanten Änderung im Vergleich zu unbehandelten wt Zellen.

In $NEP^{-/-}$ HSC hat eine NPY Inkubation keinen Einfluss auf die Renin- oder ACE-Expression. Die Expression von TGF- β 1 und Col1 α 1 wird nach NPY Inkubation signifikant gehemmt (0,6 zu 1 und 0,6 zu 1).

5.9 HSC Kontraktionsversuche

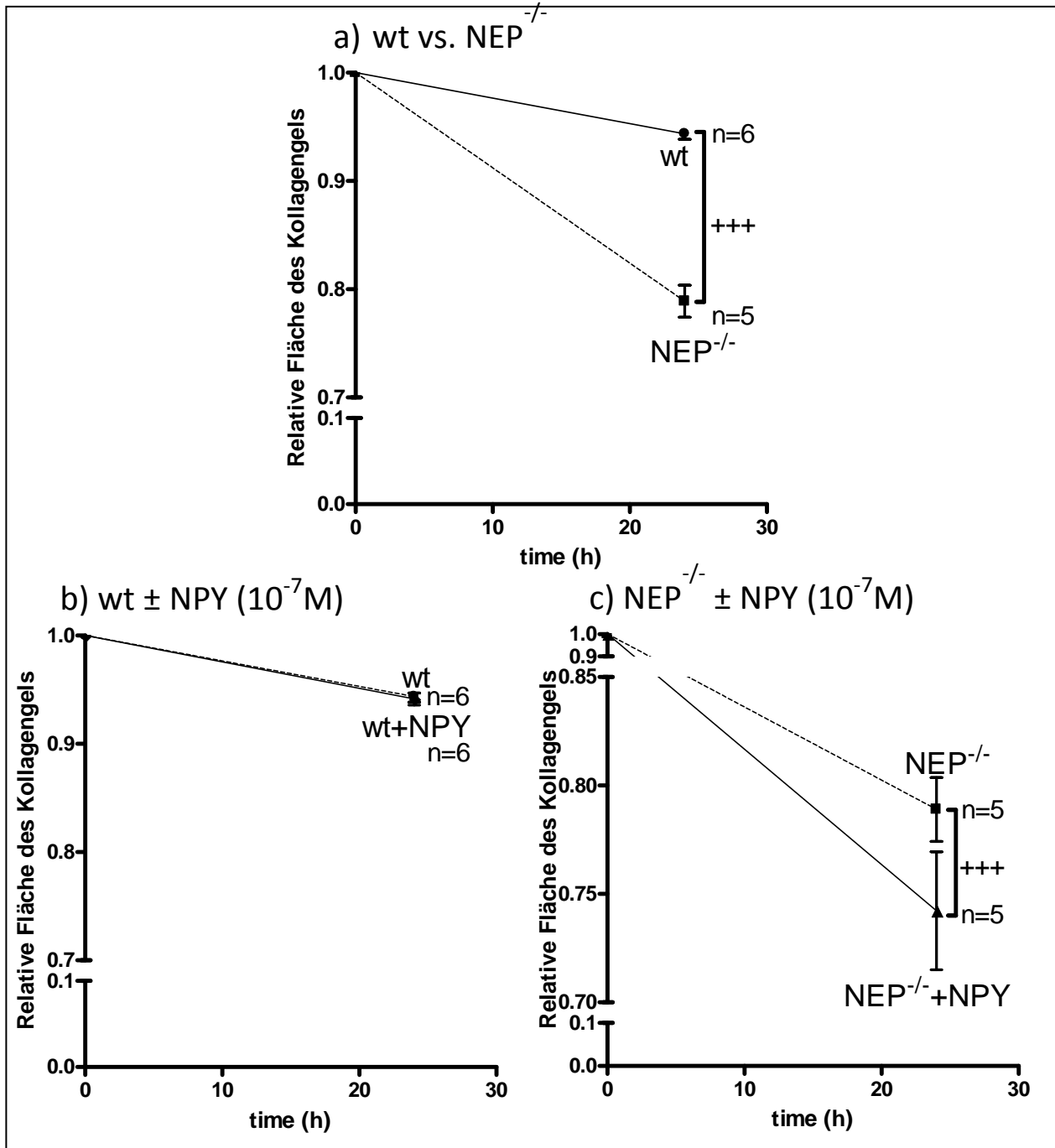


Abb. 16: Vergleich der Kontraktion von aktivierten HSC, jeweils ohne (a) bzw. mit NPY Inkubation (b,c). Die relative Größenabnahme wurde nach 24 Stunden bestimmt. Im Folgenden werden die Mittelwerte und Standardfehler angegeben: a) wt: $0,94 \pm 0,01$; NEP^{-/-}: $0,79 \pm 0,01$. b) wt: $0,94 \pm 0,01$; wt + NPY: $0,94 \pm 0,01$. c) NEP^{-/-}: $0,79 \pm 0,01$; NEP^{-/-} + NPY: $0,74 \pm 0,03$. +++ entspricht einem p-Werte von < 0,001.

Aktiviert NEP^{-/-} HSC kontrahieren signifikant stärker als aktivierte wt HSC (a: Verkleinerung der Ursprungsgröße des Kollagengels um 21% auf 79% bei NEP^{-/-} HSC

bzw. um 6% auf 94% bei wt HSC). Eine zusätzliche Inkubation mit NPY führte in wt HSC zu keiner weiteren Verstärkung der Kontraktion (b). $NEP^{-/-}$ HSC kontrahieren nach einer Inkubation mit NPY hingegen noch stärker, als sie das ohne zusätzliche Stimulation ohnehin schon taten (c: Verkleinerung der Ursprungsgröße des Kollagengels um 26% auf 74% im Vergleich zum obigen Wert).

5.10 Proteinspiegel der AT1R-Signalkaskade in aktivierten HSC

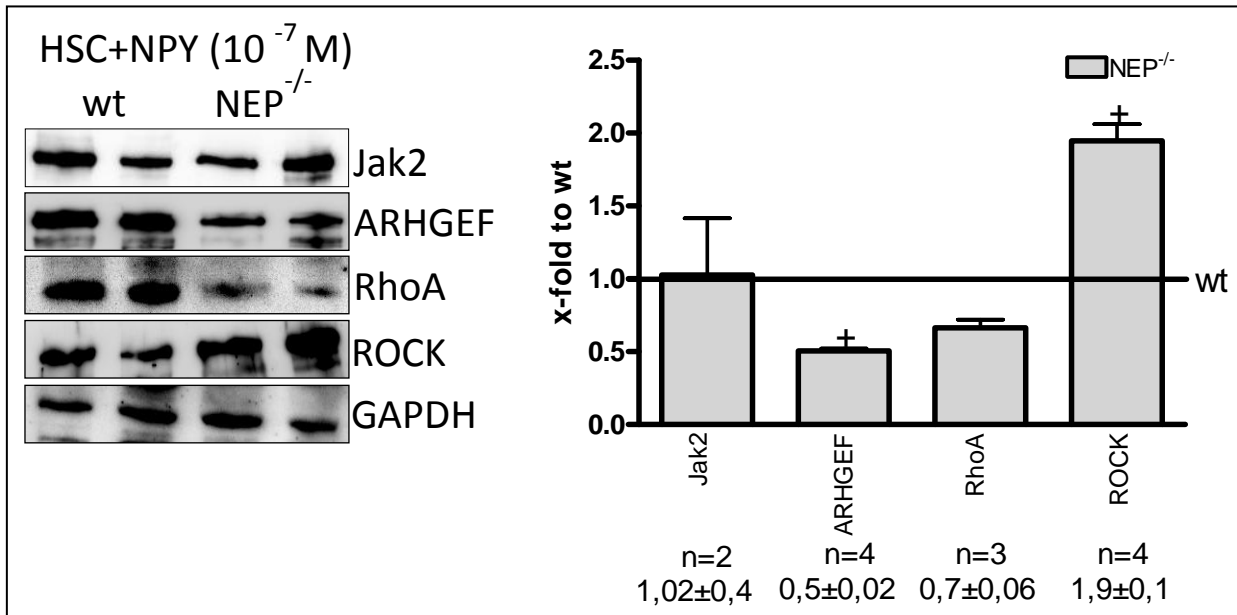


Abb. 17: Exemplarische Westernblots und Proteinspiegel fibrotischer und kontraktile Signalkaskaden in aktivierten HSC nach NPY Inkubation. In Klammern ist der Mittelwert mit Standardfehler angegeben. + entspricht einem p-Werte von $< 0,05$.

Zum Vergleich wurden die entsprechenden Werte der wt Zellen auf 1 normiert. Nach einer Inkubation mit NPY ändern sich der Jak2 und RhoA Spiegel in $NEP^{-/-}$ HSC nicht verglichen mit den entsprechenden Werten in wt HSC. ARHGEF als Aktivator der profibrotischen Signalkaskade wird jedoch auf einem deutlich niedrigeren Level exprimiert (0,5 zu 1). ROCK als Aktivator der Kontraktion wird in $NEP^{-/-}$ HSC auf einem deutlich höheren Level exprimiert (1,9 zu 1), was ebenfalls einen signifikanten Unterschied entspricht. Der GAPDH Wert diente der endogenen Kontrolle.

