

Anti-fibrotische Effekte von Amyloid β und dem α_2 adrenergen Rezeptor-Inhibitor Mesedin in vitro und in vivo

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Ute Angelina Schwinghammer
aus Böblingen

Tübingen
2024

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:

18.07.2024

Dekan:

Prof. Dr. Thilo Stehle

1. Berichterstatter/-in:

Apl. Prof. Dr. Lusine Danielyan

2. Berichterstatter/-in:

Prof. Dr. Harald Groß

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
Zusammenfassung.....	5
Summary.....	8
Liste der Publikationen	10
1. In der vorliegenden Dissertation einbezogene Forschungsdaten aus veröffentlichten Publikationen.....	10
Erklärung zum Anteil an gemeinschaftl. Veröffentlichungen.....	11
1. Einleitung.....	13
1.1 Aufbau der Leber.....	13
1.2 Schädigung der Leber.....	14
1.3 Amyloid β und Präsenilin	15
1.4 Die Mausmodelle 3xTg-AD, 5xFAD und APP-KO	17
1.5 Das adrenerge System in der Leber	18
1.6 Das CCl₄-Modell für die Untersuchung einer Schädigung der Leber	19
1.7 Die Gallengangligatur und weitere Modelle der Leberschädigung.....	20
2. Zielsetzung	21
3. Ergebnisse und Diskussion.....	23
3.1 AR und Mesedin in der Leber.....	23
3.1.1 Die Expression α2 adrenerger Rezeptoren ist in vivo unter fibrotischen Bedingungen erhöht.....	23
3.1.2 Die Expression α2 adrenerger Rezeptoren wird durch Mesedin in vitro reduziert.....	24
3.1.3 Mesedin zeigt anti-fibrotische Effekte in hepatischen Sternzellen	25
3.1.4 Mesedin zeigt Permeabilitätsfördernde und anti-fibrotische Effekte in hLSEC	25
3.2 Verlust von Amyloid β in zirrhotischen Lebern und anti-fibrotische Effekte von Amyloid β in vitro	28
3.2.1 Das Amyloid-Vorläuferprotein, sowie Amyloid β-generierende und - abbauende Proteine sind in humanen zirrhotischen Lebern reduziert.....	28
3.2.2 eNOS ist in humanen zirrhotischen Lebern reduziert	29
3.2.3 Das Amyloid-Vorläuferprotein, sowie Amyloid β-generierende und - abbauende Proteine sind in gallengangligierten Lebern von Mäusen und Ratten reduziert	30
3.2.4 eNOS ist in gallengangligierten Lebern von Mäusen und Ratten reduziert 	31
3.2.5 Parallelen zwischen Astrozyten und hepatischen Sternzellen und deren Fähigkeit zur Degradation von Amyloid β	31
3.2.6 Amyloid β zeigt anti-fibrotische Effekte auf HSC und hLSEC	33

3.2.7	Amyloid β 42 ist in den Lebern von 5xFAD-Mäusen hochreguliert.....	35
3.2.8	Systemisch erhöhte Amyloid β Level zeigen positive Wirkungen auf Fibrosemarker und Permeabilitätsmarker in AD-Mausmodellen.....	35
3.2.9	Amyloid β in Gehirnen von 3xTg-AD Mäusen.....	36
3.3	Auswirkungen eines Amyloid β -Defizits auf die Leberfunktion.....	37
3.3.1	Einfluss von Amyloid β auf die Physiologie verschiedener Leberzelltypen 37	
3.3.2	Effekte einer passiven Immunisierung und APP-KO auf die Leber	41
3.3.3	Verlust von Amyloid β in humanen fibrotischen Lebern	43
3.3.4	Reduktion und Verlust von Amyloid β steht in Verbindung mit der Aktivierung des Notch-Signalweges	44
3.4	Eine Leberschädigung durch CCl ₄ ist in 3xTg-AD Mäusen reduziert.....	46
3.4.1	Der Verlust von Amyloid β nach 5-wöchiger CCl ₄ -Behandlung ist in 3xTg- AD-Lebern weniger stark ausgeprägt als in Wildtypen.....	46
3.4.2	Amyloid β Überexpression schützt vor einem fibrotischen Umbau des Lebergewebes durch CCl ₄ -Behandlung	46
3.4.3	Eine Leberenzyminduktion bleibt bei CCl ₄ -behandelten 3xTg-AD Mäusen aus 47	
3.4.4	Erhöhtes Amyloid β in 3xTg-AD-Lebern führt zu einer verminderten Aktivierung von HSC nach einer CCl ₄ -Behandlung	47
3.4.5	Der Schaden durch CCl ₄ ist in perizentralen Hepatozyten von 3xTg-AD Mäusen reduziert.....	48
3.4.6	Oxidativer Stress ist in CCl ₄ -behandelten 3xTg-AD Lebern reduziert.....	49
3.4.7	Lebertranskriptom-Analyse	50
3.4.8	Ein verminderter A β -Abbau verhindert eine CCl ₄ -induzierte Leberfibrose	52
4.	Ausblick	54
5.	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	57
6.	Anhang.....	70
I.	Akzeptierte Publikationen	70
II.	Manuskript.....	70

Abkürzungsverzeichnis

3xTg-AD	-	<i>engl. triple transgenic mouse model of AD</i> , dreifach transgenes Mausmodell der Alzheimer-Krankheit
5xFAD	-	Transgenes Mausmodell, das 5 Mutationen die in Zusammenhang mit familiärem AD stehen in sich vereint
8-OH-dG	-	8-Hydroxydesoxyguanosin
AD	-	<i>engl. alzheimer's disease</i> , Alzheimer Krankheit
ADAM	-	<i>engl. a disintegrin and metalloproteinase</i>
AFP	-	Alpha-Fetoprotein
AICD	-	<i>engl. amyloid precursor protein intracellular domain</i> , intrazelluläre Domäne des Amyloid-Vorläuferproteins
ALT	-	Alanin Aminotransferase
APP	-	<i>engl. Amyloid β precursor protein</i> , Amyloid β Vorläuferprotein
AR	-	Adrenerge Rezeptoren
AST	-	Aspartat Aminotransferase
ATP	-	Adenosintriphosphat
BACE1	-	<i>engl. β-site of APP cleaving enzyme</i> , β -Sekretase
BACE2	-	Beta Sekretase 2
BDL	-	<i>engl. bile duct ligation</i> , Gallengangligatur
CCl ₄	-	Tetrachlormethan
CD10	-	<i>engl. cluster of differentiation 10</i>
CYP	-	Cytochrom P450 Isoenzyme
DNA	-	<i>engl. desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
EGTA	-	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure

eNOS	-	endotheliale NO-Synthase
EZM	-	Extrazelluläre Matrix
FITC	-	Fluoresceinisothiocyanat
GFAP	-	engl. glial fibrillary acidic protein, Saures Gliafaserprotein
GO	-	Gen-Ontologie
GS	-	Glutaminsynthetase
GSDI	-	<i>engl. glycogen storage disease type 1a</i> , Glykogenspeicherkrankheit Typ 1a
HCC	-	<i>engl. hepatocellular carcinoma</i> , Hepatozelluläres Karzinom
hFL	-	humane fibrotische Leber
HGF	-	<i>engl. hepatocyte growth factor</i> , Hepatozyten-Wachstumsfaktors
HIF1 α	-	Hypoxie-induzierbarer Faktor 1 α
hLSEC	-	<i>engl. human liver sinusoidal endothelial cells</i> , humane sinusoidale Endothelzellen der Leber
hNL	-	humane normale (gesunde) Leber
HSC	-	<i>engl. hepatic stellate cells</i> , Hepatische Sternzellen
hZL	-	humane zirrhotische Leber
IFN γ	-	Interferon γ
IgG2a	-	Immunglobulin G2a
IL-10	-	Interleukin 10
IL-13	-	Interleukin 13
IL-6	-	Interleukin 6
iNOS	-	induzierbare NO-Synthase
iPS-Zellen	-	induzierte pluripotente Stammzellen
KEGG	-	engl. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, Kyoto-

Enzyklopädie der Gene und Genome

KO	-	Knockout
LBQ657	-	(2R,4S)-5-(Biphenyl-4-yl)-4-((3-carboxypropionyl)amino)-2-methylpentanoic acid, Sacubitrilat, aktiver Metabolit von Sacubitril
L-NAME	-	N-Nitroarginin-Methylester
LRP	-	LRP1 (engl. low density lipoprotein receptor-related protein 1), auch Apolipoprotein E-Rezeptor (APOER)
MBP	-	<i>engl. myelin basic protein</i> , basisches Myelinprotein
MMP-12	-	Matrixmetalloproteinase 12
MMP-13	-	Matrixmetalloproteinase 13
MMP-2	-	Matrixmetalloproteinase 2 (oder auch Gelatinase A)
MMP-9	-	Matrixmetalloproteinase 9
mRNA	-	<i>engl. messenger ribonucleic acid</i> , Boten-Ribonukleinsäure
NAFLD	-	<i>engl. non-alcoholic fatty liver disease</i> , Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung
NF-κB	-	<i>engl. nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i> , Nukleärer Faktor κB
NICD	-	<i>engl. notch intracellular domain</i> , Notch intrazelluläre Domäne
nNOS	-	neuronale NO-Synthase
NO	-	Stickoxid
OPN	-	Osteopontin
oxPhos	-	oxidative Phosphorylierung
PCNA	-	Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen
PDGF	-	<i>engl. platelet derived growth factor</i> ,

		Thrombozytenwachstumsfaktor
RT-qPCR	-	<i>engl. real time quantitative PCR</i> , Echtzeit quantitative PCR
Smad3	-	<i>engl. Mothers against decapentaplegic homolog 3</i> , Mediator in der TGF β -Signalkaskade
SOD-1	-	Superoxid-Dismutasen
TGF β	-	<i>engl. transforming growth factor</i> , Transformierender Wachstumsfaktor
TIAM	-	<i>engl. t-lymphoma invasion and metastasis-inducing protein 2</i> , T-Lymphom-Invasions- und Metastasen-induzierendes Protein 2
TIMP1	-	<i>engl. tissue inhibitor of metalloproteinases-1</i> , Metalloproteinase Inhibitor 1
TNF α	-	<i>engl. tumor necrosis factor α</i> , Tumor-Nekrose-Faktor α
TTR	-	Transthyretin
UCHL1	-	<i>engl. Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1</i> , Ubiquitin-Carboxyl-Terminal-Hydrolase L1
VEGF-A	-	<i>engl. vascular endothelial growth factor A</i> , vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor A
VPF	-	<i>engl. vascular permeability factor</i> , vaskulärer Permeabilitätsfaktor
Wt	-	Wildtyp
α SMA	-	<i>engl. α smooth muscle actin</i> , α -Aktin der glatten Muskulatur

Zusammenfassung

Als zentrales Organ des Stoffwechsels ist die Leber unter anderem für den Giftstoffabbau und den Gallestoffwechsel verantwortlich. Dies spiegelt sich in ihrer sehr guten Durchblutung (ca. 100ml/min/100g) und ihrer hohen Permeabilität – vor allem der Lebersinusoide – wider. Bei einer Schädigung kommt es zur Aktivierung von hepatischen Sternzellen, die zur Kapillarisation der Leber durch eine Sezernierung von Kollagenen beitragen. Die sinusoidalen Endothelzellen der Leber verlieren ihre Fenestrierung und schränken so den Austausch zwischen Blut und Leberzellen weiter ein. Aktuell existiert keine kurative Behandlung einer Leberfibrose/-zirrhose. Ein besseres Verständnis der Vorgänge, während der Fibrose-Entwicklung, und die Möglichkeit diese pharmakologisch zu beeinflussen, könnte neue Behandlungsansätze schaffen, sodass eine Lebererkrankung in der Zukunft besser behandelbar sein wird. Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss des adrenergen Systems und des Amyloid β -Haushalts in der Leber durch eine pharmakologische Manipulation besser zu verstehen.

Dafür wurde erstmals Mesedin - ein Inhibitor für α_2 Adrenerge Rezeptoren - genutzt. In CCl_4 -behandelten Mäusen waren die α_2 -AR Subtypen α_2a , α_2b und α_2c jeweils stärker exprimiert als in den Kontrollen, was auf eine pro-fibrotische Wirkung der α_2 -AR hinweist. In vitro konnte durch eine Behandlung mit Mesedin eine deutliche Reduktion der Aktivierung von hepatischen Sternzellen (HSC)- erkennbar durch eine Reduktion von αSMA und $\text{TGF}\beta$ - erreicht werden. In humanen Leber sinusoidalen Endothelzellen (hLSEC) kam es zu einem Anstieg des Permeabilitätsmarkers eNOS und einer gleichzeitigen, nahezu vollständigen, Reduktion der $\text{TGF}\beta$ -Expression. Mesedin wirkte dabei nicht nur inhibierend, sondern reduzierte die Expression der α_2 -AR Subtypen α_2a und α_2b in einer murinen HSC Zelllinie (M1-4HSC).

Weiterhin wurde die Rolle von Amyloid β in der Leber unter normalen und fibrotischen Bedingungen untersucht. Dabei wurde in Lebern von zirrhotischen PatientInnen ein Verlust der Amyloid β Peptide mit 38, 40 und 42 Aminosäuren Kettenlänge deutlich. Auch die an der Amyloid β Generierung beteiligten Enzyme Präsenilin und BACE1, sowie die Amyloid β -abbauenden Enzyme Neprilysin und MBP waren reduziert. Ähnliche Ergebnisse zeigten Lebern von gallenganglierten Ratten. In vitro wurde die Fähigkeit von HSC aus Maus und Ratte deutlich, Amyloid β 42 abzubauen. Eine Behandlung von HSC mit Amyloid β 42 führte zu einer Reduktion von αSMA und

Kollagen 1. In hLSEC konnte durch eine Amyloid β 42-Behandlung eine Reduktion von TGF β und eine Erhöhung von eNOS erreicht werden. Amyloid β zeigt also anti-fibrotische Effekte und geht bei einer Leberzirrhose verloren. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden die Lebern von 5xFAD und 3xTg-AD Mäusen - zwei Alzheimer-Modellen mit erhöhter systemischer Amyloid β -Konzentration - untersucht. Im Vergleich zu den Kontrollen war in beiden Modellen eNOS höher exprimiert. In 5xFAD Lebern war Kollagen 1 weniger stark exprimiert als in den Kontrollen. Eine höhere Amyloid β Expression scheint somit einen anti-fibrotischen Effekt auf die Leber zu haben.

Aufbauend darauf wurde im vorliegenden, noch nicht zur Veröffentlichung eingereichten Manuskript untersucht, welchen Einfluss eine Alzheimer-Therapie basierend auf Antikörpern gegen Amyloid β (3D6) auf die Leber zeigen könnte. Hierbei wurde deutlich, dass eine Reduktion von Amyloid β durch eine 3D6-Immunisierung zur Ausbildung einer Fibrose führt. Die 3D6-Immunisierung von 5xFAD Mäusen zeigte, dass selbst im Alzheimer-Modell systemisch erhöhte Amyloid β -Konzentrationen so weit abgesenkt wurden, dass es auch hier zu einer Schädigung der Leber im Sinne fibrotischer Veränderungen (Aktivierung von HSC, Kollagenablagerung) kam. Untersuchungen mit APP Knockout Mäusen zeigten, dass die vollständige Abwesenheit von APP und dessen Spaltprodukten ebenfalls zu einer Leberschädigung führt. Sowohl in 3D6-Immunisierten, als auch APP-KO Mäusen kam es zu einer Aktivierung des pro-fibrotischen Notch-Signalweges.

Um nun im Umkehrschluss zu überprüfen, ob eine systemisch erhöhte Amyloid β -Konzentration prinzipiell in der Lage ist die Entwicklung einer Leberfibrose zu verhindern bzw. zu verlangsamen, wurde bei 3xTg-AD Mäusen und entsprechenden Wildtyp-Kontrollen eine Leberschädigung mit CCl₄ induziert. In 3xTg-AD Mäusen wiesen die Ergebnisse auf eine geringere Schädigung als in den Kontrollen hin. Dies wurde anhand der Plasmakonzentration der Leberenzyme, sowie einem Parameter der HSC Aktivierung und Kollagenablagerungen verifiziert.

Damit konnte gezeigt werden, dass Amyloid β zur Protektion der Leber beiträgt und sein Verlust zu einer fibrotischen Reorganisation der Leber führt. In diesem Kontext konnte der Neprilysin-Inhibitor Sacubitril zur Prävention und Behandlung der Leberfibrose genutzt werden. In einem präventiven Einsatz, in dem CCl₄ zeitgleich zur Behandlung von Sacubitrilat (den aktiven Metaboliten von Sacubitril) über einen 5-wöchigen Zeitraum gegeben wurde, konnten die hepatoprotektiven Effekte von

Sacubitrilat bei BL/6 Mäusen nachgewiesen werden. Durch einen verminderten Abbau von Amyloid β und somit einer Konzentrations-Erhöhung dieses Peptides konnten zusätzlich zu den signifikant reduzierten Serum-Leberenzymen (AST, ALT und AP), eine deutliche Reduktion der fibrotischen Markern (Kollagen, α SMA, OPN und TGF β) sowie eine signifikante Erhöhung der Marker sinusoidaler Permeabilität (CD31 und VEGF) erzielt werden. Ein Ansatz zur Therapie bei einem fortgeschrittenen Leberschaden muss in zukünftigen Experimenten geprüft werden. Weiterhin sollte eine mögliche Anwendung von α 2-AR-Inhibitoren bei einer Leberfibrose genauer untersucht werden, da eine Inhibition von α 2-AR ebenfalls anti-fibrotische Effekte zeigt.

Summary

Etiologically different causes of liver fibrosis/cirrhosis result in activation of hepatic stellate cells, which contribute to capillarization of the liver by secreting collagens. Liver sinusoidal endothelial cells lose their fenestrations, further restricting the exchange between blood and liver cells. Given that currently no curative or progression-slowing therapies for fibrotic liver diseases exist, their effective treatment remains one of the greatest challenges in modern medicine. In this context a more profound understanding of the processes involved in fibrosis will open new opportunities of novel pharmacological targeting strategies.

In the first paper, the novel α 2-AR inhibitor mesedin was used to investigate the involvement of this receptor subtype in fibrosis. CCl₄ treated animals displayed an elevated expression of the α 2-AR subtypes α 2a, α 2b and α 2c compared to controls, indicating a pro-fibrotic effect of α 2-AR. In vitro, treatment with mesedin significantly reduced HSC activation (evident by a reduction of α SMA and TGF β). In hLSEC, there was a marked increase in the permeability marker eNOS while TGF β was almost completely downregulated to the level of the control. Interestingly, besides being inhibitory to α 2-AR, mesedin also reduced the expression of the receptor subtypes α 2a and α 2b in M1-4HSC.

The second publication investigates the role of amyloid β in the liver under normal and fibrotic conditions. Thereby, a loss of amyloid β peptides with 38, 40 and 42 amino acids chain length became evident in livers of cirrhotic patients. The amyloid β generating enzymes presenilin and BACE1, as well as the amyloid β degrading enzymes neprilysin and MBP were significantly reduced. Similar results were observed in bile duct ligated rats. Our in vitro experiments have proven the capability of mouse and rat HSC to degrade amyloid β 42. Amyloid β 42 treatment of HSC resulted in a reduction of α SMA and collagen 1. In hLSEC, amyloid β 42 treatment induced a reduction of TGF β and an increase of eNOS. All together, these findings point at an anti-fibrotic effect of amyloid β and its loss in liver cirrhosis. Based on these results, the livers of 5xFAD and 3xTg-AD mice - two Alzheimer's disease models with increased systemic amyloid β - were examined. Compared to their respective controls, eNOS expression was elevated in both AD models. 5xFAD livers displayed decreased collagen 1 expression compared to the control, leading to the conclusion that amyloid

β helps to counteract the deposition of extracellular matrix and thus contributes to the maintenance of liver sinusoid permeability.

As a follow-up to the second paper, the present manuscript, which has not yet been submitted for publication, investigated possible effects on the liver induced by an Alzheimer's treatment based on antibodies against amyloid β (3D6). The data of this study support the notion that a reduction/neutralization of amyloid β by 3D6 antibody leads to the development of fibrosis. Even in a situation of elevated amyloid β levels in 5xFAD mice the action of this peptide is depleted by 3D6 antibody to a point where liver damage occurs. Experiments with APP knockout mice showed that the complete absence of APP and its fragments also leads to liver damage resulting in dramatic elevation of fibrotic hallmarks. Activation of the pro-fibrotic Notch signaling pathway was found in both 3D6 immunized and APP-KO mice. To elucidate whether elevated amyloid β levels might be sufficient to prevent or delay fibrosis, liver injury was induced by CCl₄ in 3xTg-AD mice and their corresponding wild-type controls. Assessment of the fibrotic markers collagen1, α SMA and liver enzymes (AST and ALT) indicate less damage in 3xTg-AD mice compared to controls. A simultaneous treatment of wildtype mice with sacubitril and CCl₄ showed promising hepatoprotective effects. Sacubitril is a neprilysin-inhibitor and therefore blocks the degradation of amyloid β peptides, thereby elevating amyloid β levels.

Alltogether the results of aforementioned studies provide insights into the physiological role of amyloid β in the liver and suggest that its loss leads to hepatic fibrosis. Future investigations of amyloid β level increasing strategies to treat liver fibrosis are assured. The possibility of using sacubitril to reverse liver damage might be promising for future studies. Furthermore, a possible application of α 2-AR inhibitors in liver fibrosis should be investigated in more detail to elucidate the pathways involved in anti-fibrotic effects of α 2-AR inhibition in the liver.

Liste der Publikationen

1. In der vorliegenden Dissertation einbezogene Forschungsdaten aus veröffentlichten Publikationen

1.1. Schwinghammer, U. A., Melkonyan, M. M., Hunanyan, L., Tremmel, R., Weiskirchen, R., Borkham-Kamphorst, E., Schaeffeler, E., Seferyan, T., Mikulits, W., Yenkyan, K., Schwab, M. & Danielyan, L. (2020)

α 2-Adrenergic Receptor in Liver Fibrosis: Implications for the Adrenoblocker Mesedin. *Cells*, 9(2), 456.

1.2. Buniatian, G. H., Weiskirchen, R., Weiss, T. S., **Schwinghammer, U. A.**, Fritz, M., Seferyan, T., Proksch, B., Glaser, M., Lourhmati, A., Buadze, M., Borkham-Kamphorst, E., Gaunitz, F., Gleiter C. H., Lang, T., Schaeffeler, E., Tremmel, R., Cynis, H., Frey II, W. H., Gebhardt, R., Friedman, S. L. & Danielyan, L. (2020)

Antifibrotic Effects of Amyloid-Beta and Its Loss in Cirrhotic Liver. *Cells*, 9(2), 452.

1.3. Gayane Hrachia Buniatian, **Ute Schwinghammer**, Roman Tremmel, Holger Cynis, Thomas S. Weiss, Ralf Weiskirchen, Volker M. Lauschke, Sonia Youhanna, Isbaal Ramos, Maria Valcarcel, Torgom Seferyan, Jens-Ulrich Rahfeld, Vera Rieckmann, Kathrin Klein, Marine Buadze, Victoria Weber, Valentina Kolak, Rolf Gebhardt, Scott L. Friedman, Ulrike C. Müller, Matthias Schwab, Lusine Danielyan

Consequences of Amyloid- β Deficiency for the Liver*

* Das Manuskript wurde nach der Einreichung publiziert und wird deshalb in der folgenden Dissertationsschrift als Manuskript bezeichnet

Erklärung zum Anteil an gemeinschaftl. Veröffentlichungen

Name: Ute Angelina Schwinghammer

Liste der Publikationen und Manuskripte

1. **Schwinghammer, U. A.**, Melkonyan, M. M., Hunanyan, L., Tremmel, R., Weiskirchen, R., Borkham-Kamphorst, E., Schaeffeler, E., Seferyan, T., Mikulits, W., Yenkyan, K., Schwab, M. & Danielyan, L. (2020)

α 2-Adrenergic Receptor in Liver Fibrosis: Implications for the Adrenoblocker Mesedin. *Cells*, 9(2), 456.

2. Buniatian, G. H., Weiskirchen, R., Weiss, T. S., **Schwinghammer, U. A.**, Fritz, M., Seferyan, T., Proksch, B., Glaser, M., Lourhmati, A., Buadze, M., Borkham-Kamphorst, E., Gaunitz, F., Gleiter C. H., Lang, T., Schaeffeler, E., Tremmel, R., Cynis, H., Frey II, W. H., Gebhardt, R., Friedman, S. L. & Danielyan, L. (2020)

Antifibrotic Effects of Amyloid-Beta and Its Loss in Cirrhotic Liver. *Cells*, 9(2), 452.

3. Gayane Hrachia Buniatian, **Ute Schwinghammer**, Roman Tremmel, Holger Cynis, Thomas S. Weiss, Ralf Weiskirchen, Volker M. Lauschke, Sonia Youhanna, Isbaal Ramos, Maria Valcarcel, Torgom Seferyan, Jens-Ulrich Rahfeld, Vera Rieckmann, Kathrin Klein, Marine Buadze, Victoria Weber, Valentina Kolak, Rolf Gebhardt, Scott L. Friedman, Ulrike C. Müller, Matthias Schwab, Lusine Danielyan

Consequences of Amyloid- β Deficiency for the Liver

Nr.	Publikation akzeptiert Ja/Nein	Liste der Autoren	Position der Kandidatin auf der Autoren-Liste
1	Ja	12	1
2	Ja	21	4
3	Nein	22	2

Der Anteil an den wissenschaftlichen Ideen, der Datengeneration, Analyse und Interpretation, sowie dem Schreibprozess der Publikationen ist in der folgenden Tabelle prozentual dargestellt.

	Publikation 1	Publikation 2	Manuskript
Wissenschaftlichen Ideen	10%	10%	30%
Datengeneration	80%	10%	40%
Analyse	80%	30%	40%
Interpretation	50%	30%	30%
Schreibprozess	20%	20%	30%
Reviewprozess	80%	10%	20%

1. Einleitung

1.1 Aufbau der Leber

Eine gesunde Leber zeichnet sich durch einen intensiven Austausch des Blutes mit den Hepatozyten aus. Die kleinste Funktionseinheit der Leber stellt das Leberläppchen dar, das beim Menschen annähernd sechseckig aufgebaut ist. An den jeweiligen Ecken befindet sich die sogenannte Glisson-Trias, bestehend aus einem Ast der Leberarterie (Arteria interlobularis), einem Ast der Pfortader (Vena interlobularis) und einem Gallengang. Sauerstoff- und nährstoffreiches Blut wird aus der Leberarterie und der Pfortader durch die Lebersinusoiden in die Zentralvene (Vena centralis) transportiert. Lebersinusoiden bestehen aus fenestrierten Endothelzellen ohne Basalmembran und ermöglichen somit den Übergang des Blutplasmas in den Disse'schen Raum, eine lockere Bindegewebsstruktur. In diese Struktur ragen die Hepatozyten und befinden sich somit stets in engem Kontakt mit dem Blut und allen Substanzen, die im Blut transportiert werden. Im Disse'schen Raum befinden sich die Kupfer-Zellen - leberspezifische Makrophagen - und ruhende hepatische Sternzellen (Munding und Tannapfel, 2011; Eppinger, 2013).

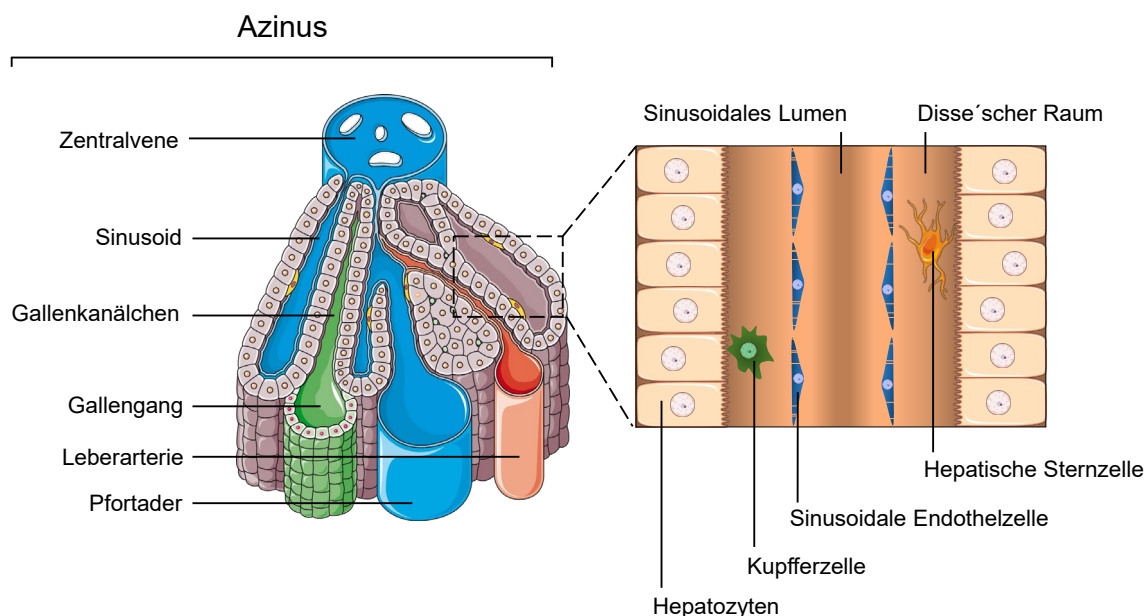


Abbildung 1: Aufbau eines Azinus der Leber und eines Lebersinusoids. Erstellt und modifiziert nach Vorbild von Adams und Eksteen, 2006 mit Hilfe von Abbildungsvorlagen der Internetseite <https://smart.servier.com/> und eigens kreierten Elementen.

1.2 Schädigung der Leber

Ein Leberschaden kann durch verschiedene Faktoren entstehen. Zu den Ursachen zählen der Kontakt mit lebertoxischen Substanzen (u.a. Medikamente und Alkohol), Viruserkrankungen (Hepatitis B und C) oder auch die Entzündung einer bereits bestehenden Fettleber (Steatohepatitis), die durch einen ungesunden Lebenswandel entstanden sein kann. Weiterhin existieren Autoimmunerkrankungen und genetische Ursachen (z.B. hereditäre Hämochromatose), die eine Leberschädigung verursachen können. Unabhängig von der Ursache werden Hepatozyten geschädigt und es kommt zu einer Nekrose (Tacke und Weiskirchen, 2010). Geschädigte Hepatozyten entlassen Proteine in den Blutstrom, wie die Aspartat Aminotransferase (AST) und die Alanin Aminotransferase (ALT). Eine Erhöhung der Konzentration von AST und ALT im Blut kann folglich auf eine Schädigung der Leber hinweisen (Novacek, 2004). Abgestorbenes Lebergewebe wird sukzessive durch Bindegewebsstrukturen ersetzt. Bei der Fibrose ist dabei der Anteil an Bindegewebe innerhalb der Leber erhöht, die Läppchenstruktur der Leber aber unverändert. Bei einer Zirrhose kommt es zur Ausbildung von Septen, welche die Zirkulation von Blut einschränken. Außerdem kommt es zur Ausbildung von Regeneratknoten. Insgesamt führt dies zu einer Umstrukturierung der Leberarchitektur. Die sich abwechselnden Prozesse der Schädigung, Entzündung und Vernarbung können über Jahre stattfinden und verlaufen häufig ohne spezifische Symptome, bis es zur Dekompensation der Leber kommt.

Hepatische Sternzellen (HSC) werden bei einer Schädigung der Leber und den darauffolgenden Entzündungsprozessen aktiviert, bilden einen myofibroblastischen Phänotyp aus und produzieren große Mengen extrazellulärer Matrixproteine wie Kollagene (Mann und Marra, 2010). Dabei sensitivieren sich die HSC für Signale durch Zytokine wie den transformierenden Wachstumsfaktor β (*engl. transforming growth factor β* , TGF β), der anfangs parakrin wirkt und von geschädigten Hepatozyten, sinusoidalen Endothelzellen (LSEC) und Kupffer-Zellen stammt (Schon und Weiskirchen, 2014). Die HSC beginnen zu proliferieren und wandern in die geschädigten Bereiche der Leber, wo sie zur Regeneration der Leber nach einer Schädigung beitragen. Ist die Schädigung kurzzeitig bzw. einmalig, gehen die HSC wieder in den Ruhezustand oder in die Apoptose über. Bei einer chronischen Schädigung kommt es immer wieder zu Nekrosen von Hepatozyten und die HSC werden kontinuierlich stimuliert (Wasmuth und Trautwein, 2010). Im späteren Verlauf

kommt es zur autokrinen Stimulation der HSC durch eigens produziertes TGF β und somit zur Perpetuierung der HSC-Aktivierung (Gressner und Bachem, 1995). Durch wiederholt ablaufende Vernarbungsprozesse können Blutgefäße eingengt und unterbrochen werden, was den Blutfluss in der Leber - und somit deren Funktion - einschränkt. Die sinusoidalen Endothelzellen verlieren ihre Fenestrierung, ein Merkmal das zu ihrer guten Durchlässigkeit für große Moleküle beiträgt, und tragen somit zusätzlich zu einer Kapillarisation der Leber bei (Xiaonan et al., 2020). Diese Prozesse führen schließlich zu einer portalen Hypertonie (Berzigotti et al., 2013). Häufige Komplikationen sind Ösophagusvarizen - die bei einer Ruptur zu einem lebensbedrohlichen Blutverlust führen können - Aszites und ein stark erhöhtes Risiko für die Entstehung eines Leberzellkarzinoms, welches engmaschige Kontrolluntersuchungen erfordert. Ist die Leber zu stark geschädigt, bleibt als letzte mögliche Behandlungsoption eine Lebertransplantation (Mazzaferro et al., 1996; Adam et al., 2003). Da Spenderorgane knapp sind, ist die Suche nach Therapie- und Präventionsmitteln unumgänglich.

1.3 Amyloid β und Präsenilin

Amyloid β Peptide sind kleine Proteine aus 38-43 Aminosäuren. Sie entstehen durch die enzymatische Spaltung des Amyloid-Vorläuferproteins (*engl. amyloid β precursor protein*, APP). Die Funktion von APP und seinen verschiedenen Spaltprodukten ist bisher nicht vollständig geklärt. Studien deuten auf eine wachstumsfördernde Wirkung auf Neuronen und zelladhäsive Effekte von APP hin (Thinakaran et al. 2008). Eine Expression von APP auf Ebene der mRNA wurde in Gehirn, Lunge, Gastrointestinaltrakt, Leber und Gallenblase, sowie vielen weiteren Organen nachgewiesen, wobei eine Proteinexpression nur in einem Teil dieser Organe gezeigt werden konnte - darunter die Leber und natürlich das Gehirn – (The Human Protein Atlas). In polymerisierter Form sind die β Amyloide Hauptbestandteile der amyloiden Plaques im Gehirn und gehören zu den wichtigsten Pathologiemerkmalen der Alzheimer-Krankheit.

Das APP wird über den nicht-amyloidogenen Weg durch die α -Sekretase in das N-terminale sAPP α und das C-terminale und membrangebundene C83 Segment gespalten. Anschließend wird C83 durch die γ -Sekretase in p3 und die intrazelluläre Domäne des Amyloid-Vorläuferproteins (*engl. amyloid precursor protein intracellular*

domain, AICD) gespalten. Im Gegensatz dazu schneidet im amyloidogenen Weg die β -Sekretase (BACE1) das APP in sAPP β und C99. Vom C99 Segment wird anschließend durch den γ -Sekretase-Komplex (dieser enthält das Präsenilin) bevorzugt das 40 Aminosäuren umfassende Amyloid β 40 und das 42 Aminosäuren umfassende Amyloid β 42, aber auch weitere Amyloid β Peptide (38-43 Aminosäuren), abgespalten. Auch hier entsteht AICD, wie im nicht-amyloidogenen Weg.