6. Diskussion

6.1 Auswirkungen der Neprilysin Defizienz auf den hepatischen Phänotyp

Im Unterschied zu den Ergebnissen anderer Forschungsgruppen sahen wir keine signifikante Änderung bei der Ausprägung des Gesamtgewichtes zwischen Neprilysin defizienten Tieren und den entsprechenden Kontrolltieren (Tab. III). In der Arbeit von *Becker et al.* aus dem Jahr 2010 entwickelten $NEP^{-/-}$ Tiere und wt Tiere, die mit einem NEP-Hemmer behandelt wurden, nach einem Zeitraum von 6-7 Monaten einen übergewichtigen Phänotyp (*Becker et al.*, 2010). In diesem längeren Zeitrahmen könnte auch schon der entscheidende Unterschied liegen. Unsere Tiere wurden durchschnittlich in einem Alter von 3 Monaten für die Versuche verwendet. Es ist also durchaus möglich, dass der Einfluss einer Neprilysin Defizienz auf das Körpergewicht und die Körperfettsynthese erst nach einem längeren Zeitraum auffällig wird.

Bezüglich des Lebergewichtes zeigten sich uns gegenläufige Ergebnisse. In der Kontrollgruppe führte eine Neprilysin Defizienz zu einem signifikant erhöhten, in der Fibrosegruppe zu einem signifikant erniedrigten Lebergewicht. Hier ergaben sich jedoch deutliche Unterschiede bei den Geschlechtern mit einem höheren Lebergewicht bei männlichen Tieren (Daten nicht aufgeführt). Mit unserer Betrachtung, die beide Geschlechter einbezieht, können wir also keine valide Aussage treffen. Sehr wahrscheinlich ist hier eine testosteronabhängige Wirkung. Diese konnte schon für die konstriktive NPY Wirkung nachgewiesen werden (*Wocial et al.*, 1995) und ist auch hier eine mögliche Erklärung. Im Verhältnis Lebergewicht/Gesamtgewicht zeigten sich die gleichen Ergebnisse.

Bei der Untersuchung der Fibrose konnten wir folgende interessante Entdeckung machen: $NEP^{-/-}$ Mäuse zeigten einen signifikant niedrigeren HP Gehalt in den untersuchten Lebern in beiden Gruppen (Abb. 9). Dieses Ergebnis bestätigte sich bei der Auswertung der Sirius-Rot Färbungen, bei denen eine signifikant kleinere Fläche in den Lebern der $NEP^{-/-}$ Tiere angefärbt wurde (Abb. 10). Beide Methoden weisen den Kollagengehalt der untersuchten Lebern nach. Die Ergebnisse sprechen demnach für eine signifikante Abschwächung der Fibrose durch eine Neprilysin Defizienz. Dies wäre vereinbar mit der Arbeit von *Sansoè et al.*, die mittels einer Neprilysin Hemmung eine

signifikante Abschwächung eines Portalen Hypertonus in Ratten erreichen konnten (Sansoè et al., 2005). Entsprechend den Ausführungen zur Pathogenese des Portalen Hypertonus in Kapitel 2.3 könnte ein verringerter Flusswiderstand durch eine verringerte Fibrose der Leber eine Folge der Nephilysin Defizienz sein.

Überraschenderweise bildeten die $NEP^{-/-}$ Tiere in unseren Versuchen jedoch einen erhöhten Portaldruck aus (Abb. 11). Schon unbehandelte $NEP^{-/-}$ Tiere zeigten einen Portalen Hypertonus, der sich nach Induktion der Fibrose noch verstärkte. Passend dazu zeigte sich in den α -SMA Färbungen eine signifikant größer angefärbte Fläche in den entsprechenden Leberschnitten (Abb. 12). α -SMA ist ein anerkannter Marker der Aktivierung von HSC (Bataller und Brenner, 2005). Der erhöhte Nachweis von diesem in $NEP^{-/-}$ Tieren spricht also für eine verstärkte Aktivierung der HSC durch einen Nephilysin Knock-Out. Vermittelt werden könnte diese vermehrte Aktivierung durch eine Hochregulation des RAS. Dieses wird bei einer Leberschädigung an sich schon hochreguliert (Bataller et al., 2003c; Paizis et al., 2002). Eine Nephilysin Defizienz scheint nun mit einer zusätzlich verstärkten Hochregulierung einherzugehen. So sind Renin und ACE auf mRNA Level in fibrotischen $NEP^{-/-}$ Tieren signifikant erhöht, verglichen mit den entsprechenden wt Tieren (Abb. 13, Abb. 18).

Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass eine Nephilysin Defizienz zu einer verstärkten HSC Aktivierung führt. Diese resultiert in einem erhöhten Portaldruck, jedoch nicht in einer verstärkten Fibrose. Dies ist verwunderlich, wurde doch bisher davon ausgegangen, dass der typische Phänotypwechsel der HSC nach Aktivierung sowohl mit einer verstärkten Kontraktilität als auch einer verstärkten Fibrogenese einhergeht (Friedman et al., 1985; Friedman, 2000). Eine mögliche Erklärung ist, dass die Signalkaskaden, die nach einer HSC Aktivierung die entsprechenden Auswirkungen vermitteln, bei einer Nephilysin Defizienz nicht mehr einheitlich ablaufen. Eventuell gibt es Schlüsselemente, über die ganz gezielt eine Wirkung gehemmt werden kann, wobei eine andere bestehen bleibt. Bei dem Versuch, dieses Schlüsselement zu identifizieren, haben wir uns auf das NPY konzentriert.

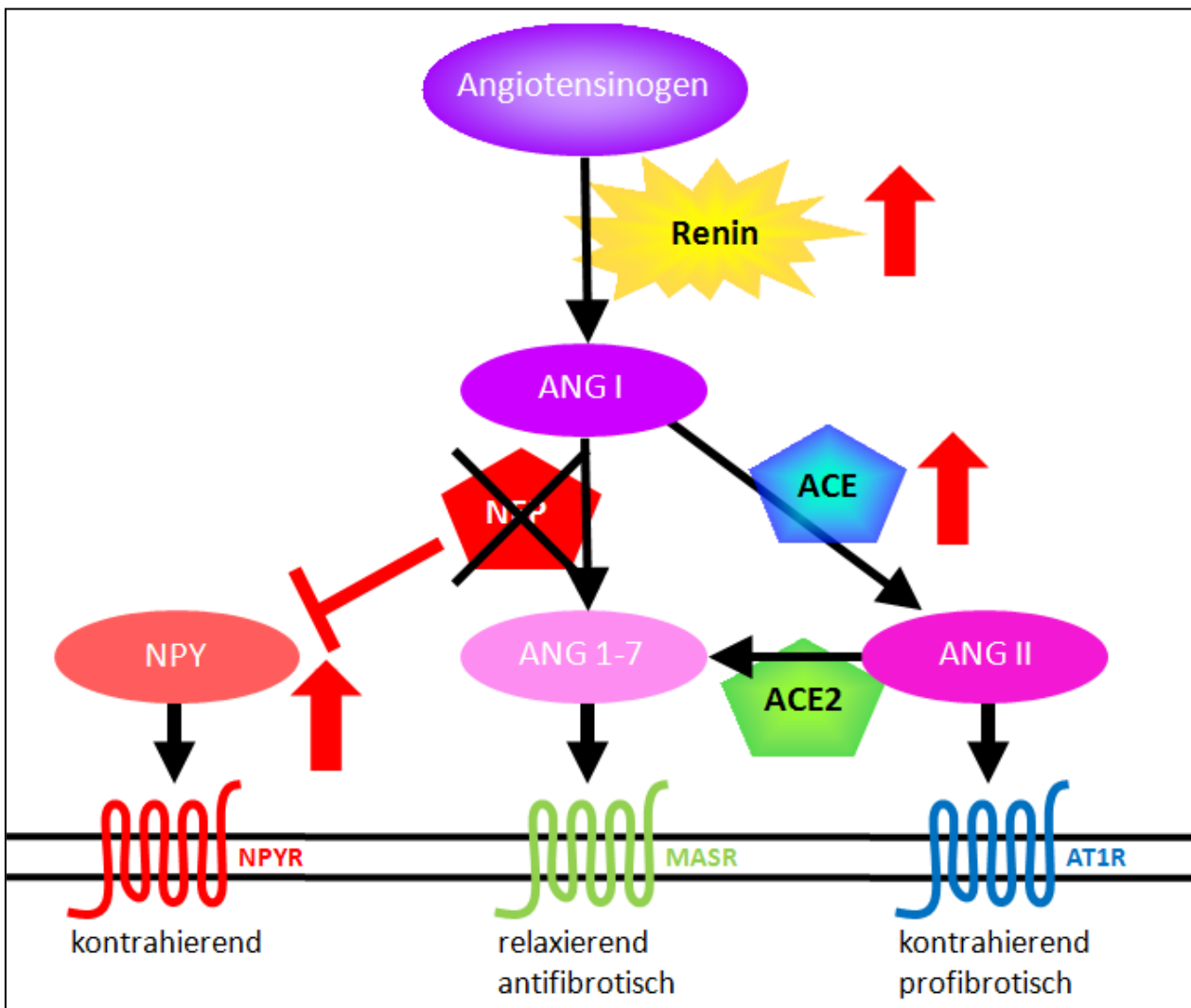


Abb. 18: Schematische Übersicht des RAS mit Darstellung der Änderungen nach einem NEP Knock-Out, modifiziert nach Herath et al., 2009, Bataller et al., 2000, Grace et al., 2013 und Hartl et al., 2015

6.2 NPY als mögliches Schlüsselprotein zwischen Kontraktion und Fibrose

Neprilysin als Peptidase mit zahlreichen Substraten spaltet und inaktiviert auch NPY (Skidgel und Erdős, 2004). Dementsprechend zeigten $NEP^{-/-}$ Tiere im Vergleich zu wt Tieren erhöhte NPY Spiegel (Abb. 14). Um die Wirkung des NPY auf die aktivierten HSC zu erforschen, haben wir diese mit NPY inkubiert und die Auswirkung dieser Inkubation untersucht. Das RAS mit seinen Komponenten zeigt sich durch eine NPY Inkubation nicht wesentlich beeinflusst. Auffällig ist jedoch die Wirkung auf profibrotische Zytokine. Neprilysin defiziente HSC exprimieren nach NPY Inkubation signifikant weniger TGF- β 1, das am stärksten profibrotisch wirkende Zytokin (Oben et al., 2003). Die verringerte TGF- β 1 Produktion resultiert dann auch in abgeschwächten Col1 α 1

mRNA Spiegel. Die entsprechenden wt HSC exprimieren nach NPY Inkubation eher mehr TGF- β 1 und Col1 α 1 (Abb. 15). Die erhöhten NPY Spiegel bei einem Neprilysin Mangel scheinen also tatsächlich profibrotische Signalkaskaden zu hemmen.

HSC sind auch wesentlich an der Ausprägung des Portalen Hypertonus beteiligt. Sie besitzen selbst kontraktile Eigenschaften und beeinflussen den Phänotyp der LSEC (Rockey, 2006). Sie sind also unmittelbar an der dynamischen Komponente des gesteigerten Flusswiderstandes in der Leber beteiligt (Bhathal und Grossman, 1985). NEP^{-/-} HSC zeigen im Vergleich zu wt HSC eine verstärkte Kontraktion (Abb. 16a). Eine Inkubation der wt HSC mit NPY führt zu keiner Änderung der Kontraktilität (Abb. 16b). Werden jedoch NEP^{-/-} HSC zusätzlich mit NPY inkubiert, fällt die kontraktile Antwort noch stärker aus (Abb. 16c).

NPY scheint also der Schlüssel zwischen Kontraktilität und Fibrose zu sein. Erhöhte Werte, bedingt durch eine Neprilysin Defizienz, resultieren in einer Abschwächung der Fibrose und einer Verstärkung der Kontraktilität. Der typische Phänotyp aktivierter HSC scheint also nicht so einheitlich zu sein, wie lange gedacht. Die entsprechenden Signalkaskaden müssen insofern gesteuert sein, dass eine Feinmodulierung einer einzelnen möglich ist, ohne die jeweils anderen zu beeinflussen. Nur so ist es möglich zu erklären, dass bei NEP^{-/-} Tieren die beiden Phänotypmerkmale Kontraktilität und Fibrosierung gegenläufig ausgeprägt sind. Die Kontraktilität könnte dabei mittels einer erhöhten ROCK Aktivität ausgelöst werden. Diese zeigt sich auf Protein Ebene in NEP^{-/-} HSC erhöht, verglichen mit den wt Zellen (Abb. 17). Über die ROCK wird die MLCP gehemmt. Die MLC verbleiben also in einem phosphorylierten Zustand und die Kontraktion wird aufrechterhalten (Jin et al., 2006; Shin et al., 2002). RhoA und ARHGEF werden jedoch abgeschwächt, was sich in erniedrigten Spiegeln der Proteinexpression in aktivierten HSC niederschlägt (Abb. 17). Hier könnte also die Erklärung einer verringerten Fibrose liegen, wurde doch für die Rho GTPasen auch ein wesentlicher Einfluss auf fibrotische Prozesse nachgewiesen (Ridley, 2001). Gut möglich ist hier ein Rezeptor unabhängiger Mechanismus, da die Jak2 Expression scheinbar unbeeinflusst ist (Abb. 17). Solch ein Rezeptor unabhängiger Mechanismus wurde schon für die NPY Wirkung im splanchnischen Gefäßsystem nachgewiesen (Hartl et al., 2015). So ließe sich auch erklären, dass der Phänotyp aktivierter HSC in NEP^{-/-}

Tieren nicht der klassischen Ausprägung entspricht. Nämlich in dem Maße, dass die Kontraktilität gesteigert ist, die Fibrosierung hingegen abgeschwächt (Abb. 19).

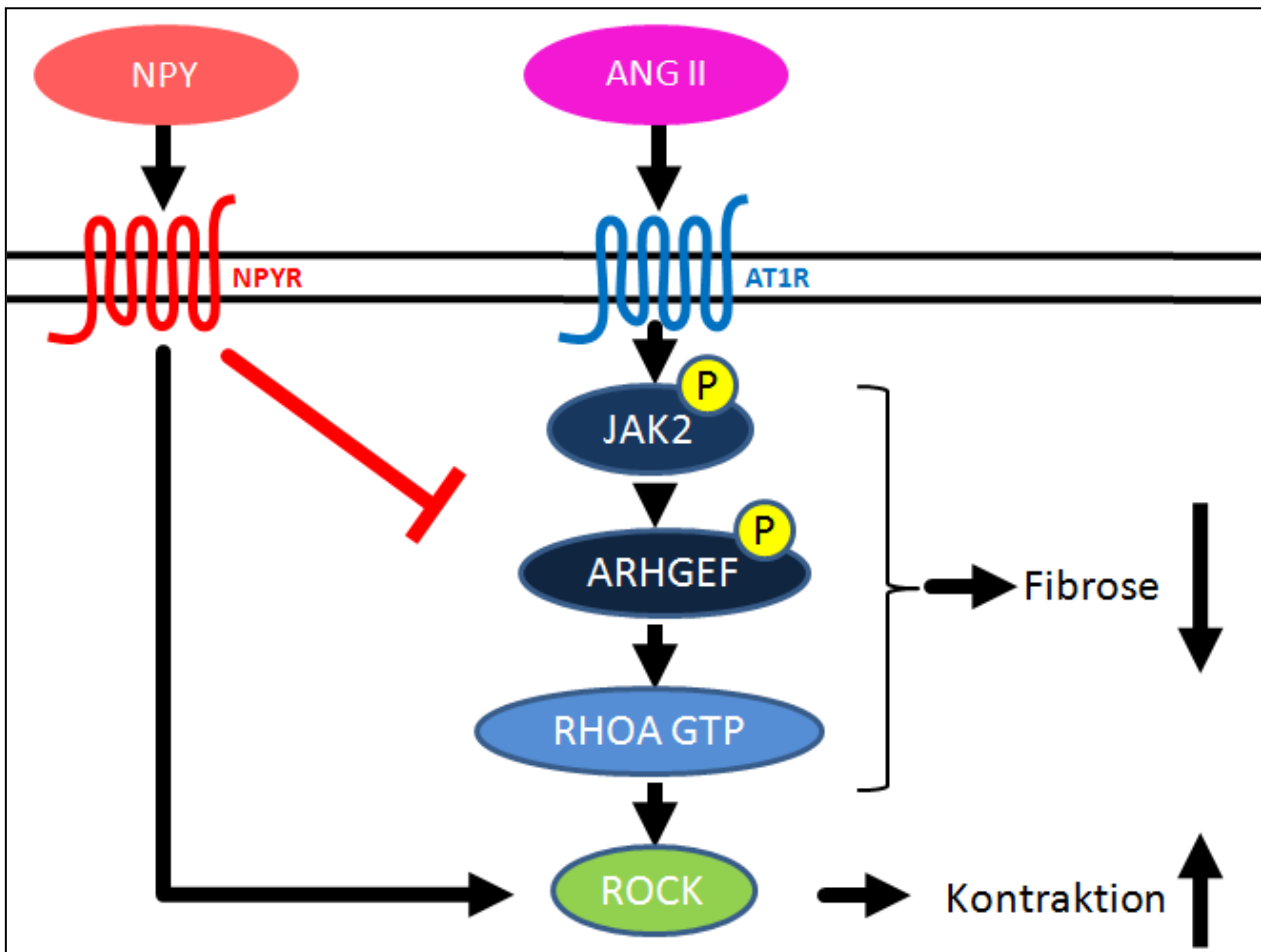


Abb. 19: Schematische Übersicht der profibrotischen und kontraktilen AT1R-Signalkaskade mit der möglichen NPY Wirkung: Hemmung der Fibrogenese, Stimulation der Kontraktilität, modifiziert nach Klein et al., 2017

6.3 Ausblick und mögliche therapeutische Relevanz

Die Relevanz der Arbeit ist vor allem der Tatsache geschuldet, dass Nephilysin-Hemmer im Rahmen der Herzinsuffizienztherapie bereits im klinischen Gebrauch sind. Ihre Überlegenheit in Kombination mit einem AT1R Blocker gegenüber einer einfachen Medikation mittels eines ACE-Hemmers konnte in der PARADIGM-HF Studie nachgewiesen werden (McMurray et al., 2014). Diese Ergebnisse weckten die Hoffnung auf eine deutlich gebesserte Therapieoption für Patienten mit einer chronischen kardialen Insuffizienz. Kritiker mahnen aber zur Zurückhaltung, da NEP, wie oben ausgeführt, ebenfalls am Abbau des β -Amyloid beteiligt ist. Anders als beim Herzen ist

hier bei der theoretischen Überlegung zur Alzheimer Therapie also eine Stimulation gewünscht und eine Langzeithemmung könnte in Bezug auf die Ausbildung einer Demenz nachteilige Wirkungen entfalten (Schoenfeld et al., 2017).