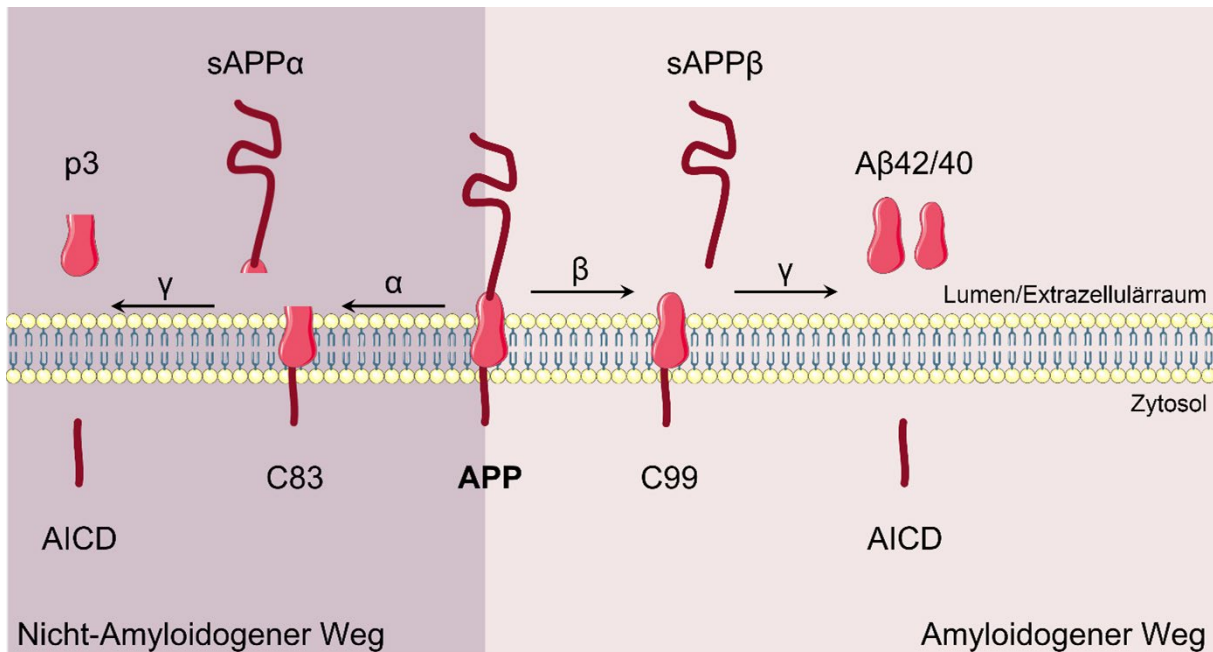


Abbildung 2: Amyloidogener und Nicht-Amyloidogener Weg nach Thinakaran und Koo 2008 mit Hilfe von Abbildungsvorlagen der Internetseite <https://smart.servier.com/> und eigens kreierten Elementen.

Mutationen des APP-Gens und der APP-schneidenden Enzyme BACE1 und Präsenilin führen zu einem vermehrten Aufkommen von Amyloid β 42, das unter den β Amyloiden am stärksten mit der Alzheimer-Pathologie in Verbindung zu stehen scheint (Düering et al., 2005). Diese Wirkung von Amyloid β 42 ist vermutlich auf seine starke Neigung zur Aggregation zurückzuführen (Snyder et al. 1994), wodurch eine Bildung von Amyloid β -Plaques gefördert wird. In der Leber ist die Funktion von APP und Amyloid β bisher nur wenig erforscht, es konnte aber gezeigt werden, dass die Leber Amyloid β Peptide generiert (Ghisso et al., 2004) und Amyloid β aus dem Blutplasma abbaut (Wang et al., 2017). Eine Schädigung oder Nekrose von Hepatozyten könnte sowohl den Abbau als auch die Generation von Amyloid β Peptiden stören. Im Gehirn konnte für Amyloid β neben der Plaquerbildung eine Erhöhung der Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke nachgewiesen werden (Biron et al. 2011, Carrano et al. 2011).

1.4 Die Mausmodelle 3xTg-AD, 5xFAD und APP-KO

Die 3xTg-AD Mauslinie wurde zur besseren Erforschung der Alzheimer-Krankheit erzeugt. Durch das Einbringen der menschlichen APP_{Swe} und tau_{P301L}-Transgene in eine homozygote PS1_{M146V}-Mauslinie wurden diese dreifach-transgenen Mäuse generiert. Die sogenannte schwedische Mutation im Gen für APP (APP_{Swe}) beinhaltet zwei Mutationen, die zu einer früh einsetzenden familiären Alzheimer-Erkrankung führen und in zwei schwedischen Familien festgestellt wurden (Mullan et al. 1992). Der Basentausch in tau_{P301L} führt zu einer Hyperphosphorylierung des taus, wodurch dieses vermehrt zur Bildung neurofibrillärer Tangles neigt. 3xTg-AD Mäuse neigen mit fortschreitendem Alter zu synaptischer Dysfunktion mit Defiziten der Langzeitpotenzierung und entwickeln Amyloid β -Plaques und neurofibrilläre Tangles (Oddo et al., 2003). Bisher ist unklar, ob eine systemische Erhöhung des Amyloid β auch den Lebergehalt der Amyloid β Peptide beeinflussen und der Erforschung der hepatischen Funktion von Amyloid β bei einer Leberschädigung dienen kann.

Die 5xFAD Mauslinie exprimiert APP- und Präsenilin-Transgene, die insgesamt fünf Mutationen tragen, die mit der familiären Alzheimer-Erkrankung in Verbindung stehen. Das eingebrachte menschliche APP enthält die „Swedish Mutation“ (K670N/M671L), die „Florida Mutation“ (I716V), sowie die „London Mutation“ (V717I). Das Präsenilin enthält die Mutationen M146L und L286V. Die Kombination dieser fünf Transgene führt zu einer starken Überexpression von Amyloid β 42 und die Tiere entwickeln bereits ab einem Alter von 2 Monaten Amyloid β -Plaques im Zentralnervensystem (Oakley et al., 2006).

Die APP Knockout Mauslinie (APP-KO) stellt ein absolutes APP-Defizit mit keiner nachweisbaren APP Expression in den verschiedenen Organen dar. Die Tiere sind lebens- und fortpflanzungsfähig, wiegen aber 15-20% weniger als Artgenossen ohne den Knockout im gleichen Alter (Zheng et al., 1995). Diese Mauslinie diente bisher ausschließlich der Erforschung der grundlegenden Funktion von APP bzw. der Effekte der Abwesenheit dessen im zentralen Nervensystem.

1.5 Das adrenerge System in der Leber

PatientInnen mit Leberzirrhose und portaler Hypertension zeigen einen deutlichen systemischen Anstieg von Noradrenalin (Henriksen et al., 1998) und es konnte gezeigt werden, dass Noradrenalin starke profibrotische Eigenschaften aufweist (Oben et al., 2003). Die adrenergen Rezeptor (AR)-Subtypen $\alpha 2$ ($\alpha 2a$, $\alpha 2b$ und $\alpha 2c$) werden in parenchymalen und nicht-parenchymalen Leberzellen exprimiert (Miksa et al., 2009; Hoffman et al., 1981; Zhou et al., 2001). Aufgrund vasoaktiver Effekte (Vasokonstriktion) von Noradrenalin kann die Beteiligung des adrenergen Systems durch die weitere Einschränkung des Blutflusses beim Fortschreiten einer Leberfibrose eine Rolle spielen. Zusätzlich wurde in humanen hepatischen Sternzellen gezeigt, dass Noradrenalin über TGF β sowohl die Proliferation als auch die Expression von Kollagen 1 anregt (Sigala et al., 2013).

In der Tat wurde für den $\alpha 2$ -AR Antagonisten Idazoxan im CCl₄-Modell eine anti-fibrotische Wirkung gezeigt. Dieser Effekt wurde allerdings der Blockade des Imidazolin Rezeptors zugeschrieben (Xuanfei et al., 2017). Eine mögliche Beteiligung einer $\alpha 2$ -AR-Inhibition an diesen anti-fibrotischen Effekten blieb bisher ungeklärt. Yohimbin, ein weiterer $\alpha 2$ -AR Antagonist, inhibiert die Sekretion des pro-fibrotischen Tumor-Nekrose-Faktors α (TNF α) durch Kupffer-Zellen (Miksa et al., 2009; Zhou et al., 2001). Eine Reihe von Substanzen mit selektiver oder nicht-selektiver Adrenoblockade (Lin et al., 2016; Miksa et al., 2009; Zhou et al., 2001) zeigen im experimentellen Einsatz das Potential, sowohl einer hepatischen Fibrose als auch dem Fortschreiten der Alzheimer-Erkrankung entgegenzuwirken. Interessanterweise finden viele dieser Effekte auf die pathologischen Merkmale des M. Alzheimer unabhängig von der vasoaktiven Funktion und Amyloid β -reduzierenden Wirkung dieser Substanzen statt. Der neu synthetisierte selektive $\alpha 2$ -AR-Inhibitor Mesedin (Vartanyan et al., 2016) verspricht durch seine höhere Selektivität eine genauere Erforschung von $\alpha 2$ -AR und deren Inhibition auf die Leber. Neben Studien, die eine anti-fibrotische Wirkung von Adrenozeptor Antagonisten zeigen, gibt es allerdings auch Studien, die einen entgegengesetzten Effekt beobachten. Die Gabe von Dexmetomidin, eines Sedativums mit $\alpha 2$ -AR-agonistischer Wirkung, führt zur Protektion der Leberzellen bei einer Lipopolysaccharid-induzierten Leberschädigung (Sha et al., 2019). Diese Effekte wurden der anti-apoptischen und anti-oxidativen Wirkung von Dexmetomidin zugeschrieben.

1.6 Das CCl₄-Modell für die Untersuchung einer Schädigung der Leber

Ein sehr häufig angewandtes Modell zur Untersuchung einer Leberschädigung ist das Tetrachlormethan (CCl₄) Modell. CCl₄ ist ein Chlorkohlenwasserstoff und kann auf verschiedene Arten appliziert werden. Für die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurde eine intraperitoneale Gabe gewählt. Bereits 1923 gab es Tierversuche mit dieser chemischen Verbindung (Chopra et al., 1923) und heutzutage ist die Induktion einer Leberfibrose/-zirrhose mit CCl₄ in experimentellen Tiermodellen global etabliert. Für eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist ein Standard Operating Procedure (SOP) (Scholten et al., 2015) verfügbar, das die Behandlungsdauer und Dosis zur Induktion entsprechender Stadien der Leberschädigung vorgibt. In der Leber wird CCl₄ primär durch das Cytochrom P450 2E1 (CYP2E1) Isoenzym in das Trichlormethylradikal umgewandelt. Dieses Radikal reagiert mit Nukleinsäuren, Proteinen und Lipiden und schädigt somit Hepatozyten und deren Stoffwechselvorgänge auf verschiedenen Ebenen (Abb. 3A). Bei der weiteren Verstoffwechslung des Trichlormethylradikals entstehen in der Leber Trichlormethylperoxyradikale, die den Zelltod durch Einwirken auf Membranen, d.h. die Zellmembran und Membranen des Mitochondriums und endoplasmatischen Retikulums, begünstigen (Abb. 3B). Es kommt zum Absterben von Hepatozyten (Abb. 3C), Entzündungsreaktionen und bei wiederholter Gabe zur Ausbildung einer Fibrose und schließlich Zirrhose. Bei langer Exposition mit CCl₄ und dessen Radikalen kann die Bindung an die DNA weiterhin die Entstehung von Mutationen und somit eines Leberzellkarzinoms fördern (Weber et al., 2003; Khan et al. 2012).

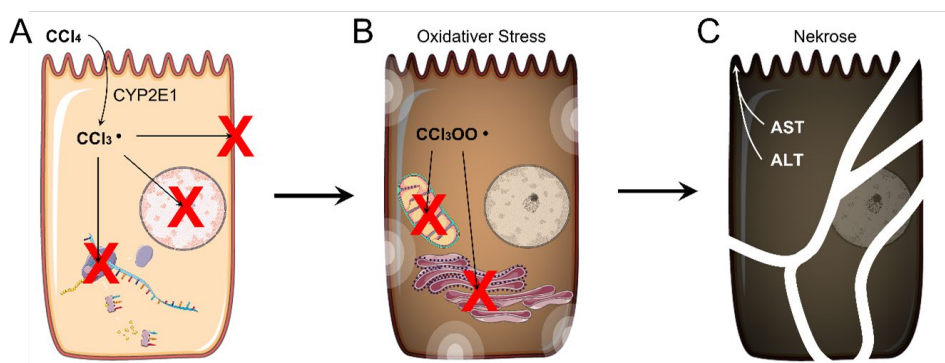


Abbildung 3: Abbau von Tetrachlormethan (CCl₄) in das Trichlormethylradikal (CCl₃-Radikal) und Trichlormethylperoxyradikale. Bildhafte Darstellungen der möglichen Bindung an verschiedene Kompartimente der Zelle und deren Störung mit fortschreitendem oxidativem Stress und Zelltod nach Weber et al., 2003 und Khan et al. 2012 mit Hilfe von Abbildungsvorlagen der Internetseite <https://smart.servier.com/> und eigens kreierten Elementen.

1.7 Die Gallengangligatur und weitere Modelle der Leberschädigung

Ein weiteres sehr häufig angewandtes Modell der Leberschädigung stellt die Gallengangligatur (*engl. bile duct ligation*, BDL) dar. Hierbei wird der Hauptgallengang, je nach experimentellen Ansprüchen und Forschungsfragen, partiell oder vollständig verschlossen. Der darauffolgende Rückstau der Galle führt zu einer Erhöhung der Konzentration von Gallensäuren im Lebergewebe und im Blutserum. In der duktilären Reaktion kommt es zur vermehrten Proliferation von Cholangiozyten, während Hepatozyten absterben (Nekrose und Apoptose) und TGF β entlassen, das, wie zuvor beschrieben, die hepatischen Sternzellen aktiviert und eine profibrotische Kaskade anstößt. Es kommt zusätzlich zur Entzündung, Aktivierung von Kupffer-Zellen und einer Infiltration von pro-inflammatorischen Immunzellen in die Leber (Geerts et al., 2008; Aller et al., 2008; Liedtke et al., 2013).

Es existieren zahlreiche Modelle des Leberschadens, je nach Forschungsgebiet können somit unterschiedliche Arten der Schädigung und die Mechanismen untersucht werden. Zu den Modellen, die hepatotoxische Substanzen verwenden, zählen neben Tetrachlormethan außerdem Thioacetamid, Diethylnitrosamin und Dimethylnitrosamin. Für Modelle der alkoholischen Lebererkrankung wird Ethanol in die Diät integriert. Zur Erforschung der nicht-alkoholischen Lebererkrankung werden transgene Tiere als auch Modelle mit einer spezialisierten Ernährung (wie einer high-fat Diät) verwendet. Weiterhin gibt es zahlreiche transgene Mausmodelle, welche die Erforschung unterschiedlicher Facetten von Lebererkrankungen erlauben (Takahashi et al., 2017).

2. Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Vorgänge einer Fibrose und Zirrhose besser zu verstehen. Dabei sollte ein bisher nur wenig untersuchter Teil des adrenergen Systems, nämlich das der α 2-AR, genauer betrachtet werden. Bisher waren die Expression der verschiedenen Subtypen (α 2a, α 2b, α 2c) in gesunden Lebern und deren mögliche Änderungen in fibrotischen Lebern (BDL und CCl_4 -induziert) nicht genau geklärt. Für Idazoxan, einen α 2-AR- und Imidazolin-Inhibitor, wurden anti-fibrotische Effekte gezeigt, diese wurden aber der Inhibition des Imidazolin Rezeptors zugeschrieben. Mit Hilfe des selektiveren Mesedin sollte der Frage nachgegangen werden, ob eine α 2-AR-Inhibition anti-fibrotische Effekte erzielen kann. Interessanter Weise zeigen mehrere selektive und nicht-selektive Adrenoblocker im experimentellen Einsatz das Potential einer hepatischen Fibrose und einem Fortschreiten des M. Alzheimer entgegenzuwirken. Diese Effekte scheinen dabei nicht auf eine Amyloid β -Reduktion oder vasoaktive Effekte zurückzuführen zu sein. Amyloid β selbst ist für permeabilitätssteigernde Effekte auf die Hirngefäße bekannt. Für eine normale Funktion der Leber ist eine hohe Permeabilität der Lebersinusoide unerlässlich und nimmt bei einer Leberfibrose/-zirrhose dramatisch ab. Aufgrund dessen und der Tatsache, dass die Leber eine wichtige Rolle in der Generation und dem Abbau von Amyloid β Peptiden spielt, sollte weiterhin untersucht werden, ob die Entwicklung einer Fibrose und Zirrhose in menschlichen Lebern mit Änderungen der Amyloid β -Konzentration im Lebergewebe assoziiert ist. Hierzu wurden Leberbiopsien aus Regensburg zur Verfügung gestellt. In verschiedenen Zelllinien und primären Zellen der Leber sollten die grundlegenden Mechanismen der Amyloid β -Generation und des Abbaus betrachtet werden. Mögliche anti-fibrotische und permeabilitätssteigernde Effekte von Amyloid β sollten durch eine Behandlung mit synthetischen Amyloid β Peptiden in verschiedenen Zelltypen der Leber untersucht werden. Aufbauend auf diesen Ergebnissen und Erkenntnissen aus der Alzheimer-Forschung, sollten schließlich Effekte einer Antikörpertherapie gegen Amyloid β auf die Leber untersucht werden. Der Amyloid β -spezifische Antikörper 3D6 dient der Verlangsamung der Amyloid β Plaque-Progression im Gehirn. Da der Antikörper aber Amyloid β Peptide im gesamten Körper angreift, wären negative Effekte auf die Leber zu befürchten. Dies sollte durch eine Immunisierung von Wildtyp- und 5xFAD Mäusen mit 3D6 und anschließende post mortem Analysen der Lebern geklärt werden. Zusätzlich sollten

erstmals die Lebern von APP Knockout Mäusen auf Anzeichen einer Fibrose untersucht werden, da ein vollständiges Defizit von Amyloid β Peptiden ebenfalls einen negativen Einfluss auf die Physiologie der Leber haben könnte. Als möglicher Rescue sollten transgene Tiere mit einer systemisch erhöhten Amyloid β -Konzentration auf eine mögliche erhöhte Resistenz gegen eine Leberschädigung untersucht werden. Um einen ersten Schritt in Richtung einer medikamentösen Prävention einer Leberschädigung zu testen, sollten Mäuse gleichzeitig mit dem Neprilysin-Inhibitor LBQ657 und CCl_4 – einer Leberschädigenden Chemikalie – behandelt werden.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 AR und Mesedin in der Leber

Eine Beteiligung des adrenergen Systems in Prozessen der Steatose, Leberfibrose und -zirrhose ist für die α 1- und β -AR bereits bekannt (Oben et al., 2004; Serna-Salas et al., 2022; Dubuisson et al. 2002; Shi et al., 2021; Zapater et al., 2012). Es ist bisher nicht bekannt, wie sich die Expression von α 2-AR unter fibrotischen Bedingungen und in den wichtigsten Zelltypen, die an der Entwicklung eines Leberschadens beteiligt sind, ändert. Der α 2-AR spezifische Antagonist Mesedin und dessen Effekte auf die verschiedenen Zellen der Leber sollten hier erstmals untersucht werden.

3.1.1 Die Expression α 2 adrenerger Rezeptoren ist in vivo unter fibrotischen Bedingungen erhöht

Zu Beginn sollte die Änderung der Expression von α 2 adrenergen Rezeptor-Subtypen bei Vorliegen einer Leberfibrose charakterisiert werden. Nach 4-wöchiger Behandlung von Mäusen mit Tetrachlormethan konnte eine erhöhte Expression der drei AR-Subtypen α 2a, α 2b und α 2c auf Ebene der mRNA nachgewiesen werden (Publikation 1, Abb. 1A-C). Für Mäuse, deren Leberschädigung durch eine Gallengangligatur herbeigeführt wurde, konnte eine Erhöhung ausschließlich für den α 2b-AR-Subtypen gezeigt werden (Publikation 1, Abb. 1D-F). Das Modell der Gallengangligatur stellt vor allem die Vorgänge, wie sie bei einer Cholestase (Gallenstauung) von statten gehen dar. Dabei wird unabhängig von der Ursache der Stauung (physikalisch in Form eines Gallensteins, Tumors oder aus genetischen Gründen) die Galle in der Leber rückgestaut, was zu einer Erhöhten Konzentration von Gallensäure im Lebergewebe und dem Blutserum führt (Zhang et al., 2012). Das CCl_4 Modell unterscheidet sich von der Gallengangligatur durch unterschiedliche Lokalisation der Initialschädigung (perizentral vs. periportal) und durch eine langsamere Entwicklung der Fibrose und portalen Hypertension (Liedtke et al., 2013; Martínez et al., 2014). Die unterschiedliche Expression der verschiedenen Subtypen der adrenergen Rezeptoren könnte möglicherweise durch verschiedene Ausmaße der portalen Hypertension begründet sein. Die genauen Mechanismen, die zu einer unterschiedlichen Erhöhung der α 2-AR

je nach gewähltem Modell des Leberschadens führen, sollten in zukünftigen Studien charakterisiert werden.

Die Beteiligung von Noradrenalin am Fortschreiten von Lebererkrankungen wird durch Studien unterstützt, die zeigen konnten, dass Noradrenalin in der nichtalkoholischen Fettlebererkrankung (*engl. non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD*) vermehrt ausgeschüttet wird (Wang et al., 2000). Die Expression der $\alpha 1$, $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 3$ -AR hängt in der NAFLD vom Stadium der Schädigung ab. Die frühen Stadien zeichnen sich durch einen Abfall der Expressionslevel aus, während bei Fortschreiten der Fibrose/Zirrhose ein deutlicher Anstieg zu vermerken ist (Sigala et al., 2013). Der $\alpha 2$ -AR ist diesbezüglich bisher nur wenig erforscht.

3.1.2 Die Expression $\alpha 2$ adrenerger Rezeptoren wird durch Mesedin in vitro reduziert

Um die Rolle von $\alpha 2$ -AR in den einzelnen, an der Fibrose-Entwicklung beteiligten, Zelltypen besser zu verstehen, wurde erstmals der $\alpha 2$ -AR-spezifische Inhibitor Mesedin verwendet. Die aus der Maus stammende hepatische Sternzelllinie M1-4HSC zeichnet sich durch einen intermediären Phänotyp der Aktivierung aus (Proell et al., 2005), wobei α SMA als Marker für die myofibroblastische Differenzierung diene. Die Behandlung dieser Zellen mit Mesedin führte zu einer Reduktion der $\alpha 1$ -AR-positiven Zellen in der immunhistochemischen Färbung (Publikation 1, Abb. 2A, B und E). Der $\alpha 2$ -AR wurde durch die Mesedin-Behandlung ebenfalls reduziert, was durch eine verminderte Anzahl $\alpha 2$ -AR-positiver Zellen und eine allgemein schwächere Färbung sichtbar wurde (Publikation 1, Abb. 2 C, D und F). Diese Reduktion durch Mesedin konnte durch Western Blots von $\alpha 2a$ -AR und die densitometrische Auswertung auf der Proteinebene (Publikation 1, Abb. 2G), sowie RT-qPCR Analysen von $\alpha 2a$ -AR und $\alpha 2b$ -AR auf der Ebene der mRNA, bestätigt werden (Publikation 1, Abb. 3A und B). Für $\alpha 2c$ -AR konnte keine Änderung durch eine Mesedin-Behandlung nachgewiesen werden (Publikation 1, Abb. 3C). Für hepatische Sternzellen war bereits bekannt, dass sie $\alpha 1$ -, $\beta 1$ - und $\beta 2$ -AR exprimieren (Garcia-Tsao, 2016). Änderungen in der Expression durch eine Fibrose wurden in vivo bisher ausschließlich für $\alpha 1$ - und β -AR nachgewiesen (Zhu et al., 2000; Trebicka et al., 2009). Studien mit $\alpha 1$ - und $\beta 2$ -Inhibitoren konnten protektive Effekte nachweisen und somit die pro-fibrotische Rolle adrenerger Rezeptoren aufzeigen (Oben et al., 2004).

3.1.3 Mesedin zeigt anti-fibrotische Effekte in hepatischen Sternzellen

Die Behandlung von M1-4HSC mit Mesedin führte sowohl zu einer Reduktion von α SMA-positiven Zellen in der immunhistochemischen Färbung (Publikation 1, Abb. 4B und 5A) als auch der α SMA mRNA (Publikation 1, Abb. 4A) und des α SMA-Proteins (Publikation 1, Abb. 4C). Für einen zweiten wichtigen Fibrosemarker, das TGF β , konnte ebenso eine Reduktion durch die Behandlung mit Mesedin erreicht werden. Dies konnte in der immunhistochemischen Färbung durch eine Reduktion der TGF β -positiven M1-4HSC (Publikation 1, Abb. 5A) und im Western Blot durch eine Reduktion der Proteinexpression (Publikation 1, Abb. 5B) gezeigt werden. Mesedin ist also in der Lage die Aktivierung der hepatischen Sternzellen zu reduzieren und somit deren Beitrag zur Fibrosierung des Lebergewebes entgegenzuwirken. Zuvor wurde die Modulation von TGF β über Noradrenalin vor allem über den α 1-AR in primären Hepatozytenkulturen aus der Ratte gezeigt (Fabregat et al., 2016) bzw. durch α 1-AR-Inhibition eine Reduktion von TGF β erreicht (Briest et al., 2004). Gemeinsam mit der Reduktion der α 1- und α 2-AR zeigen unsere Ergebnisse eine Beteiligung dieser Rezeptoren in der profibrogenen Wirkung von Noradrenalin, welches von HSC produziert und freigesetzt wird (Oben et al., 2004).

PDGF (*engl. platelet derived growth factor*) zeigte keine Änderungen in der Proteinexpression in den HSC (Publikation 1, Abb. 5C). Für α 1-AR wurde gezeigt, dass PDGF diese über eine Phosphorylierung desensibilisieren kann (Del Carmen Medina et al., 2000). Diesen Effekt scheint Mesedin allerdings nicht auszulösen.

3.1.4 Mesedin zeigt Permeabilitätsfördernde und anti-fibrotische Effekte in hLSEC

Um den Einfluss von Mesedin auf einen weiteren an der Fibrose-Entwicklung beteiligten Zelltypen, die sinusoidalen Endothelzellen, zu untersuchen, wurde die Zelllinie hLSEC (humane sinusoidale Endothelzellen) verwendet. Die Behandlung mit Mesedin führte zu einer erhöhten Proteinexpression der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) (Publikation 1, Abb. 6A). Die immunhistochemische Färbung zeigte eine deutliche Erhöhung der eNOS-positiven hLSEC (Publikation 1, Abb. 6B). Gleichzeitig war die Anzahl der α 1 und α 2-AR-positiven hLSEC durch die Behandlung mit Mesedin reduziert (Publikation 1, Abb. 6B). Mesedin scheint in hLSEC, aber auch in HSC, α 2-AR spezifisch zu inhibieren und

zusätzlich die Expression der Rezeptoren selbst zu unterdrücken. In Experimenten mit dem NO-Donator S-Nitrosoglutathion wurde eine Reduktion der α 1-AR auf Lungenmembranen gezeigt (Nozik-Grayck et al., 2006). Unsere Ergebnisse deuten ebenfalls auf eine Verbindung zwischen Expressionsniveaus von eNOS und α 1-AR hin. Möglicherweise besteht eine Verbindung zu den α 2-AR, welche sich zumindest partiell durch eine α 2-AR-Blockade-vermittelte Erhöhung von NO mit daraus resultierender Reduktion von α 1-AR erklären lässt. Dieser mögliche Mechanismus könnte über NOS-Inhibitoren in weiteren Experimenten aufgeklärt werden.

TGF β wird von HSC, als auch LSEC produziert. Die Zelltypen stimulieren sich dabei parakrin (Schon und Weiskirchen, 2014). Bei HSC kommt es bei fortschreitender Aktivierung zu einer zusätzlichen autokrinen Stimulation (Sigala et al., 2013). Die Behandlung von hLSEC mit Mesedin führte zu einer sehr starken Reduktion in der Proteinexpression der Prodomäne, die durch Abspaltung der aktiven Form des TGF β entsteht (Publikation 1, Abb. 6C). Dies ist ein weiteres Indiz für die anti-fibrotische Wirkung einer α 2-AR-Inhibition.

Eine der entscheidenden Entwicklungen in der Fibrose/Zirrhose der Leber stellt die Reduktion der endothelialen Permeabilität in den Lebersinusoiden dar. Bei einer eingeschränkten Funktionsfähigkeit des Endothels kommt es zu einer geringeren Verfügbarkeit von NO in der zirrhotischen Leber. Behandlungen von HSC aus Ratte und Mensch mit NO-spendenden Nanopartikeln führten unter anderem zu einer Reduktion der Kollagen 1 und α SMA Expression. Eine Wiederherstellung der NO-Versorgung über die Stimulation von eNOS durch Mesedin in hLSEC könnte somit als therapeutischer Ansatz zur Verbesserung der Permeabilitätsfunktion der Lebersinusoiden dienen. Eine α 2-AR induzierte Reduktion der NO-Synthese über iNOS durch Endothelzellen der Niere wurde mit Hilfe des α 2-AR-Agonisten Dexmedetomidin erreicht (Chen et al., 2019). Allerdings gibt es Studien, die über einen genau umgekehrten Effekt, nämlich eine Erhöhung von NO durch α 2-AR-Agonisten, berichten (Vanhoutte, 2001). Möglicherweise sind in den Interaktionen der α - und β -AR mit eNOS andere Mechanismen wirksam als mit iNOS.

In Zellen des zentralen Nervensystems führt eine α 2-AR-Inhibition durch Mesedin unter hypoxischen Bedingungen Interleukin-10-vermittelt (IL-10) zu einem besseren Überleben von Astroglia, Neuronen und neuronalen Vorläuferzellen (Melkonyan et al., 2017). Ein ähnlicher Mechanismus von Mesedin über IL-10 in der Leber wäre gut

vorstellbar, da IL-10 Hepatozyten vor Schädigungen schützt und in aktivierten HSC eine Rückkehr in die Seneszenz fördern kann (Abd-Elgawad, 2016; Huang et al., 2020). Bei chronischen Lebererkrankungen kommt es häufig zu einer Hypoxie, bei der die Leberzellen auf eine Sauerstoffunterversorgung mit der Induktion von Hypoxie-Reaktionsgenen über den Hypoxie-induzierbaren Faktor 1 α (HIF1 α) reagieren (Mesarwi et al., 2016). Im zentralen Nervensystem konnte für Mesedin eine anti-hypoxische Wirkung nachgewiesen werden (Tananyan und Balasanyan, 2014; Melkonyan et al., 2017; Tananyan et al., 2019). Zukünftige Experimente mit verschiedenen Zelltypen der Leber unter Hypoxie könnten Aufschluss über die weiteren Mechanismen von hepatischen α 2-AR und deren Nutzen bei der Behandlung chronischer Lebererkrankungen ergeben.

3.2 Verlust von Amyloid β in zirrhotischen Lebern und anti-fibrotische Effekte von Amyloid β in vitro

Die Leber produziert Amyloid β Peptide und baut diese ab (Ghiso et al., 2004). Bei einer Alzheimer-Erkrankung führt Amyloid β zu einer erhöhten Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke, was in Zusammenhang mit stark erhöhten eNOS Werten steht (Lüth et al., 2001). Wie Produktion und Abbau von Amyloid β unter fibrotischen bzw. zirrhotischen Bedingungen beeinflusst werden und dies wiederum mit eNOS korreliert und die Permeabilität der Leber beeinflusst, sollte in dieser Veröffentlichung untersucht werden.

3.2.1 Das Amyloid-Vorläuferprotein, sowie Amyloid β -generierende und -abbauende Proteine sind in humanen zirrhotischen Lebern reduziert

Proben aus humanen Lebern, die über ein Scoring als normal (hNL), fibrotisch (hFL) und zirrhotisch (hZL) eingeordnet wurden, wurden auf das Expressionsniveau des Amyloid-Vorläuferproteins analysiert. In fibrotischen und zirrhotischen Lebern war im Vergleich zu normalen Lebern, die als Kontrollgruppe dienten, die APP mRNA deutlich reduziert (Publikation 2, Abb. 1A). Für Präsenilin 1, das am Schneideprozess zur Bildung der Amyloid β Peptide beteiligt ist, konnte auf Ebene der mRNA eine Reduktion in fibrotischen und zirrhotischen Lebern gezeigt werden (Publikation 2, Abb. 1B). Auf der Proteinebene wurde eine Reduktion von Präsenilin 1 in zirrhotischen Lebern im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich (Publikation 2, Abb. 1D). BACE1, das ebenfalls am Schneiden von APP beteiligt ist, war in zirrhotischen Lebern sowohl auf Ebene der mRNA, als auch auf Proteinebene, stark reduziert (Publikation 2, Abb. 1C und E). Für fibrotische Lebern konnte kein signifikanter Unterschied auf der mRNA- und der Proteinebene festgestellt werden. Neprilysin, das am Abbau der Amyloid β Peptide beteiligt ist, war ähnlich wie BACE1 auf der mRNA- und Proteinebene in zirrhotischen Lebern reduziert (Publikation 2, Abb. 1F und G). Auch hier war in fibrotischen Lebern im Vergleich zu normalen Lebern kein Unterschied feststellbar (Publikation 2, Abb. 1F). MBP, ein weiteres am Abbau von Amyloid β Peptiden beteiligtes Protein (Liao et al., 2009), zeigte in zirrhotischen Lebern auf der Proteinebene ebenfalls eine Reduktion (Publikation 2, Abb. 1H). Diese Reduktion von MBP könnte zum Auftreten nicht-myelinisierter Nervenbündel und einer allgemein verminderten hepatischen Innervation bei einer Leberzirrhose beitragen (Nam et al.,

2007). Im nächsten Schritt wurde die Menge der wichtigsten Amyloid β -Peptide in den Lebern betrachtet. Amyloid β mit einer Länge von 40 Aminosäuren war in den normalen Lebern fünf-mal höher als in den zirrhotischen Lebern (Publikation 2, Abb. 2A). Die Menge an Amyloid β 42 war in der Kontrollgruppe 10-mal höher als in der Zirrhosegruppe und Amyloid β 38 war in den Kontrolllebern sogar 160-mal höher im Vergleich zu den zirrhotischen Lebern (Publikation 2, Abb. 2A).

Damit konnte erstmals gezeigt werden, dass bei einer Zirrhose die wichtigsten an der Bildung von Amyloid β beteiligten Proteine, aber auch Amyloid β -abbauende Proteine stark reduziert werden. Dies wirkt sich direkt auf die im Gewebe enthaltene Menge verschiedener Amyloid β Peptide aus. Gleichzeitig sind die Amyloid β -abbauenden Proteine Neprilysin und MBP deutlich reduziert, was die Fähigkeit der Leber, Amyloid β Peptide aus dem Blutplasma zu filtern einschränkt und so die erhöhten Konzentrationen von systemischem Amyloid β , wie sie in zirrhotischen PatientInnen zu beobachten sind, erklärt (Wang et al., 2017).

3.2.2 eNOS ist in humanen zirrhotischen Lebern reduziert

Die endotheliale NO-Synthase spielt in der Physiologie der Leber eine wichtige Rolle und unterstützt eine hohe Permeabilität. In zirrhotischen Lebern kam es im Vergleich zu normalen Lebern zu einem deutlichen Abfall von eNOS auf der Proteinebene (Publikation 2, Abb. 3A). Für die neuronale NOS konnte keine signifikante Änderung gezeigt werden (Publikation 2, Abb. 3D). Zwischen Amyloid β und NO konnte in neurochemischen Studien eine funktionelle Verbindung festgestellt werden, die eine koordinierte Wirkung zur Erhöhung der Permeabilität erwarten lässt (Hartz et al., 2012; Thiel und Kenneth, 2001; Cho et al., 2009; Chiarini et al., 2005). Unsere Ergebnisse bestätigen die Existenz dieser Verbindung in der Leber. NO wiederum reguliert die Expression der Amyloid β -schneidenden Enzyme BACE1 und Präsenilin in einer positiven Feedback-Schleife (Nagai et al., 2017).

3.2.3 Das Amyloid-Vorläuferprotein, sowie Amyloid β -generierende und -abbauende Proteine sind in gallengangligierten Lebern von Mäusen und Ratten reduziert

Für die folgenden Versuche wurden Maus- und Rattenmodelle der Gallengangligatur betrachtet. Als Kontrollgruppe dienten scheinoperierte Tiere. Zur Bestätigung des Leberschadens in gallengangligierten Ratten wurde die Expression des Fibrosemarkers α SMA auf Ebene der mRNA untersucht. In gallengangligierten Lebern war eine höhere Expression von α SMA zu verzeichnen als in den scheinoperierten Tieren (Publikation 2, Abb. 4A). Gleichzeitig war die Expression von GFAP auf der mRNA Ebene reduziert (Publikation 2, Abb. 4A). GFAP ist ein Marker für Seneszenz in hepatischen Sternzellen und eines der Haupt-Intermediär-Filamente. Bei der Aktivierung und Transdifferenzierung in einen myofibroblastischen Phänotyp wird GFAP durch α SMA ersetzt, wodurch sich die beiden Marker umgekehrt proportional zueinander verhalten (Böttger et al., 2013). Bei scheinoperierten Ratten konnte in der immunhistochemischen Färbung eine moderate und gleichmäßige GFAP Expression im Lebergewebe festgestellt werden (Publikation 2, Abb. 4D links oben). α SMA wurde vor allem perivaskulär nachgewiesen (Publikation 2, Abb. 4D Mitte oben). Als weiterer Marker für hepatische Sternzellen wurde Desmin verwendet (Publikation 2, Abb. 4D rechts), welches unabhängig von einer HSC Aktivierung exprimiert wird (Takase et al., 1988). In Gallengangligierten Lebern zeigte sich eine relativ schwache Cluster-artige Anordnung GFAP-positiver Zellen (Publikation 2, Abb. 4D links unten). α SMA war in großen Clustern aktivierter HSC angeordnet (Publikation 2, Abb. 4D Mitte unten). Die nachgewiesene Cluster-artige Anordnung von Desmin-positiven Zellen (Publikation 2, Abb. 4D rechts unten) ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die aktivierten hepatischen Sternzellen in die geschädigten Bereiche einwandern und dort dementsprechend gehäuft auftreten.

In gallengangligierten Ratten kam es zu einem deutlichen Anstieg des Amyloid-Vorläuferproteins im Vergleich zur Kontrolle (Publikation 2, Abb. 4E). In den humanen zirrhotischen Lebern verhielt sich dies auf Ebene der mRNA genau entgegengesetzt (Publikation 2, Abb. 1A). Präsenilin 1 war ähnlich wie bei humanen zirrhotischen Leberproben bei Gallengangligatur-induzierter Fibrose reduziert (Publikation 2, Abb. 4F). Die größere Menge an APP könnte in der Reduktion der APP-schneidenden Proteine begründet sein. Neprilysin war in gallengangligierten Ratten und Mäusen auf der Proteinebene erhöht (Publikation 2, Abb. 4B und C). In der immunhistochemischen

Färbung von gallengangligierten Rattenlebern wurde eine Cluster-artige Expression im Gegensatz zur gleichmäßigen Neprilysin-Expression in Kontrolltieren festgestellt (Publikation 2, Abb. 4D). Dabei wurde Neprilysin vor allem in GFAP-negativen Bereichen bzw. in Bereichen mit α SMA-positiven hepatischen Sternzellen detektiert. Die Menge von Amyloid β 42 war in Kontrolltieren mehrfach höher als in den gallengangligierten Ratten und Mäusen (Publikation 2, Abb. 2B).

Diese Ergebnisse spiegeln größtenteils die Erkenntnisse aus der menschlichen Leber wider und zeigen, dass die Synthese und der Abbau von Amyloid β auch in Ratten und Mäusen bei einer Leberschädigung durch Gallengangligatur negativ beeinträchtigt werden. Aus APP wird, auch wenn dieses vermehrt vorhanden ist, durch geringere Expression von BACE1 und Präsenilin weniger Amyloid β Peptid hergestellt. Ob ein vermehrter Abbau der Amyloid β Peptide durch Neprilysin die Amyloid β -Konzentration in physiologisch relevanten Mengen weiter verringern kann, ist nicht bekannt. Die letztendliche Reduktion von Amyloid β 42 in gallengangligierten Tieren ist, unabhängig vom genauen Zusammenspiel der generierenden und abbauenden Proteine, gegeben. Dies könnte in gallengangligierten Ratten und Mäusen das Fortschreiten der Fibrose weiter fördern.

3.2.4 eNOS ist in gallengangligierten Lebern von Mäusen und Ratten reduziert

In gallengangligierten Lebern von Ratten war eine deutliche Reduktion von eNOS auf der Proteinebene zu beobachten. Auch hier war, wie in humanen Lebern, keine Änderung von nNOS nachweisbar (Publikation 2, Abb. 3B und C). Die Verbindung zwischen Amyloid β und NO wird somit wie unter 3.2.2. diskutiert nochmals bestätigt.

3.2.5 Parallelen zwischen Astrozyten und hepatischen Sternzellen und deren Fähigkeit zur Degradation von Amyloid β

Zwischen aktivierten hepatischen Sternzellen und Astrozyten lassen sich bestimmte Parallelen feststellen. Beide Zelltypen sind an der Regulation an einer Blut-Gewebe-Schranke beteiligt und spielen eine wichtige Rolle in der Homöostase und der Reaktion auf Schädigungen ihres jeweiligen Gewebes (Buniatian et al., 1999; Buniatian et al., 2001). Aktivierte hepatische Sternzellen könnten also auch, ähnlich wie Astrozyten im Gehirn, am Abbau von Amyloid β Peptiden beteiligt sein. Für Astrozyten wurde gezeigt,

dass dieser Abbau zu einem großen Anteil über die Zink-abhängige Endopeptidase Neprilysin funktioniert (Shirotani et al., 2001). Um aufzuklären, ob in hepatischen Sternzellen ebenfalls Neprilysin für den Abbau von Amyloid β verantwortlich ist, wurden Astroglia Primärkulturen mit HSC-Zelllinien aus Mäusen (M1-4HSC), Ratten (HSC-T6) und Menschen (LX-2) verglichen. Interessanter Weise zeigte sich in HSC Zelllinien aus Maus und Ratte eine höhere Proteinexpression für Neprilysin als in den Astrozyten-Kulturen (Publikation 2, Abb. 5A und B). In den M1-4HSC wurde die Aktivierung anhand der α SMA-Expression bestätigt, wogegen die Astrozyten, wie erwartet kein α SMA exprimierten (Publikation 2, Abb. 5B).

Um den Abbau von Amyloid β direkt zu messen, wurde das Kulturmedium mit 1.000pg/ml exogenem Amyloid β versetzt. Dabei kommt es immer zu leichten Verlusten von Amyloid β , da dieses sich wahrscheinlich an Plastik anlagert. Um eine bessere Vergleichbarkeit zu erreichen, wurde stets eine Kontrolle ohne Zellen mitgeführt, die den Verlust des Amyloid β an das verwendete Material darstellt und als 100% Wert genutzt wurde, weil der hier gemessene Wert die Menge des tatsächlich für die Zellen verfügbaren Amyloid β widerspiegelt. Die exogene Gabe von Amyloid β 42 zeigte, dass in Zellkulturüberständen von Astrozyten die Menge der Amyloid β Peptide um ca. 25% vermindert wurde (Publikation 2, Abb. 5C). In den Überständen von M1-4HSC und HSC-T6 konnten weniger als 50% des ursprünglich applizierten Amyloid β nachgewiesen werden (Publikation 2, Abb. 5C). Für LX-2 konnte gezeigt werden, dass mit steigender Zellzahl die nachweisbare Menge an exogenem Amyloid β progressive vermindert war (Publikation 2, Abb. 5D). Um zu beweisen, dass das in das Medium zugegebene Amyloid β dem enzymatischen Abbau durch Neprilysin unterliegt, wurden Versuche mit Zelllysaten von M1-4HSC durchgeführt. Dabei wurde EGTA verwendet, da dieses dem Zink-abhängigen Neprilysin den Kofaktor entzieht (Dineley et al., 2005) und somit dessen Funktion einschränkt. Nach 30 und 60 Minuten wurde die Menge an Amyloid β bestimmt. Auch hier wurde die Amyloid β Menge ohne Zellen und ohne EGTA als 100% definiert. 30 Minuten nach Zugabe der Zelllysate war das Amyloid β 42 auf 50% reduziert, nach 60 Minuten auf 25%. Durch Zugabe von EGTA konnte diese Reduktion von Amyloid β 42 deutlich verlangsamt werden (Publikation 2, Abb. 6A). Für Amyloid β 40 ergaben sich dieselben Ergebnisse (Publikation 2, Abb. 6B). Der Abbau von Amyloid β findet also hauptsächlich über eine Zink-anhängige Endopeptidase statt. Diese Ergebnisse wurden in einem weiteren Experiment durch den Einsatz von einem Neprilysin-spezifischen Inhibitor, LBQ657,

überprüft (Schiering et al., 2016). Primären hepatischen Sternzellen aus der Maus wurde mit dem Medium das exogene Amyloid β 40 zugeführt. Als 100% Wert wurde auch hier eine Kontrolle ohne Zellen definiert. Amyloid β 40 wurde von den primären HSC abgebaut, sodass nur noch weniger als 25% der ursprünglich hinzugegebenen Menge nachweisbar waren. Durch die Zugabe von LBQ657 wurde dieser Abbau von Amyloid β 40 reduziert, sodass 75% der ursprünglich hinzugegebenen Menge nachweisbar blieb. Auch für Amyloid β 42 konnte durch LBQ657 der Abbau auf ursprünglich unter 25% auf nur noch 75% der ursprünglich hinzugegebenen Menge Amyloid β 42 erreicht werden (Publikation 2, Abb. 6C und D). Damit konnten wir nachweisen, dass Neprilysin in HSC das für die Amyloid β -Degradation hauptverantwortliche Enzym ist.

3.2.6 Amyloid β zeigt anti-fibrotische Effekte auf HSC und hLSEC

Um zu untersuchen, ob Amyloid β möglicherweise die Aktivierung von hepatischen Sternzellen reduzieren bzw. rückgängig machen kann, wurde zuerst der Aktivierungsmarker α SMA in M1-4HSC untersucht. Auf mRNA Ebene konnte durch eine 48-stündige Behandlung mit 1.000pg/ml Amyloid β 42 die Expression von α SMA deutlich reduziert werden. Dieser Effekt war durch die zusätzliche Gabe des Neprilysin-Inhibitors LBQ657 zwar abgeschwächt, aber dennoch vorhanden (Publikation 2, Abb. 6E). Eine Behandlung von M1-4HSC mit Amyloid β 40 und 42, führte in beiden Fällen zu einer deutlich verringerten Kollagen 1 Sekretion in das Kulturmedium (Publikation 2, Abb. 6F). In murinen primären hepatischen Sternzellen, konnte nur mit einer Kombination aus Amyloid β 42 mit LBQ657 eine reduzierte TGF β -Sekretion erreicht werden. Die jeweils einzelne Behandlung mit Amyloid β 42 oder LBQ657, zeigte keine Effekte auf die TGF β Sekretion in das Kulturmedium (Publikation 2, Abb. 6G). Für LBQ657 allein waren keine Änderungen zu erwarten. Das Amyloid β keinen Effekt hatte, könnte im zu schnellen Abbau des Peptids durch die Zellen begründet sein. Möglicherweise steht erst durch die Inhibition des Neprilysins durch LBQ657 das Amyloid β ausreichend lang zur Verfügung, um eine Wirkung erzielen zu können.

Um mögliche Effekte von exogenem Amyloid β auf sinusoidale Endothelzellen zu untersuchen, wurde die Zelllinie hLSEC genutzt. Die immunhistochemische Färbung auf TGF β und die Auszählung der TGF β -positiven Zellen konnte zeigen, dass durch

eine Behandlung der Zellen mit exogenem Amyloid β 42 die Anzahl TGF β -positiver Zellen deutlich reduziert wurde (Publikation 2, Abb. 6H). Parallel wurde mit eNOS als Permeabilitätsmarker gegengefärbt und ebenfalls die Anzahl der eNOS-positiven Zellen gezählt. Die Anzahl der eNOS-positiven Zellen verhielt sich umgekehrt proportional zur Anzahl TGF β -positiver Zellen und stieg durch die Behandlung mit Amyloid β 42 im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle deutlich an (Publikation 2, Abb. 6H).

Anhand dieser Daten lässt sich eine Beteiligung von Amyloid β in mehreren Signalkaskaden zwischen Hepatozyten, hepatischen Sternzellen und sinusoidalen Endothelzellen ableiten. Unter physiologischen Umständen wäre folgendes Zusammenspiel anzunehmen: Gesunde Hepatozyten generieren große Mengen an Amyloid β Peptiden durch die BACE- und Präsenilin-prozessierte amyloidogene Proteolyse von APP. Amyloid β wird in den Extrazellularraum entlassen und wirkt sich dort positiv auf die Permeabilität aus. Bei einer Zirrhose werden APP und BACE1/Präsenilin weniger stark exprimiert, was durch NO als Reaktion auf eine deutliche Verringerung der Amyloid β -Konzentration in einer Feedback-Schleife zusätzlich verstärkt wird. Weiterhin ist unter zirrhotischen Bedingungen die Synthese von MBP reduziert, was zweierlei Wirkungen hat. Zum einen kann MBP über NO die Permeabilität positiv beeinflussen (Chiarini et al., 2005), was bei einer verringerten Synthese deutlich eingeschränkt wird, und zum anderen führt eine Abwesenheit von MBP zur Schädigung hepatischer Nervenfasern (Nam et al., 2007).

Amyloid β hat also anti-fibrotische Effekte auf hepatische Sternzellen, indem es die Aktivierung von HSC reduziert und den Rückgang in den ruhenden Phänotypen fördert. Dies wird vor allem über eine Unterdrückung der α SMA, TGF β und Kollagen 1 Expression erreicht. In sinusoidalen Endothelzellen wird durch Amyloid β die Produktion von eNOS gefördert. eNOS fördert über die Produktion von NO die Perfusion der Leber, da es als Vasodilatans wirkt (Mittal et al., 1994). Dieser Wirkmechanismus von Amyloid β auf hLSEC über eNOS und NO mit einer gleichzeitigen Reduktion der TGF β -Expression kann so indirekt in aktivierten HSC förderlich für deren Rückkehr zur Seneszenz sein.

3.2.7 Amyloid β 42 ist in den Lebern von 5xFAD-Mäusen hochreguliert

Bei 5xFAD Mäusen handelt es sich um ein Mausmodell der Alzheimer-Erkrankung, das Mutationen besitzt, die mit dem früh einsetzenden familiären Alzheimer in Verbindung stehen. Unter anderem neigen diese Tiere zu einer Überproduktion von Amyloid β Peptiden (Ou-Yang und Van Nostrand, 2013; Cho et al., 2016), wodurch es zur Plaquebildung kommt. Da es sich um Modelle der Alzheimer-Krankheit handelt, wurde der Schwerpunkt der Untersuchungen natürlich stets auf das zentrale Nervensystem gelegt. Zu Beginn sollte die Menge an Amyloid β 40 und 42 im Lebergewebe bestimmt werden. Dabei zeigte sich, dass für Amyloid β 40 in 5xFAD Lebern im Vergleich zu Wildtyp-Lebern kein Unterschied vorliegt (Publikation 2, Abb. 7B links). Amyloid β 42 hingegen ist in den Lebern von 5xFAD Mäusen in einer deutlich höheren Konzentration nachweisbar als in Wildtyp-Lebern (Publikation 2, Abb. 7B rechts). In der immunhistochemischen Färbung konnte dies ebenfalls bestätigt werden (Publikation 2, Abb. 7A oben links und rechts).

3.2.8 Systemisch erhöhte Amyloid β Level zeigen positive Wirkungen auf Fibrosemarker und Permeabilitätsmarker in AD-Mausmodellen

Mit Hilfe der AD-Mausmodelle 5xFAD und 3xTg-AD konnte untersucht werden, ob höhere Amyloid β Konzentrationen positive Auswirkungen auf die Leberphysiologie zeigen könnten. Eine immunhistochemische Färbung auf α SMA und Kollagen 1 konnte zeigen, dass in 5xFAD Lebern sichtbar weniger Kollagen 1 nachweisbar war als in den wildtypischen Kontrollen. Auch α SMA zeigte in 5xFAD Tieren eine deutlich schwächere Färbung (Publikation 2, Abb. 7A unten links und rechts), was auf eine Verminderung in der Zahl der aktivierten hepatischen Sternzellen hinweist. Western Blot Analysen auf eNOS in 3xTg-AD und 5xFAD Lebern zeigten, dass in den AD-Modellen eNOS auf der Proteinebene deutlich stärker exprimiert ist als in den jeweiligen Kontrollen. Diese Erhöhung des Proteinlevels betrug bei 5xFAD Tieren das 1,6-fache und bei 3xTg-AD Mäusen sogar das 2,2-fache (Publikation 2, Abb. 7 C).

3.2.9 Amyloid β in Gehirnen von 3xTg-AD Mäusen

In den Gehirnen von 3xTg-AD Mäusen konnte eine erhöhte Konzentration von Amyloid β 40 und 42 im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen bestätigt werden (Publikation 2, Abb. 8A). Gleichzeitig zeigte sich in der immunhistochemischen Färbung im Cortex und Hippocampus von 3xTg-AD Mäusen eine stärkere eNOS Expression als in den Wildtyp-Kontrollen (Publikation 2, Abb. 8B).

Amyloid β könnte also in Gehirn und Leber entgegengesetzte Effekte haben. Eine Reduktion der Amyloid β -Akkumulation als Alzheimer-Therapie könnte aufgrund der in der hier vorliegenden Arbeit nachgewiesenen anti-fibrotischen Wirkung von Amyloid β in der Leber negative Folgen nach sich ziehen. Insbesondere der Einsatz von Antikörpern gegen Amyloid β und BACE1-/ γ -Sekretase-Inhibitoren, die systemisch Änderungen im Amyloid β -Haushalt verursachen können, wäre unter diesen Umständen mit Vorsicht zu betrachten. Ein zielgerichteter Ansatz, der Gehirnspezifische Formen von Amyloid β angreift, ist dabei eine Möglichkeit diese Problematik zu umgehen (DeMattos et al., 2012).

3.3 Auswirkungen eines Amyloid β -Defizits auf die Leberfunktion

Es existieren verschiedene Ansätze in der Alzheimer-Forschung, die auf eine Reduktion von Amyloid β abzielen, um einer Plaquebildung vorzubeugen bzw. diese rückgängig zu machen. Dabei gibt es verschiedene Angriffspunkte, wie die direkte Reduktion von Amyloid β Peptiden oder dem Amyloid β Vorläuferprotein (APP), oder das APP-schneidende Enzym β -Sekretase (BACE1) (Aisen et al., 2020). Antikörper gegen verschiedene Amyloid β Oligomere und Fibrillen sind vielversprechende Therapieoptionen (Söderberg et al., 2022), wobei Aducanumab als erster Antikörper von der FDA zur Behandlung der Alzheimer Krankheit zugelassen wurde (Decourt et al., 2021). Der 3D6-Antikörper bindet am N-Terminus von Amyloid β (Lee et al., 2005) und ist in der Lage dessen lösliche und unlösliche oligomerisierte Form zu binden (Schroeter et al., 2008; Bard et al., 2000). Die humanisierte Form dieses Maus-Antikörpers wurde unter dem Namen Bapineuzumab bis zur Phase 3 klinisch getestet und schließlich eingestellt (Ivanioiu et al., 2016).

Eine Betrachtung der Vorgänge in der Leber bei einer Reduktion von Amyloid β Peptiden durch Antikörper ist nach unseren vorherigen Ergebnissen unbedingt notwendig, um eine Schädigung der Leber bei der Alzheimer-Therapie bzw. - Vorbeugung auszuschließen. Um zu erforschen, was bei vollständiger Abwesenheit von Amyloid β Peptiden in einem Organismus geschieht und welche Mechanismen dabei zum Tragen kommen, können Knockout-Modelle wie APP-KO -Mäuse genutzt werden.

3.3.1 Einfluss von Amyloid β auf die Physiologie verschiedener Leberzelltypen

Die verschiedenen Zellen der Leber befinden sich in einem ständigen engen Austausch über unterschiedliche Signalwege. Insbesondere zwischen hepatischen sinusoidalen Endothelzellen und hepatischen Sternzellen konnten intensive parakrine Wechselwirkungen nachgewiesen werden (Publikation 2). Eine Behandlung mit Amyloid β Peptiden der einzelnen Zelltypen könnte zeigen, wie diese für sich auf die Behandlung reagieren und dabei die jeweils anderen Zellen ebenfalls beeinflussen können.

3.3.1.1 Die hLSEC Zelllinie und primäre LSEC

Die Aufnahme und der Abbau von Amyloid β durch hepatische Sternzellen ist bereits bekannt (Buniatian et al., 2020/Publikation 2). hLSEC reagierten auf eine Behandlung mit Amyloid β 42 mit einer Erhöhung der eNOS Expression (Publikation 2). Um zu überprüfen, ob eine Aufnahme bzw. ein Abbau von Amyloid β durch hLSEC stattfinden kann, wurde das Medium mit 1.000pg/ml synthetischem Amyloid β 42 versetzt. Für die bessere Vergleichbarkeit wurde auch hier, wie in den Versuchen mit HSC (siehe Publikation 2), eine Kontrolle ohne Zellen mitgeführt und als 100%-Wert des für die Zellen verfügbaren Amyloid β 42 festgelegt. Um auszuschließen, dass die Zellen selbst Amyloid β Peptide in das Medium sezernieren, wurde eine Kontrolle mit hLSEC, aber ohne Zugabe von synthetischem Amyloid β , mitgeführt. Nach 48-stündiger Behandlung wurde das im Medium verbliebene Amyloid β bestimmt. Ohne Zugabe von exogenem Amyloid β konnte kein Amyloid β 42 nachgewiesen werden. Bei Zugabe von Amyloid β wurden über 50% des Peptids durch hLSEC aus dem Medium entfernt (Manuskript, Abb. 1A). Diese Aufnahme von Amyloid β resultierte in einer erhöhten Permeabilität, welche anhand einer erhöhten Aufnahme von 150kDa FITC-markiertem Dextran gezeigt werden konnte (Manuskript, Abb. 1B und C). Diese erhöhte Permeabilität spiegelte sich auch in einer verminderten Kollagen I (Manuskript, Suppl. Abb. 1B), Kollagen IV (Manuskript, Abb. 1E) und Laminin I (Manuskript, Abb. 1D) Expression wieder. Laminin und Kollagen IV sind Teil der Basalmembran und können die Blut-Gewebe-Barriere bei einer Leberfibrose verstärken (Marcato et al., 1998). Im Gehirn kann Amyloid β durch die Bildung von Poren in Kapillaren des Gehirns zu einer erhöhten Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke führen (Di Scala et al., 2016). Analog besitzen hLSEC Fenestrierungen, welche während einer Zirrhose und unter Kulturbedingungen, verloren gehen. Gleichzeitig verlieren die hLSEC ihre Fähigkeit zur Produktion von NO und beginnen den Marker für kontinuierliches Endothel CD31 zu exprimieren (DeLeve et al., 2008). In primären hLSEC konnte durch eine Behandlung mit Amyloid β eine vermehrte Produktion von NO ausgelöst werden (Manuskript, Abb. 1F). Amyloid β 40 und 42 führten in der hLSEC Zelllinie zu einer geringeren proteolytischen Aktivierung von TGF β , das heißt das Monomer (~13kDa) und das aktive 25kDa Fragment waren reduziert (Manuskript, Abb.1G). Der Effekt von Amyloid β 42 war hierbei deutlicher als der von Amyloid β 40. Das Amyloid β 40 ist nur 2 Aminosäuren kürzer als das Amyloid β 42 und zeichnet sich durch eine leicht verminderte Hydrophobizität aus (Côté et al., 2012). Auf Ebene der mRNA konnte

ebenfalls eine Reduktion der TGF β Expression festgestellt werden (Manuskript, Suppl. Abb. 1B).

Notch ist als pro-fibrotischer Faktor und starker Aktivator von Myofibroblasten und der epithelial-mesenchymalen Transition im Kontext von Fibrosen bekannt (Zhu et al., 2018; Condorelli et al., 2021). Die Aktivierung von Notch-Rezeptoren erfolgt durch eine zweistufige Spaltung (S2 und S3). Die S2-Spaltung erfolgt unter Beteiligung von ADAM17/ADAM10 (Bozkulak and Weinmaster 2009), die S3-Spaltung durch Präsenilin, welches ebenfalls für die Proteolyse von APP zu Amyloid β -Peptiden unverzichtbar ist. Durch die S3-Spaltung entsteht die intrazelluläre Domäne des Notch (*engl. notch intracellular domain*, NICD), die in den Zellkern wandert und dort Notch-Zielgene wie Hes1 aktiviert (Jarriault et al., 1995). Da mit einem Verlust des Amyloid β möglicherweise auch eine Verschiebung der proteolytischen Aktivität des Präsenilins in Richtung der Proteolyse von Notch statt APP stattfindet, wurde die Expression von Notch1 und Hes1 in Zellen der hLSEC Zelllinie untersucht. Eine zusätzliche Aktivierung von Präsenilin während einer Steatose, Leberentzündung und -fibrose ist bereits bekannt (Fang et al., 2022). Für Notch1 konnte eine Reduktion durch die Behandlung mit Amyloid β auf dem Proteinlevel erreicht werden (Manuskript, Abb. 1I). Hes1 war auf Ebene der mRNA reduziert (Manuskript, Abb. 1J).

3.3.1.2 Primäre HSC

Aktivierte HSC sind als die Treiber von fibrotischen Veränderungen in der Leber identifiziert worden. Auch in ihrer „Ruheform“ führen sie wichtige Funktionen aus und tragen zur Physiologie einer gesunden Leber bei. Primäre hepatische Sternzellen reagierten auf eine Behandlung mit Amyloid β mit einer deutlich erhöhten VEGF-A Produktion (Manuskript, Abb. 1F). Gleichzeitig konnte durch die Behandlung mit Amyloid β eine Reduktion von α SMA, einem Marker der HSC-Aktivierung, erreicht werden (Manuskript, Abb. 1H).

3.3.1.3 Die HepG2 Zelllinie und primäre Hepatozyten

Hepatozyten stellen die größte Zellpopulation der Leber dar. Es ist davon auszugehen, dass auch diese Zellen auf einen ausgeglichenen Amyloid β Gehalt des Gewebes

angewiesen sind und mit diesem interagieren können. Um dies zu überprüfen wurden Zellen der HepG2 Zelllinie mit Amyloid β behandelt und ähnlich wie für hLSEC eine deutliche Aufnahme des Peptids aus dem Medium gezeigt (Manuskript, Suppl. Abb. 1A). Amyloid β führte in HepG2 zu einer reduzierten Expression von TGF β , Notch1 und AFP (Manuskript, Suppl. Abb. 1b). Hepatozyten verfügen in vivo über die Fähigkeit zur Replikation und Regeneration. Diese Fähigkeit ist in vitro deutlich eingeschränkt. Mit Hilfe von Amyloid β konnte eine fünffache Erhöhung für das Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen (PCNA) in primären Hepatozyten aus der Maus erreicht werden (Manuskript, Abb. 1K und L). Amyloid β trägt also zum Erhalt und zur Erneuerung des funktionalen Lebergewebes bei, welches bei chronischen Lebererkrankungen sukzessive verloren geht (Luedde et al., 2014).

Die Ergebnisse aus den verschiedenen Zelltypen deuten auf eine wichtige Rolle von Amyloid β in der parakrinen Kommunikation zwischen LSEC und HSC zum Erhalt funktioneller Lebersinusoiden hin. Amyloid β scheint die Aktivierung von HSC direkt über α SMA und gleichzeitig indirekt über die Reduktion des TGF β -Signalweges durch LSEC zu reduzieren. Die erhöhte Produktion von VEGF-A in HSC kann wiederum die Permeabilität, welche direkt über eine erhöhte NO-Produktion und eine verminderte CD31 Expression in LSEC verbessert wird, zusätzlich positiv beeinflussen. In LSEC und HepG2 ist Amyloid β zusätzlich in der Lage, die nicht-amyloidogene Aktivität von Präsenilin für das Schneiden von Notch zu unterdrücken. Primäre Hepatozyten profitieren von Amyloid β durch eine bessere Proliferation. Amyloid β unterdrückt in Summe also verschiedene Mechanismen, die in Zusammenhang mit der Fibrosierung der Leber und der Entstehung von HCC stehen. Darunter fallen die Aktivierung von HSC, die Aktivierung von TGF β und dem Notch-Signalweg, die erhöhte Expression extrazellulärer Matrix Proteine und die epithelial-mesenchymale Transition (Dewidar et al., 2019).

3.3.1.4 3D Modell humaner Lebersphäroide

Um die Effekte von Amyloid β in Zusammenhang mit einer Interaktion von Leberzelltypen zu untersuchen, wurden Sphäroide aus primären humanen Hepatozyten und primären HSC erzeugt. Durch einen Knock-down von APP konnte

die Expression von APP mRNA deutlich reduziert werden (Manuskript, Abb. 2A). Es kann davon ausgegangen werden, dass eine Reduktion des APP ebenfalls eine Reduktion in dessen Spaltungsprodukten, im speziellen von Amyloid β Peptiden, nach sich zieht. Gleichzeitig kam es durch den Knock-down zu einer erhöhten Proteinexpression von α SMA (Manuskript, Abb. 2B) und einer tendenziellen Erhöhung der Kollagen 1 Expression (Manuskript, Abb. 2C). Der Knock-down begünstigte außerdem die Infiltration mit α SMA -positiven HSC und die epithelial-mesenchymale Transition von Hepatozyten, was durch eine Reduktion von CYP3A4-positiven Hepatozyten im Sphäroid und eine gleichzeitige Zunahme der CYP3A4- und α SMA-positiven HSC deutlich wurde (Manuskript, Abb. 2D und E).

3.3.2 Effekte einer passiven Immunisierung und APP-KO auf die Leber

Die Auswirkungen eines teilweisen Amyloid β -Verlusts sollte durch eine Immunisierung mit dem monoklonalen 3D6-Antikörper, der am N-Terminus von Amyloid β angreift (Lee et al., 2005). Der 3D6-Antikörper erkennt sowohl lösliches, als auch unlösliches Amyloid β in vivo und in vitro (Schroeter et al., 2008; Bard et al., 2000; Fuller et al., 2015; Gnoth et al., 2020). Es wurden Mäuse mit normalem systemischem Amyloid β (Wt) und Mäuse mit erhöhtem systemischem Amyloid β (5xFAD, ein ebenfalls in Publikation 2 genutztes Mausmodell für Familiären Alzheimer) für 4 Wochen, 6 Wochen und 9 Monate entweder mit 3D6 oder einem IgG-Antikörper (Kontrolle) passiv immunisiert. Die 3D6 Immunisierung führte unabhängig von der Behandlungsdauer in Wt und 5xFAD-Tieren zu einer signifikanten Reduktion von Amyloid β 42 im Lebergewebe (Manuskript, Suppl. Abb. 2A-C). Amyloid β 40 war in 4 Wochen behandelten Wt Mäusen und 9 Monate behandelten 5xFAD Mäusen unverändert, in 6 Wochen behandelten 5xFAD Mäusen hingegen leicht reduziert (Manuskript, Suppl. Abb. 2A-C). Frühere Studien konnten zeigen, dass Amyloid β 42 durch den 3D6-Antikörper reduziert wird, Amyloid β 40 hingegen unbeeinflusst bleiben kann (Fuller et al., 2015). Eine Bindung des 3D6 Antikörpers an murines Amyloid β wurde durch Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie nachgewiesen. Dabei ergab sich eine Dissoziationskonstante von 185nM, was nach der Immunisierung einem Siebtel der berechneten Konzentration von 3D6 im Blut mit ungefähr 1,3 μ M entspricht (Manuskript, Suppl. Abb. 2D). Die K_D für humanes Amyloid β liegt dagegen bei 1-3 nM (De Mattos et al., 2012).

Ein vollständiger Verlust von Amyloid β wurde bei APP-KO Mäusen durch Entfernen der APP-Sequenz im Genom erreicht. Dadurch ist weder auf mRNA- noch auf der Proteinebene eine Restexpression des Proteins und der Amyloid β Peptide möglich (Manuskript, Suppl. Abb. 3A).

Der partielle und der vollständige Verlust von Amyloid β 42 führte zu einem Auftreten verschiedener Marker für Fibrose. Dazu gehörte eine erhöhte Expression von Kollagen 1 (Manuskript, Abb. A-D und Suppl. Abb. 3D, rechts oben), Kollagen 4 (Manuskript, Suppl. Abb. 3D, links unten), α SMA (Manuskript, Abb. 3A-J, Suppl. Abb. 3C und D) und TGF β (Manuskript, Abb. 3E-H). Laminin positive Gefäße kamen in 9 Monate immunisierten 5xFAD Mäusen deutlich häufiger vor und weisen auf eine zunehmende Ablagerung dieses Basalmembranproteins in den Gefäßen hin (Manuskript, Suppl. Abb. 3C, oben). In APP-KO Lebern ist eine Umstrukturierung des Gewebes erkennbar, welche durch Bereiche mit starker Kollagen 1 Expression und hoher Dichte α SMA-positiver HSC deutlich wird (Manuskript, Abb. 3C und D). Hierbei wurde eine klare Trennung von Bereichen mit einer hohen GFAP-Expression von jenen mit hoher HSC/ α SMA Dichte deutlich (Manuskript, Abb. 3J). In immunisierten Mäusen konnte ein proportionaler Anstieg der Inflammations- und Fibrosemarker zur Dauer der passiven Immunisierung festgestellt werden. Die Permeabilitätsmarker GFAP und VEGF-A verhielten sich umgekehrt proportional zur Behandlungsdauer (Manuskript, Suppl. Abb. 4B und C). α SMA, Kollagen 1 und TNF α waren bereits in 6 Wochen immunisierten Wt Mäusen erhöht (Manuskript, Suppl. Abb. 4A und C). Die Interleukine 6 und 13 waren in 6 Wochen behandelten 5xFAD Mäusen erhöht (Manuskript, Suppl. Abb. 5), was auch in 9 Monate Immunisierten 5xFAD Mäusen weiterhin nachzuweisen war (Manuskript, Abb. 3L und M).

In APP-KO Mäusen waren neben einer deutlichen morphologischen Strukturänderung auch α SMA, Kollagen 1 und TGF β stärker exprimiert (Manuskript, Abb. 3C und D, sowie G und H). Die Inflammationsmarker IL-6 und IL-13 (Manuskript, Abb. 3L und M) zeigten in APP-KO Mäusen im Vergleich zu Wt Tieren ebenfalls eine deutlich erhöhte Expression. IL-10 und IFN γ waren in APP-KO deutlicher reduziert als in 9 Monate immunisierten 5xFAD Mäusen (Manuskript, Abb. 3 O und P), was zusammen mit den ausgeprägten morphologischen Veränderungen ein Hinweis auf eine stärkere Ausprägung der fibrotischen Veränderungen in APP-KO Mäusen ist. IL-10 und IFN γ sind in der Lage über eine Inhibition von TGF β das Auftreten chronischer fibroproliferativer Krankheiten zu verhindern (Breitkopf et al., 2005). IFN γ trägt

außerdem ähnlich wie VEGF zur Permeabilität der Lebersinusoide bei (Ng et al., 2015; Yokomori et al., 2003). Die Reduktion von TNF α die bei APP-KO, im Gegensatz zu einer starken Erhöhung in immunisierten 5xFAD Mäusen, auftritt (Manuskript, Abb. 3K), könnte auf dessen Sensibilität gegenüber der Abwesenheit von Amyloid β , sowie Beteiligung an der Amyloid β Produktion beruhen, ähnlich wie bei Neuronen und Astrozyten (Yamamoto et al., 2007).

Permeabilitätsmarker wie VEGF und eNOS waren in 3D6-immunisierten Wt und 5xFAD, sowie APP-KO Mäusen reduziert (Manuskript, Abb. 3N, Q und R). GFAP, das mit einer hohen Durchlässigkeit der Blut-Leber- und auch der Blut-Hirn-Schranke assoziiert ist (Buniatian et al., 2001), war durch eine Immunisierung bzw. APP-KO ebenfalls deutlich reduziert (Manuskript, Abb. 3I und J).

Die Reduktion von Amyloid β bzw. vollständige Abwesenheit von Amyloid β führt in der Leber also zur fibrotischen Umstrukturierung, reduzierter Permeabilität und inflammatorischen Prozessen, die zur Bildung einer Leberfibrose führen. Bei der vollständigen Abwesenheit von Amyloid β durch einen Knockout, sind viele Marker stärker verändert, als bei einer 3D6-immunisierung verursachter Reduktion des Peptides.