Unsere Ergebnisse liefern nun erste Hinweise, dass eine Neprilysin Hemmung auch im Gastrointestinal Trakt mit negativen Nebenwirkungen verbunden sein könnte. Vor allem Patienten mit einem hepatischen Grundleiden sollten bei der Therapie mit einem dualen Hemmstoff regelmäßige Kontrolluntersuchungen angeboten werden. Bei einer bestehenden Portalen Hypertension wäre besondere Vorsicht angebracht bzw. sollte bei dem ersten Verdacht vermehrter Komplikationen darüber nachgedacht werden, eine Lebererkrankung als Kontraindikation für eine Neprilysin Hemmung aufzuführen.

Neben aller Vorsicht bezüglich aktueller Therapieformen liefert die vorliegende Arbeit aber auch einschneidende Erkenntnisse für die weitere Erforschung von Erkrankungen der Leber. Sollten sich die Ergebnisse bestätigen, so wäre unserer Arbeitsgruppe der erste Nachweis gelungen, dass die Aktivierung der HSC insofern beeinflusst werden kann, dass nur bestimmte Änderungen im Phänotyp vonstatten gehen. Mit genauerem Verständnis der ablaufenden Signalkaskaden könnten also gezielt bestimmte Eigenschaften wie Migration, Proliferation, Kontraktion stimuliert oder gehemmt werden. Damit wäre eine viel spezifischere Therapie der zugrundeliegenden Erkrankung möglich.

Dieses Ziel ist jedoch noch in weiter Ferne, da sich mit jeder neuen Erkenntnis neue Fragen auftun. Die drängendsten Fragen, die es im Weiteren zu beantworten gilt, sind vor allem, wie die NPY Wirkung genau zum Tragen kommt. Ist sie Rezeptor vermittelt oder nicht? Wenn ja, welche Rezeptoren sind beteiligt? Wie genau verläuft die Interaktion mit den entsprechenden Signalkaskaden? Gibt es weitere spezifische Schaltstellen? Lassen sich diese medikamentös beeinflussen? Die wichtigste Frage jedoch ist, wie bei allen Erkenntnissen der Grundlagenforschung, ob die Ergebnisse überhaupt auf den Menschen übertragbar sind.

7. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Neprilysin in der Entstehung der Leberzirrhose untersucht. Das Hauptaugenmerk war gerichtet auf Auswirkungen auf Fibrosierungsprozesse und den portalen Blutdruck. Zu diesem Zweck wurden Neprilysin defiziente Tiere mit Wild-Typ Tieren verglichen. Beide Gruppen wurden weiter unterteilt in eine unbehandelte Kontrollgruppe und eine Gruppe in der mittel CCl₄ Intoxikation eine Leberzirrhose induziert wurde. Neben hämodynamischen Messungen wurde das gewonnene Lebergewebe weiter untersucht. Zusätzlich zu den Proteinspiegeln wichtiger Signalmoleküle wurden die kontraktile Eigenschaften myofibroblastischer Leberzellen, die sogenannten hepatischen Sternzellen, untersucht. Durch spezielle Färbungen konnten bestimmte Markerproteine für Fibrose und Kontraktilität nachgewiesen werden.

Neprilysin defiziente Tiere zeigten eine geringere Fibrosierung des Lebergewebes. Dies zeigte sich bei der Bestimmung des Hydroxyprolin-Gehalt im Lebergewebe und Siriusrot Färbungen der untersuchten Leberschnitten. Zusätzlich zeigten Neprilysin defiziente Tiere einen pathologisch-gesteigerten Portaldruck. In vitro konnte dieser Phänotyp bei den hepatischen Sternzellen nachgewiesen werden. Diese Zellen zeigten in Abwesenheit von Neprilysin ein geringeres profibrotisches Potenzial aber gesteigerte Kontraktilität. Dieser Phänotyp hängt mit der Spaltung von Neuropeptid Y zusammen. Die höheren Spiegel von Neuropeptid Y in Abwesenheit von Neprilysin können die Fibrose hemmen, führen jedoch zu einem gesteigerten Pfortaderdruck. Damit konnte Neuropeptid Y als Schlüsselprotein zwischen diesen beiden Achsen identifiziert werden. Da Neprilysin das Neuropeptid Y spaltet und somit inaktiviert, kontrolliert Neprilysin diesen Schlüssel (Abb. 20).

Da es bereits kombinierte Angiotensin-II-Typ-1-Rezeptor-blocker/Neprilysin-inhibitoren für Herzinsuffizienz in der klinischen Routine eingesetzt werden, könnten diese auch für die Behandlung von frühen Stadien der Leberzirrhose eingesetzt werden.

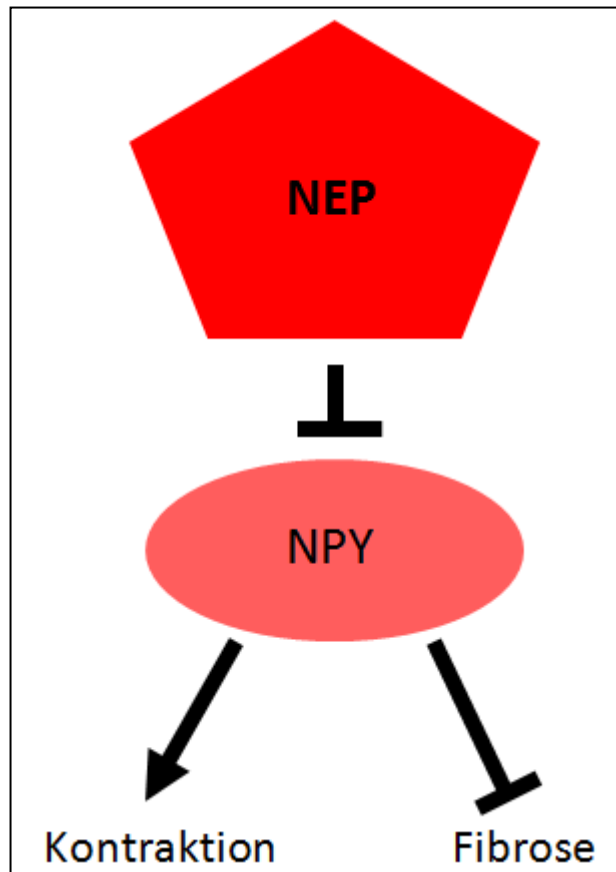


Abb. 20: Schematische Zusammenfassung der Wirkungen von NPY und NEP nach eigenen Ergebnissen

8. Literaturverzeichnis

- Abara WE, Collier MG, Teshale EH. Impact of universal infant hepatitis B vaccination in the US-affiliated Pacific Islands, 1985-2015. *Vaccine* 2017; 35: 997–1000
- Abdel-Misih SRZ, Bloomston M. Liver Anatomy. *Surg Clin North Am* 2010; 90: 643–653
- Afdhal NH, Nunes D. Evaluation of liver fibrosis: a concise review. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 1160–1174
- Ahmed A, Keeffe EB. Hepatitis C virus and liver transplantation. *Clin Liver Dis* 2004; 5: 1073–1090
- Allen JM, Adrian TE, Polak JM, Bloom SR. Neuropeptide Y (NPY) in the adrenal gland. *J Auton Nerv Syst* 1983; 9: 559–563
- Ankoma-Sey V, Matli M, Chang KB, Lalazar A, Donner DB, Wong L, Warren RS, Friedman SL. Coordinated induction of VEGF receptors in mesenchymal cell types during rat hepatic wound healing. *Oncogene* 1998; 17: 115–121
- Arthur MJ. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279: G245-249
- Arthur MJP. Reversibility of liver fibrosis and cirrhosis following treatment for hepatitis C. *Gastroenterology* 2002; 122: 1525–1528
- Baig S, Moon JY, Shankar H. Review of Sympathetic Blocks: Anatomy, Sonoanatomy, Evidence, and Techniques. *Reg Anesth Pain Med* 2017; 42: 377-391
- Bañares R, Albillos A, Rincón D, Alonso S, González M, Ruiz-del-Arbol L, Salcedo M, Molinero L-M. Endoscopic treatment versus endoscopic plus pharmacologic treatment for acute variceal bleeding: a meta-analysis. *Hepatology* 2002; 35: 609–615
- Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115: 209–218
- Bataller R, Gäbele E, Schoonhoven R, Morris T, Lehnert M, Yang L, Brenner DA, Rippe RA. Prolonged infusion of angiotensin II into normal rats induces stellate cell activation and proinflammatory events in liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003a; 285: G642-651
- 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; 118: 1149–1156
- Bataller R, North KE, Brenner DA. Genetic polymorphisms and the progression of liver fibrosis: a critical appraisal. *Hepatology* 2003b; 37: 493–503