3.3.3 Verlust von Amyloid β in humanen fibrotischen Lebern

In Publikation 2 wurde ein Verlust von Amyloid β 42 in den Lebern von Nagern und Menschen nachgewiesen. In einer Expressionsanalyse in gesunden und fibrotischen humanen Lebern wurde deutlich, dass die an der Aktivierung von Notch beteiligten α -Sekretasen ADAM10, ADAM17 und ADAM9 allesamt bei einer Fibrose hochreguliert waren (Manuskript, Abb. 2F-H). Diese erhöhte Expression deutet auf eine Reduktion des amyloidogenen Signalweges hin. Zusätzlich konnte für ADAM9, neben der Funktion als α -Sekretase für die Spaltung von APP (Hotoda et al., 2002), eine Abspaltung des Latenz-assoziierten Peptides von TGF β und somit eine Aktivierung von TGF β gezeigt werden (Umeda et al., 2021). Eine erhöhte Expression von Notch 3 (Manuskript, Abb. 2I) deutet weiterhin auf eine erhöhte γ -Sekretase-Aktivität während einer Fibrose hin. Auch die Expression von JAG1 war in fibrotischen Lebern erhöht (Manuskript, Abb. 2J), was ebenfalls auf eine Aktivierung des Notch-Signalweges schließen lässt. Insgesamt weisen diese Ergebnisse auf eine Reduktion der

amyloidogenen APP-Spaltung und eine verstärkte Aktivierung des Notch-Signalweges hin, wodurch die Generation von Amyloid β Peptiden reduziert wird.

Zusätzlich war eine erhöhte Expression der Matrixmetalloproteinase 2 (MMP-2 oder auch Gelatinase A) in fibrotischen Lebern zu beobachten (Manuskript, Abb. 2K). Für die MMP-2 wurde eine Amyloid β 40 und 42 reduzierende Wirkung durch den hydrolytischen Abbau an verschiedenen Peptidbindungen gezeigt (Roher et al., 1994).

Die Expression der Ubiquitin-Carboxyl-Terminal-Hydrolase L1 (*engl. Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1*, UCHL1) war in fibrotischen Lebern deutlich erhöht (Manuskript, Abb. 2L). Eine antagonistische Beziehung zwischen Amyloid β und UCHL1 konnte bereits gezeigt werden. Dabei wurde durch Amyloid β 42 die Aktivität von UCHL1 über den NF- κ B Signalweg und BACE1 reduziert (Guglielmotto et al., 2012), aber durch erhöhtes UCHL1 die Abspaltung von C99 aus APP über BACE vermindert, wodurch der amyloidogene Signalweg reduziert war (M. Zhang et al., 2012). Zusätzlich kommt es in fibrotischen Lebern zur erhöhten Expression von BACE2 (Manuskript, Abb. 2M). Bei BACE2 handelt es sich um ein Homolog zu BACE1, das in der Amyloid β Region von APP schneidet und dadurch eine Entstehung der Amyloid β Peptide verhindert (Farzan et al., 2000).

In fibrotischen Lebern kann also ein Shift vom amyloidogenen Signalweg zum Notch Signalweg, ein erhöhter Abbau von Amyloid β Peptiden und eine verminderte Spaltung von APP über den amyloidogenen Weg zum Verlust von Amyloid β führen.

3.3.4 Reduktion und Verlust von Amyloid β steht in Verbindung mit der Aktivierung des Notch-Signalweges

Eine Aktivierung des Notch-Signalweges wurde in menschlichen fibrotischen Lebern bereits nachgewiesen (siehe 3.3.3.). Die Verbindung zwischen Amyloid β und Notch über die γ -Sekretase Präsenilin wurde in 3.3.1.1 beschrieben. Gleichzeitig besteht eine Verbindung des TGF β Signalweges zum Notch-Signalweg. Eine Fibrose in Nagern und Menschen zog zusätzlich zu einer Aktivierung des TGF β Signalweges auch eine Aktivierung des Notch-Signalweges nach sich (Bansal et al., 2015; Duan et al., 2018). Wie die Aktivierung dieses Signalweges durch die Reduktion bzw. Abwesenheit von Amyloid β beeinflusst wird, sollte im Folgenden untersucht werden. Im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen konnte in immunisierten und KO Lebern eine großflächige

NICD-Expression in Zellkernen festgestellt werden. Dabei war teilweise eine α SMA-Koexpression sichtbar, in anderen Arealen war diese nicht vorhanden (Manuskript, Abb. 4A-H). NICD und α SMA positive Areale wiesen zusätzlich Kleinstgefäße auf, die von mehreren Schichten NICD und α SMA positiver HSC umgeben waren (Manuskript, Abb. 4H). Die gemeinsame Wirkung von TGF β und Notch entsteht durch das Zusammenspiel von NICD und Smad3, dem intrazellulären Vermittler der TGF β -Aktivierung, wodurch es in beiden Fällen zu einer Hes1-Expression kommt (Blokzijl et al., 2003; Zhang et al., 2015). In immunisierten 5xFAD und APP-KO Mäusen wird diese Notch-TGF β -Interaktion durch einen starken Anstieg Hes1-positiver Zellen und Kolo-kalisation mit α SMA positiven HSC deutlich (Manuskript, Abb. 4M und N, Suppl. Abb. 3C und D). Die Notch-TGF β -Interaktion spielt zusätzlich eine Rolle in der epithelial-mesenchymalen Transition, die in der Fibrose und Onkogenese stattfindet (Lamouille et al., 2014; Zhou et al., 2013). In immunisierten 5xFAD Lebern und APP-KO Lebern waren binukleäre Hepatozyten-ähnliche NICD-positive Zellen erkennbar, die eine starke α SMA Expression aufwiesen (Manuskript, Abb. 4 C, D und G). Ähnlich zu den humanen APP Knock-Down Lebersphäroiden (Manuskript, Abb. 2D und E) stellen diese binukleären Zellen in immunisierten 5xFAD und APP-KO Lebern die fortschreitende epitheliale-mesenchymale Transition von Hepatozyten dar.

Die erhöhte Expression von Notch 1 und ADAM10 in immunisierten und KO Lebern (Manuskript, Abb. 4I und J) weist auf eine vermehrte S2-Spaltung und somit Reifung des Notch-Rezeptors hin (Alabi et al., 2021). Zusätzlich war in APP-KO Mäusen eine vermehrte Expression von ADAM17 deutlich (Manuskript, Abb. 4K), welche auf eine zusätzliche Aktivierung des Notch-Signalweges bei vollständiger Abwesenheit der APP-Spaltung zu den A β Peptiden hinweist.

In neuronalen Zellen wurde durch eine Erhöhung von TNF α eine Erhöhung der β -Sekretase, Amyloid β und der A β -assoziierten Aktivität der γ -Sekretase nachgewiesen (Yamamoto et al., 2007; Liaoi et al., 2004). Die Deletion von TNF α hingegen führt in den Gehirnen von 5xFAD Mäusen zu einer reduzierten Produktion von Amyloid β Peptiden durch die Reduktion von funktional aktivem Präsenilin (γ -Sekretase) und BACE (β -Sekretase) (Paouri et al., 2017). Die verstärkte Expression von TNF α (Manuskript, Abb. 3K), BACE1 und Präsenilin (Manuskript, Abb. 4 L und M) in 5xFAD Lebern könnte somit auf einen Mechanismus zur Wiederherstellung der Amyloid β -Homeostase als Reaktion auf die 3D6-Immunisierung zurückzuführen sein.

3.4 Eine Leberschädigung durch CCl₄ ist in 3xTg-AD Mäusen reduziert

Wir konnten zeigen, dass eine Reduktion bzw. der vollständige Verlust von Amyloid β zur Entwicklung einer Leberfibrose führt. In vitro konnte durch eine Behandlung mit exogenem Amyloid β eine anti-fibrotische Wirkung erzielt werden. In einem nächsten Schritt sollte nun überprüft werden, ob ein Alzheimer-Modell mit systemisch erhöhter Amyloid β -Konzentration möglicherweise vor einem fibrotischen Umbau bei einer Leberschädigung geschützt ist. Hierfür wurde eine peritoneale CCl₄-Applikation zweimal wöchentlich über 5 Wochen als klassisches Fibrose-Modell verwendet. Wildtypmäuse (BL/6) wurden als Kontrollgruppe mit normalen Amyloid β Spiegeln verwendet und 3xTg-AD Mäuse stellten die Gruppe mit erhöhtem systemischen Amyloid β Gehalt dar.

3.4.1 Der Verlust von Amyloid β nach 5-wöchiger CCl₄-Behandlung ist in 3xTg-AD-Lebern weniger stark ausgeprägt als in Wildtypen

3xTg-AD Mäuse sind ein AD-Modell mit humanen APP, Präsenilin und tau Mutationen, welche unter 1.4. genauer beschrieben wurden. Die Behandlung mit CCl₄ führte in Wt Mäusen zu einer Reduktion von Amyloid β 42 Peptiden im Lebergewebe. Amyloid β level lagen in 3xTg-AD Mäusen aufgrund der erhöhten Amyloid β Produktion sowohl im Serum, als auch im Lebergewebe deutlich höher als in CCl₄-behandelter BL/6 Gruppe (Manuskript, Suppl. Abb. 7).

3.4.2 Amyloid β Überexpression schützt vor einem fibrotischen Umbau des Lebergewebes durch CCl₄-Behandlung

Basierend auf in-vitro Ergebnissen müssten die 3xTg-AD Mäuse durch die erhöhten Amyloid β Level widerstandsfähiger gegenüber einer CCl₄-induzierten fibrotischen Veränderung der Leber sein als die wildtypischen Tiere. Tatsächlich war in der Sirius Rot-Färbung von Leberschnitten bei CCl₄-behandelten BL/6 Mäusen eine fibrotische Umstrukturierung des Gewebes mit der Bildung von Septen erkennbar, die bei der unbehandelten Kontrolle vollständig ausblieb und bei CCl₄-behandelten 3xTg-AD Lebern deutlich schwächer ausgeprägt war (Manuskript, Abb. 5 A-C).

3.4.3 Eine Leberenzyminduktion bleibt bei CCl₄-behandelten 3xTg-AD Mäusen aus

Eine Schädigung von Hepatozyten und deren Absterben, ob durch Nekrose oder Apoptose, führt zu einer Freisetzung von Enzymen in den Blutkreislauf. Zu diesen Enzymen gehört die Alanin Aminotransferase (ALT), die im Blutserum der Tiere mit Hilfe von einem ELISA bestimmt werden konnte. Die Kontrollgruppe, als auch die CCl₄-behandelten 3xTg-AD Tiere zeigten relativ niedrige ALT-Level mit circa 50ng/ml. Die CCl₄-behandelten Wildtyp-Mäuse hingegen, zeigten eine deutliche Erhöhung der ALT-Level im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen (Manuskript, Abb. 5D, links). Ein weiteres Leberenzym, das bei einer Leberschädigung im Blut erhöht sein kann, ist die Aspartat Aminotransferase (AST). Auch diese konnte mit einem ELISA gemessen werden und zeigte für die Kontrollgruppe und die CCl₄-behandelten 3xTg-AD Mäuse ein relativ niedriges Niveau. Die CCl₄-behandelten Wildtyp Mäuse wiesen auch hier im Vergleich zu den anderen Gruppen eine sehr deutliche Erhöhung auf (Manuskript, Abb. 5D, Mitte). Ergänzend wurde die alkalische Phosphatase (AP) ebenfalls mit einem ELISA bestimmt. Auch dieses Enzym gelangt beim Absterben von Hepatozyten in den Blutstrom und kann als Indikator für einen Leberschaden genutzt werden. Bei der Kontrollgruppe und CCl₄-behandelten 3xTg-AD Tieren lagen die AP Level sehr niedrig, während CCl₄-behandelte Wildtypen eine deutliche Erhöhung der AP Level zeigten (Manuskript, Abb. 5D, rechts). In 3xTg-AD Mäusen sterben Hepatozyten also in geringeren Zahlen ab als in Wildtypmäusen.

3.4.4 Erhöhtes Amyloid β in 3xTg-AD-Lebern führt zu einer verminderten Aktivierung von HSC nach einer CCl₄-Behandlung

Die Expression von α SMA war auf Ebene der mRNA niedrig in der Maisöl-Kontrollgruppe. In 3xTg-AD Tieren kam es nach 5-wöchiger CCl₄-Behandlung zu keinem signifikanten Anstieg der α SMA-mRNA. In den Lebern der CCl₄-behandelten Wildtypmäuse zeigte sich ein deutlicher Anstieg der α SMA mRNA im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen (Manuskript, Abb. 5E). Zusätzlich wurde der Anstieg der α SMA-Expression in CCl₄-behandelten Wildtypen gegenüber den 3xTg-AD Lebern mittels immunohistochemischer Färbung auf α SMA verifiziert. Es wurden dabei Clusterartige Anhäufungen von α SMA-positiven Zellen sichtbar (Manuskript, Abb. 5G), wobei es sich mit höchster Wahrscheinlichkeit um aktivierte HSC handelte, die in die

geschädigten Bereiche migriert sind. In den CCl₄-behandelten 3xTg-AD Lebern war die α SMA-Expression nur sehr schwach ausgeprägt (Manuskript, Abb. 5H). Die Wildtyp-Kontrolle zeigte im Parenchym keine α SMA-Expression (Manuskript, Abb. 5I). Gleichzeitig waren die TGF β Level in CCl₄-behandelten Wildtypen im Vergleich zur Kontrollgruppe und CCl₄-behandelten 3xTg-AD Mäusen deutlich erhöht (Manuskript, Abb. 5F, rechts). Auch für weitere profibrotische Marker wie Osteopontin (OPN) (Manuskript, Abb. 5F, links) und Komponenten des Notch-Signalweges, wie NICD, NOTCH1 und Hes1 (Manuskript, Abb. 5G-I und M), war in CCl₄-behandelten Wildtypen eine deutliche Erhöhung zu sehen, welche bei CCl₄-behandelten 3xTg-AD Mäusen nicht auftrat.

Die reduzierte Aktivierung von hepatischen Sternzellen mit geringfügigen Kollagenablagerungen zusammen mit nicht erhöhten ALT und AST Enzymwerten und reduzierten profibrotischen Markern, weist auf einen hepatoprotektiven Effekt in den 3xTg-AD Tieren gegen eine Induktion eines Leberschadens durch CCl₄ hin. Hiermit konnte erstmals eine höhere Resistenz dieser transgenen Tiere gegen eine Leberschädigung gezeigt werden, welche auf der erhöhten Expression von Amyloid β Peptiden beruht.

3.4.5 Der Schaden durch CCl₄ ist in perizentralen Hepatozyten von 3xTg-AD Mäusen reduziert

Die Glutaminsynthetase (GS) ist ein Enzym, das Glutamat und Ammoniak zu Glutamin umwandelt. Sie wird in der gesunden Leber in spezialisierten perizentralen Hepatozyten, welche in 2-3 Reihen um die Zentralvene angeordnet sind, exprimiert (Manuskript, Abb. 5L). Dieser spezialisierte Bereich ist besonders empfindlich für eine CCl₄-induzierte Schädigung (Ghallab et al., 2019). In CCl₄-behandelten Wildtypen war dementsprechend fast keine GS-Expression mehr sichtbar (Manuskript, Abb. 5J). In CCl₄-behandelten 3xTg-AD Mäusen war die GS-Expression reduziert, aber dennoch deutlich erkennbar (Manuskript, Abb. 5K).

Eine TGF β -induzierte epithelial-mesenchymale-Transition wurde bereits in Hepatozyten nachgewiesen. Ein Kennzeichen für die EMT ist die Abnahme der E-Cadherin-Expression mit gleichzeitigem Auftreten von myofibroblastischen Markern -

wie α SMA - (Kaimori et al., 2007), was bei CCl₄-behandelten Wildtyplebern in den perizentralen Hepatozyten deutlich erkennbar war (Manuskript, Suppl. Abb. 8A). In CCl₄-behandelten 3xTg-AD Lebern und der Wildtypkontrolle hingegen war eine deutlich höhere E-Cadherin-Expression um die Zentralvene und keine α SMA-Expression zu erkennen (Manuskript, Suppl. Abb. 8B und C).

3.4.6 Oxidativer Stress ist in CCl₄-behandelten 3xTg-AD Lebern reduziert

Eine Leberschädigung, insbesondere durch CCl₄, zieht deutlichen oxidativen Stress nach sich. Dabei wurde für verschiedene Modelle des Leberschadens bei Nagern, darunter auch für CCl₄, eine Reduktion antioxidativer Superoxid-Dismutasen wie SOD-1 gezeigt (Liao et al., 2021). Auch in diesem speziellen Aspekt der Fibrose wird der hepatoprotektive Effekt von Amyloid β sichtbar. Die CCl₄-behandelten 3xTg-AD Mäuse zeigten eine erhöhte SOD-1 Expression, sowie eine Reduktion von DNS-Oxidationsprodukten wie 8-Hydroxydesoxyguanosin (8-OH-dG) (Manuskript, Suppl. Abb. 8D-F).

Hohe Amyloid β Level in den CCl₄-behandelten 3xTg-AD Mäusen führten zu einer Reduktion von CD31 – dem Marker für kontinuierliches Endothel in LSEC – (Manuskript, Abb. 5M), TNF α , IL-6, IL-13 und einer Erhöhung von IFN γ und VEGF (Manuskript, Abb. 5N). Die Metalloproteinase 9 (MMP-9), bekannt für ihre profibrotische und Amyloid β -abbauende Wirkung (Hernandez-Guillamon et al., 2015), war in CCl₄-behandelten 3xTg-AD Mäusen im Vergleich zu CCl₄-behandelten Wildtypen deutlich reduziert (Manuskript, Abb. 5N). Dies weist auf einen möglichen Mechanismus über vermehrt vorkommende Amyloid β Peptide mit konstant erhöhten hepatischen Amyloid β Leveln über die MMP-9 in den 3xTg-AD Mäusen und den bei ihnen auftretenden hepatoprotektiven Effekt hin. Die Metalloproteinase 12 (MMP-12) ist bekannt dafür, Entzündungen der Leber und IL-13-induzierte Fibrose zu steuern (Madala et al., 2010). In CCl₄-behandelten 3xTg-AD Mäusen war eine deutliche Reduktion von MMP-12 und IL-13 im Vergleich zu CCl₄-behandelten Wildtypen zu sehen (Manuskript, Abb. 5N).

3.4.7 Lebertranskriptom-Analyse

Um einen tieferen Einblick in die Signalwege des Amyloid β -vermittelten hepatoprotektiven Effekts zu erhalten, wurde eine Transkriptom-Analyse der CCl₄-behandelten Wildtyp und 3xTg-AD Tiere, als auch der Wildtyp-Kontrolle durchgeführt. Im Vergleich zur Wildtyp-Kontrollgruppe waren in CCl₄-behandelten Wildtypen 110 Gene deutlich dereguliert (Manuskript, Abb. 6A). Bei diesen Genen handelte es sich vor allem um inflammatorische, Fibrogenese- und Onkogenese Marker, sowie Gene des Lipid- und Glukose-Metabolismus (Manuskript, Abb. 6B). CCl₄-behandelte 3xTg-AD Mäuse exprimierten 26 Gene anders als die CCl₄-behandelten Wildtypen (Manuskript, Abb. 6A). Die Expression von Genen der Cyp2b Familie (Cyp2b9, Cyp2b10, Cyp2b13) war ausschließlich in CCl₄-behandelten 3xTg-AD Tieren, im Vergleich zu behandelten und unbehandelten Wildtypen, deutlich reduziert (Manuskript, Abb. 6B und C).

Gene die eine Rolle im Umbau der extrazellulären Matrix spielen, TIMP1 (Metallopeptidase Inhibitor 1, *engl. tissue inhibitor of metalloproteinases-1*) und MMP-12, waren in CCl₄-behandelten 3xTg-AD Mäusen deutlich reduziert (Manuskript, Abb. 6B und C).

Der Onkosupressor Hao2 (Hydroxysäureoxidase 2, *engl. hydroxyacid oxidase 2*), der im HCC weniger stark exprimiert wird (Mattu et al., 2016), war in CCl₄-behandelten 3xTg-AD Lebern deutlich hochreguliert (Manuskript, Abb. 6B and C). TIAM2 (T-Lymphom-Invasions- und Metastasen-induzierendes Protein 2, *engl. t-lymphoma invasion and metastasis-inducing protein 2*), ein Marker für HCC und EMT, war gleichzeitig deutlich reduziert in CCl₄-behandelten 3xTg-AD Lebern (Manuskript, Abb. 6 B und C). Der onkosuppressive Effekte eines hohen Amyloid β Levels in der Leber wird außerdem durch die verminderte Expression von Lipocalin 2 (Lcn2), einem Adiponektin das eine wichtige Rolle in der Lipogenese spielt und gleichzeitig einen Marker für eine schlechte HCC-Prognose darstellt, unterstützt. Lcn2 ist während einer NASH, NAFLD, Leberzirrhose, sowie Leberverletzung durch CCl₄ in Mäusen, deutlich erhöht und gilt als Indikator für eine Leberschädigung (Asimakopoulou et al., 2016).

Der Amyloid β Metabolismus wurde durch die Gene MME (für Nephrylysin) und ctse (für Cathepsin E) vertreten. Für Cathepsin E konnte gezeigt werden, dass es die Expression von BACE1 reguliert und die BACE1-vermittelte Produktion von Amyloid β

im Gehirn induziert (Xie et al., 2022). In der MME Expression gab es keine deutlichen Unterschiede zwischen CCl₄-behandelten Wildtypen und 3xTg-AD Lebern. Ctse hingegen war in CCl₄-behandelten 3xTg-AD Lebern deutlich stärker exprimiert, was die Fähigkeit der 3xTg-AD Leberzellen verstärkt Amyloid β zu produzieren unterstützt.

CCl₄-behandelte 3xTg-AD Lebern zeigten außerdem eine erhöhte Expression der Glukose-6-Phosphatase α (g6pc) im Vergleich zu CCl₄-behandelten Wildtypen und der Wildtypkontrolle (Manuskript, Abb. 6B und C). Bei der Glukose-6-Phosphatase handelt es sich um das Geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Gluconeogenese. Ein Mangel dieses Enzyms führt in Menschen zur Glykogenspeicherkrankheit Typ 1a (engl. *glycogen storage disease type 1a, GSDI*), welche sich durch Hypoglykämie, hepatische Glykogenansammlungen und Lipogenese auszeichnet, was wiederum Steatose und Zirrhose, Tumorgenese und eine beeinträchtigte oxidative Phosphorylierung in der Leber verursacht (Farah et al., 2017). Die Glukose-6-Phosphatase stellt hier einen Knotenpunkt zwischen Lipogenese, Fettsäurestoffwechsel, oxidativer Phosphorylierung und β -Oxidation dar, welche allesamt in CCl₄-behandelten 3xTg-AD Lebern deutlich anders reguliert sind als in CCl₄-behandelten Wildtypen (Manuskript, Abb. 6C und Suppl. Abb. 9).

Die GO und KEGG Analyse (engl. Gene ontology and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) zeigte, dass in 3xTg-CCl Lebern die Signalwege mit einer engen Assoziation zu Leberfibrose in Menschen und Nagern herunterreguliert waren. Zu diesen Signalwegen gehörten strukturelle Bestandteile der extrazellulären Matrix, die Kollagenvernetzungsorganisation und -verstoffwechslung, die Metalloproteinase Aktivität, Zytokin-vermittelte Signalwege, Zytokine der TNF Superfamilie, die TGF β Aktivierung, der Fettsäurestoffwechsel und die Beseitigung apoptotischer Zellen (Manuskript, Abb. 6C und Suppl. Abb. 9). Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den Ergebnissen auf der Proteinebene für TNF α , TGF β , Kollagen1, MMP-12 und MMP-9 (Manuskript, Abb. 5).

CCl₄-behandelte 3xTg-AD Lebern zeigten außerdem eine deutliche Hochregulation der oxidativen Phosphorylierung (oxPhos) im Vergleich zu CCl₄-behandelten und unbehandelten Wildtypen. Im Gehirn ist eine verringerte oxPhos mit der Alzheimer-, Parkinson- und Huntington-Krankheit assoziiert (Area-Gomez et al., 2019), welche in den Gehirnen des 3xTg-AD-Mausmodells ebenfalls zu finden ist (Yao et al., 2009). In den Lebern von 3xTg-AD Tieren hingegen herrscht eine starke oxPhos vor, die zum

Erhalt einer normalen Leberfunktion beiträgt und bei einer Fibrose deutlich vermindert ist (Middleton und Vergis, 2021). Eine verminderte oxPhos in der Leber ist weiterhin mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von Krebs assoziiert (Santacatterina et al., 2016).

Die Ergebnisse der Transkriptom-Analyse der 3xTg-CCl₄ Lebern zeigen eine deutliche Präsenz von Genen die am Lipidstoffwechsel, an verstärkter oxPhos und β -Oxidation, sowie der Herunterregulierung von EZM-Komponenten, dem Inflammasom, fibrogenen und HCC Markern beteiligt sind.

3.4.8 Ein verminderter A β -Abbau verhindert eine CCl₄-induzierte Leberfibrose

Das in Publikation 2 verwendete LBQ657 ist der aktive Metabolit von LCZ696, Sacubitril, welches in einem Kombipräparat (Valsartan – Angiotensin-Rezeptor-Antagonist und Sacubitril – Neprilysin-Inhibitor) enthalten ist. Dieses Kombipräparat trägt den Namen Entresto® und wird bei Herzinsuffizienz eingesetzt. LBQ657 vermindert eine TGF β -induzierte Herzfibrose (Jia et al. 2021). Neueste Ergebnisse konnten zeigen, dass eine Behandlung mit Sacubitril/Valsartan bzw. der Knock-Out von Neprilysin die Beschwerden einer CCl₄-induzierten Leberfibrose mindert (Ortiz et al., 2023). Dieser Effekt wurde auf die Kombination der beiden aktiven Substanzen in Entresto® zugeordnet. In Vitro Experimente der Publikation 2 konnten allerdings zeigen, dass dieser Effekt auch mit LBQ657 als Monotherapie erreicht werden kann, wenn ausreichend Amyloid β 42 vorliegt. Ob eine Behandlung mit LBQ657 die durch CCl₄ induzierte Leberschädigung verhindern kann, sollte in den folgenden Experimenten untersucht werden.

BL/6 Tiere wurden hierfür über einen Zeitraum von 5 Wochen mit Vehikel (Maisöl), CCl₄, CCl₄ + 5mg LBQ657 oder CCl₄ +30mg LBQ657 behandelt (Manuskript, Abb. 7A). Für die Leberenzyme AST, ALT und AP konnte ein deutlicher Dosis-abhängiger antifibrotischer Effekt von LBQ657 gezeigt werden (Manuskript, Abb. 7B). Dieser zeigte sich auch in der Sirius Rot Färbung, in der für die ausschließlich mit CCl₄ behandelten Tiere eine deutliche Umstrukturierung und Ablagerung von Kollagenen im Leberparenchym sichtbar wurde, welche bei der niedrigen LBQ657 Dosis leicht vermindert und in der hohen LBQ657 Dosis deutlich weniger ausgeprägt war (Manuskript, Abb. 7C). Weitere fibrotische Marker, wie Kollagen, α SMA, OPN und

TGF β (Manuskript, Abb. 7D-G) zeigten ebenfalls eine Dosis-abhängige Verbesserung durch die LBQ657-Behandlung. Eine verbesserte sinusoidale Permeabilität durch LBQ657 zeigte sich durch eine reduzierte Expression von CD31 und eine ebenfalls Dosis-abhängige Erhöhung von VEGF-A (Manuskript, Abb. 7E und H).

Ähnlich wie bei der systemischen Erhöhung von Amyloid β im Alzheimer Mausmodell, führt der verminderte Abbau von Amyloid β durch LBQ657 – hier allerdings Dosis-unabhängig – zu einer Erhöhung des Hepatozyten-Wachstumsfaktors (*engl. hepatocyte growth factor*, HGF) und IFN γ (Manuskript, Abb. 7H). Auch die Verminderung der MMP-9 und 12 konnte analog zu CCl₄-behandelten 3xTg-AD Mäusen auch in LBQ657-behandelten Wildtypen bei gleichzeitiger CCl₄-Behandlung nachgewiesen werden (Manuskript, Abb. 7I). Insbesondere für die MMP-9 wurde neben einer Amyloid β -abbauenden Funktion eine Aktivierung von TGF β und anschließende HSC Aktivierung mit vermehrter Ablagerung von Kollagenen beobachtet (Yu und Stamenkovic, 2000). Im Gegensatz zur Inhibition von MMP-9 durch LBQ, welche bereits in einem Modell einer TGF β -induzierten Herzfibrose gezeigt wurde (Jia et al., 2021), kann eine Erhöhung der MMP-9 die EMT begünstigen (Lamouille et al., 2014).

Diese Erkenntnisse zeigen, dass die Inhibition des Amyloid β -Abbaus eine Möglichkeit darstellt, die antifibrotischen Effekte von Amyloid β zu nutzen. Zusammen mit den Ergebnissen aus APP-KO, 5xFAD 3D6-immunisierten und 3xTg-AD Mäusen, zeigen die Ergebnisse aus LBQ657-behandelten Wildtypen, dass die CCl₄-induzierte Leberschädigung in Mäusen durch die Erhöhung der Amyloid β Level in der Leber vermindert und ein gesundes Milieu aufrechterhalten werden kann.

4. Ausblick

Die zuvor dargelegten Ergebnisse zeigen, dass Amyloid β am Erhalt eines gesunden Lebermilieus beteiligt ist. Zusätzlich ist es aber auch in der Lage fibrotischen Effekten entgegen zu wirken. Dabei greift Amyloid β in ein Netzwerk aus fibrotischen Faktoren und Signalwegen ein, an dem unter anderem Notch, TGF β , TNF α mit den Interleukinen und NO beteiligt sind. Dadurch vermindert Amyloid β inflammatorische Prozesse, beeinflusst die Bildung von extrazellulären Matrixkomponenten positiv, vermindert die Aktivierung von HSC und die epitheliale-mesenchymale Transition und die Schädigung von Hepatozyten durch oxidativen Stress (Manuskript, Abb. 8).

Die genauen Mechanismen über die Amyloid β diese Wirkung in der Leber entfaltet müssen in zukünftigen Studien genauer untersucht werden. Dabei wäre interessant, ob Amyloid β Signalkaskaden über eine Bindung an Rezeptoren anstößt und wie genau es von den Zellen der Leber dabei aufgenommen wird. LRP1 (*engl. low density lipoprotein receptor-related protein 1*), auch Apolipoprotein E-Rezeptor (APOER), und Transthyretin (TTR) sind im Zentralnervensystem am Transport von Amyloid β beteiligt. TTR wird in Hepatozyten produziert und in das Blutserum entlassen (Yan et al. 1990), wo es Amyloid β Peptide bindet und an deren Transport mitwirkt (Schwarzman et al., 1994). Amyloid β kann aber auch über Pinozytose internalisiert werden (Mandrekar et al., 2009). LRP1 wurde in humanen Hepatozyten und Kupffer-Zellen (Moestrup et al., 1992), sowie sinusoidalen Endothelzellen der Ratte nachgewiesen (Øie et al., 2011). In der Leber ist LRP1 zu einem großen Anteil für die Internalisierung von Amyloid β Peptiden verantwortlich (Tamaki et al., 2006). Ein LRP1-Defizit erhöht weiterhin die Anfälligkeit für eine Diät-bedingte Insulinresistenz und Steatose bei Mäusen (Van De Sluis et al., 2017). Eine partielle Einschränkung des Amyloid β -Transportes macht die Leber also anfällig für eine Schädigung. Hier könnte in zukünftigen Experimenten das Zusammenspiel der verminderten Synthese von Amyloid β und eines eingeschränkten Transports auf die Leber untersucht werden. Die Amyloid β generierenden und abbauenden Enzyme setzen in der Regel weitere Substrate um. Ist durch eine verminderte Amyloid β -Konzentration die Konkurrenzfähigkeit eingeschränkt, kann es zu einem bevorzugten Schneiden anderer Substrate wie zum Beispiel dem pro-fibrotischen Notch kommen. Weitere mögliche pro-fibrotische Signalwege könnten auf diesem Weg ebenfalls aktiviert bzw. anti-fibrotische Signalwege deaktiviert werden. Zur Behandlung der Alzheimer-Krankheit

gibt es Ansätze, die auf die Amyloid β -generierenden Enzyme, wie beispielsweise BACE1, abzielen. Für BACE1-Inhibitoren konnten allerdings keine positiven Effekte auf die kognitive Leistungsfähigkeit gezeigt werden (Egan et al., 2019; Henley et al., 2019). Ein konditionaler Knockout zeigte eine teilweise Reduktion der Amyloid-Plaques, gleichzeitig aber Störungen in der axonalen Organisation des Hippocampus (Ou-Yang et al., 2018). Mögliche negative Folgen wären basierend auf den zuvor gezeigten Ergebnissen auch in der Leber zu erwarten und könnten Schädigungen, wie sie durch APP-KO und 3D6-Immunisierung entstehen, ähneln. Hinzu kommen Einflüsse des adrenergen Systems, die ebenfalls pro-fibrotisch wirken können. Experimente mit den verschiedenen Zelltypen der Leber unter Hypoxie, könnten dabei weitere Erkenntnisse über die Mechanismen hepatischer α 2-AR geben. Als Schnittpunkt scheint NO eine wichtige Rolle zu spielen und sowohl von Amyloid β , als auch durch Noradrenalin beeinflusst zu werden. Wie dieser genaue Crosstalk aussehen könnte und eine Inhibition von α 2-AR sich möglicherweise zusammen mit einer Amyloid β -Behandlung auswirken könnte, dürfte sehr spannend sein.

In transgenen Tieren mit systemisch erhöhter Amyloid β -Konzentration konnte ein hepatoprotektiver Effekt von Amyloid β gezeigt werden. Mittels Sacubitrilat-erzielter Erhöhung der Amyloid β -Konzentration und den positiven Effekten, den diese auf die Leberphysiologie trotz gleichzeitiger Schädigung durch CCl_4 gezeigt haben, wurde ein erster Schritt für eine mögliche Prävention gemacht. In einem nächsten Schritt könnte nun überprüft werden, ob auch ein therapeutischer Effekt erzielt werden kann, wenn eine Schädigung bereits vorliegt.

Für Sacubitril wurde gezeigt, dass es keine schwerwiegenden Nebenwirkungen hat und trotz der potenziell erhöhten Amyloid β -Konzentration aufgrund eines verminderten Abbaus keine Plaques im zentralen Nervensystem von Totenkopffäffchen nachweisbar sind (Schoenfeld et al., 2017). Die PERSPECTIVE Studie (NCT02884206) zur Untersuchung möglicher Langzeitauswirkungen auf die Cognition im Menschen sollte Anfang 2022 beendet werden. Erste Ergebnisse stehen bisher aber nicht zur Verfügung. Einen eleganteren Ansatz könnte eine Zelltherapie darstellen. Dabei könnten APP-überexprimierende induzierte pluripotente Stammzellen (iPS-Zellen) als mögliche Therapiekandidaten zum Einsatz kommen. Diese Zellen könnten dort dabei helfen den Amyloid β -Haushalt hoch zu regulieren und nach einer Schädigung (beispielsweise mit CCl_4) die Erholung des Gewebes unterstützen.

Insgesamt bieten die in dieser Arbeit zusammengefassten Studien eine gute Grundlage, um die Möglichkeiten der Prävention und Therapie einer Leberfibrose/-zirrhose mit Amyloid β und Sacubitril weiter auszubauen. Da bisher keine kurative Therapie für eine Leberfibrose existiert, ist dies ein wichtiger Schritt in diesem Feld und kann zukünftigen Patienten Hoffnung schenken.

5. Literatur- und Quellenverzeichnis

"APP – Tissue – RNA and protein expression summary." The Human Protein Atlas. Web. 01. November 2022. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000142192-APP/tissue>.

Abd-Elgawad, Hazem, et al. "Piceatannol increases the expression of hepatocyte growth factor and IL-10 thereby protecting hepatocytes in thioacetamide-induced liver fibrosis." *Canadian journal of physiology and pharmacology* 94.7 (2016): 779-787.