- Bataller R, Sancho-Bru P, Ginès P, Lora JM, Al-Garawi A, Solé M, Colmenero J, Nicolás JM, Jiménez W, Weich N, Gutiérrez-Ramos J-C, Arroyo V, Rodés J. Activated human hepatic stellate cells express the renin-angiotensin system and synthesize angiotensin II. *Gastroenterology* 2003c; 125: 117–125
- Becker M, Siems W-E, Kluge R, Gembardt F, Schultheiss H-P, Schirner M, Walther T. New function for an old enzyme: NEP deficient mice develop late-onset obesity. *PLoS One* 2010; 5(9): e12793
- Behar J, Ganesan A, Zhang J, Yaniv Y. The Autonomic Nervous System Regulates the Heart Rate through cAMP-PKA Dependent and Independent Coupled-Clock Pacemaker Cell Mechanisms. *Front Physiol* 2016; 7: 419
- Benter IF, Ferrario CM, Morris M, Diz DI. Antihypertensive actions of angiotensin-(1-7) in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol* 1995; 269: H313-319
- Benyon RC, Iredale JP. Is liver fibrosis reversible? *Gut* 2000; 46: 443–446
- Berge KE, Bakken A, Bøhn M, Erikssen J, Berg K. A DNA polymorphism at the angiotensin II type 1 receptor (AT1R) locus and myocardial infarction. *Clin Genet* 1997; 52: 71–76
- Bhathal PS, Grossman HJ. Reduction of the increased portal vascular resistance of the isolated perfused cirrhotic rat liver by vasodilators. *J Hepatol* 1985; 1: 325–337
- Blachier M, Leleu H, Peck-Radosavljevic M, Valla D-C, Roudot-Thoraval F. The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data. *J Hepatol* 2013; 58: 593–608
- Bonnardeaux A, Davies E, Jeunemaitre X, Féry I, Charru A, Clauser E, Tiret L, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms in human essential hypertension. *Hypertension* 1994; 24: 63–69
- Bosch J, Berzigotti A, Garcia-Pagan JC, Abraldes JG. The management of portal hypertension: rational basis, available treatments and future options. *J Hepatol* 2008; 48: S68-92
- Bosch J, Groszmann RJ, Shah VH. Evolution in the understanding of the pathophysiological basis of portal hypertension: How changes in paradigm are leading to successful new treatments. *J Hepatol* 2015; 62: S121-130
- Canbay A, Friedman S, Gores GJ. Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis. *Hepatology* 2004; 39: 273–278
- Cárdenas A, Ginès P. Portal hypertension. *Curr Opin Gastroenterol* 2009; 25: 195–201
- Cavadas C, Céfai D, Rosmaninho-Salgado J, Vieira-Coelho MA, Moura E, Busso N, Pedrazzini T, Grand D, Rotman S, Waeber B, Aubert J-F, Grouzmann E. Deletion

- of the neuropeptide Y (NPY) Y1 receptor gene reveals a regulatory role of NPY on catecholamine synthesis and secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 103: 10497–10502
- Chavez-Tapia NC, Tellez-Avila FI, Barrientos-Gutierrez T, Mendez-Sanchez N, Lizardi-Cervera J, Uribe M. Bariatric surgery for non-alcoholic steatohepatitis in obese patients. *Cochrane Database Syst Rev* 2010; 1: CD007340
- Chen A, Davis BH. UV irradiation activates JNK and increases alpha(I) collagen gene expression in rat hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 1999; 274: 158–164
- Chen D, Liu J, Rui B, Gao M, Zhao N, Sun S, Bi A, Yang T, Guo Y, Yin Z, Luo L. GSTpi protects against angiotensin II-induced proliferation and migration of vascular smooth muscle cells by preventing signal transducer and activator of transcription 3 activation. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1843: 454–463
- Cho JJ, Hocher B, Herbst H, Jia JD, Ruehl M, Hahn EG, Riecken EO, Schuppan D. An oral endothelin-A receptor antagonist blocks collagen synthesis and deposition in advanced rat liver fibrosis. *Gastroenterology* 2000; 118: 1169–1178
- Chung RT, Baumert TF. Curing chronic hepatitis C--the arc of a medical triumph. *N Engl J Med* 2014; 370: 1576–1578
- D'Amico G, Garcia-Tsao G, Pagliaro L. Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: a systematic review of 118 studies. *J Hepatol* 2006; 44: 217–231
- Davis GL, Albright JE, Cook SF, Rosenberg DM. Projecting future complications of chronic hepatitis C in the United States. *Liver Transplant Off Publ Am Assoc Study Liver Dis Int. Liver Transplant Soc* 2003; 9: 331–338
- de Franchis R. Expanding consensus in portal hypertension: Report of the Baveno VI Consensus Workshop: Stratifying risk and individualizing care for portal hypertension. *J Hepatol* 2015; 63: 743–752
- Devault A, Lazure C, Nault C, Le Moual H, Seidah NG, Chrétien M, Kahn P, Powell J, Mallet J, Beaumont A. Amino acid sequence of rabbit kidney neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) deduced from a complementary DNA. *EMBO J* 1987; 6: 1317–1322
- Dixon JB, Bhathal PS, Hughes NR, O'Brien PE. Nonalcoholic fatty liver disease: Improvement in liver histological analysis with weight loss. *Hepatology* 2004; 39: 1647–1654
- Ebermann L, Spillmann F, Sidiropoulos M, Escher F, Heringer-Walther S, Schultheiss H-P, Tschöpe C, Walther T. The angiotensin-(1-7) receptor agonist AVE0991 is cardioprotective in diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 2008; 590: 276–280

- Elvevold K, Smedsrød B, Martinez I. The liver sinusoidal endothelial cell: a cell type of controversial and confusing identity. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol* 2008; 294: G391–G400
- European Association for Study of Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: management of hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2014; 60: 392–420
- European Association for Study of Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Wilson's disease. *J Hepatol* 2012; 56: 671–685
- European Association for Study of Liver, Asociacion Latinoamericana para el Estudio del Hígado. EASL-ALEH Clinical Practice Guidelines: Non-invasive tests for evaluation of liver disease severity and prognosis. *J Hepatol* 2015; 63: 237–264
- European Association For The Study Of The Liver. EASL clinical practice guidelines for HFE hemochromatosis. *J Hepatol* 2010; 53: 3–22
- European Association for the Study of Liver. EASL clinical practical guidelines: management of alcoholic liver disease. *J Hepatol* 2012; 57: 399–42
- European Association For The Study Of The Liver. EASL clinical practice guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2012; 57: 167–185
- Fernandez M, Vizzutti F, Garcia-Pagan JC, Rodes J, Bosch J. Anti-VEGF receptor-2 monoclonal antibody prevents portal-systemic collateral vessel formation in portal hypertensive mice. *Gastroenterology* 2004; 126: 886–894
- Ferro CJ, Spratt JC, Haynes WG, Webb DJ. Inhibition of neutral endopeptidase causes vasoconstriction of human resistance vessels in vivo. *Circulation* 1998; 97: 2323–2330
- Fontana RJ, Lok ASF. Noninvasive monitoring of patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36: S57-64
- Forns X, Ampurdanès S, Llovet JM, Aponte J, Quintó L, Martínez-Bauer E, Bruguera M, Sánchez-Tapias JM, Rodés J. Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model. *Hepatology* 2002; 36: 986–992
- Friedman SL. Hepatic Fibrosis: Emerging Therapies. *Dig Dis* 2015; 33: 504–507
- Friedman SL. Evolving challenges in hepatic fibrosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 7: 425–436
- Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* 2008; 134: 1655–1669
- Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000; 275: 2247–2250
- Friedman SL. Cytokines and fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 1999; 19: 129–140

- 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; 82: 8681–8685
- Geisterfer AA, Peach MJ, Owens GK. Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circ Res* 1988; 62: 749–756
- Gluud LL, Klingenberg S, Nikolova D, Gluud C. Banding ligation versus beta-blockers as primary prophylaxis in esophageal varices: systematic review of randomized trials. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 2842-2848
- Goessling W, Sadler KC. Zebrafish: an important tool for liver disease research. *Gastroenterology* 2015; 149: 1361–1377
- Grace JA, Klein S, Herath CB, Granzow M, Schierwagen R, Masing N, Walther T, Sauerbruch T, Burrell LM, Angus PW, Trebicka J. Activation of the MAS receptor by angiotensin-(1-7) in the renin-angiotensin system mediates mesenteric vasodilatation in cirrhosis. *Gastroenterology* 2013; 145: 874–884
- Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci J Virtual Libr* 2002; 7: d793-807
- Griendling KK, Delafontaine P, Rittenhouse SE, Gimbrone MA, Alexander RW. Correlation of receptor sequestration with sustained diacylglycerol accumulation in angiotensin II-stimulated cultured vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1987; 262: 14555–14562
- Groszmann RJ, Abraldes JG. Portal hypertension: from bedside to bench. *J Clin Gastroenterol* 2005; 39: S125-130
- Gupta TK, Toruner M, Chung MK, Groszmann RJ. Endothelial dysfunction and decreased production of nitric oxide in the intrahepatic microcirculation of cirrhotic rats. *Hepatology* 1998; 28: 926–931
- 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; 344: 418–423
- Hartl J, Dietrich P, Moleda L, Müller-Schilling M, Wiest R. Neuropeptide Y restores non-receptor-mediated vasoconstrictive action in superior mesenteric arteries in portal hypertension. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver* 2015; 35: 2556–2563
- Henriksen EJ, Jacob S, Kinnick TR, Teachey MK, Krekler M. Selective angiotensin II receptor antagonism reduces insulin resistance in obese Zucker rats. *Hypertension* 2001; 38: 884–890