Adam, René, et al. "Evolution of liver transplantation in Europe: report of the European Liver Transplant Registry." *Liver transplantation* 9.12 (2003): 1231-1243.

Aisen, P. S., et al. "The future of anti-amyloid trials." *The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease* 7 (2020): 146-151.

Alabi, Rolake O., et al. "Analysis of the conditions that affect the selective processing of endogenous Notch1 by ADAM10 and ADAM17." *International journal of molecular sciences* 22.4 (2021): 1846.

Aller, María-Angeles, et al. "Experimental obstructive cholestasis: the wound-like inflammatory liver response." *Fibrogenesis & tissue repair* 1 (2008): 1-17.

An, Lulu, et al. "Deficiency of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) exacerbates brain damage and cognitive deficit in a mouse model of vascular dementia." *Aging and disease* 12.3 (2021): 732.

Area-Gomez, Estela, et al. "Mitochondria, OxPhos, and neurodegeneration: cells are not just running out of gas." *The Journal of clinical investigation* 129.1 (2019): 34-45.

Asimakopoulou, Anastasia, Sabine Weiskirchen, and Ralf Weiskirchen. "Lipocalin 2 (LCN2) expression in hepatic malfunction and therapy." *Frontiers in physiology* 7 (2016): 430.

Bansal, Ruchi, et al. "The interplay of the Notch signaling in hepatic stellate cells and macrophages determines the fate of liver fibrogenesis." *Scientific reports* 5.1 (2015): 18272.

Bansal, Ruchi, et al. "Novel engineered targeted interferon-gamma blocks hepatic fibrogenesis in mice." *Hepatology* 54.2 (2011): 586-596.

Bard, Frédérique, et al. "Peripherally administered antibodies against amyloid β -peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease." *Nature medicine* 6.8 (2000): 916-919.

Bell, Catherine C., et al. "Characterization of primary human hepatocyte spheroids as a model system for drug-induced liver injury, liver function and disease." *Scientific reports* 6.1 (2016): 25187.

Berzigotti, Annalisa, et al. "Assessing portal hypertension in liver diseases." Expert review of gastroenterology & hepatology 7.2 (2013): 141-155.

Biron, Kaan E., et al. "Amyloid triggers extensive cerebral angiogenesis causing blood brain barrier permeability and hypervascularity in Alzheimer's disease." *PloS one* 6.8 (2011): e23789.

Blokzijl, Andries, et al. "Cross-talk between the Notch and TGF- β signaling pathways mediated by interaction of the Notch intracellular domain with Smad3." *The Journal of cell biology* 163.4 (2003): 723-728.

Böttger, J., et al. "Untersuchungen zum Einfluss von Glial-fibrillaric-acidic-protein (GFAP) am Umbau der Mausleber." *Zeitschrift für Gastroenterologie* 51.01 (2013): P_1_06.

Bozkulak, Esra Cagavi, and Gerry Weinmaster. "Selective use of ADAM10 and ADAM17 in activation of Notch1 signaling." *Molecular and cellular biology* 29.21 (2009): 5679-5695.

Brahmachari, Saurav, Yiu K. Fung, and Kalipada Pahan. "Induction of glial fibrillary acidic protein expression in astrocytes by nitric oxide." *Journal of Neuroscience* 26.18 (2006): 4930-4939.

Breitkopf, Katja, et al. "Anti-TGF- β strategies for the treatment of chronic liver disease." *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 29 (2005): 121S-131S.

Briest, Wilfried, et al. "Norepinephrine-induced changes in cardiac transforming growth factor- β isoform expression pattern of female and male rats." *Hypertension* 44.4 (2004): 410-418.

Brou, Christel, et al. "A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE." *Molecular cell* 5.2 (2000): 207-216.

Buniatian, Gayane Hrachia, et al. "Acquisition of blood–tissue barrier–supporting features by hepatic stellate cells and astrocytes of myofibroblastic phenotype. Inverse dynamics of metallothionein and glial fibrillary acidic protein expression." *Neurochemistry international* 38.5 (2001): 373-383.

Buniatian, Gayane Hrachia, et al. "Antifibrotic effects of amyloid-beta and its loss in cirrhotic liver." *Cells* 9.2 (2020): 452.

Buniatian, Gayane, Bernd Hamprecht, and Rolf Gebhardt. "Glial fibrillary acidic protein as a marker of perisinusoidal stellate cells that can distinguish between the normal and myofibroblast-like phenotypes." *Biology of the Cell* 87.1-2 (1996): 65-73.

Buniatian, Gayane Hrachia, et al. "Common myofibroblastic features of newborn rat astrocytes and cirrhotic rat liver stellate cells in early cultures and in vivo." *Neurochemistry international* 35.4 (1999): 317-327.

Bylund, D. B. "Subtypes of alpha 1 and alpha 2-adrenergic receptors FASEB J 1992 6." 832-839.

Carrano, Anna, et al. "Amyloid beta induces oxidative stress-mediated blood–brain barrier changes in capillary amyloid angiopathy." *Antioxidants & redox signaling* 15.5 (2011): 1167-1178.

Chen, Yongping, et al. "Dexmedetomidine protects against lipopolysaccharide-induced early acute kidney injury by inhibiting the iNOS/NO signaling pathway in rats." *Nitric Oxide* 85 (2019): 1-9.

Chiaromonte, Mónica G., et al. "An IL-13 inhibitor blocks the development of hepatic fibrosis during a T-helper type 2–dominated inflammatory response." *The Journal of clinical investigation* 104.6 (1999): 777-785.

Chiarini, Anna, et al. "Soluble amyloid β -peptide and myelin basic protein strongly stimulate, alone and in synergism with combined proinflammatory cytokines, the expression of functional nitric oxide synthase-2 in normal adult human astrocytes." *International journal of molecular medicine* 16.5 (2005): 801-807.

Cho, Dong-Hyung, et al. "S-nitrosylation of Drp1 mediates β -amyloid-related mitochondrial fission and neuronal injury." *Science* 324.5923 (2009): 102-105.

Cho, Soo Min, et al. "Age-dependent inverse correlations in CSF and plasma amyloid- β (1–42) concentrations prior to amyloid plaque deposition in the brain of 3xTg-AD mice." *Scientific reports* 6.1 (2016): 1-9.

Chopra, R. N., and J. Borland McVail. "Carbon tetrachloride in pharmacology and therapeutics." *The Indian Medical Gazette* 58.10 (1923): 453.

Condorelli, Angelo Giuseppe, et al. "Notch-ing up knowledge on molecular mechanisms of skin fibrosis: focus on the multifaceted Notch signalling pathway." *Journal of biomedical science* 28.1 (2021): 1-17.

Corey, Kathleen E., et al. "The effect of angiotensin-blocking agents on liver fibrosis in patients with hepatitis C." *Liver International* 29.5 (2009): 748-753.

Côté, Sébastien, et al. "Distinct dimerization for various alloforms of the amyloid-beta protein: A β 1–40, A β 1–42, and A β 1–40 (D23N)." *The journal of physical chemistry B* 116.13 (2012): 4043-4055.

Cressman, Drew E., et al. "Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice." *Science* 274.5291 (1996): 1379-1383.

Croquet, Vincent, et al. "Hemodynamic and antifibrotic effects of losartan in rats with liver fibrosis and/or portal hypertension." *Journal of hepatology* 37.6 (2002): 773-780.

Decourt, Boris, et al. "Critical appraisal of amyloid lowering agents in AD." *Current Neurology and Neuroscience Reports* 21.8 (2021): 39.

Del Carmen Medina, Luz, José Vázquez-Prado, and J. Adolfo García-Sáinz. "Cross-talk between receptors with intrinsic tyrosine kinase activity and α 1b-adrenoceptors." *Biochemical Journal* 350.2 (2000): 413-419.

DeLeve, Laurie D., Xiangdong Wang, and Yumei Guo. "Sinusoidal endothelial cells prevent rat stellate cell activation and promote reversion to quiescence." *Hepatology* 48.3 (2008): 920-930.

DeMattos, Ronald B., et al. "A plaque-specific antibody clears existing β -amyloid plaques in Alzheimer's disease mice." *Neuron* 76.5 (2012): 908-920.

Dewidar, Bedair, et al. "TGF- β in hepatic stellate cell activation and liver fibrogenesis—updated 2019." *Cells* 8.11 (2019): 1419.

Di Scala, Coralie, et al. "Common molecular mechanism of amyloid pore formation by Alzheimer's β -amyloid peptide and α -synuclein." *Scientific reports* 6.1 (2016): 28781.

Dineley, Kirk E., et al. "Zinc causes loss of membrane potential and elevates reactive oxygen species in rat brain mitochondria." *Mitochondrion* 5.1 (2005): 55-65.

Duan, Juan-Li, et al. "Endothelial Notch activation reshapes the angiocrine of sinusoidal endothelia to aggravate liver fibrosis and blunt regeneration in mice." *Hepatology* 68.2 (2018): 677-690.

Dubuisson, Liliane, et al. "Inhibition of rat liver fibrogenesis through noradrenergic antagonism." *Hepatology* 35.2 (2002): 325-331.

Duering, Marco, et al. "Mean age of onset in familial Alzheimer's disease is determined by amyloid beta 42." *Neurobiology of aging* 26.6 (2005): 785-788.

Egan, Michael F., et al. "Randomized trial of verubecestat for prodromal Alzheimer's disease." *New England Journal of Medicine* 380.15 (2019): 1408-1420.

Eppinger, Hans. *Die Leberkrankheiten: allgemeine und spezielle Pathologie und Therapie der Leber*. Springer-Verlag, 2013.

Estrada, Lisbell D., Luciana Oliveira-Cruz, and Daniel Cabrera. "Transforming growth factor beta type I role in neurodegeneration: implications for Alzheimer's disease." *Current Protein and Peptide Science* 19.12 (2018): 1180-1188.

Fabregat, Isabel, et al. "TGF- β signalling and liver disease." *The FEBS journal* 283.12 (2016): 2219-2232.

Fang, Zhi-Qiang, et al. "Notch-triggered maladaptation of liver sinusoidal endothelium aggravates nonalcoholic steatohepatitis through endothelial nitric oxide synthase." *Hepatology* 76.3 (2022): 742-758.

Farah, Benjamin L., et al. "Hepatic mitochondrial dysfunction is a feature of glycogen storage disease type Ia (GSDIa)." *Scientific reports* 7.1 (2017): 44408.

Farkas, Lilla M., et al. "Transforming growth factor- β s are essential for the development of midbrain dopaminergic neurons in vitro and in vivo." *Journal of Neuroscience* 23.12 (2003): 5178-5186.

Farzan, Michael, et al. "BACE2, a β -secretase homolog, cleaves at the β site and within the amyloid- β region of the amyloid- β precursor protein." *Proceedings of the national academy of sciences* 97.17 (2000): 9712-9717.

Fuller, James P., et al. "Comparing the efficacy and neuroinflammatory potential of three anti- β antibodies." *Acta neuropathologica* 130 (2015): 699-711.

Funyu, Junji, et al. "VEGF can act as vascular permeability factor in the hepatic sinusoids through upregulation of porosity of endothelial cells." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 280.2 (2001): 481-485.

Garcia-Tsao, Guadalupe. "Beta blockers in cirrhosis: The window re-opens." *Journal of hepatology* 64.3 (2016): 532-534.

Geerts, Anja M., et al. "Comparison of three research models of portal hypertension in mice: macroscopic, histological and portal pressure evaluation." *International journal of experimental pathology* 89.4 (2008): 251-263.

Ghallab, Ahmed, et al. "Influence of liver fibrosis on lobular zonation." *Cells* 8.12 (2019): 1556.

Ghiso, Jorge, et al. "Systemic catabolism of Alzheimer's A β 40 and A β 42." *Journal of Biological Chemistry* 279.44 (2004): 45897-45908.

Gnoth, Kathrin, et al. "Targeting isoaspartate-modified A β rescues behavioral deficits in transgenic mice with Alzheimer's disease-like pathology." *Alzheimer's Research & Therapy* 12.1 (2020): 1-20.

Grainger, David J., and Emma K. Frow. "Thrombospondin 1 does not activate transforming growth factor β 1 in a chemically defined system or in smooth-muscle-cell cultures." *Biochemical Journal* 350.1 (2000): 291-298.

Gressner, A. M., and M. G. Bachem. "Molecular mechanisms of liver fibrogenesis—a homage to the role of activated fat-storing cells." *Digestion* 56.5 (1995): 335-346.

Guglielmotto, Michela, et al. "A β 1-42-mediated down-regulation of Uch-L1 is dependent on NF- κ B activation and impaired BACE1 lysosomal degradation." *Aging cell* 11.5 (2012): 834-844.

Hartz, Anika MS, et al. "Amyloid- β contributes to blood–brain barrier leakage in transgenic human amyloid precursor protein mice and in humans with cerebral amyloid angiopathy." *Stroke* 43.2 (2012): 514-523.

Heintz, M. M., McRee, R., Kumar, R., & Baldwin, W. S. (2020). Gender differences in diet-induced steatotic disease in Cyp2b-null mice. *PLoS ONE*, 15(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229896>

Henley, David, et al. "Preliminary Results of a Trial of Atabecestat in Preclinical Alzheimer's Disease." *The New England journal of medicine* 380.15 (2019): 1483-1485.

Henriksen, Jens H., et al. "The sympathetic nervous system in liver disease." *Journal of hepatology* 29.2 (1998): 328-341.

Hernandez-Guillamon, Mar, et al. "Sequential amyloid- β degradation by the matrix metalloproteases MMP-2 and MMP-9." *Journal of Biological Chemistry* 290.24 (2015): 15078-15091.

Hersh, Louis B., and David W. Rodgers. "Nepriylsin and amyloid beta peptide degradation." *Current Alzheimer Research* 5.2 (2008): 225-231.

Hoffman, Brian B., Diane F. Dukes, and Robert J. Lefkowitz. "Alpha-adrenergic receptors in liver membranes: delineation with subtype selective radioligands." *Life Sciences* 28.3 (1981): 265-272.

Hotoda, Nika, et al. "A secreted form of human ADAM9 has an α -secretase activity for APP." *Biochemical and biophysical research communications* 293.2 (2002): 800-805.

Huang, Yue-Hong, et al. "Interleukin-10 induces senescence of activated hepatic stellate cells via STAT3-p53 pathway to attenuate liver fibrosis." *Cellular Signalling* 66 (2020): 109445.

Ivanoiu, Adrian, et al. "Long-term safety and tolerability of bapineuzumab in patients with Alzheimer's disease in two phase 3 extension studies." *Alzheimer's research & therapy* 8.1 (2016): 1-11.

Jarriault, Sophie, et al. "Signalling downstream of activated mammalian Notch." *Nature* 377.6547 (1995): 355-358.

Jia, Tian, et al. "Sacubitril ameliorates cardiac fibrosis through inhibiting TRPM7 channel." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9 (2021): 760035.

Kaimori, Aki, et al. "Transforming growth factor- β 1 induces an epithelial-to-mesenchymal transition state in mouse hepatocytes in vitro." *Journal of Biological Chemistry* 282.30 (2007): 22089-22101.

Kanemitsu, Hyoe, Takami Tomiyama, and Hiroshi Mori. "Human neprilysin is capable of degrading amyloid β peptide not only in the monomeric form but also the pathological oligomeric form." *Neuroscience letters* 350.2 (2003): 113-116.

Kaviratne, Mallika, et al. "IL-13 activates a mechanism of tissue fibrosis that is completely TGF- β independent." *The Journal of Immunology* 173.6 (2004): 4020-4029

Khan, Rahmat A., Muhammad R. Khan, and Sumaira Sahreen. "CCI4-induced hepatotoxicity: protective effect of rutin on p53, CYP2E1 and the antioxidative status in rat." *BMC complementary and alternative medicine* 12.1 (2012): 1-6.

Lamouille, Samy, Jian Xu, and Rik Derynck. "Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition." *Nature reviews Molecular cell biology* 15.3 (2014): 178-196.

Lee, Michael, et al. "A β 42 immunization in Alzheimer's disease generates A β N-terminal antibodies." *Annals of neurology* 58.3 (2005): 430-435.

Liao, Mei-Chen, et al. "Degradation of amyloid β protein by purified myelin basic protein." *Journal of Biological Chemistry* 284.42 (2009): 28917-28925.

Liao, Yi-Jen, et al. "Ketogenic diet enhances the cholesterol accumulation in liver and augments the severity of ccl4 and taa-induced liver fibrosis in mice." *International journal of molecular sciences* 22.6 (2021): 2934.

Liao, Yung-Feng, et al. "Tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β , and interferon- γ stimulate γ -secretase-mediated cleavage of amyloid precursor protein through a JNK-dependent MAPK pathway." *Journal of Biological Chemistry* 279.47 (2004): 49523-49532.

Liedtke, Christian, et al. "Experimental liver fibrosis research: update on animal models, legal issues and translational aspects." *Fibrogenesis & tissue repair* 6.1 (2013): 1-25.

Lin, Jung-Chun, et al. "Sympathetic nervous system control of carbon tetrachloride-induced oxidative stress in liver through α -adrenergic signaling." *Oxidative medicine and cellular longevity* 2016 (2016).

Liu, Yan, et al. "IL-13 induces connective tissue growth factor in rat hepatic stellate cells via TGF- β –independent Smad signaling." *The Journal of Immunology* 187.5 (2011): 2814-2823.

Luedde, Tom, Neil Kaplowitz, and Robert F. Schwabe. "Cell death and cell death responses in liver disease: mechanisms and clinical relevance." *Gastroenterology* 147.4 (2014): 765-783.

Lüth, Hans-Joachim, et al. "Expression of endothelial and inducible NOS-isoforms is increased in Alzheimer's disease, in APP23 transgenic mice and after experimental brain lesion in rat: evidence for an induction by amyloid pathology." *Brain research* 913.1 (2001): 57-67.

Maarouf, Chera L., et al. "Impaired hepatic amyloid-beta degradation in Alzheimer's disease." *PloS one* 13.9 (2018): e0203659.

Madala, Satish K., et al. "Matrix metalloproteinase 12-deficiency augments extracellular matrix degrading metalloproteinases and attenuates IL-13-dependent fibrosis." *The Journal of Immunology* 184.7 (2010): 3955-3963.

Magara, Fulvio, et al. "Genetic background changes the pattern of forebrain commissure defects in transgenic mice underexpressing the β -amyloid-precursor protein." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96.8 (1999): 4656-4661.

Mandrekar, Shweta, et al. "Microglia mediate the clearance of soluble A β through fluid phase macropinocytosis." *Journal of Neuroscience* 29.13 (2009): 4252-4262.

Mann, Derek A., and Fabio Marra. "Fibrogenic signalling in hepatic stellate cells." *Journal of hepatology* 52.6 (2010): 949-950.

Marcato, P. S., et al. "Pretelangiectasis and telangiectasis of the bovine liver: a morphological, immunohistochemical and ultrastructural study." *Journal of comparative pathology* 119.2 (1998): 95-110.

Martínez, Allyson K., et al. "Mouse models of liver fibrosis mimic human liver fibrosis of different etiologies." *Current pathobiology reports* 2.4 (2014): 143-153.

Mattu, Sandra, et al. "The metabolic gene HAO2 is downregulated in hepatocellular carcinoma and predicts metastasis and poor survival." *Journal of hepatology* 64.4 (2016): 891-898.

Maurya, Vineet Kumar, et al. "Transforming growth factor-beta 1 (TGF-B1) liberation from its latent complex during embryo implantation and its regulation by estradiol in mouse." *Biology of reproduction* 89.4 (2013): 84-1.

Mazzaferro, Vincenzo, et al. "Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis." *New England Journal of Medicine* 334.11 (1996): 693-700.

Melkonyan, Magda M., et al. "Neuroprotective, neurogenic, and amyloid beta reducing effect of a novel alpha 2-Adrenoblocker, mesedin, on astroglia and neuronal progenitors upon hypoxia and glutamate exposure." *International Journal of Molecular Sciences* 19.1 (2017): 9.

Mesarwi, Omar A., et al. "Hepatocyte hypoxia inducible factor-1 mediates the development of liver fibrosis in a mouse model of nonalcoholic fatty liver disease." *PLoS One* 11.12 (2016): e0168572.

Middleton, Paul, and Nikhil Vergis. "Mitochondrial dysfunction and liver disease: role, relevance, and potential for therapeutic modulation." *Therapeutic Advances in Gastroenterology* 14 (2021): 17562848211031394.

Miksa, Michael, et al. "Pivotal role of the α 2A-adrenoceptor in producing inflammation and organ injury in a rat model of sepsis." *PLoS One* 4.5 (2009): e5504.

Mittal, Manoj K., et al. "Nitric oxide modulates hepatic vascular tone in normal rat liver." *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 267.3 (1994): G416-G422.

Moestrup, Søren K., Jørgen Gliemann, and Gorm Pallesen. "Distribution of the α 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein in human tissues." *Cell and tissue research* 269.3 (1992): 375-382.

Mullan, Mike, et al. "A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of β -amyloid." *Nature genetics* 1.5 (1992): 345-347.

Munding, J., and A. Tannapfel. "Anatomie der Leber." *Der Radiologe* 51.8 (2011): 655-660.

Nagai, Noriaki, et al. "A positive feedback loop between nitric oxide and amyloid β (1-42) accelerates mitochondrial damage in human lens epithelial cells." *Toxicology* 381 (2017): 19-30.

Nam, Soon Woo, et al. "Decreased hepatic nerve fiber innervation in patients with liver cirrhosis." *Gut and liver* 1.2 (2007): 165.

Ng, Chin Theng, et al. "Interferon-gamma increases endothelial permeability by causing activation of p38 MAP kinase and actin cytoskeleton alteration." *Journal of Interferon & Cytokine Research* 35.7 (2015): 513-522.

Novacek, G. "Leber und nicht-hepatale Leberwerte." *Journal für Gastroenterologische und Hepatologische Erkrankungen* 2.3 (2004): 30-33.

Nozik-Grayck, Eva, et al. "S-nitrosoglutathione inhibits α 1-adrenergic receptor-mediated vasoconstriction and ligand binding in pulmonary artery." *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 290.1 (2006): L136-L143.

O'Brien, R. J., & Wong, P. C. (2011). Amyloid precursor protein processing and alzheimer's disease. *Annual Review of Neuroscience*, 34. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113613>

Oakley, Holly, et al. "Intraneuronal β -amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation." *Journal of Neuroscience* 26.40 (2006): 10129-10140.

Oben, Jude A., et al. "Hepatic fibrogenesis requires sympathetic neurotransmitters." *Gut* 53.3 (2004): 438-445.

Oben, Jude A., et al. "Norepinephrine induces hepatic fibrogenesis in leptin deficient ob/ob mice." *Biochemical and biophysical research communications* 308.2 (2003): 284-292.

Oddo, Salvatore, et al. "Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular A β and synaptic dysfunction." *Neuron* 39.3 (2003): 409-421.

Ohnuki, Hidetaka, and Giovanna Tosato. "Notch and TGF β ." *Oncolmmunology* 3.5 (2014).

Ohrui, Takashi, et al. "Effects of brain-penetrating ACE inhibitors on Alzheimer disease progression." *Neurology* 63.7 (2004): 1324-1325.

Øie, Cristina Ionica, et al. "Rat liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) express functional low density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1)." *Journal of hepatology* 55.6 (2011): 1346-1352.

Ongali, Brice, et al. "Angiotensin II type 1 receptor blocker losartan prevents and rescues cerebrovascular, neuropathological and cognitive deficits in an Alzheimer's disease model." *Neurobiology of disease* 68 (2014): 126-136.

Ortiz, Cristina, et al. "Nepriylsin-dependent neuropeptide Y cleavage in the liver promotes fibrosis by blocking NPY-receptor 1." *Cell Reports* 42.2 (2023).

Ou-Yang, Ming-Hsuan, and William E. Van Nostrand. "The absence of myelin basic protein promotes neuroinflammation and reduces amyloid β -protein accumulation in Tg-5xFAD mice." *Journal of neuroinflammation* 10.1 (2013): 1-12.

Ou-Yang, Ming-Hsuan, et al. "Axonal organization defects in the hippocampus of adult conditional BACE1 knockout mice." *Science translational medicine* 10.459 (2018): eaao5620.

Paouri, Evi, et al. "Genetic deletion of tumor necrosis factor- α attenuates amyloid- β production and decreases amyloid plaque formation and glial response in the 5xfad model of Alzheimer's disease." *Journal of Alzheimer's Disease* 60.1 (2017): 165-181.

Proell, Verena, et al. "The plasticity of p19ARF null hepatic stellate cells and the dynamics of activation." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1744.1 (2005): 76-87.

Rey, Imelda, and Rustam Effendi-Ys. "Association Between Serum IL-6, IL-10, IL-12, and IL-23 Levels and Severity of Liver Cirrhosis." *Medical Archives* 75.3 (2021): 199.

Rockey, Don C., et al. "Inhibition of rat hepatic lipocyte activation in culture by interferon- γ ." *Hepatology* 16.3 (1992): 776-784.

Roher, A. E., et al. "Proteolysis of A β peptide from Alzheimer disease brain by gelatinase A." *Biochemical and biophysical research communications* 205.3 (1994): 1755-1761.

Santacatterina, Fulvio, et al. "Down-regulation of oxidative phosphorylation in the liver by expression of the ATPase inhibitory factor 1 induces a tumor-promoter metabolic state." *Oncotarget* 7.1 (2016): 490.

Schiering, Nikolaus, et al. "Structure of neprilysin in complex with the active metabolite of sacubitril." *Scientific reports* 6.1 (2016): 1-5.

Schmidt-Arras, Dirk, and Stefan Rose-John. "IL-6 pathway in the liver: from physiopathology to therapy." *Journal of hepatology* 64.6 (2016): 1403-1415.

Schoenfeld, Heidi A., et al. "The effect of angiotensin receptor neprilysin inhibitor, sacubitril/valsartan, on central nervous system amyloid- β concentrations and clearance in the cynomolgus monkey." *Toxicology and applied pharmacology* 323 (2017): 53-65.

Scholten, D., et al. "The carbon tetrachloride model in mice." *Laboratory animals* 49.1_suppl (2015): 4-11.

Schon, Hans-Theo, and Ralf Weiskirchen. "Immunomodulatory effects of transforming growth factor- β in the liver." *Hepatobiliary surgery and nutrition* 3.6 (2014): 386.

Schroeter, Sally, et al. "Immunotherapy reduces vascular amyloid- β in PDAPP mice." *Journal of Neuroscience* 28.27 (2008): 6787-6793.

Schwarzman, Alexander L., et al. "Transthyretin sequesters amyloid beta protein and prevents amyloid formation." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91.18 (1994): 8368-8372.

Selzner, Nazia, et al. "ICAM-1 triggers liver regeneration through leukocyte recruitment and Kupffer cell-dependent release of TNF- α /IL-6 in mice." *Gastroenterology* 124.3 (2003): 692-700.

Serna-Salas, Sandra A., et al. " α -1 Adrenergic receptor antagonist doxazosin reverses hepatic stellate cells activation via induction of senescence." *Mechanisms of Ageing and Development* 201 (2022): 111617.

Sha, Jichen, et al. "Dexmedetomidine attenuates lipopolysaccharide-induced liver oxidative stress and cell apoptosis in rats by increasing GSK-3 β /MKP-1/Nrf2 pathway activity via the α 2 adrenergic receptor." *Toxicology and Applied Pharmacology* 364 (2019): 144-152.

Shakiba, Ebrahim, Mazaher Ramezani, and Masoud Sadeghi. "Evaluation of serum interleukin-6 levels in hepatocellular carcinoma patients: a systematic review and meta-analysis." *Clinical and Experimental Hepatology* 4.3 (2018): 182-190.

Shi, Yun, et al. " β 2-Adrenergic receptor agonist induced hepatic steatosis in mice: modeling nonalcoholic fatty liver disease in hyperadrenergic states." *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 321.1 (2021): E90-E104.

Shirotani, Keiro, et al. "Neprilysin degrades both amyloid β peptides 1–40 and 1–42 most rapidly and efficiently among thiorphan-and phosphoramidon-sensitive endopeptidases." *Journal of Biological Chemistry* 276.24 (2001): 21895-21901.

Sigala, Barbara, et al. "Sympathetic nervous system catecholamines and neuropeptide Y neurotransmitters are upregulated in human NAFLD and modulate the fibrogenic function of hepatic stellate cells." *PloS one* 8.9 (2013): e72928.

Snyder, Seth W., et al. "Amyloid-beta aggregation: selective inhibition of aggregation in mixtures of amyloid with different chain lengths." *Biophysical journal* 67.3 (1994): 1216-1228.

Söderberg, L., Johannesson, M., Nygren, P., Laudon, H., Eriksson, F., Osswald, G., Möller, C., & Lannfelt, L. (2022). Lecanemab, Aducanumab, and Gantenerumab — Binding Profiles to Different

Forms of Amyloid-Beta Might Explain Efficacy and Side Effects in Clinical Trials for Alzheimer's Disease. Neurotherapeutics.

Su, Xiaonan, et al. "FN-EDA mediates angiogenesis of hepatic fibrosis via integrin-VEGFR2 in a CD63 synergetic manner." *Cell Death Discovery* 6.1 (2020): 1-14.

Tacke, F., and R. Weiskirchen. "Pathophysiologie der Leberfibrose." *Der Internist* 51.1 (2010): 21-29.

Takahashi, Yoshihisa, and Toshio Fukusato. "Animal models of liver diseases." *Animal models for the study of human disease*. Academic Press, 2017. 313-339.

Takase, Shujiro, et al. "Desmin distinguishes cultured fat-storing cells from myofibroblasts, smooth muscle cells and fibroblasts in the rat." *Journal of hepatology* 6.3 (1988): 267-276.

Tamaki, Chihiro, et al. "Major involvement of low-density lipoprotein receptor-related protein 1 in the clearance of plasma free amyloid β -peptide by the liver." *Pharmaceutical research* 23.7 (2006): 1407-1416.

Tananyan, A. G., et al. "The effect of mesedin on the content of oxidative stress biomarkers in the brain tissue in ischemia." *Neurochemical Journal* 13.1 (2019): 68-72.

Tananyan, A., and M. Balasanyan. "P. 4. c. 008 Prevention of focal ischemia induced memory deficit and anxiety by mesedin." *European Neuropsychopharmacology* 24 (2014): S610.

Thiel, Victoria E., and Kenneth L. Audus. "Nitric oxide and blood-brain barrier integrity." *Antioxidants and Redox Signaling* 3.2 (2001): 273-278.

Thinakaran, Gopal, and Edward H. Koo. "Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function." *Journal of Biological Chemistry* 283.44 (2008): 29615-29619.

Thomsen, Maj Schneider, et al. "Synthesis and deposition of basement membrane proteins by primary brain capillary endothelial cells in a murine model of the blood-brain barrier." *Journal of neurochemistry* 140.5 (2017): 741-754.

Trebicka, Jonel, et al. "Role of β 3-adrenoceptors for intrahepatic resistance and portal hypertension in liver cirrhosis." *Hepatology* 50.6 (2009): 1924-1935.

Ulloa, Luis, Jacqueline Doody, and Joan Massagué. "Inhibition of transforming growth factor- β /SMAD signalling by the interferon- γ /STAT pathway." *Nature* 397.6721 (1999): 710-713.

Umeda, Masataka, et al. "ADAM9 enhances Th17 cell differentiation and autoimmunity by activating TGF- β 1." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 118.18 (2021): e2023230118.

Van De Sluis, Bart, Melinde Wijers, and Joachim Herz. "News on the molecular regulation and function of hepatic LDLR and LRP1." *Current opinion in lipidology* 28.3 (2017): 241.

Vanhoutte, Paul M. "Endothelial adrenoceptors." *Journal of cardiovascular pharmacology* 38.5 (2001): 796-808. Vartanyan, S. O., et al. "Synthesis and biologic properties of new thiazolylbenzodioxane derivatives." *Russian Journal of Organic Chemistry* 52.2 (2016): 244-248.

Wang, Ping, Stephen M. Tait, and Irshad H. Chaudry. "Sustained elevation of norepinephrine depresses hepatocellular function." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 1535.1 (2000): 36-44.

Wang, ShengPeng, et al. "Endothelial cation channel PIEZO1 controls blood pressure by mediating flow-induced ATP release." *The Journal of clinical investigation* 126.12 (2016): 4527-4536.

Wang, Ye-Ran, et al. "Associations between hepatic functions and plasma amyloid-beta levels—implications for the capacity of liver in peripheral amyloid-beta clearance." *Molecular neurobiology* 54.3 (2017): 2338-2344.

Wang, Ye-Ran, et al. "Associations between hepatic functions and plasma amyloid-beta levels—implications for the capacity of liver in peripheral amyloid-beta clearance." *Molecular neurobiology* 54.3 (2017): 2338-2344.

Wasmuth, H. E., and C. Trautwein. "Leberfibrose." *Der Internist* 51.1 (2010): 14-20.

Weber, Lutz WD, Meinrad Boll, and Andreas Stampfl. "Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model." *Critical reviews in toxicology* 33.2 (2003): 105-136.

Wieckowska, Anna, et al. "Increased hepatic and circulating interleukin-6 levels in human nonalcoholic steatohepatitis." *Official journal of the American College of Gastroenterology| ACG* 103.6 (2008): 1372-1379.

Wilson, Caroline L., et al. "Ubiquitin C-terminal hydrolase 1: A novel functional marker for liver myofibroblasts and a therapeutic target in chronic liver disease." *Journal of hepatology* 63.6 (2015): 1421-1428.

Xie, Zhen, et al. "Microglial cathepsin E plays a role in neuroinflammation and amyloid β production in Alzheimer's disease." *Aging cell* 21.3 (2022): e13565.

Xuanfei, Li, et al. "Imidazoline I2 receptor inhibitor idazoxan regulates the progression of hepatic fibrosis via Akt-Nrf2-Smad2/3 signaling pathway." *Oncotarget* 8.13 (2017): 21015.

Yamamoto, Masaru, et al. "Interferon- γ and tumor necrosis factor- α regulate amyloid- β plaque deposition and β -secretase expression in Swedish mutant APP transgenic mice." *The American journal of pathology* 170.2 (2007): 680-692.

Yan, Chen, et al. "Distinct positive and negative elements control the limited hepatocyte and choroid plexus expression of transthyretin in transgenic mice." *The EMBO Journal* 9.3 (1990): 869-878.

Yao, Jia, et al. "Mitochondrial bioenergetic deficit precedes Alzheimer's pathology in female mouse model of Alzheimer's disease." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106.34 (2009): 14670-14675.

Yasojima, K., E. G. McGeer, and P. L. McGeer. "Relationship between beta amyloid peptide generating molecules and neprilysin in Alzheimer disease and normal brain." *Brain research* 919.1 (2001): 115-121.

Yokomori, Hiroaki, et al. "Vascular endothelial growth factor increases fenestral permeability in hepatic sinusoidal endothelial cells." *Liver international* 23.6 (2003): 467-475.

Yu, Qin, and Ivan Stamenkovic. "Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF- β and promotes tumor invasion and angiogenesis." *Genes & development* 14.2 (2000): 163-176.

Zapater, Pedro, et al. "Beta-adrenergic receptor 1 selective antagonism inhibits norepinephrine-mediated TNF-alpha downregulation in experimental liver cirrhosis." (2012): e43371.

Zhang, Kai, et al. "Hes1, an important gene for activation of hepatic stellate cells, is regulated by Notch1 and TGF- β /BMP signaling." *World Journal of Gastroenterology: WJG* 21.3 (2015): 878.

Zhang, Li-Juan, et al. "Effects of cytokines on carbon tetrachloride-induced hepatic fibrogenesis in rats." *World journal of gastroenterology* 10.1 (2004): 77.

Zhang, Mingming, et al. "Control of BACE1 degradation and APP processing by ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1." *Journal of neurochemistry* 120.6 (2012): 1129-1138.

Zhang, Shuman, et al. "Protective effect of melatonin on soluble A β 1–42-induced memory impairment, astrogliosis, and synaptic dysfunction via the Musashi1/Notch1/Hes1 signaling pathway in the rat hippocampus." *Alzheimer's research & therapy* 8.1 (2016): 1-18.

Zhang, Youcai, et al. "Effect of bile duct ligation on bile acid composition in mouse serum and liver." *Liver International* 32.1 (2012): 58-69.

Zheng, Hui, et al. " β -Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity." *Cell* 81.4 (1995): 525-531.

Zhou, Mian, et al. "The role of Kupffer cell α 2-adrenoceptors in norepinephrine-induced TNF- α production." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 1537.1 (2001): 49-57.

Zhou, Qi, et al. "The roles of Notch1 expression in the migration of intrahepatic cholangiocarcinoma." *BMC cancer* 13.1 (2013): 1-10.

Zhu, Changyu, et al. "Hepatocyte Notch activation induces liver fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis." *Science translational medicine* 10.468 (2018): eaat0344.

Zhu, J., et al. "Expression of alpha1 adrenoceptor subtypes mRNA in hepatic tissues of cirrhotic patients with portal hypertension." *Zhonghua wai ke za zhi [Chinese Journal of Surgery]* 38.5 (2000): 325-328.





Abbildungen der Einleitung wurden mit Hilfe von Abbildungsvorlagen der Internetseite <https://smart.servier.com/> erstellt.

6. Anhang

- I. Akzeptierte Publikationen**
- II. Manuskript**

Article

α 2-Adrenergic Receptor in Liver Fibrosis: Implications for the Adrenoblocker Mesedin

Ute A. Schwinghammer ¹, Magda M. Melkonyan ², Lilit Hunanyan ², Roman Tremmel ³ , Ralf Weiskirchen ⁴ , Erawan Borkham-Kamphorst ⁴, Elke Schaeffeler ³, Torgom Seferyan ⁵, Wolfgang Mikulits ⁶ , Konstantin Yenkovyan ⁷ , Matthias Schwab ^{1,3,7,8} and Lusine Danielyan ^{1,*}

¹ Department of Clinical Pharmacology, University Hospital of Tuebingen, 72076 Tuebingen, Germany; schwinghammer.ute@gmail.com (U.A.S.); Matthias.Schwab@ikp-stuttgart.de (M.S.)

² Department of Medical Chemistry, Yerevan State Medical University, 0025 Yerevan, Armenia; magda.melkonyan@meduni.am (M.M.M.); h-lilit@live.com (L.H.)

³ Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institute of Clinical Pharmacology, 70376 Stuttgart, Germany, and University of Tuebingen, 72074 Tuebingen, Germany; Roman.Tremmel@ikp-stuttgart.de (R.T.); Elke.Schaeffeler@ikp-stuttgart.de (E.S.)

⁴ Institute of Molecular Pathobiochemistry, Experimental Gene Therapy and Clinical Chemistry, RWTH University Hospital Aachen, 52074 Aachen, Germany; rweiskirchen@ukaachen.de (R.W.); eborkham@ukaachen.de (E.B.-K.)

⁵ H. Buniatian Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of the Republic of Armenia (NAS RA), 0014 Yerevan, Armenia; seferyant@yahoo.com

⁶ Department of Medicine I, Institute of Cancer Research, Comprehensive Cancer Center, Medical University of Vienna, 1090 Vienna, Austria; wolfgang.mikulits@meduniwien.ac.at

⁷ Department of Biochemistry and Neuroscience Laboratory, Yerevan State Medical University, 0025 Yerevan, Armenia; konstantin.yenkovyan@meduni.am

⁸ Department of Biochemistry and Pharmacy, University of Tuebingen, 72076 Tuebingen, Germany

* Correspondence: lusine.danielyan@med.uni-tuebingen.de; Tel.: +49-7071-2974926

Received: 2 January 2020; Accepted: 13 February 2020; Published: 18 February 2020



Abstract: The noradrenergic system is proposed to play a prominent role in the pathogenesis of liver fibrosis. While α 1- and β -adrenergic receptors (ARs) are suggested to be involved in a multitude of profibrogenic actions, little is known about α 2-AR-mediated effects and their expression pattern during liver fibrosis and cirrhosis. We explored the expression of α 2-AR in two models of experimental liver fibrosis. We further evaluated the capacity of the α 2-AR blocker mesedin to deactivate hepatic stellate cells (HSCs) and to increase the permeability of human liver sinusoidal endothelial cells (hLSECs). The mRNA of α 2a-, α 2b-, and α 2c-AR subtypes was uniformly upregulated in carbon tetrachloride-treated mice vs the controls, while in bile duct-ligated mice, only α 2b-AR increased in response to liver injury. In murine HSCs, mesedin led to a decrease in α -smooth muscle actin, transforming growth factor- β and α 2a-AR expression, which was indicated by RT-qPCR, immunocytochemistry, and Western blot analyses. In a hLSEC line, an increased expression of endothelial nitric oxide synthase was detected along with downregulated transforming growth factor- β . In conclusion, we suggest that the α 2-AR blockade alleviates the activation of HSCs and may increase the permeability of liver sinusoids during liver injury.

Keywords: α 2-adrenoceptors; norepinephrine; mesedin; hepatic stellate cells; sinusoidal endothelial cells; liver fibrosis; sinusoidal permeability

1. Introduction

Chronic liver disease leads to the dysregulation of various neuroendocrine systems, including the adrenergic system. A significant systemic increase in norepinephrine (NE) and epinephrine in patients with liver cirrhosis and portal hypertension has been known since the 1980s (for a review, see Reference [1]). Moreover, NE was reported to exert strong profibrogenic effects in the liver and in hepatic stellate cells (HSCs) in vitro [2] and in vivo [3]. Despite this evidence of the strong involvement of the noradrenergic system in the pathogenesis of liver fibrosis, the functional role of the α -adrenergic receptors (α -ARs) remains largely unexplored. The vasoactive effects of adrenergic receptors on portal hypertension can consequently accelerate the progression of hepatic fibrosis. Moreover, the fact that the majority of parenchymal and nonparenchymal cells in the liver do express the main subclasses of adrenergic receptors, including α 2-AR [4–7], hint at the potential direct effects of this system at the cellular level. Among the adrenergic receptors, the α 2 adrenergic receptor (α 2-AR) subclass has been rarely investigated in the liver. Idazoxan, the main classic α 2-adrenoblocker, has been shown to exert protective antifibrotic features in experimental liver fibrosis [8]. Thus, it is of potential interest to elucidate the mechanisms behind the antifibrogenic effects of the α 2-AR blockade in general and to explore the potential therapeutic value of the novel α 2-adrenoblocker mesedin in liver fibrosis/cirrhosis in particular. Mesedin has been previously shown to possess neuroprotective features in vivo and in vitro. In a model of focal ischemia, mesedin improved memory and anxiety symptoms and decreased oxidative stress markers in brain tissue [9,10]. In astroglial primary culture of normal and Alzheimer's mouse model (3xTg-AD) brains, the increased survival of neurons, upregulated neurogenesis markers, and anti-inflammatory cytokines have been observed upon treatment with mesedin [11].

The role of α -ARs in healthy and diseased livers has been controversial in the literature. The sympathetic nervous system has been suggested to control oxidative stress during carbon tetrachloride (CCl_4) induced liver injury through α -adrenergic signaling. This is evidenced by the protective effects of a nonselective α 1 and α 2 blocker (phentolamine) in CCl_4 -treated mice, which were reflected by decreased tissue necrosis, lactate dehydrogenase (LDH), liver enzymes, and hepatic lipid peroxidation [12].

Several profibrogenic factors are controlled by NE in liver cells. NE stimulates tumor necrosis factor- α (TNF α) secretion from Kupffer cells, which is inhibited by the α 2-AR inhibitor yohimbine [4,7]. NE induces human hepatic stellate cell (HSC) proliferation and increases the expression of collagen-1 α 2 via transforming growth factor- β (TGF β) [13]. On the other hand, both deleterious and protective effects from the α 2-AR blockade have been reported in experimental models of liver injury. Xuanfei and colleagues demonstrated protection against the progression of hepatic fibrosis by the α 2-AR blocker idazoxan [8]. In contrast, a recent in vivo study by Sha and colleagues showed that the antiapoptotic and antioxidative effects of the α 2-AR agonist dexmedetomidine in the livers of rats with lipopolysaccharide-induced oxidative stress are reversed by the α 2-AR antagonist atipamezole [14].

In light of the aforementioned controversial discussion around the role of α 2-ARs in liver fibrosis/cirrhosis, we sought to investigate the influence of the novel α 2-AR blocker mesedin (2-(2-methyl-amino-thiazolyl)-1,4-benzodioxane hydrochloride) [15] on the two main nonparenchymal liver cell types, hepatic stellate cells and liver sinusoidal endothelial cells, which are key players in the fibrotic reorganization of liver tissue and the permeability of the blood-tissue barrier during cirrhosis. Mesedin was used as a novel α 2-adrenoblocker because of its selectivity to α 2-adrenoreceptors and its lower toxicity compared to known structural analogs, such as idazoxan (as previously discussed in Reference [11]). Notably, the levels of α 1-, β 1-, and β 2-AR have been previously assessed in HSCs in vitro [16], while the influence of liver injury and HSC activation on α 2-AR expression remains largely unexplored. Therefore, the levels of α 2-AR were analyzed in the livers of mice with CCl_4 - or bile duct ligation (BDL)-induced fibrosis and in culture-activated HSCs with and without the α 2 blocker mesedin.

2. Materials and Methods

2.1. Cell Cultures

Murine HSCs (M1-4HSCs) and a human hepatic sinusoidal endothelial cell (hLSEC) line were grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) with high glucose (4.5 g/L) containing either 5% (for hLSECs) or 10% fetal calf serum (for M1-4HSCs), 1% nonessential amino acids (only for M1-HSCs), 100 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Germany). Cells were kept at 37 °C in an atmosphere containing 5% CO₂.

For Western blot analyses, M1-4HSCs and hLSECs were seeded into 150-cm² culture flasks at a density of 2 × 10⁶ cells/flask. To culture the hLSECs, flasks precoated with collagen 1 (ME04043, Corning, Kennebunk, ME, USA) were used. After 24 h, adherent cells were incubated for 48 h with or without 10 µM mesedin (dissolved in phosphate-buffered saline). Mesedin has been previously characterized as a selective α₂-AR blocker [15].

For immunofluorescence analyses, M1-4HSCs and hLSECs were placed on coverslips in a petri dish at a density of 100,000 cells/coverslip. For hLSECs, the cover slips were precoated with collagen 1. After 24 h, adherent cells were incubated for 48 h with or without 10 µM mesedin.

2.2. Animal Models

All animal experiments were approved by the Local Institutional Committee for Animal Welfare in Aachen (LANUV, approval number: Az. 84-02.04.2012.A092, Recklinghausen, Germany). For chronic liver injury tests, we employed 6–8-week-old female C57BL/6J mice (Charles River, Sulzfeld, Germany), which were subjected to an intraperitoneal injection of 0.8 µL/g body weight CCl₄ in mineral oil or vehicle twice weekly for 4 weeks, as described previously [17]. The mice were then euthanized and sacrificed under isoflurane, and blood samples were taken for standard liver function tests. Liver specimens were snap-frozen in liquid nitrogen and kept at –80 °C for protein and RNA isolation.

For BDL, eight-week-old male C57BL/6J mice were used. The animals were separated into BDL and sham-operated (SO) groups (*n* = 6 each). A common BDL procedure was performed following standardized protocols [18]. After 4 weeks, the mice were sacrificed, and the livers were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at –80 °C.

2.3. RNA Isolation and Quantification

High-quality RNA from mouse liver tissue or mouse M1-4HSCs was extracted using a mirVana miRNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Per sample, 1 µg of total RNA was transcribed to cDNA using a high-capacity cDNA reverse transcription kit with an RNase inhibitor (according to the manufacturer's instructions) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). cDNA measurements of α-smooth muscle actin (α-SMA) and the α₂-AR subtypes α_{2a}-, α_{2b}-, and α_{2c}-AR (encoded by *Adra2a*, *Adra2b*, and *Adra2c* as well as *Gapdh* (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) as a housekeeping gene) were performed using a 7900 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) and predesigned TaqMan gene expression assays (see Table 1; Thermo Fisher Scientific). The ΔΔCT-method (relative expression difference between the cycle threshold of treatment vs control) [19] was applied to calculate the relative quantity (RQ) of target gene mRNA normalized to GAPDH.

Table 1. TaqMan gene expression assays used for the mRNA analysis.

Gene Alias	Gene Symbol	RefSeq	Assay ID
α-SMA	<i>Acta2</i>	NM_007392.3	Mm01204962_gH
α _{2a} -AR	<i>Adra2a</i>	NM_007417.4	Mm00845383_s1
α _{2b} -AR	<i>Adra2b</i>	NM_009633.3	Mm00477390_s1
α _{2c} -AR	<i>Adra2c</i>	NM_007418.3	Mm00431686_s1
GAPDH	<i>Gapdh</i>	NM_008084.3; NM_001289726.1	Mm99999915_g1

2.4. Western Blot Analysis

For homogenization of the liver tissue and harvested cells, ice cold lysis buffer (300 mM NaCl, 50 mM Tris, 2 mM MgCl₂, 0.5% NP40) containing “complete protease inhibitor” (Roche, Mannheim, Germany) was used. A DC Protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) was employed to determine the total protein amount. Proteins were fractionated by SDS/PAGE (12% acrylamide) and transferred onto PVDF (Polyvinylidene fluoride) membranes (EMD Millipore, Billerica, CA, USA). Membranes were then blocked in 5% BSA (bovine serum albumin) (Albumin Fraction V, protease-free, Roth, Germany) in TBST (Tris-buffered saline with Tween20) for 1 h and incubated overnight at 4 °C with primary antibodies diluted in 5% BSA (see Table 2). Membranes were incubated with Cy3/Cy5-conjugated antibodies for 3 h at room temperature (RT) to visualize the antibody binding. Protein bands were detected by fluorescence detection systems (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Densitometric analyses and imaging were performed with a VersaDoc™ 4000 MP imaging system (Bio-Rad). Data were normalized to the respective densitometric values of the loading controls (GAPDH).

Table 2. Antibodies used for Western blot and immunofluorescence analyses.

Antibody	Catalog Number	Supplier
α-SMA (Western) (rabbit monoclonal)	ab124964	abcam, Cambridge, UK
α-SMA (IHC) (mouse monoclonal)	61001	Progen, Heidelberg, Germany
TGF-β (rabbit polyclonal)	ab92486	abcam
α2a-AR (rabbit polyclonal)	SAB4500548	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany
α1-AR (rabbit polyclonal)	ab3462	abcam
eNOS (rabbit monoclonal)	#32027	Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main, Germany
PDGF-AA (rabbit polyclonal)	ab135881	abcam
Goat antimouse IgG Fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated (polyclonal)	115-095-003	Jackson ImmunoResearch, Ely, UK
Goat antirabbit IgG Cy3-conjugated (polyclonal)	111-165-144	Jackson ImmunoResearch
Goat antirabbit Cy3-conjugated (monoclonal)	28901106V	GE Healthcare UK Ltd., Amersham, Little Chalfont, UK
Goat antimouse Cy5-conjugated (monoclonal)	PA45009V	GE Healthcare UK Ltd.

2.5. Immunofluorescence Analyses

For immunofluorescence analyses, hLSECs and M1-4HSCs were each grown on coverslips and incubated with or without mesedin, as described in Section 2.1. The cells were then fixed in 4% Paraformaldehyde (PFA) for 15 min, washed 3 times with PBS, and incubated for 1 h at RT (Table 2). Antibodies were diluted in PBS. After incubation with primary antibodies, cells were washed 3 times with PBS, incubated with a corresponding fluorochrome-linked secondary antibody in the dark for 1 h at RT, and then washed twice with PBS and once with PBS containing 0.1% Triton® X-100 (Sigma, Taufkirchen, Germany). The cells were then covered with Vectashield mounting medium (Vector Laboratories Burlingame, Burlingame, CA, USA) containing 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and were dried and stored at −20 °C. As for negative controls, samples were treated with secondary antibodies only.

Immunofluorescence staining was evaluated by fluorescence microscopy using an Olympus BX51 Microscope (Olympus Optical Co. Europe, Hamburg, Germany). Images were acquired using the digital camera F-View II and processed by the software Analysis DOKU® (Soft Imaging System GmbH, Leinfelden-Echterdingen, Germany).

Primary and secondary antibodies were applied in concentrations in accordance with the manufacturer's information.

2.6. Statistical Analyses

Data were analyzed using two-tailed Student's *t*-test with GraphPad Prism Software (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA). A threshold of $p < 0.05$ was considered significant.

3. Results

3.1. $\alpha 2$ Receptors are Upregulated in Fibrotic/Cirrhotic Livers

To study the impact of fibrotic/cirrhotic injury on hepatic $\alpha 2$ -AR expression, we analyzed three main subtypes of $\alpha 2$ -ARs ($\alpha 2a$, $\alpha 2b$, and $\alpha 2c$) using qPCR in the livers of mice four weeks after BDL or CCl₄ treatment vs the respective controls (Figure 1A–F). While all three receptor subtypes were uniformly upregulated after CCl₄-induced fibrosis (cf. ctrl. vs CCl₄ in Figure 1A–C), only $\alpha 2b$ -AR was significantly higher than the control group in terms of BDL (Figure 1E).

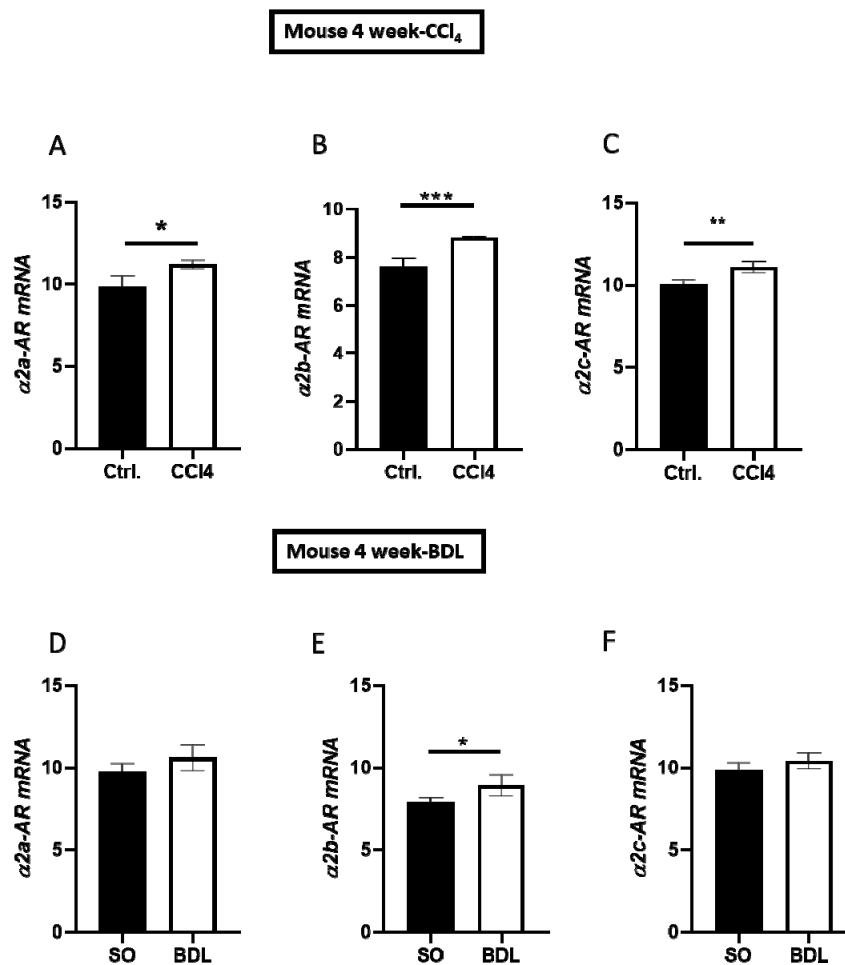


Figure 1. Expression of $\alpha 2$ adrenergic receptor ($\alpha 2$ -AR) subtypes in carbon tetrachloride (CCl₄)-treated and bile duct-ligated (BDL) mouse models of liver fibrosis/cirrhosis. (A–C) Expression of $\alpha 2a$ -AR, $\alpha 2b$ -AR, and $\alpha 2c$ -AR mRNA in liver tissues from mice treated with CCl₄ and controls, measured after 4 weeks using RT-qPCR. (D–F) Hepatic expression of $\alpha 2a$ -AR, $\alpha 2b$ -AR, and $\alpha 2c$ -AR in mice after 4 weeks of BDL vs a sham operation (SO), measured using RT-qPCR. mRNA levels are shown as the mean \pm standard error of the mean (SEM) ($n = 4$). Differences between both groups were analyzed using Student's *t*-test. Statistical significance is indicated as follows: $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**); $p < 0.001$ (***)

3.2. Mesedin Decreased the Expression of $\alpha 1$, $\alpha 2a$, and $\alpha 2b$ Receptors in HSCs

Next, we assessed the influence of mesedin, mediated by $\alpha 2$ blockade, on the expression of $\alpha 2$ receptors in HSCs in vitro. We used M1-4HSC cells, which displayed key features of the intermediate activation of HSCs, which were reflected by α -smooth muscle actin (α -SMA), pro-collagen I expression, and the capacity to undergo a TGF- β -induced transition into a myofibroblastic cell type [20]. In M1-4HSCs, a tendency for a decreased number of $\alpha 1$ -positive cells was observed in mesedin-treated

cultures (Figure 2A,B). A quantification of $\alpha 1$ -positive cells determined that this difference was statistically significant (Figure 2E). The expression of $\alpha 2$ -AR was also significantly downregulated by mesedin, which was reflected by reduced intensity in the staining (Figure 2C,D) and by the number of $\alpha 2$ -positive M1-4HSCs (Figure 2F). A densitometric analysis of the $\alpha 2a$ -AR Western blot (Figure 2G) revealed a decrease in the ~ 70 -kDa band, which most likely represented a homodimer or glycosylated $\alpha 2a$ -AR [21], whereas the $\beta 2$ -AR expression in mesedin-treated cells was equal to that of the control.

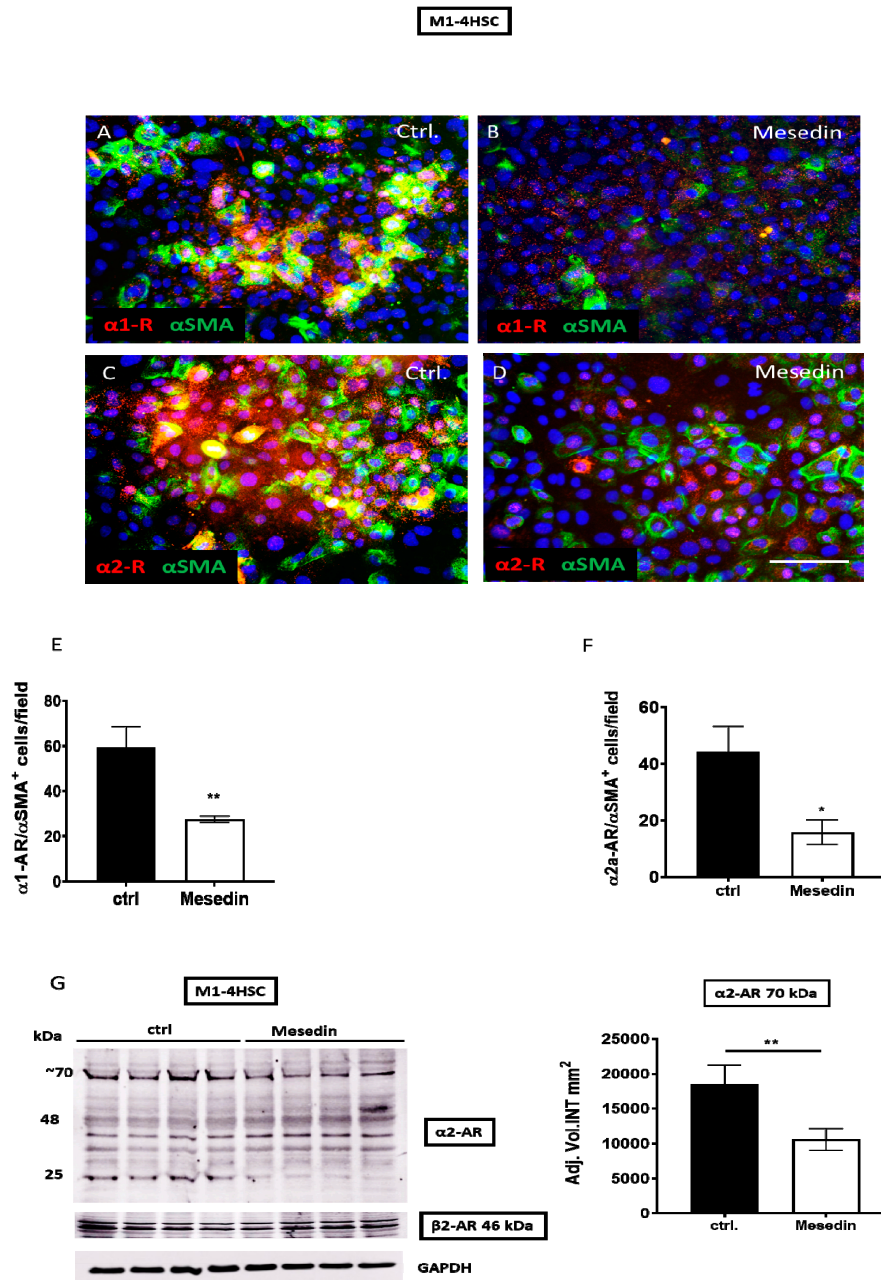


Figure 2. Influence of mesedin on the expression of α -adrenergic receptors in murine hepatic stellate cells (M1-4HSCs). (A–D) Immunofluorescence analysis of $\alpha 1/\alpha$ -ARs (red) and α -SMA (green) in M1-4HSCs treated with 10 μ M mesedin vs untreated controls (ctrl.). The scale bar corresponds to 100 μ m, and the cell nuclei were stained with DAPI. (E,F) Quantification of $\alpha 1$ -AR⁺/ α -SMA⁺ and $\alpha 2$ -AR/ α -SMA⁺ M1-4HSCs upon incubation with mesedin vs the control (ctrl.). (G) Western blot and densitometric analysis of $\alpha 2$ -AR and $\beta 2$ -AR in M1-4HSCs with and without mesedin. Student's *t*-test, $n = 4$, $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**).

At the mRNA level, only the $\alpha 2a$ and $\alpha 2b$ receptors were significantly decreased in mesedin-treated M1-4HSCs (Figure 3A,B), while $\alpha 2c$ -AR remained unchanged (Figure 3C).

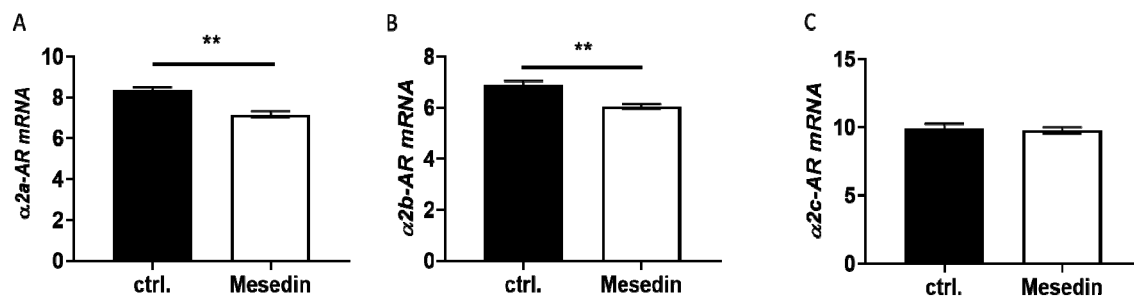


Figure 3. Altered expression of $\alpha 2$ -AR in M1-4HSCs due to mesedin-treatment. (A–C) Quantification of three major subtypes of $\alpha 2$ -AR ($\alpha 2a$ -AR, $\alpha 2b$ -AR, and $\alpha 2c$ -AR) under mesedin treatment in comparison to control cultures (ctrl.) using RT-qPCR. Student's *t*-test, $n = 6$, $p < 0.01$ (**).

3.3. Antifibrotic Effects of Mesedin

The decrease in α -receptors was concomitant with the downregulation of α -SMA mRNA (Figure 4A) and a reduced number of α -SMA-positive M1-4HSCs treated with mesedin (Figure 4B). These data were also confirmed by reduced α -SMA protein expression in the Western blot analysis (Figure 4C).

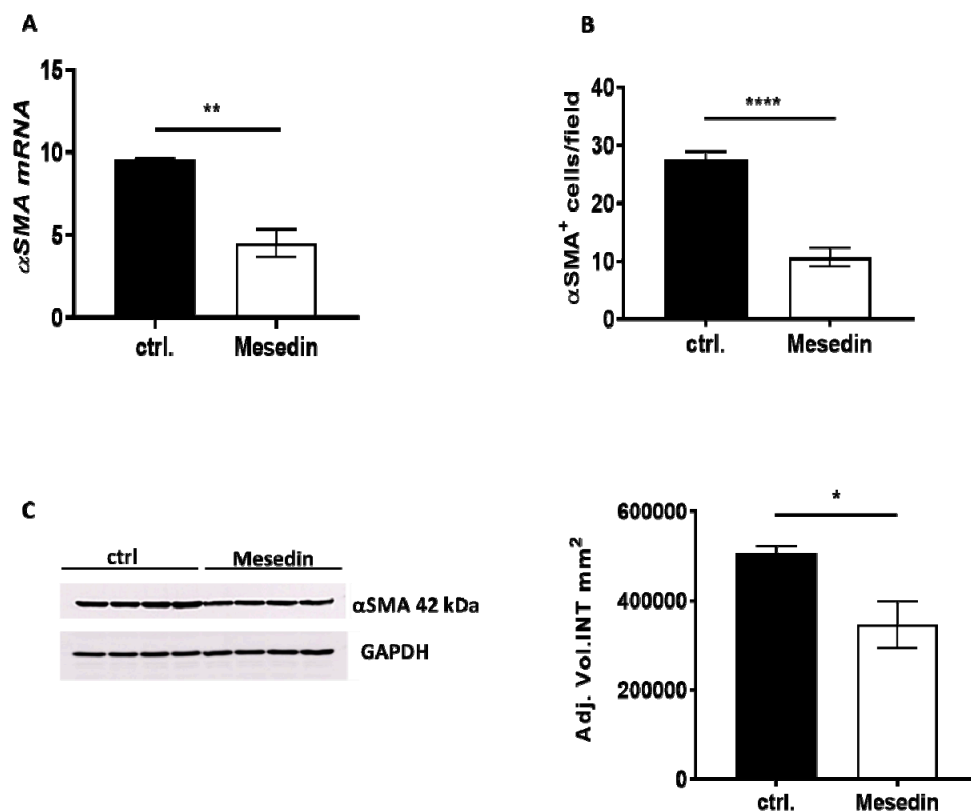


Figure 4. Influence of mesedin on α -smooth muscle actin (α -SMA) expression in M1-4HSCs. (A) Quantification of α -SMA mRNA in mesedin-treated M1-4HSCs vs controls (ctrl.), $n = 6$. (B) Quantification of α -SMA⁺ M1-4HSCs with and without mesedin, $n = 5$. (C) Western blot and densitometric analysis of α -SMA in M1-4HSCs treated with mesedin, $n = 4$. Student's *t*-test; data are shown as the mean \pm SEM, $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.0001$ (****).

Immunofluorescence and Western blot analyses revealed a decrease in TGF- β / α -SMA-positive HSCs (cf. ctrl. vs mesedin in Figure 5A) and in the expression level of the protein in mesedin-treated HSCs (Figure 5B). PDGF was equally expressed in mesedin-treated cells compared to the control (Figure 5C).

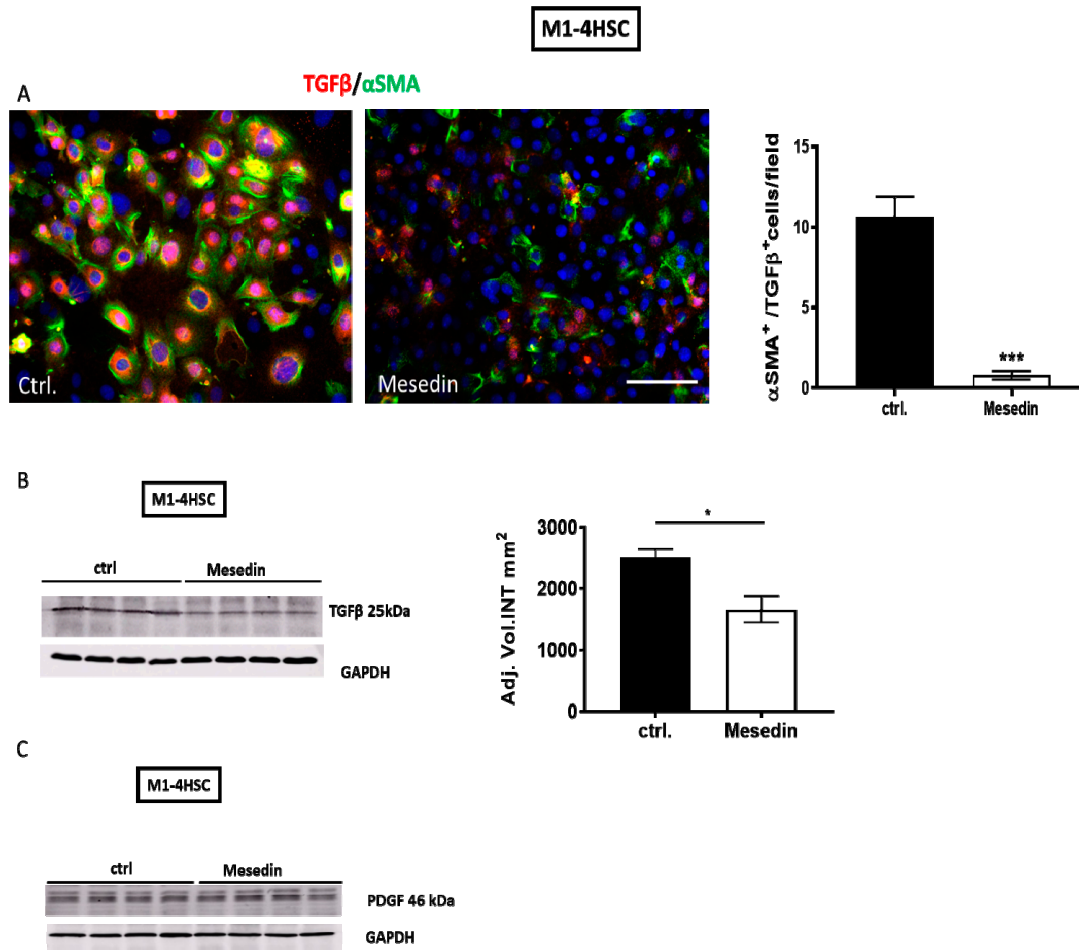


Figure 5. Transforming growth factor- β (TGF- β) and platelet-derived growth factor (PDGF) expression in mesedin-treated M1-4HSCs. (A) TGF- β (red) and α -SMA (green) staining of M1-4HSCs under control conditions (ctrl.) and incubation with mesedin. Cell nuclei were stained with DAPI; scale bar 100 μ m. Quantification of α -SMA/TGF- β -positive M1-4HSCs ($n = 9$, $p < 0.001$ (***), Student's t -test; data shown as the mean \pm SEM). (B) TGF- β expression as analyzed by Western blot and a corresponding densitometric analysis of M1-4HSCs treated with mesedin vs the control (ctrl.) ($n = 4$, $p < 0.05$ (*), Student's t -test, data shown as the mean \pm SEM). (C) PDGF Western blot of M1-4HSCs with and without mesedin (ctrl.), $n = 4$.

3.4. Influence of the α 2 Blockade on Permeability Marker Expression in hLSECs

Acknowledging the importance of liver sinusoidal endothelial cell fenestration in the maintenance of normal liver function and its decrease during fibrosis/cirrhosis [22], we investigated the role of α 2-ARs in the permeability and differentiation of hLSECs [23]. Here, hLSECs incubated with mesedin enhanced the expression of eNOS (Figure 6A,B). Interestingly, the high level of eNOS coincided with the decreased intensity of α 1- and α 2-receptors in hLSECs (Figure 6B). Finally, given that TGF- β produced by hLSECs may contribute to the activation of HSCs and may negatively influence the differentiation of hLSECs, we analyzed the impact of mesedin on TGF- β expression in hLSECs. Western blot analyses demonstrated decreased active TGF- β (25kDa) in mesedin-treated hLSECs (Figure 6C).