- Herath CB, Lubel JS, Jia Z, Velkoska E, Casley D, Brown L, Tikellis C, Burrell LM, Angus PW. Portal pressure responses and angiotensin peptide production in rat liver are determined by relative activity of ACE and ACE2. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 297: G98–G106
- Herath CB, Warner FJ, Lubel JS, Dean RG, Jia Z, Lew RA, Smith AI, Burrell LM, Angus PW. Upregulation of hepatic angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) and angiotensin-(1-7) levels in experimental biliary fibrosis. *J Hepatol* 2007; 47: 387–395
- Hernandez-Gea V, Friedman SL. Pathogenesis of Liver Fibrosis. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2011; 6: 425–456
- Higuchi H, Gores GJ. Mechanisms of liver injury: an overview. *Curr Mol Med* 2003; 3: 483–490
- Howell S, Nalbantoglu J, Crine P. Neutral endopeptidase can hydrolyze beta-amyloid(1-40) but shows no effect on beta-amyloid precursor protein metabolism. *Peptides* 1995; 16: 647–652
- Ichiki T, Usui M, Kato M, Funakoshi Y, Ito K, Egashira K, Takeshita A. Downregulation of angiotensin II type 1 receptor gene transcription by nitric oxide. *Hypertension* 1998; 31: 342–348
- Igarashi M, Hirata A, Yamaguchi H, Tsuchiya H, Ohnuma H, Tominaga M, Daimon M, Kato T. Candesartan inhibits carotid intimal thickening and ameliorates insulin resistance in balloon-injured diabetic rats. *Hypertension* 2001; 38: 1255–1259
- Ikeda K, Wakahara T, Wang YQ, Kadoya H, Kawada N, Kaneda K. In vitro migratory potential of rat quiescent hepatic stellate cells and its augmentation by cell activation. *Hepatology* 1999; 29: 1760–1767
- Ikeda Y, Takeuchi K, Kato T, Taniyama Y, Sato K, Takahashi N, Sugawara A, Ito S. Transcriptional suppression of rat angiotensin AT1a receptor gene expression by interferon-gamma in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 262: 494–498
- Iwakiri Y, Shah V, Rockey DC. Vascular pathobiology in chronic liver disease and cirrhosis - current status and future directions. *J Hepatol* 2014; 61: 912–924
- Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Watanabe K, Sekiguchi M, Hosoki E, Kawashima-Morishima M, Lee HJ, Hama E, Sekine-Aizawa Y, Saido TC. Identification of the major Abeta1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: suppression leads to biochemical and pathological deposition. *Nat Med* 2000; 6: 143–150
- Jin L, Ying Z, Hilgers RHP, Yin J, Zhao X, Imig JD, Webb RC. Increased RhoA/Rho-kinase signaling mediates spontaneous tone in aorta from angiotensin II-induced hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 318: 288–295

- Johnston CI, Hodsman PG, Kohzuki M, Casley DJ, Fabris B, Phillips PA. Interaction between atrial natriuretic peptide and the renin angiotensin aldosterone system. Endogenous antagonists. *Am J Med* 1989; 87: 24S–28S
- Jonsson JR, Clouston AD, Ando Y, Kelemen LI, Horn MJ, Adamson MD, Purdie DM, Powell EE. Angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates the progression of rat hepatic fibrosis. *Gastroenterology* 2001; 121: 148–155
- Kanno K, Tazuma S, Chayama K. AT1A-deficient mice show less severe progression of liver fibrosis induced by CCl₄. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 308: 177–183
- Karoor V, Oka M, Walchak SJ, Hersh LB, Miller YE, Dempsey EC. Nephilysin regulates pulmonary artery smooth muscle cell phenotype through a platelet-derived growth factor receptor-dependent mechanism. *Hypertension* 2013; 61: 921–930
- Kim Y, Ratziu V, Choi SG, Lalazar A, Theiss G, Dang Q, Kim SJ, Friedman SL. Transcriptional activation of transforming growth factor beta1 and its receptors by the Kruppel-like factor Zf9/core promoter-binding protein and Sp1. Potential mechanisms for autocrine fibrogenesis in response to injury. *J Biol Chem* 1998; 273: 33750–33758
- Klein S, Herath CB, Schierwagen R, Grace J, Haltenhof T, Uschner FE, Strassburg CP, Sauerbruch T, Walther T, Angus PW, Trebicka. Hemodynamic Effects of the Non-Peptidic Angiotensin-(1-7) Agonist AVE0991 in Liver Cirrhosis. *PLoS One* 2015; 10: e0138732
- Klein S, Rick J, Lehmann J, Schierwagen R, Schierwagen IG, Verbeke L, Hittatiya K, Uschner FE, Manekeller S, Strassburg CP, Wagner K-U, Sayeski PP, Wolf D, Laleman W, Sauerbruch T, Trebicka J. Janus-kinase-2 relates directly to portal hypertension and to complications in rodent and human cirrhosis. *Gut* 2017; 66: 145–155
- Kmieć Z. Cooperation of liver cells in health and disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 2001; 161: III–XIII, 1-151
- Kostis JB, Packer M, Black HR, Schmieder R, Henry D, Levy E. Omapatrilat and enalapril in patients with hypertension: the Omapatrilat Cardiovascular Treatment vs. Enalapril (OCTAVE) trial. *Am J Hypertens* 2004; 17: 103–111
- Lassègue B, Alexander RW, Nickenig G, Clark M, Murphy TJ, Griendling KK. Angiotensin II down-regulates the vascular smooth muscle AT1 receptor by transcriptional and post-transcriptional mechanisms: evidence for homologous and heterologous regulation. *Mol Pharmacol* 1995; 48: 601–609
- Lebel N, D'Orléans-Juste P, Fournier A, Sirois P. Role of the neutral endopeptidase 24.11 in the conversion of big endothelins in guinea-pig lung parenchyma. *Br J Pharmacol* 1996; 117: 184–188

- Liaw Y-F, Sung JJY, Chow WC, Farrell G, Lee C-Z, Yuen H, Tanwandee T, Tao Q-M, Shue K, Keene ON, Dixon JS, Gray DF, Sabbat J, Cirrhosis Asian Lamivudine Multicentre Study Grou. Lamivudine for patients with chronic hepatitis B and advanced liver disease. *N Engl J Med* 2004; 351: 1521–1531
- Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, Abraham J, Adair T, Aggarwal R, Ahn SY, Alvarado M, Anderson HR, Anderson LM, Andrews KG, Atkinson C, Baddour LM, Barker-Collo S, Bartels DH, Bell ML, Benjamin EJ, Bennett D, Bhalla K, Bikbov B, Bin Abdulhak A, Birbeck G, Blyth F, Bolliger I, Boufous S, Bucello C, Burch M, Burney P, Carapetis J, Chen H, Chou D, Chugh SS, Coffeng LE, Colan SD, Colquhoun S, Colson KE, Condon J, Connor MD, Cooper LT, Corriere M, Cortinovis M, de Vaccaro KC, Couser W, Cowie BC, Criqui MH, Cross M, Dabhadkar KC, Dahodwala N, De Leo D, Degenhardt L, Delossantos A, Denenberg J, Des Jarlais DC, Dharmaratne SD, Dorsey ER, Driscoll T, Duber H, Ebel B, Erwin PJ, Espindola P, Ezzati M, Feigin V, Flaxman AD, Forouzanfar MH, Fowkes FGR, Franklin R., Fransen M, Freeman MK, Gabriel SE, Gakidou E, Gaspari F, Gillum RF, Gonzalez-Medina D, Halasa YA, Haring D, Harrison JE, Havmoeller R, Hay RJ, Hoen B, Hotez PJ, Hoy D, Jacobsen KH, James SL, Jasrasaria R, Jayaraman S, Johns N, Karthikeyan G, Kassebaum N, Keren A, Khoo J-P, Knowlton LM, Kobusingye O, Koranteng A, Krishnamurthi R, Lipnick M, Lipshultz SE, Ohno SL, Mabweijano J, MacIntyre MF, Mallinger L, March L, Marks GB, Marks R, Matsumori A, Matzopoulos R, Mayosi BM, McAnulty JH, McDermott MM, McGrath J, Mensah GA, Merriman TR, Michaud C, Miller M, Miller TR, Mock C, Mocumbi AO, Mokdad AA, Moran A, Mulholland K, Nair MN, Naldi L, Narayan KMV, Nasseri K, Norman P, O'Donnell M, Omer SB, Ortblad K, Osborne R, Ozgediz D, Pahari B, Pandian JD, Rivero AP, Padilla RP, Perez-Ruiz F, Perico N, Phillips D, Pierce K, Pope CA, Porrini E, Pourmalek F, Raju M, Ranganathan D, Rehm JT, Rein DB, Remuzzi G, Rivara FP, Roberts T, De León FR, Rosenfeld LC, Rushton L, Sacco RL, Salomon JA, Sampson U, Sanman E, Schwebel DC, Segui-Gomez M, Shepard DS, Singh D, Singleton J, Sliwa K, Smith E, Steer A, Taylor JA, Thomas B, Tleyjeh IM, Towbin JA, Truelsen T, Undurraga EA, Venketasubramanian N, Vijayakumar L, Vos T, Wagner GR, Wang M, Wang W, Watt K, Weinstock MA, Weintraub R, Wilkinson JD, Woolf AD, Wulf S, Yeh P-H, Yip P, Zabetian A, Zheng Z-J, Lopez AD, Murray CJL, AlMazroa MA, Memish ZA. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 2012; 38: 2095–2128
- Lubel JS, Herath CB, Tchongue J, Grace J, Jia Z, Spencer K, Casley D, Crowley P, Sievert W, Burrell LM, Angus PW. Angiotensin-(1-7), an alternative metabolite of the renin-angiotensin system, is up-regulated in human liver disease and has antifibrotic activity in the bile-duct-ligated rat. *Clin Sci Lond* 2009; 117: 375–386
- Lundberg JM, Terenius L, Hökfelt T, Martling CR, Tatemoto K, Mutt V, Polak J, Bloom S, Goldstein M. Neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity in peripheral noradrenergic neurons and effects of NPY on sympathetic function. *Acta Physiol Scand* 1982; 116: 477–480