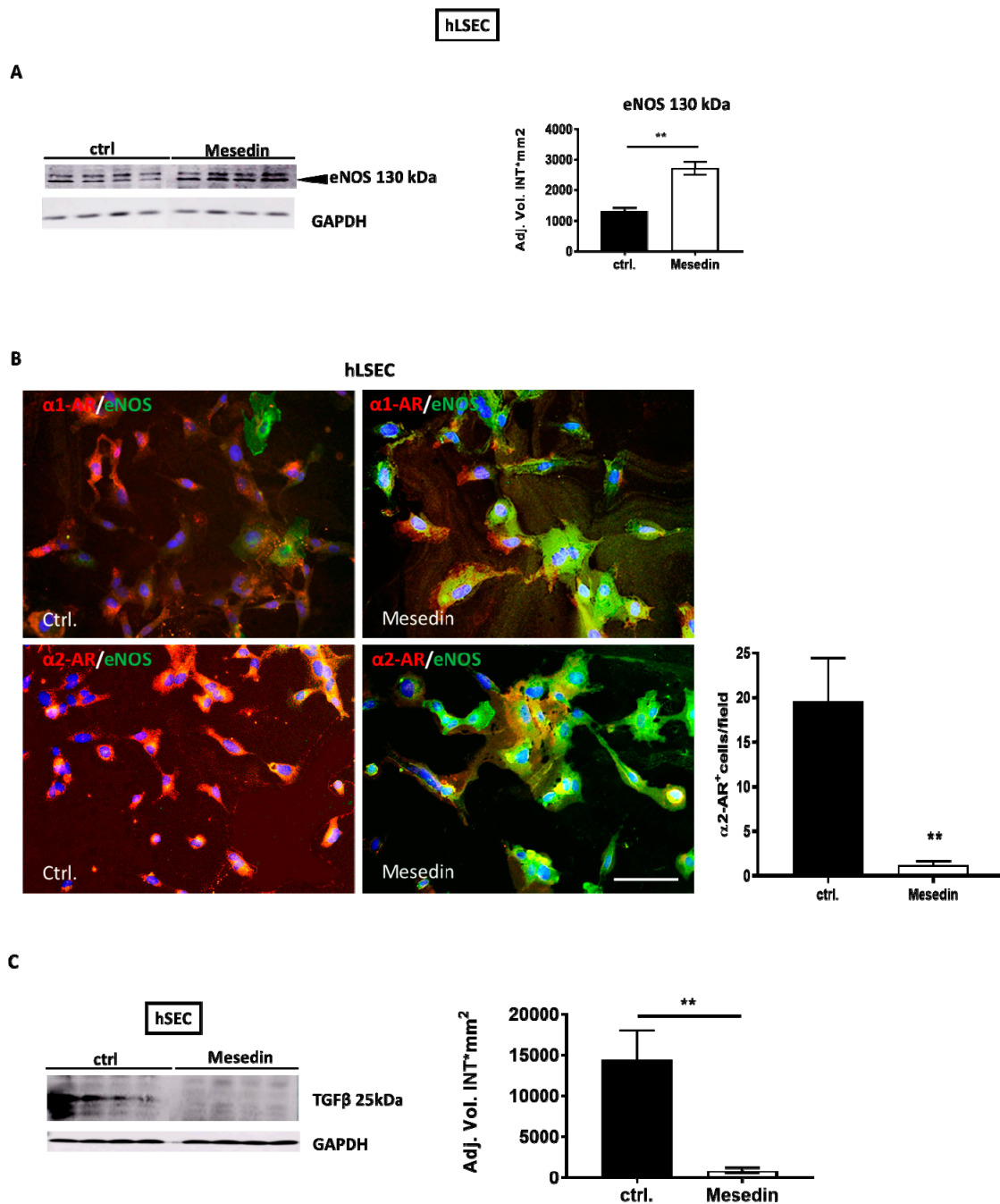


Figure 6. Impact of mesedin on the permeability of human liver sinusoidal endothelial cells (hLSECs). (A) Western blot and densitometric analysis of eNOS in hLSECs with and without (ctrl.) mesedin, $n = 4$. (B) Immunofluorescence analysis of $\alpha 1$ -AR vs $\alpha 2$ -AR (red) and eNOS (green) in hLSECs. Cell nuclei were stained with DAPI. Scale bar corresponds to 100 μ m. Quantification of $\alpha 2$ -AR-positive cells in hLSECs ($n = 6$, $p < 0.01$ (**), Student's t -test, data shown as the mean \pm SEM). (C) Western blot and densitometric analysis of TGF- β in hLSECs 48 h after incubation with and without (ctrl.) mesedin. Student's t -test, $p < 0.01$ (**).

4. Discussion

The present study reports for the first time the antifibrotic effects of the novel $\alpha 2$ -AR blocker, mesedin, in HSCs and its capacity to increase the permeability marker eNOS in hLSECs. In chronic CCl₄-induced fibrosis, all subtypes of $\alpha 2$ -AR ($\alpha 2a$, $\alpha 2b$, and $\alpha 2c$) were increased. In contrast, in acute

BDL-caused injury, only $\alpha 2b$ was elevated. HSCs responded to mesedin with a decrease in key fibrotic markers such as TGF- β and α -SMA. Notably, a concomitant downregulation in $\alpha 2a$ -AR and $\alpha 1$ -AR was detected in mesedin-treated HSCs. These data may reflect that $\alpha 2a$ -AR and $\alpha 1$ -AR are at least partially involved in the profibrogenic action of NE, which is produced and released by HSCs [2]. HSCs have been previously shown to possess $\alpha 1$ -AR, $\beta 1$ -AR, and $\beta 2$ -AR [2]. In addition, during liver fibrosis, only $\alpha 1$ -AR and β -AR have been shown to be altered by fibrotic injury in vivo, whereas the involvement of $\alpha 2$ -AR remained unexplored. $\alpha 1$ -AR is decreased in the liver of patients with liver cirrhosis and portal hypertension [24], while $\beta 3$ -AR is markedly upregulated in a CCl₄ model of fibrosis and patients with cirrhosis [25]. Studies using the antagonists of $\alpha 1$ -AR and β -AR have hinted at the protective features of the $\alpha 1$ and $\beta 2$ blockade, which in turn has unveiled the role of these receptors in the progression of liver fibrosis [26]. Mesedin appears not only to block $\alpha 2$ -AR specifically, but also to reduce the de novo production of $\alpha 2$ -AR. Thus, mesedin may exert its antifibrogenic effects via at least two different actions that may, each alone or together, contribute to HSC deactivation: i) via the decrease of $\alpha 2$ -AR expression and ii) via the direct blockade of $\alpha 2$ -AR.

The $\alpha 2$ -AR blockade (in other nonparenchymal cells) has been reported to influence the generation and release of profibrogenic factors. The direct activation of $\alpha 2$ -AR by NE has led to a dramatic increase in TNF α in Kupffer cells, which was reversed by the $\alpha 2$ -AR antagonist yohimbine [7]. Our data showing a decrease in the key fibrotic marker TGF- β due to mesedin in HSCs hint at the profibrogenic features of $\alpha 2$ -AR in HSCs. Besides decreased TGF- β , the deactivation of HSCs by mesedin was confirmed by α -SMA downregulation, which was shown at the RNA and protein level. To date, the modulation of TGF- β by NE in different cell types has been primarily ascribed to $\alpha 1$ -AR, as shown in primary rat hepatocyte cultures [27] or in the ventricular myocardium of female and male Sprague–Dawley rats, where the NE-induced expression of the mRNA of all TGF isoforms and type I and type III collagen was reduced by the $\alpha 1$ -adrenoceptor blockade [28].

PDGF has been shown to desensitize $\alpha 1$ -AR through phosphorylation [29]. Mesedin did not alter the production of PDGF in the HSCs; however, in the hLSECs it appeared to decrease the intensity of $\alpha 1$ -AR expression. In the context of previous findings reporting a decrease in the $\alpha 1$ -AR density in rat lung membranes in response to the NO donor compound S-nitrosoglutathione [30], our data hint at a link between the eNOS and $\alpha 1$ -AR expression level in endothelial cells. Future studies employing the inhibitors of NOS may confirm the crosstalk between $\alpha 2$ - and $\alpha 1$ -AR via NO.

The notion that NE substantially contributes to the progression of liver fibrosis is supported by reports showing elevated levels of NE during nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) or after sepsis or hemorrhagic shock [13,31]. In addition, exogenous NE stimulates proliferation of HSCs, leading to hepatocellular dysfunction [13]. In NAFLD, the expression of $\alpha 1$ -, $\beta 1$ -, $\beta 2$ -, and $\beta 3$ -AR is dependent on the stage of fibrosis/cirrhosis: while in an early stage of fibrosis, these receptors are decreased, in progressive fibrosis/cirrhosis, they are markedly upregulated [13]. Moreover, $\beta 1$ -AR has been suggested as being involved in the development of nonalcoholic steatohepatitis [32], while $\alpha 2$ -AR remains uninvestigated.

One of the most important hallmarks of liver fibrosis/cirrhosis is the decrease in sinusoidal endothelial cell permeability [22]. In mesedin-treated hLSECs, the permeability marker eNOS increases concomitantly with the downregulation of TGF β . Endothelial dysfunction is characterized by the decreased bioavailability of NO in cirrhotic livers, suggesting that NO as a possible target for the treatment of liver fibrosis [33,34]. Notably, the inhibition of collagen I, α -SMA, and fibrogenic genes in HSCs has previously been observed in primary rat liver and human activated HSCs treated with nanoparticles containing NO donor molecules releasing NO [35]. Thus, the restoration of eNOS activity in mesedin-treated cells can be considered to be a valuable strategy for NO induction in hLSECs. In contrast to other nonparenchymal cells of the liver, the expression of $\alpha 2$ -AR in hLSECs remains unexplored. $\alpha 2$ -AR expression has been reported in HSCs, Kupffer cells, hepatocytes [4–7], and endothelial cells of extrahepatic origin [1,36]. The $\alpha 2$ -AR-mediated modulation of NO generation by endothelial cells has been recently proven by Chen et al., showing a decrease in renal NO/inducible

NOS (iNOS) in response to the α 2-AR agonist dexmedetomidine [37]. However, other reports have suggested an NO-enhancing role for α 2-AR agonists, proposing different mechanisms for the crosstalk between α - and β -AR and endothelial NOS (for a review, see Reference [38]). Since the relaxation of endothelium induced by β -adrenergic agonists is prevented by inhibitors of NOS [38], one possible pathway for a mesedin-induced increase in eNOS, besides the direct deactivation of α 2-AR, can be via a NE effect on β -AR. In summary, previous findings along with our data demonstrating an increase in eNOS in hLSECs due to mesedin, hint at a role for α 2-AR in the regulation of NO production through either iNOS or eNOS, depending on the type of targeted cells.

Hypoxia has been shown to affect approximately one-third of patients with chronic liver disease and is considered to be a prognosis-worsening factor [39]. In mice, the hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) generated upon oxygen deprivation has been demonstrated to be a crucial factor in collagen cross-linking, contributing to liver fibrosis in NAFLD [40]. In neural cells, an α 2-AR blockade due to mesedin has led to the improved survival of astroglia, neurons, and neuronal progenitors, mediated partially by the upregulation of interleukin-10 (IL-10) [11]. Extrapolating this result to the progression of liver injury, it can be assumed that mesedin may exert its antifibrotic properties through IL-10, which is known to possess strong protective features in hepatocytes and to induce the senescence of activated HSCs [41,42]. By acknowledging the antihypoxic properties of mesedin in the central nervous system in vitro and in vivo [9–11], future investigations of mesedin's effects on parenchymal and nonparenchymal liver cells exposed to hypoxia can provide additional mechanistic insight into the function of hepatic α 2-AR and the feasibility of its blockade in the treatment of chronic liver injury.

Author Contributions: Conceptualization, L.D. and M.M.M.; investigation, U.A.S., L.H., R.T., E.S., E.B.-K., and T.S.; resources, M.S., K.Y., R.W., and W.M.; writing—original draft preparation, L.D., M.M.M., and U.A.S.; writing—review and editing, T.S., R.W., R.T., E.B.-K., W.M., K.Y., and M.S.; supervision, L.D.; funding acquisition, L.D., R.T., and M.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Interfaculty Centre for Pharmacogenomics and Pharma Research (ICEPHA) Graduate School of Tuebingen-Stuttgart, the Robert Bosch Stiftung, Stuttgart, Germany; and DAAD (German Academic Exchange Service).

Acknowledgments: The authors wish to thank Michael Glaser and Ursula Waldherr for the excellent technical support. We acknowledge support from the Open Access Publishing Fund of the University of Tübingen.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Henriksen, J.H.; Møller, S.; Ring-Larsen, H.; Christensen, N.J. The sympathetic nervous system in liver disease. *J. Hepatol.* **1998**, *29*, 328–341. [[CrossRef](#)]
2. Oben, J.A.; Roskams, T.; Yang, S.; Lin, H.; Sinelli, N.; Torbenson, M.; Smedh, U.; Moran, T.H.; Li, Z.; Huang, J.; et al. Hepatic fibrogenesis requires sympathetic neurotransmitters. *Gut* **2004**, *53*, 438–445. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Oben, J.A.; Roskams, T.; Yang, S.; Lin, H.; Sinelli, N.; Li, Z.; Torbenson, M.; Thomas, S.A.; Diehl, A.M. Norepinephrine induces hepatic fibrogenesis in leptin deficient ob/ob mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *308*, 284–292. [[CrossRef](#)]
4. Miksa, M.; Das, P.; Zhou, M.; Wu, R.; Dong, W.; Ji, Y.; Goyert, S.M.; Ravikumar, T.S.; Wang, P. Pivotal role of the α 2A-adrenoceptor in producing inflammation and organ injury in a rat model of sepsis. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e5504. [[CrossRef](#)]
5. Hoffman, B.B.; Dukes, D.F.; Lefkowitz, R.J. Alpha-adrenergic receptors in liver membranes: Delineation with subtype selective radioligands. *Life Sci.* **1981**, *28*, 265–272. [[CrossRef](#)]
6. Bylund, D.B. Subtypes of alpha-1 and alpha-2 adrenergic receptors. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **1992**, *2*, 229–230. [[CrossRef](#)]
7. Zhou, M.; Yang, S.; Koo, D.J.; Ornan, D.A.; Chaudry, I.H.; Wang, P. The role of Kupffer cell α 2-adrenoceptors in norepinephrine-induced TNF- α production. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Basis Dis.* **2001**, *1537*, 49–57. [[CrossRef](#)]








8. Xuanfei, L.; Hao, C.; Zhujun, Y.; Yanming, L.; Jianping, G. Imidazoline I2 receptor inhibitor idazoxan regulates the progression of hepatic fibrosis via Akt-Nrf2-Smad2/3 signaling pathway. *Oncotarget* **2017**, *8*, 21015–21030. [[CrossRef](#)]
9. Tananyan, A.; Balasanyan, M.P. 4.c.008 Prevention of focal ischemia induced memory deficit and anxiety by mesedin. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **2014**, *24*, S610. [[CrossRef](#)]
10. Tananyan, A.G.; Balasanyan, M.G.; Baykov, A.V.; Hovsepyan, L.M.; Ghazaryan, G.S. The effect of mesedin on the content of oxidative stress biomarkers in the brain tissue in ischemia. *Neurochem. J.* **2019**, *13*, 68–72. [[CrossRef](#)]
11. Melkonyan, M.M.; Hunanyan, L.; Lourhmati, A.; Layer, N.; Beer-Hammer, S.; Yenkovyan, K.; Schwab, M.; Danielyan, L. Neuroprotective, neurogenic, and amyloid beta reducing effect of a novel alpha 2-Adrenoblocker, mesedin, on astroglia and neuronal progenitors upon hypoxia and glutamate exposure. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Lin, J.C.; Peng, Y.J.; Wang, S.Y.; Lai, M.J.; Young, T.H.; Salter, D.M.; Lee, H.S. Sympathetic nervous system control of carbon tetrachloride-induced oxidative stress in liver through α -adrenergic signaling. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, *2016*, 3190617. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Sigala, B.; McKee, C.; Soeda, J.; Paziienza, V.; Morgan, M.; Lin, C.I.; Selden, C.; Vander Borgh, S.; Mazzoccoli, G.; Roskams, T.; et al. 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Sha, J.; Zhang, H.; Zhao, Y.; Feng, X.; Hu, X.; Wang, C.; Song, M.; Fan, H. Dexmedetomidine attenuates lipopolysaccharide-induced liver oxidative stress and cell apoptosis in rats by increasing GSK-3 β /MKP-1/Nrf2 pathway activity via the α 2 adrenergic receptor. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2019**, *364*, 144–152. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Vartanyan, S.O.; Avakyan, A.S.; Sargsyan, A.B.; Arutyunyan, S.A.; Noravyan, O.S.; Tsatinyan, A.S. Synthesis and biologic properties of new thiazolylbenzodioxane derivatives. *Russ. J. Org. Chem.* **2016**, *52*, 244–248. [[CrossRef](#)]
16. Garcia-Tsao, G. Beta blockers in cirrhosis: The window re-opens. *J. Hepatol.* **2016**, *64*, 532–534. [[CrossRef](#)]
17. Borkham-Kamphorst, E.; van de Leur, E.; Zimmermann, H.W.; Karlmark, K.R.; Tihaa, L.; Haas, U.; Tacke, F.; Berger, T.; Mak, T.W.; Weiskirchen, R. Protective effects of lipocalin-2 (LCN2) in acute liver injury suggest a novel function in liver homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Basis Dis.* **2013**, *1832*, 660–673. [[CrossRef](#)]
18. Tag, C.; Weiskirchen, S.; Hittatiya, K.; Tacke, F.; Tolba, R.; Weiskirchen, R. Induction of experimental obstructive cholestasis in mice. *Lab. Anim.* **2015**, *49*, 70–80. [[CrossRef](#)]
19. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408. [[CrossRef](#)]
20. Proell, V.; Mikula, M.; Fuchs, E.; Mikulits, W. The plasticity of p19ARF null hepatic stellate cells and the dynamics of activation. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.* **2005**, *1744*, 76–87. [[CrossRef](#)]
21. De Salamanca, A.E.; Siemasko, K.F.; Diebold, Y.; Calonge, M.; Gao, J.; Juárez-Campo, M.; Stern, M.E. Expression of muscarinic and adrenergic receptors in normal human conjunctival epithelium. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2005**, *46*, 504–513. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Deleve, L.D. Liver sinusoidal endothelial cells in hepatic fibrosis. *Hepatology* **2015**, *61*, 1740–1746. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Yoshida, M.; Nishikawa, Y.; Omori, Y.; Yoshioka, T.; Tokairin, T.; McCourt, P.; Enomoto, K. Involvement of signaling of VEGF and TGF- β in differentiation of sinusoidal endothelial cells during culture of fetal rat liver cells. *Cell Tissue Res.* **2007**, *329*, 273–282. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Zhu, J.; Chen, L.; Leng, X.; Du, R. Expression of alpha1 adrenoceptor subtypes mRNA in hepatic tissues of cirrhotic patients with portal hypertension. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* **2000**, *38*, 325–328.
25. Trebicka, J.; Hennenberg, M.; Pröbsting, A.S.; Laleman, W.; Klein, S.; Granzow, M.; Nevens, F.; Zaagsma, J.; Heller, J.; Sauerbruch, T. Role of β 3-adrenoceptors for intrahepatic resistance and portal hypertension in liver cirrhosis. *Hepatology* **2009**, *50*, 1924–1935. [[CrossRef](#)]

26. Muñoz-Ortega, M.H.; Llamas-Ramírez, R.W.; Romero-Delgadillo, N.I.; Elías-Flores, T.G.; De Jesus Tavares-Rodríguez, E.; Del Rosario Campos-Esparza, M.; Cervantes-García, D.; Muñoz-Fernández, L.; Gerardo-Rodríguez, M.; Ventura-Juárez, J. Doxazosin treatment attenuates carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in hamsters through a decrease in transforming growth factor β secretion. *Gut Liver* **2016**, *10*, 101–108. [[CrossRef](#)]
27. Fabregat, I.; Moreno-Càceres, J.; Sánchez, A.; Dooley, S.; Dewidar, B.; Giannelli, G.; ten Dijke, P. TGF- β signalling and liver disease. *FEBS J.* **2016**, 2219–2232. [[CrossRef](#)]
28. Briest, W.; Homagk, L.; Raßler, B.; Ziegelhoffer-Mihalovicova, B.; Meier, H.; Tannapfel, A.; Leiblein, S.; Saalbach, A.; Deten, A.; Zimmer, H.G. Norepinephrine-induced changes in cardiac transforming growth factor- β isoform expression pattern of female and male rats. *Hypertension* **2004**, *44*, 410–418. [[CrossRef](#)]
29. Medina, L.D.C.; Vazquez-Prado, J.; Garcia-SHIRSCH-ERNSTainz, J.A. Cross-talk between receptors with intrinsic tyrosine kinase activity and alpha1b-adrenoceptors [In Process Citation] 154 154. *Biochem. J.* **2000**, *350 Pt 2*, 413–419. [[CrossRef](#)]
30. Nozik-Grayck, E.; Whalen, E.J.; Stamler, J.S.; McMahon, T.J.; Chitano, P.; Piantadosi, C.A. S-nitrosoglutathione inhibits α 1-adrenergic receptor-mediated vasoconstriction and ligand binding in pulmonary artery. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* **2006**, *290*. [[CrossRef](#)]
31. Wang, P.; Tait, S.M.; Chaudry, I.H. Sustained elevation of norepinephrine depresses hepatocellular function. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Basis Dis.* **2000**, *1535*, 36–44. [[CrossRef](#)]
32. Ueta, C.B.; Fernandes, G.W.; Capelo, L.P.; Fonseca, T.L.; Maculan, F.D.A.; Gouveia, C.H.A.; Brum, P.C.; Christoffolete, M.A.; Aoki, M.S.; Lancellotti, C.L.; et al. β 1 Adrenergic receptor is key to cold-and diet-induced thermogenesis in mice. *J. Endocrinol.* **2012**, *214*, 359–365. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Vairappan, B. Endothelial dysfunction in cirrhosis: Role of inflammation and oxidative stress. *World J. Hepatol.* **2015**, *7*, 443–459. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Bosch, J.; Abraldes, J.G.; Fernández, M.; García-Pagán, J.C. Hepatic endothelial dysfunction and abnormal angiogenesis: New targets in the treatment of portal hypertension. *J. Hepatol.* **2010**, *53*, 558–567. [[CrossRef](#)]
35. Duong, H.T.T.; Dong, Z.; Su, L.; Boyer, C.; George, J.; Davis, T.P.; Wang, J. The use of nanoparticles to deliver nitric oxide to hepatic stellate cells for treating liver fibrosis and portal hypertension. *Small* **2015**, *11*, 2291–2304. [[CrossRef](#)]
36. Angus, J.A.; Cocks, T.M.; Satoh, K. The α adrenoceptors on endothelial cells. *Fed. Proc.* **1986**, *45*, 2355–2359.
37. Chen, Y.; Luan, L.; Wang, C.; Song, M.; Zhao, Y.; Yao, Y.; Yang, H.; Ma, B.; Fan, H. Dexmedetomidine protects against lipopolysaccharide-induced early acute kidney injury by inhibiting the iNOS/NO signaling pathway in rats. *Nitric Oxide-Biol. Chem.* **2019**, *85*, 1–9. [[CrossRef](#)]
38. Vanhoutte, P.M. Endothelial adrenoceptors. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2001**, *38*, 796–808. [[CrossRef](#)]
39. Rao, M.Y.; Raghu, J.; Deshmukh, S.; Amaravathi, K.S.; Sudhir, U. Arterial hypoxemia in patients with cirrhosis of liver. *J. Assoc. Physicians India* **2008**, *56*, 681–684.
40. Mesarwi, O.A.; Shin, M.K.; Bevans-Fonti, S.; Schlesinger, C.; Shaw, J.; Polotsky, V.Y. Hepatocyte hypoxia inducible factor-1 mediates the development of liver fibrosis in a mouse model of nonalcoholic fatty liver disease. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0168572. [[CrossRef](#)]
41. Abd-Elgawad, H.; Abu-Elsaad, N.; El-Karef, A.; Ibrahim, T. Piceatannol increases the expression of hepatocyte growth factor and IL-10 thereby protecting hepatocytes in thioacetamide-induced liver fibrosis. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **2016**, *94*, 779–787. [[CrossRef](#)]
42. Huang, Y.-H.; Chen, M.-H.; Guo, Q.-L.; Chen, Z.-X.; Chen, Q.-D.; Wang, X.-Z. Interleukin-10 induces senescence of activated hepatic stellate cells via STAT3-p53 pathway to attenuate liver fibrosis. *Cell. Signal.* **2020**, *66*, 109445. [[CrossRef](#)]



Article

Antifibrotic Effects of Amyloid-Beta and Its Loss in Cirrhotic Liver

Gayane Hrachia Buniatian ^{1,2,*}, Ralf Weiskirchen ³ , Thomas S. Weiss ⁴ , Ute Schwinghammer ¹, Martin Fritz ¹, Torgom Seferyan ², Barbara Proksch ¹, Michael Glaser ¹, Ali Lourhmati ¹, Marine Buadze ¹, Erawan Borkham-Kamphorst ³, Frank Gaunitz ⁵ , Christoph H. Gleiter ¹, Thomas Lang ⁶, Elke Schaeffeler ⁶, Roman Tremmel ⁶ , Holger Cynis ⁷, William H. Frey II ⁸ , Rolf Gebhardt ⁹, Scott L. Friedman ¹⁰ , Wolfgang Mikulits ¹¹ , Matthias Schwab ^{1,6,12,13} and Lusine Danielyan ^{1,13,*}

- ¹ Department of Clinical Pharmacology, University Hospital of Tübingen, 72076 Tübingen, Germany; schwinghammer.ute@gmail.com (U.S.); email.martinfritz@googlemail.com (M.F.); barbara.proksch@uni-tuebingen.de (B.P.); michael.glaser@uni-tuebingen.de (M.G.); alilourhmati@yahoo.de (A.L.); buadze@hotmail.com (M.B.); christoph.gleiter@med.uni-tuebingen.de (C.H.G.); Matthias.Schwab@ikp-stuttgart.de (M.S.)
 - ² H. Buniatian Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of the Republic of Armenia (NAS RA), Yerevan 0014, Armenia; seferyant@yahoo.com
 - ³ Institute of Molecular Pathobiochemistry, Experimental Gene Therapy and Clinical Chemistry, RWTH University Hospital Aachen, 52074 Aachen, Germany; rweiskirchen@ukaachen.de (R.W.); eborkham@ukaachen.de (E.B.-K.)
 - ⁴ Children's University Hospital (KUNO), University of Regensburg, 93053 Regensburg, Germany; Thomas.Weiss@klinik.uni-regensburg.de
 - ⁵ Department of Neurosurgery, University Hospital of Leipzig, 04103 Leipzig, Germany; Frank.Gaunitz@medizin.uni-leipzig.de
 - ⁶ Dr. Margarete Fischer-Bosch Institute of Clinical Pharmacology, 70376 Stuttgart, Germany, and University of Tuebingen, 72076 Tuebingen, Germany; Dr.Thomas.Lang@gmx.de (T.L.); Elke.Schaeffeler@ikp-stuttgart.de (E.S.); Roman.Tremmel@ikp-stuttgart.de (R.T.)
 - ⁷ Department of Drug Design and Target Validation, Fraunhofer Institute for Cell Therapy and Immunology, 06120 Halle, Germany; holger.cynis@izi.fraunhofer.de
 - ⁸ Center for Memory & Aging, HealthPartners Neuroscience Center, St. Paul, MN 55130, USA; alzheimr@umn.edu
 - ⁹ Rudolf-Schönheimer Institute of Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Leipzig, 04103 Leipzig, Germany; ivs.gebh@t-online.de
 - ¹⁰ Division of Liver Diseases, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY 10029-6574, USA; Scott.Friedman@mssm.edu
 - ¹¹ Department of Medicine I, Institute of Cancer Research, Comprehensive Cancer Center, Medical University of Vienna, Vienna 1090, Austria; wolfgang.mikulits@meduniwien.ac.at
 - ¹² Department of Pharmacy and Biochemistry, University of Tuebingen, 72076 Tuebingen, Germany
 - ¹³ Departments of Biochemistry and Clinical Pharmacology, and Neuroscience Laboratory, Yerevan State Medical University, Yerevan 0025, Armenia
- * Correspondence: buniatian@web.de (G.H.B.); lusine.danielyan@med.uni-tuebingen.de (L.D.)

Received: 23 December 2019; Accepted: 13 February 2020; Published: 17 February 2020



Abstract: The function and regulation of amyloid-beta ($A\beta$) in healthy and diseased liver remains unexplored. Because $A\beta$ reduces the integrity of the blood-brain barrier we have examined its potential role in regulating the sinusoidal permeability of normal and cirrhotic liver. $A\beta$ and key proteins that generate (beta-secretase 1 and presenilin-1) and degrade it (nepilysin and myelin basic protein) were decreased in human cirrhotic liver. In culture, activated hepatic stellate cells (HSC) internalized $A\beta$ more efficiently than astrocytes and HSC degraded $A\beta$ leading to suppressed expression of α -smooth muscle actin (α -SMA), collagen 1 and transforming growth factor β (TGF β). $A\beta$ also upregulated sinusoidal permeability marker endothelial NO synthase (eNOS) and decreased TGF β

in cultured human liver sinusoidal endothelial cells (hLSEC). Liver A β levels also correlate with the expression of eNOS in transgenic Alzheimer's disease mice and in human and rodent cirrhosis/fibrosis. These findings suggest a previously unexplored role of A β in the maintenance of liver sinusoidal permeability and in protection against cirrhosis/fibrosis via attenuation of HSC activation.

Keywords: liver cirrhosis; liver sinusoidal permeability; liver sinusoidal endothelial cells; hepatic stellate cells; beta secretase; presenilin; endothelial nitric oxide synthase; myelin basic protein; Alzheimer's disease; neprilysin; astrocytes

1. Introduction

The generation and degradation of amyloid-beta (A β) in the central nervous system (CNS) are well characterized, but these pathways are poorly understood in the liver. Although the liver generates, takes up, and degrades A β peptides [1], little is known about its role in healthy and cirrhotic liver. In progressive fibrosis leading to cirrhosis, activated hepatic stellate cells (A-HSC) are the primary fibrogenic cell type following their transdifferentiation from a quiescent, vitamin A-rich cell type to myofibroblasts (reviewed in [2]). Interestingly, A-HSC acquire many features resembling healthy brain astrocytes [3,4], which protect against A β -induced toxicity in the CNS [5]. Therefore, we examined whether HSCs, like astrocytes, contribute to the homeostasis of A β .

A β is generated from its parent molecule, the amyloid precursor protein (APP), through sequential cleavage by three specialized proteases: α -, β - (BACE1), and γ -secretase complex containing presenilin (PS) 1/2 [6]. Cleavage of APP through α -secretase is the major physiological nonamyloidogenic route of APP maturation, resulting in the release of a soluble 100–120-kDa N-terminal fragment (β APPs α) and a small C-terminal membrane-bound segment (C83). Cleavage of APP by β -secretase (BACE), a membrane bound aspartic protease initiating the first step of amyloidogenic APP degradation, produces large soluble APP-beta fragment (sAPP β) and 99-amino-acid beta-carboxyterminal APP fragment (C99, β -CTF). γ -secretase cleaves C99 mainly after residue 40 and partly after residue 42, thus generating the peptides A β 40 and, to a lesser extent, A β 42, as well as other A β fragments that vary in length and hydrophobicity [6,7]. High heritability of mouse presenilin 2 has been demonstrated in the liver, but not the brain [8], indicating that liver is a powerful source of A β peptides. Interestingly, in the liver of Alzheimer's disease (AD) patients, the total A β level is 1/8th that found in the liver of a nonaffected control group [9], suggesting that there is either reduced production or accelerated mechanisms of hepatic A β elimination in AD.

The dysfunction and death of hepatocytes in cirrhosis may affect A β metabolism. Because of rare reports of an overlap between cirrhosis and AD, we sought to clarify whether the A β -generating function of BACE and presenilin, as well as the A β degrading function performed by neutral endopeptidase neprilysin (NEP) [10,11], are maintained in cirrhosis. The lack of evidence for a direct correlation between cirrhosis and AD progression suggests that there are compensatory mechanisms of A β elimination in liver, possibly by HSCs, whose numbers are greatly increased during cirrhosis. Based on functional and phenotypic similarities between A-HSC and astrocytes, we hypothesized that A-HSC may contribute to the clearance of A β , similar to the activities of astrocytes in healthy brain [5].

We further hypothesized that in healthy liver, which is characterized by facilitated blood-tissue interactions, A β contributes to the maintenance of normal integrity and porosity of liver sinusoids through the production of nitric oxide (NO) and vascular endothelial growth factor (VEGF), which also maintains transendothelial permeability in liver and brain [12–14]. This hypothesis is based upon: (1) the capacity of A β and NO [15–17] to disrupt the blood-brain-barrier (BBB); (2) the functional similarity between A β and NO in neural cells in vivo and in vitro [15,16,18]; and, (3) the A β -dependent production of NO in neural tissue during AD [17].

Herein we have investigated the influence of A β on sinusoidal permeability and fibrotic markers in cirrhotic livers from different species, as well as in livers of the transgenic AD mice (TgAD). The latter animals are characterized by accelerated generation of A β and plaque burden in the brain [19,20]. This study uncovers a previously unknown activity of A β in regulating hepatic sinusoidal permeability and quiescence of HSC.

2. Materials and Methods

2.1. Human Liver Tissue Samples

Liver tissues for immunoblotting, PCR, and A β quantification by V-Plex[®] analysis were obtained from 44 patients (21 males and 23 females) with normal liver (15 patients), with fibrosis (15 patients), and with cirrhosis (14 patients). Surgery was done because of hepatic metastases of extrahepatic tumors (19 patients), cholangiocarcinoma (4 patients), hepatocellular carcinoma (5 patients), and other diseases (4 patients), and only nonaffected or nontumorous tissue was used. Further cirrhotic liver tissue (12 patients) was obtained from explanted liver organs. Liver samples were histologically examined by a pathologist and the severity of fibrosis/cirrhosis was judged by the MELD score [21]: fibrosis 8.78 ± 3.33 and cirrhosis 15.63 ± 7.87 (see Table 1). The histological scores of tissue samples, patient's age, gender, and assessed levels of aspartate (AST) and alanine (ALT) aminotransferase and alkaline phosphatase (AP) are listed in Table 1.

Table 1. Histological scoring of human liver samples.

Human Liver Tissue Sample ^a	Histological Score (0/1/2/3/4) ^a	MELD Score ^{b,c}	Steatosis (0/1/2/3) ^d	Gender (m/f)	Age	AST [U/L]	ALT	AP [U/L]
normal (<i>n</i> = 15)	(15/0/0/0/0)	7.3 ± 1.3	(15/0/0/0/0)	(4/11)	57.1 ± 12.8	30.9 ± 13.7	27.6 ± 15.5	111.3 ± 59.2
fibrosis (<i>n</i> = 15)	(0/1/6/8/0)	8.8 ± 3.3	(10/4//1/0)	(12/3)	63.0 ± 11.9	48.5 ± 42.4	46.7 ± 26.9	200.9 ± 190.8
cirrhosis (<i>n</i> = 14)	(0/0/0/0/14)	15.6 ± 7.3	(10/1/3)	(5/9)	51.6 ± 7.9	122.0 ± 139.8	66.7 ± 80.4	211.1 ± 117.1

Note: Tissue samples were characterized as follows: (a) Histological score was defined as no fibrosis (0), zone 3 perisinusoidal/pericellular fibrosis, focally or extensively present (1), zone 3 perisinusoidal/pericellular fibrosis with focal or extensive periportal fibrosis (2), zone 3 perisinusoidal/pericellular fibrosis and portal fibrosis with focal or extensive bridging fibrosis (3) and cirrhosis (4); (b) The MELD (Model of End Stage Liver Disease) scores were calculated using blood levels of creatinine, INR and total bilirubin [21]; (c) mean \pm SD; d, Grade of steatosis was scored as <5% steatosis (0), 5 to 33% steatosis (1), >33 to 66% steatosis (2), and >66% steatosis (3). Normal ranges for selected parameters are: AST, 5–40 U/L; ALT, 5–40 U/L; AP, 35–130 U/L.