- Lundberg JM, Torssell L, Sollevi A, Pernow J, Theodorsson Norheim E, Anggård A, Hamberger B. Neuropeptide Y and sympathetic vascular control in man. *Regul Pept* 1985; 13: 41–52
- Lv L, Zhou Z, Huang X, Zhao Y, Zhang L, Shi Y, Sun M, Zhang J. Inhibition of peptidyl-prolyl cis/trans isomerase Pin1 induces cell cycle arrest and apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Apoptosis Int J Program Cell Death* 2010; 15: 41–54
- Maher JJ. Interactions between hepatic stellate cells and the immune system. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 417–426
- Maher JJ. Leukocytes as modulators of stellate cell activation. *Alcohol Clin Exp Res* 1999; 23: 917–921
- Marangoni RA, Carmona AK, Passaglia RCAT, Nigro D, Fortes ZB, de Carvalho MHC. Role of the kallikrein-kinin system in Ang-(1-7)-induced vasodilation in mesenteric arterioles of Wistar rats studied in vivo-in situ. *Peptides* 2006; 27: 1770–1775
- Marcellin P, Gane E, Buti M, Afdhal N, Sievert W, Jacobson IM, Washington MK, Germanidis G, Flaherty JF, Aguilar Schall R, Bornstein JD, Kitrinis KM, Subramanian GM, McHutchison JG, Heathcote EJ. Regression of cirrhosis during treatment with tenofovir disoproxil fumarate for chronic hepatitis B: a 5-year open-label follow-up study. *Lancet* 2013; 381: 468–475
- Marra F, Arrighi MC, Fazi M, Caligiuri A, Pinzani M, Romanelli RG, Efsen E, Laffi G, Gentilini P. Extracellular signal-regulated kinase activation differentially regulates platelet-derived growth factor's actions in hepatic stellate cells, and is induced by in vivo liver injury in the rat. *Hepatology* 1999a; 30: 951–958
- Marra F, Romanelli RG, Giannini C, Failli P, Pastacaldi S, Arrighi MC, Pinzani M, Laffi G, Montalto P, Gentilini. Monocyte chemoattractant protein-1 as a chemoattractant for human hepatic stellate cells. *Hepatology* 1999b; 29: 140–148
- Matallanas D, Birtwistle M, Romano D, Zebisch A, Rauch J, von Kriegsheim A, Kolch W. Raf family kinases: old dogs have learned new tricks. *Genes Cancer* 2011; 2: 232–260
- McMurray JJV, Packer M, Desai AS, Gong J, Lefkowitz MP, Rizkala AR, Rouleau JL, Shi VC, Solomon SD, Swedberg K, Zile MR, PARADIGM-HF Investigators and Committees. Angiotensin-neprilysin inhibition versus enalapril in heart failure. *N Engl J Med* 2014; 371: 993–1004
- Mederacke I, Hsu CC, Troeger JS, Huebener P, Mu X, Dapito DH, Pradere J-P, Schwabe RF. Fate tracing reveals hepatic stellate cells as dominant contributors to liver fibrosis independent of its aetiology. *Nat Commun* 2013; 4: 2823

- Mehta G, Gustot T, Mookerjee RP, Garcia-Pagan JC, Fallon MB, Shah VH, Moreau R, Jalan R. Inflammation and portal hypertension - the undiscovered country. *J Hepatol* 2014; 61: 155–163
- Mehta PK, Griendling KK. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 292: C82-97
- Mitchell SA, Bansi DS, Hunt N, Von Bergmann K, Fleming KA, Chapman RW. A preliminary trial of high-dose ursodeoxycholic acid in primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology* 2001; 121: 900–907
- Moleda L, Trebicka J, Dietrich P, Gäbele E, Hellerbrand C, Straub RH, Sauerbruch T, Schoelmerich J, Wiest R. Amelioration of portal hypertension and the hyperdynamic circulatory syndrome in cirrhotic rats by neuropeptide Y via pronounced splanchnic vasoaction. *Gut* 2011; 60: 1122–1132
- Moreno AH, Burchell AR, Rousselot LM, Panke WF, Slafsky F, Burke JH. Portal blood flow in cirrhosis of the liver. *J Clin Invest* 1967; 46: 436–445
- Morrison SJ, White PM, Zock C, Anderson DJ. Prospective identification, isolation by flow cytometry, and in vivo self-renewal of multipotent mammalian neural crest stem cells. *Cell* 1999; 96: 737–749
- Muenzner M, Tappenbeck N, Gembardt F, Rülke R, Furkert J, Melzig MF, Siems W-E, Brockmann GA, Walther T. Green tea reduces body fat via upregulation of neprilysin. *Int J Obes* 2016; 40: 1850–1855
- Nickenig G, Jung O, Strehlow K, Zolk O, Linz W, Schölkens BA, Böhm M. Hypercholesterolemia is associated with enhanced angiotensin AT1-receptor expression. *Am J Physiol* 1997; 272: H2701-2707
- Niki T, Pekny M, Hellemans K, Bleser PD, Berg KV, Vaeyens F, Quartier E, Schuit F, Geerts A. Class VI intermediate filament protein nestin is induced during activation of rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 1999; 29: 520–527
- Nilsson P, Loganathan K, Sekiguchi M, Winblad B, Iwata N, Saido TC, Tjernberg LO. Loss of neprilysin alters protein expression in the brain of Alzheimer's disease model mice. *Proteomics* 2015; 15: 3349–3355
- Oben JA, Roskams T, Yang S, Lin H, Sinelli N, Torbenson M, Smedh U, Moran TH, Li Z, Huang J, Thomas SA, Diehl AM. Hepatic fibrogenesis requires sympathetic neurotransmitters. *Gut* 2004; 53: 438–445
- Oben JA, Yang S, Lin H, Ono M, Diehl AM. Norepinephrine and neuropeptide Y promote proliferation and collagen gene expression of hepatic myofibroblastic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 302: 685–690

- 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; 123: 1667–1676
- Paizis G, Tikellis C, Cooper ME, Schembri JM, Lew RA, Smith AI, Shaw T, Warner FJ, Zuilli A, Burrell LM, Angus PW. Chronic liver injury in rats and humans upregulates the novel enzyme angiotensin converting enzyme 2. *Gut* 2005; 54: 1790–1796
- 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: 33–42
- Pereira RM, dos Santos RAS, da Costa Dias FL, Teixeira MM, Simões e Silva AC. Renin-angiotensin system in the pathogenesis of liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 2579–2586
- Pereira RM, Dos Santos RAS, Teixeira MM, Leite VHR, Costa LP, da Costa Dias FL, Barcelos LS, Collares GB, Simões e Silva AC. The renin-angiotensin system in a rat model of hepatic fibrosis: evidence for a protective role of Angiotensin-(1-7). *J Hepatol* 2007; 46: 674–681
- Pernow J, Ohlén A, Hökfelt T, Nilsson O, Lundberg JM. Neuropeptide Y: presence in perivascular noradrenergic neurons and vasoconstrictor effects on skeletal muscle blood vessels in experimental animals and man. *Regul Pept* 1987; 19: 313–324
- Pons J, Kitlinska J, Ji H, Lee EW, Zukowska Z. Mitogenic actions of neuropeptide Y in vascular smooth muscle cells: synergetic interactions with the beta-adrenergic system. *Can J Physiol Pharmacol* 2003; 81: 177–185
- Promrat K, Kleiner DE, Niemeier HM, Jackvony E, Kearns M, Wands JR, Fava JL, Wing RR. Randomized controlled trial testing the effects of weight loss on nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2010; 51: 121–129
- Raimondi L, Banchelli G, Matucci R, Stillitano F, Pirisino R. The direct stimulation of Gi proteins by neuropeptide Y (NPY) in the rat left ventricle. *Biochem Pharmacol* 2002; 63: 2063–2068
- Richards AM, Wittert GA, Crozier IG, Espiner EA, Yandle TG, Ikram H, Frampton C. Chronic inhibition of endopeptidase 24.11 in essential hypertension: evidence for enhanced atrial natriuretic peptide and angiotensin II. *J Hypertens* 1993; 11: 407–416
- Ridley AJ. Rho family proteins: coordinating cell responses. *Trends Cell Biol* 2001; 11: 471–477
- Rockey DC. Hepatic fibrosis, stellate cells, and portal hypertension. *Clin Liver Dis* 2006; 10: 459–479

- Rockey DC. New concepts in the pathogenesis of portal hypertension: hepatic wounding and stellate cell contractility. *Clin Liver Dis* 1997; 1: 13–29
- Rockey DC, Fouassier L, Chung JJ, Carayon A, Vallee P, Rey C, Housset C. Cellular localization of endothelin-1 and increased production in liver injury in the rat: potential for autocrine and paracrine effects on stellate cells. *Hepatology* 1998; 27: 472–480
- Rouleau JL, Pfeffer MA, Stewart DJ, Isaac D, Sestier F, Kerut EK, Porter CB, Proulx G, Qian C, Block AJ. Comparison of vasopeptidase inhibitor, omapatrilat, and lisinopril on exercise tolerance and morbidity in patients with heart failure: IMPRESS randomised trial. *Lancet* 2000; 356: 615–620
- Sancho-Bru P, Bataller R, Colmenero J, Gasull X, Moreno M, Arroyo V, Brenner DA, Ginès P. Norepinephrine induces calcium spikes and proinflammatory actions in human hepatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 291: G877-884
- Sansoè G, Aragno M, Mastrocola R, Restivo F, Mengozzi G, Smedile A, Rosina F, Danni O, Parola M, Rizzetto M. Neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) in cirrhotic liver: a new target to treat portal hypertension? *J Hepatol* 2005; 43: 791–798
- Santos RA, Campagnole-Santos MJ, Andrade SP. Angiotensin-(1-7): an update. *Regul Pept* 2000; 91: 45–62
- Santos RAS, Ferreira AJ. Pharmacological effects of AVE 0991, a nonpeptide angiotensin-(1-7) receptor agonist. *Cardiovasc Drug Rev* 2006; 24: 239–246
- Santos RAS, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DMR, Machado RP, de Buhr I, Heringer-Walther S, Pinheiro SVB, Lopes MT, Bader M, Mendes EP, Lemos VS, Campagnole-Santos MJ, Schultheiss H-P, Speth R, Walther T. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 8258–8263
- Sauerbruch T, Trebicka J. Future therapy of portal hypertension in liver cirrhosis - a guess. *F1000prime Rep* 2014; 6: 95
- Schiffrin EL, Park JB, Intengan HD, Touyz RM. Correction of arterial structure and endothelial dysfunction in human essential hypertension by the angiotensin receptor antagonist losartan. *Circulation* 2000; 101: 1653–1659
- Schoenfeld HA, West T, Verghese PB, Holubasch M, Shenoy N, Kagan D, Buono C, Zhou W, DeCristofaro M, Douville J, Goodrich GG, Mansfield K, Saravanan C, Cumin F, Webb RL, Bateman RJ. The effect of angiotensin receptor neprilysin inhibitor, sacubitril/valsartan, on central nervous system amyloid- β concentrations and clearance in the cynomolgus monkey. *Toxicol App. Pharmacol* 2017; 323: 53–65

- Shin H-M, Je H-D, Gallant C, Tao TC, Hartshorne DJ, Ito M, Morgan KG. Differential association and localization of myosin phosphatase subunits during agonist-induced signal transduction in smooth muscle. *Circ Res* 2002; 90: 546–553
- Shrivastava A, Radziejewski C, Campbell E, Kovac L, McGlynn M, Ryan TE, Davis S, Goldfarb MP, Glass DJ, Lemke G, Yancopoulos GD. An orphan receptor tyrosine kinase family whose members serve as nonintegrin collagen receptors. *Mol Cell* 1997; 1: 25–34
- Sigala B, McKee C, Soeda J, Paziienza V, Morgan M, Lin C-I, Selden C, Vander Borcht S, Mazzoccoli G, Roskams T, Vinciguerra M, Oben JA. Sympathetic nervous system catecholamines and neuropeptide Y neurotransmitters are upregulated in human NAFLD and modulate the fibrogenic function of hepatic stellate cells. *PLoS One* 2013; 8: e72928
- Sikuler E, Kravetz D, Groszmann RJ. Evolution of portal hypertension and mechanisms involved in its maintenance in a rat model. *Am J Physiol* 1985; 248: G618-625
- Skidgel RA, Erdös EG. Angiotensin converting enzyme (ACE) and neprilysin hydrolyze neuropeptides: a brief history, the beginning and follow-ups to early studies. *Peptides* 2004; 25: 521–525
- Spillantini MG, Sicuteri F, Salmon S, Malfroy B. Characterization of endopeptidase 3.4.24.11 (“enkephalinase”) activity in human plasma and cerebrospinal fluid. *Biochem Pharmacol* 1990; 39: 1353–1356
- Stefanovic B, Hellerbrand C, Holcik M, Briendl M, Aliehaber S, Brenner DA. Posttranscriptional regulation of collagen alpha1(I) mRNA in hepatic stellate cells. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 5201–5209
- Sugden PH, Clerk A. Regulation of the ERK subgroup of MAP kinase cascades through G protein-coupled receptors. *Cell Signal* 1997; 9: 337–351
- Takayanagi R, Ohnaka K, Sakai Y, Nakao R, Yanase T, Haji M, Inagami T, Furuta H, Gou DF, Nakamuta M. Molecular cloning, sequence analysis and expression of a cDNA encoding human type-1 angiotensin II receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 183: 910–916
- Tallant EA, Ferrario CM, Gallagher PE. Angiotensin-(1-7) inhibits growth of cardiac myocytes through activation of the mas receptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289: H1560-1566
- Taniyama Y, Ushio-Fukai M, Hitomi H, Rocic P, Kingsley MJ, Pfahnl C, Weber DS, Alexander RW, Griendling K. Role of p38 MAPK and MAPKAPK-2 in angiotensin II-induced Akt activation in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 287: C494-499

- Tatemoto K. Neuropeptide Y: complete amino acid sequence of the brain peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982; 79: 5485–5489
- Thampanitchawong P, Piratvisuth T. Liver biopsy: complications and risk factors. *World J Gastroenterol* 1999; 5: 301–304
- Touyz RM, He G, Deng LY, Schiffrin EL. Role of extracellular signal-regulated kinases in angiotensin II-stimulated contraction of smooth muscle cells from human resistance arteries. *Circulation* 1999; 99: 392–399
- Trebicka J. Emergency TIPS in a Child-Pugh B patient: When does the window of opportunity open and close? *J Hepatol* 2017; 66: 442–450
- Tsochatzis EA, Bosch J, Burroughs AK. Liver cirrhosis. *Lancet* 2014; 383: 1749–1761
- Turner AJ, Isaac RE, Coates D. The neprilysin (NEP) family of zinc metalloendopeptidases: genomics and function. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol* 2001; 23: 261–269
- Ushio-Fukai M, Griending 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; 273: 19772–19777
- Vickers C, Hales P, Kaushik V, Dick L, Gavin J, Tang J, Godbout K, Parsons T, Baronas E, Hsieh F, Acton S, Patane M, Nichols A, Tummino P. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J Biol Chem* 2002; 277: 14838–14843
- Vogel W. Discoidin domain receptors: structural relations and functional implications. *FASEB J* 1999; 13: S77-82
- Volpe M, Carnovali M, Mastromarino V. The natriuretic peptides system in the pathophysiology of heart failure: from molecular basis to treatment. *Clin Sci Lond Engl* 2016; 130, 57–77
- Vorobioff JD. Hepatic venous pressure in practice: how, when, and why. *J Clin Gastroenterol* 2007; 41: S336-343
- Wahlestedt C, Håkanson R, Vaz CA, Zukowska-Grojec Z. Norepinephrine and neuropeptide Y: vasoconstrictor cooperation in vivo and in vitro. *Am J Physiol* 1990; 258: R736-742
- Wallace K, Burt AD, Wright MC. Liver fibrosis. *Biochem J* 2008; 411: 1–18
- Wocial B, Ignatowska-Switalska H, Pruszczyk P, Jedrusik P, Januszewicz A, Lapinski M, Januszewicz W, Zukowska-Grojec Z. Plasma neuropeptide Y and

- catecholamines in women and men with essential hypertension. *Blood Press* 1995; 4: 143–147
- Wong PCY, Guo J, Zhang A. The renal and cardiovascular effects of natriuretic peptides. *Adv Physiol Educ* 2017; 41: 179–185
- Yamamoto K, Chappell MC, Brosnihan KB, Ferrario CM. In vivo metabolism of angiotensin I by neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1992; 19: 692–696
- Yan C, Kim D, Aizawa T, Berk BC. Functional interplay between angiotensin II and nitric oxide: cyclic GMP as a key mediator. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 26–36
- Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 2000; 342: 145–153
- Zhang F, Ren X, Zhao M, Zhou B, Han Y. Angiotensin-(1-7) abrogates angiotensin II-induced proliferation, migration and inflammation in VSMCs through inactivation of ROS-mediated PI3K/Akt and MAPK/ERK signaling pathways. *Sci Rep* 2016; 6: 34621
- Zhang P, Qi Y-X, Yao Q-P, Chen X-H, Wang G-L, Shen B-R, Han Y, Gao L-Z, Jiang Z-L. Neuropeptide Y Stimulates Proliferation and Migration of Vascular Smooth Muscle Cells from Pregnancy Hypertensive Rats via Y1 and Y5 Receptors. *PloS One* 2015;10: e0131124
- Zukowska Z, Pons J, Lee EW, Li L. Neuropeptide Y: a new mediator linking sympathetic nerves, blood vessels and immune system? *Can J Physiol Pharmacol* 2003; 81: 89–94
- Zukowska-Grojec Z, Karwatowska-Prokopczuk E, Rose W, Rone J, Movafagh S, Ji H, Yeh Y, Chen WT, Kleinman HK, Grouzmann E, Grant DS. Neuropeptide Y: a novel angiogenic factor from the sympathetic nerves and endothelium. *Circ Res* 1998; 83: 187–195

9. Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater und Betreuer Herrn Professor Dr. med. Jonel Trebicka für die Überlassung des Themas, die gute Betreuung und die Unterstützung bei der Ausführung dieser Arbeit bedanken. Wenn auch die vielen Verbesserungsvorschläge, und vor allem deren Umsetzung, teilweise nerven- und zeitaufwendig waren, bin ich im Nachhinein doch froh darüber, haben sie doch wesentlich dazu beigetragen, dass diese Arbeit voran geschritten ist.

Desweiteren gilt mein ganz besonderer Dank den Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Leberfibrose und portale Hypertension“: Frau Dr. rer. nat. Sabine Klein, Robert Schierwagen, Frank Uschner, Gudrun Hack und Silke Bellinghausen. Ohne eure tatkräftige Unterstützung und Mitarbeit wäre das hier wohl nie was geworden.

Schließlich möchte ich mich noch bei meiner Freundin, meiner Familie und meinen Freunden bedanken.