2.2. Animal Models

For bile duct ligation (BDL), eight-week-old male Sprague Dawley rats and C57BL/6J mice (Charles River, Sulzfeld, Germany) were separated into BDL and sham operated (SO) groups (*n* = 6 each). Ligation of the common bile duct was performed as described by Arias et al. [22]. The surgical intervention took place under halothane anesthesia. After 14 days, the rats were sacrificed and the livers were snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C. BDL in mice was done for 21 days and performed following standardized protocols published elsewhere [23,24].

Two transgenic mouse models of AD purchased from Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA) were used: (i) 6-month-old female 3 \times Tg-AD harboring PS1M146V, APPSwe, and tauP301L transgenes [19], and (ii) 3–4-month-old 5XFAD harboring five Familial Alzheimer's Disease (FAD) mutations [APP K670N/M671L (Swedish) + I716V (Florida) + V717I (London) and PS1 M146L+L286V] [20]. As control animals, C57BL/6J mice (Charles River) for 3 \times Tg-AD mice and WT littermates of 5XFAD mice were utilized. Mice were euthanized by CO₂ exposure. Brains and livers were isolated, snap frozen, and stored at -80 °C.

2.3. Cell Culture

Mouse M1-4HSC, rat HSC-T6, and human LX-2 HSC cell lines have been described previously [25–27]. Human SV40-immortalized hepatic sinusoidal endothelial cells (hLSEC) were obtained from Applied Biological Materials (Richmond, BC, Canada). STR analyses of human cell lines and Mycoplasma testing of all cell lines were performed.

Astroglia-rich primary cultures (APC) were prepared from newborn C57/BL6 (Charles River) mouse brains as described elsewhere [3,4,28]. Briefly, the cells obtained from 5–7 brains of newborn littermates were mechanically dissociated, centrifuged, and plated onto cell culture flasks (1×10^6 cells/75 cm²) in DMEM with 4.5 g/L glucose supplemented with 10% fetal calf serum, 100 µg/mL streptomycin sulphate, 100 units/mL penicillin G, and 1 µM pyruvate (Biochrom AG, Berlin, Germany) in a humidified 10% CO₂ atmosphere at 37 °C.

M1-4HSC, HSC-T6, hLSEC, and LX-2 cells were grown in DMEM with high (4.5 g/L) glucose containing either 2% (for LX-2), 5% (for hLSEC), or 10% fetal calf serum (for M1-4HSC and HSC-T6), 1% nonessential amino acids (only for M1-HSC), 1 µM pyruvate (only for HSC-T6), 100 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin (for hLSEC and HSC-T6, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Germany). Cells were kept at 37 °C in an atmosphere containing either 5% (for M1-4HSC and LSEC) or 10% CO₂ (for LX-2 and HSC-T6).

2.4. Western Blot Analyses

Liver tissue was homogenized in ice cold lysis buffer (300 mM NaCl, 50 mM Tris, 2 mM MgCl₂, 0.5% NP40) containing ‘Complete protease inhibitor’ (Roche, Mannheim, Germany). The total protein was determined by DC Protein assay (Bio-Rad). Proteins were fractionated by SDS/PAGE (12% acrylamide) and transferred onto PVDF membranes (EMD Millipore, Billerica, CA, USA). Membranes were blocked in 5% BSA (Albumin Fraction V, protease-free, Roth, Karlsruhe, Germany) in TBST for 1.5 h and were incubated at 4 °C overnight with respective primary antibodies (Table 2) diluted in PBS. For visualization of antibody binding, membranes were incubated with alkaline phosphatase- or Cy2/Cy5-conjugated antibodies for 3 h at room temperature. Protein bands were visualized using chemiluminescence or fluorescence detection systems (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). For imaging and densitometric analyses, a VersaDocTM 4000 MP imaging system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) was used. Data were normalized to the respective densitometric values of GAPDH as loading control.

Table 2. Primary polyclonal (pab) and monoclonal (mab) antibodies used in Western blot analyses.

Antibody	Cat. No.	Dilution	Supplier
APP, rabbit pab	SAB3500274	1:1000	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany
α-SMA, rabbit pab	ab5694	1:1000	Abcam, Cambridge, UK
eNOS, rabbit pab	ab95254	1:500	Abcam
Nepilysin, rabbit mab, clone EPR2997	ab79423	1:1000	Abcam
MBP, mouse mab clone MBP101	ab62631	1:500	Abcam
nNOS, rabbit pab	ab5586	1:1000	Abcam
PS1, rabbit pab	PA5-20376	1:750	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
BACE1, rabbit pab	PA1-757	1:1000	Thermo Fisher Scientific
GAPDH, mouse mab, clone 6C5	MAB374	1:500	EMD Millipore, Billerica

For Western blot analyses of NEP, M1-4HSC, T6-HSC cells and astrocytes were grown in 75 cm² culture flasks at a density $1 \times 10^6/75$ cm². For Western blot analyses of α-SMA, M1-4HSC were seeded

onto culture flasks at a density 1×10^6 cells/75 cm² and incubated for 48 h with or without 1000 pg/mL synthetic A β 42 (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) dissolved in standard medium and harvested for Western blot analysis. HLSEC were seeded onto culture flasks precoated with collagen (Corning, Kennebunk, ME, USA) at a density 5×10^5 cells/75 cm². After 12 h, adherent cells were incubated for an additional 48 h period with 1000 pg/mL synthetic A β 42 dissolved in standard medium and harvested thereafter for Western blot analysis.

2.5. Real-Time qPCR of Rat Liver Tissue and Cell Cultures

RNA was extracted from rat liver tissue or mouse M1-4HSC using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) or mirVana miRNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific), respectively. Per sample, 1 μ g of RNA was transcribed to cDNA using the TaqMan Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA); transcription was performed according to the manufacturer's instructions. Predesigned TaqMan gene expression assays were purchased from Thermo Fisher Scientific (Table 3). RNA analyses of α -SMA and glial fibrillary acidic protein (GFAP), as well as of GAPDH as a housekeeping gene, were performed using the 7900 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). The relative quantity (RQ) of target gene RNA normalized to GAPDH was calculated by the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [29].

Table 3. Gene expression assays used for rat liver and mouse M1-4HSC RNA analysis.

Target Gene	Gene Symbol	RefSeq	Assay ID
α -SMA	<i>Acta2</i>	NM_031004.2	Rn01759928_g1
GFAP	<i>Gfap</i>	NM_017009.2	Rn00566603_m1
α -SMA	<i>Acta2</i>	NM_007392.3	Mm01204962_gH
GAPDH	<i>Gapdh</i>	NM_008084.3/NM_001289726.1	Mm99999915_g1

2.6. Real-Time qPCR of Human Liver Tissue

The mRNA expression was investigated by real-time qPCR using SYBR Green. Total cellular RNA was isolated with TRIzol reagent from Life Technologies (Darmstadt, Germany). Primers for human NEP/MME and APP, as well as BACE1, were described elsewhere [30,31]. Human PS1/PSN1 was amplified with the primers 5'-CCT CAA CAA TGG TGT GGT TG-3' and 5'-TTG TGA CTC CCT TTC TGT GCT-3' and tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide (YWAHZ) mRNA with 5'-GCA ATT ACT GAG AGA CAA CTT GAC A-3' and 5'-TGG AAG GCC GGT TAA TTT T-3'. For quantification of the results, RNA of respective liver samples was reverse transcribed, and cDNA was serially diluted and used to create a standard curve of at least six different dilutions for each of the genes analyzed. The second derivative maximum method was used for quantification with the LightCycler software. The PCR reaction was evaluated by dissociation curve analysis, and expression values were normalized to the expression values of the housekeeping gene YWAHZ, encoding the tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-193 monooxygenase activation protein, zeta polypeptide.

2.7. Additional Information to qRT-PCR Analysis and Use of Housekeeping Gene YWAHZ

Isolated RNA were quantified at 260/280 nm with Thermo Fisher Scientific Nanodrop 2000 spectrophotometer. The absorption ratio A260 nm/A280 nm between 1.90 and 2 was taken into consideration for cDNA preparation. First strand cDNA was synthesized from 1 μ g of total RNA with reverse transcriptase using the QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) in 20 μ L; 0.5 μ L of the cDNA was used for amplification in a LightCycler 480 System (Roche) applying 0.5 μ M of each primer for human NEP/MME, APP, BACE1, as well as PS1/PSN1. Real-time RT-PCR was performed in triplicates using the LightCycler[®] 480 SYBR Green I Master (Roche) and the specificity of the PCR reactions was confirmed by sequencing of the amplified DNA fragments (Geneart, Regensburg,

Germany) and the efficiency of each PCR reaction was calculated using the serially diluted standard curve: NEP/MME (2.00), APP (1.97), BACE1 (2.00), PS1/PSN1 (1.99), YWHAZ (1.98). The housekeeping gene YWHAZ was chosen because of similar cp values as the genes of interest and stable expression (no statistically proven different expression) between the analyzed groups of samples [32].

2.8. A β Quantification in Cell Cultures

For analyses of A β effects on synthesis of α -SMA, M1-4HSC were seeded onto culture flasks at a density 1×10^6 cells/75cm² and incubated for 48 h with or without 1000 pg/mL synthetic A β 42 and with or without 1 μ M LBQ657 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) dissolved in standard medium and harvested for Western blot analysis.

For the comparison of different cell types regarding their ability to utilize A β 42, M1-4HSC, HSC-T6, LX-2, and astroglial primary cells (APC), as well as cell lysates from M1-4HSC, were used. All cell types were seeded onto 24-well plates at a density of 100,000 cells/well. M1-4HSC cell lysates were incubated with DMEM containing 1000 pg/mL of synthetic A β 42 and A β 40 in the presence or absence of 5 mM EGTA for 30 or 60 min or 1 μ M LBQ657 for 48 h. A β 42 and A β 40 were measured with the human A β ELISA kit (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) according to the manufacturer's protocol.

2.9. Quantification of TGF- β 1 in Cell Culture Supernatants

Primary mouse HSC were isolated from C57BL/6 mice as described elsewhere [33]. At day 9, the cells were seeded onto 24-well plates at a density of 100,000 cells/well and cultured in DMEM for 24 h. The medium was then replaced with medium containing A β 42 (1000 pg/mL) and/or LBQ657 (1 μ M). TGF- β 1 was measured in cell culture supernatant by ELISA using the Mouse TGF- β 1 ELISA kit (LSBio, LifeSpan BioSciences, Inc., Seattle, WA, USA) according to the manufacturer's protocol.

2.10. Quantification of A β Peptides in Liver and Brain Homogenates

In human rat and mouse livers A β peptides were detected by V-Plex[®] Kit (Mesoscale, Rockville, MD) using the A β antibody (4G8) recognizing human and rodent A β 40, A β 42, and A β 38. Mouse livers from transgenic AD mice with their respective WT controls were analyzed by Luminex assay using MILLIPIX MAP Mouse Amyloid Beta Magnetic Bead Kit (MABMAG-83K, Merck).

2.11. Immunofluorescence Staining

For immunofluorescence analyses M1-4HSC, mouse primary HSC and the hLSEC line were plated in 6 cm Petri dishes (2.5×10^5 cells/dish) containing coverslips. Cells were incubated with or without A β 42 (1000 pg/mL) and/or LBQ657 (1 μ M) dissolved in the respective culture medium for 48 h.

Liver and brain tissue sections (10 μ m thick) and cells grown on glass cover slips were fixed in -20 °C cold methanol, washed twice in PBS, and incubated for 1 h at RT or overnight at 4 °C with primary antibodies (Table 4) diluted in PBS. After washing twice in PBS, samples were incubated with a corresponding fluorochrome-linked secondary antibody in the dark for 1 h at RT, and were washed two times for 10 min with PBS containing 0.1% Triton[®] X-100 (Sigma). The slices and cells were then covered with Vectashield mounting medium (Vector Laboratories Burlingame, Burlingame, CA, USA) containing 4',6 diamidino-2-phenylindole (DAPI), dried, and stored at -20 °C. As for negative controls, samples were treated with secondary antibodies only.

All immunofluorescence stainings were evaluated by fluorescence microscopy, using an Olympus BX51 Microscope (Olympus Optical Co. Europe, Hamburg, Germany). Images were acquired by the digital camera F-View II and processed by the software Analysis DOKU[®] (Soft Imaging System GmbH, Leinfelden-Echterdingen, Germany). Primary and secondary antibodies were diluted as indicated in Table 4.

Table 4. Primary and secondary antibodies used in double immune labelling studies.

Antibody	Cat. No	Dilution	Supplier
Desmin mouse, mab, clone DE-U-10	D 1033	1:80	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany
GFAP mouse, mab, clone GF12.24	GF 12.24	1:10	ProGen, Heidelberg, Germany
GFAP rabbit, pab	Z 0334	1:300	Dako, Glostrup, Denmark
NEP rabbit, mab, clone EPR2997	ab 79423	1:200	Abcam, Cambridge, UK
α -SMA mouse, mab, clone ASM-1	61001	1:100	ProGen
eNOS, rabbit pab	ab 95254	1:150	Abcam
Amyloid β 42, mab clone D3E10	12843	1:500	Cell Signaling, Frankfurt am Main, Germany
FITC-conjugated goat antirabbit IgG	111-095-144	1:100	Dianova, Hamburg, Germany
FITC-conjugated goat antimouse IgG	115-095-003	1:100	Dianova
Cy3-conjugated goat antimouse IgG	111-165-144	1:800	Dianova
Cy3-conjugated goat antirabbit IgG	115-165-166	1:800	Dianova

2.12. Collagen 1 ELISA of Cell Culture Supernatants

M1-4HSC were transferred into 24-well plates (50,000/well) and after adherence incubated with medium containing 1000 pg/mL of synthetic A β 42 and A β 40 for 48 h. Collagen 1 (Col-1) was analyzed in the cell culture supernatant by the mouse collagen type 1 ELISA Kit (MyBioSource, San Diego, USA).

2.13. Statistical Analyses

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism Software (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA). All data are presented as means \pm SEM. (standard error of the mean). The normality was first determined by Shapiro-Wilk or d'Agostino Pearson tests. One-way ANOVA analysis with post hoc Bonferroni's multiple comparison test vs. two-tailed Student's *t*-tests were applied for normally distributed data sets. Nonnormally distributed data were analyzed by Kruskal-Wallis vs. Mann-Whitney test. $p < 0.05$ was considered significant.

2.14. Ethics Approval Statements

Experimental procedures on the use of patients' fibrotic and normal liver tissue were performed according to the guidelines of the charitable state controlled foundation Human Tissue and Cell Research (HTCR), with the written informed patient's consent approved by the local ethical committee of the University of Regensburg.

All animal experiments were approved by the local institutional committee of Animal Welfare in Tübingen (Regierungspräsidium Tübingen, approval number §4-14.05.2018, PH6/14), Aachen (LANUV, Recklinghausen, Germany, approval number 84-02.04.2012.A092) and Halle (Landesverwaltungsamt Halle, approval number 42502-2-1369) conducted in accordance with the German federal law regarding the protection of animals and 'Guide for the Care and Use of Laboratory Animals' (National Institutes of Health publication 8th Edition, 2011).

3. Results

We first examined the levels of APP and the enzymes involved in A β generation (BACE1 and PS1) and degradation (NEP) in human fibrotic (hFL) and cirrhotic liver (hCL). APP mRNA was down-regulated (Figure 1A) in both hFL and hCL compared to normal liver (hNL), concomitant with a decrease of PS1/PSN1 and BACE1 mRNA (Figure 1B–C), reflecting an overall decrease in the key drivers of A β generation. Furthermore, decreased BACE1 and PS1 was confirmed at the protein level by reduced expression of the enzymatically active ~20 kDa C-terminal fragment of PS1 and of the ~35 kDa BACE1 fragment in human cirrhotic liver (Figure 1D,E). On the other hand, a significant reduction of

NEP/MME mRNA and protein (Figure 1F,G) was observed in hCL vs. hNL, which indicates a minor contribution of NEP to the A β decrease in human cirrhosis.

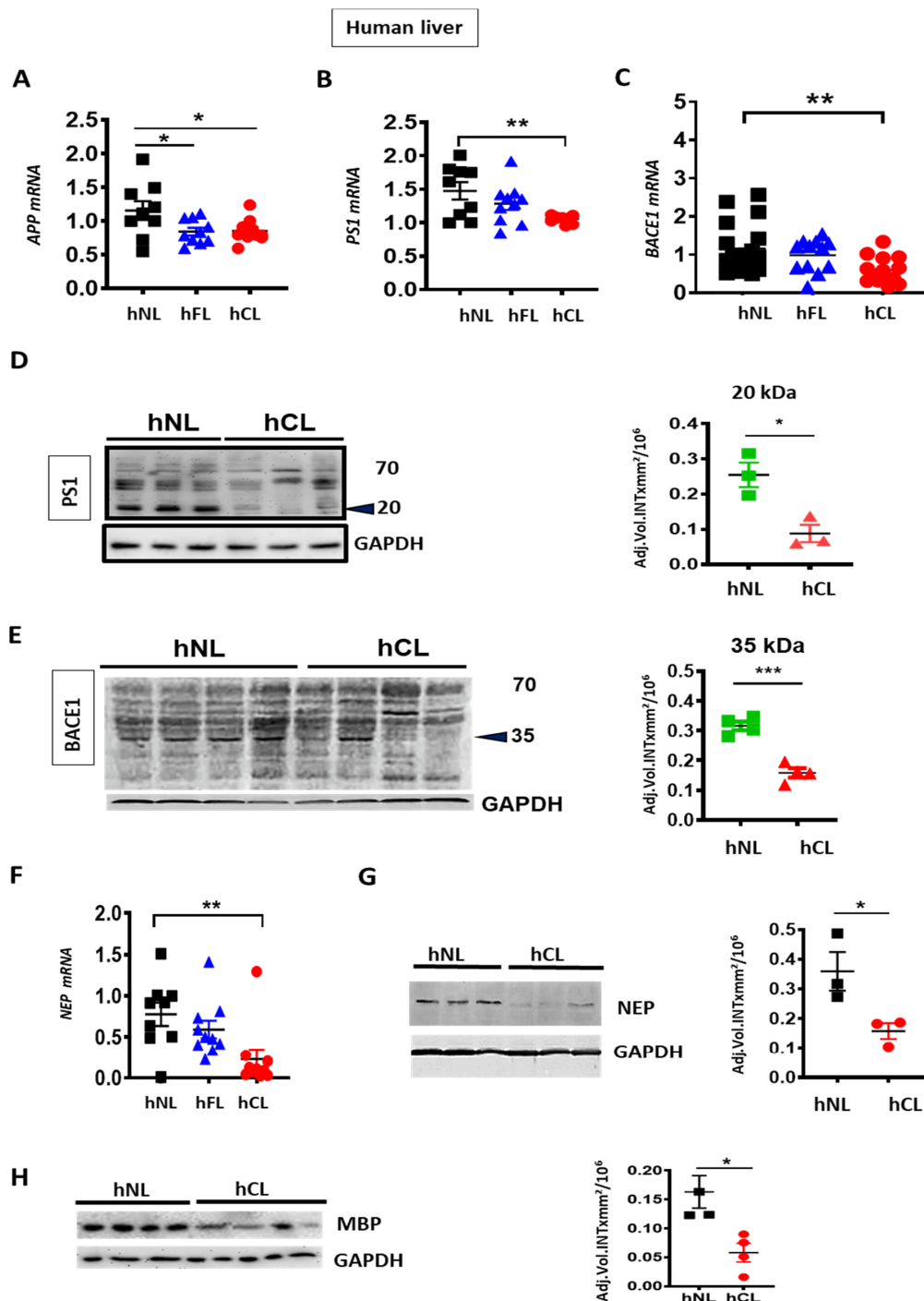


Figure 1. Decreased expression of amyloid precursor protein (APP), APP processing- and A β metabolizing enzymes in human fibrotic and cirrhotic liver. (A–C) qPCR analyses of APP, presenlin 1 (PS1) and β -secretase 1 (BACE1) in fibrotic (hFL, $n = 10$ –12) and cirrhotic (hCL, $n = 10$ –14) vs. normal human livers (hNL, $n = 9$ –20). (D–E) Western blot and densitometry of PS1 and BACE1 in hNL vs. hCL ($n = 3$ –4) (F–G) qPCR ($n = 9$) and Western blot ($n = 3$ –4) with densitometric analysis of NEP protein and NEP mRNA in hCL vs. hNL (H) Western blot and densitometry of myelin basic protein (MBP) in hCL vs. hNL ($n = 3$ –4). One-way ANOVA with post hoc Bonferroni’s multiple comparison in A–C, Kruskal-Wallis in 1F and Student’s t -tests in D, E, G and H. Means \pm SEM, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

In addition, myelin basic protein (MBP), another protein known to degrade A β [34], was reduced in hCL (Figure 1H). This may contribute to the appearance of unmyelinated nerve fiber bundles and reduced hepatic innervation in cirrhosis [35].

V-PLEX[®] analysis revealed a roughly 5-, 10-, and 160-fold decrease of A β 40/42/38 peptides respectively in hCL (Figure 2A), and a ~6-fold reduction of A β 42 in rodent liver after BDL-induced fibrosis (Figure 2B). In addition, eNOS was down-regulated in human cirrhotic liver and in a rat bile duct ligation (BDL) model (Figure 3A,B) compared to respective controls. In both, rat BDL and hCL elicited no significant changes in the level of the neuron-specific NOS (nNOS) (Figure 3C,D).

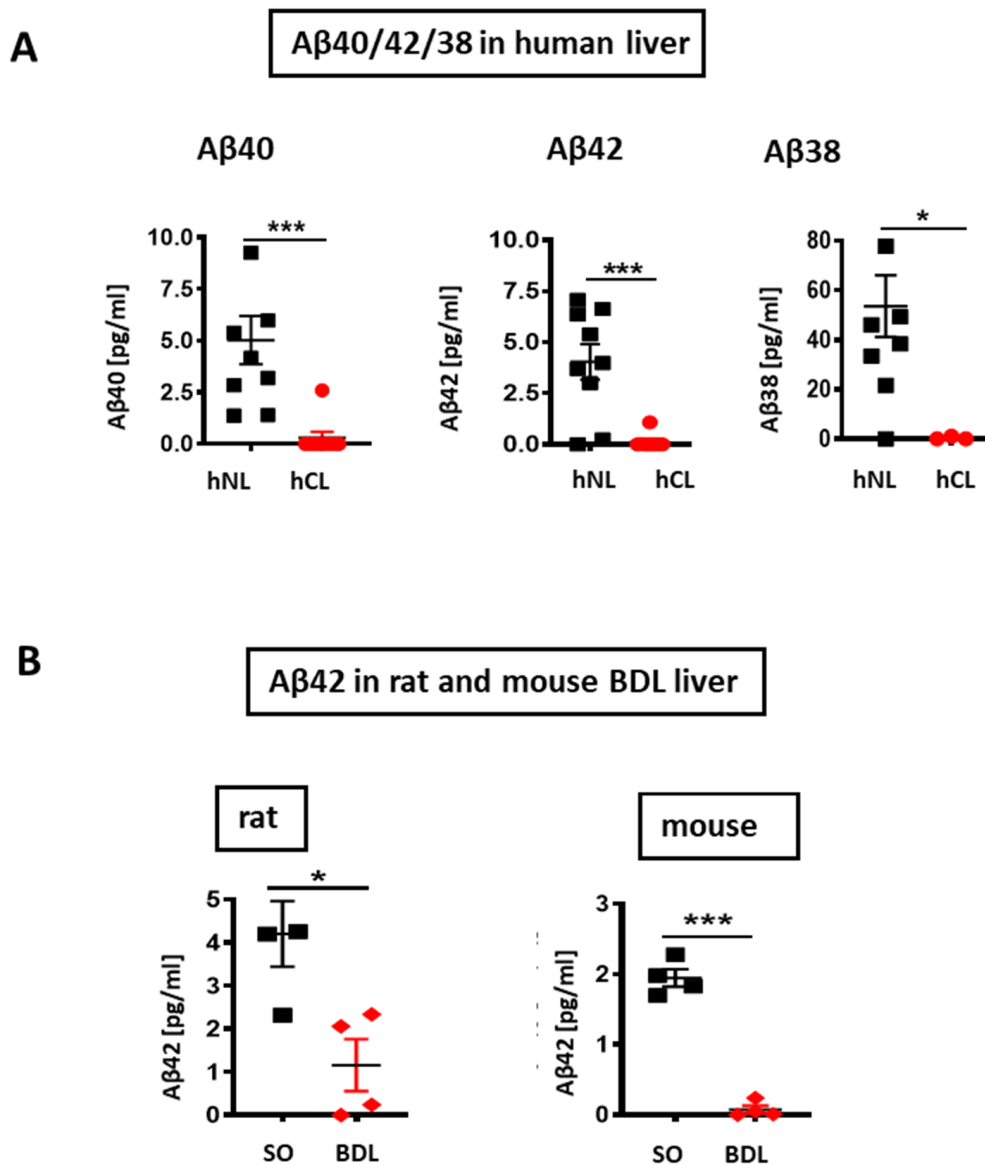


Figure 2. A β levels in cirrhotic/fibrotic and normal livers (A) V-PLEX analysis showing down-regulation of A β 40, A β 42, and A β 38 in hCL vs. hNL ($n = 9$); (B) down-regulation of A β 42 in rat BDL ($n = 4$) and in mouse BDL ($n = 4$) vs. respective SO livers. Mann-Whitney test in A and Student's t -tests in B were used. Means \pm SEM, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

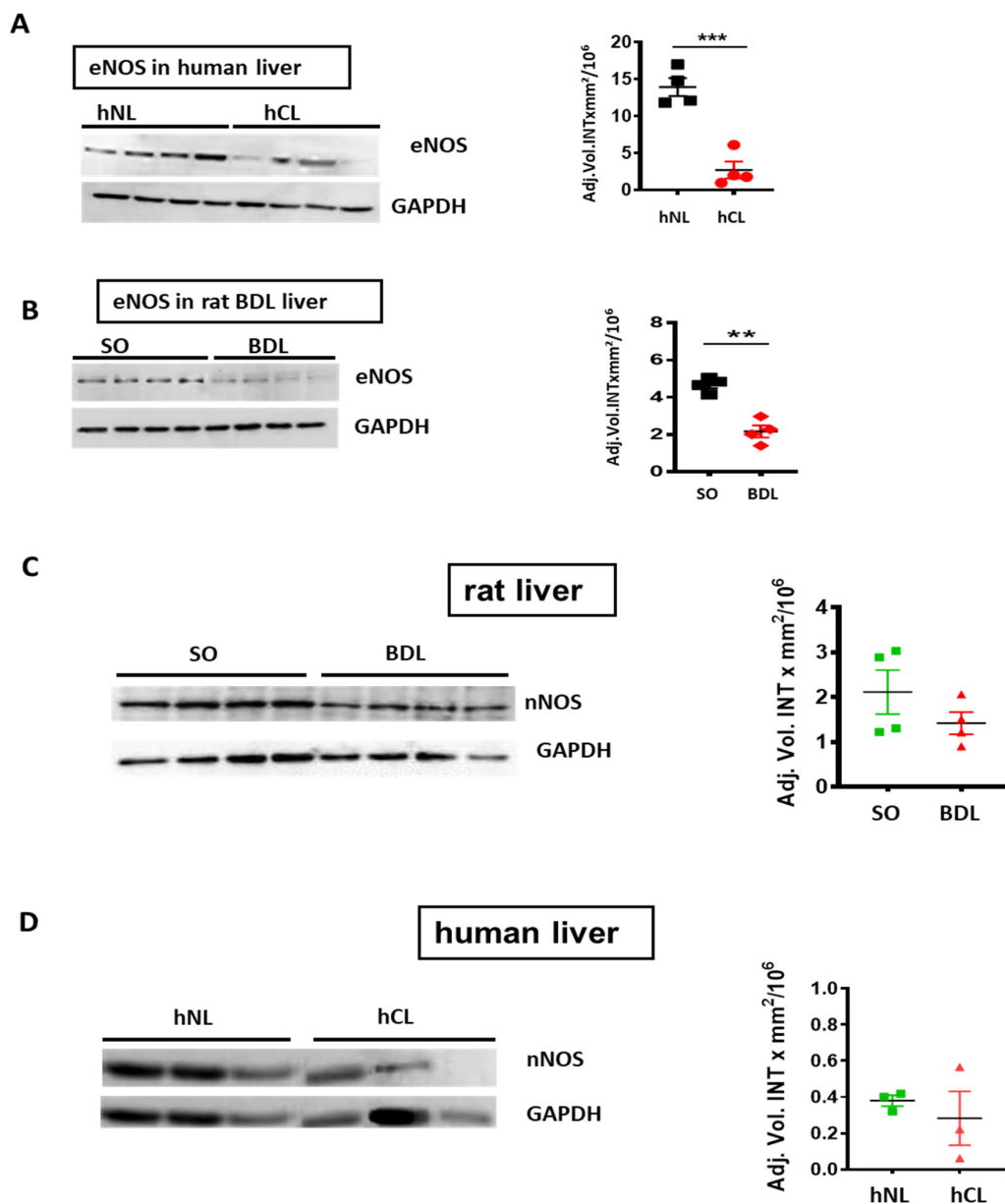


Figure 3. Endothelial (eNOS) and neuronal NO synthase (nNOS) in cirrhotic/fibrotic and normal livers. Western blot and densitometry of (A) eNOS in hCL vs. hNL ($n = 4$); (B) eNOS in rat BDL vs. sham operated (SO) controls ($n = 4$). (C) nNOS in rat BDL ($n = 4$) vs. SO (D) nNOS in hCL vs. hNL ($n = 3$); Student’s *t*-tests. Means \pm SEM, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

In BDL rats, the development of fibrosis was confirmed by RT-qPCR analyses showing upregulation of α -SMA mRNA associated with the reduction of GFAP mRNA in BDL vs. sham operated (SO) rat livers (Figure 4A). BDL-induced fibrosis increased expression of NEP in rat (Figure 4B) and mouse livers (Figure 4C). In normal liver (upper row of Figure 4D) stained for NEP and GFAP, or α -SMA, or desmin (red fluorescence), a further marker of HSC [36], NEP was moderately expressed throughout the liver tissue. Desmin was used as a marker detectable in both activated and quiescent HSC [37]. NEP was absent from GFAP-positive HSC, but was strongly expressed in the vessels. In BDL rat liver, NEP was strongly expressed in GFAP-negative areas (lower left micrograph of Figure 4D) and in the fibrotic areas containing large population of activated α -SMA positive HSC (middle panel in Figure 4D). Most cells residing in fibrosis-affected areas and a large population of α -SMA positive

HSC in fibrotic septae were NEP-negative (middle panel in Figure 4D). NEP was colocalized with α -SMA and desmin in fibrotic nodules (middle and right panel of Figure 4D).

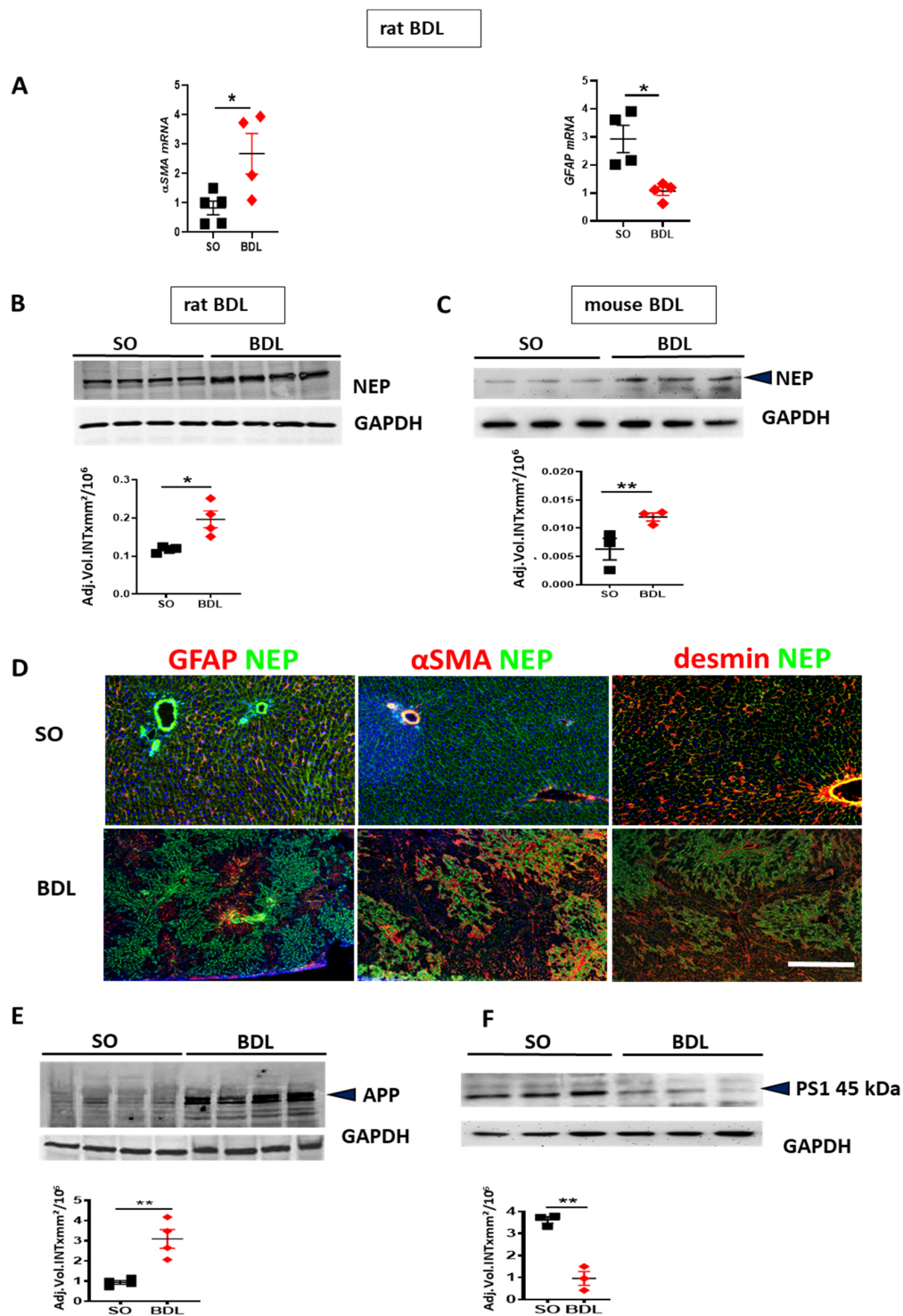


Figure 4. Bile duct ligation (BDL)-induced changes in proteins involved in generation and degradation of A β . (A) RT-qPCR of α -smooth muscle actin (α -SMA) and glial fibrillary acidic protein (GFAP) mRNA in the livers of BDL rats vs. sham operated (SO) controls. (B,C) Western blot and densitometry of neprilysin (NEP) in rat and mouse BDL livers vs. SO controls. (D) Costaining for NEP (green) and GFAP (red) (left panel), for NEP and α -SMA (red) (middle panel), for NEP and desmin (red) in (right panel) in SO (upper row) and BDL (lower row) rat liver. Cell nuclei are stained with 4',6-Diamidin-2-phenylindol

(DAPI, blue). The images are representative out of 4 animals (10 sections per animal) analyzed per group. Scale bar representative for all images in D: 200 μm . (E,F) WBs with densitometry of APP and PS1 in BDL and SO rats. Two-tailed Student's *t*-tests. Means \pm SEM ($n = 3-6$), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

In rat BDL livers, the amount of APP was higher than in the livers of SO animals (Figure 4E). Accumulation of APP indicates its decreased cleavage by $\text{A}\beta$ -generating enzymes. Also, downregulation of PS1 protein (Figure 4F) reflects the failure in APP processing for efficient $\text{A}\beta$ generation. To explore the parallels in $\text{A}\beta$ -degrading function between HSCs and astrocytes, we first assessed the expression of the $\text{A}\beta$ -degrading enzyme NEP by astrocytes in astroglial primary culture (APC) and rodent hepatic stellate cell lines. Rat and mouse HSC cell lines (HSC-T6 and M1-4HSC) contained more NEP than APC (Figure 5A,B). A two-fold higher uptake of $\text{A}\beta_{42}$ (reflected by its decrease in cell culture supernatant) by M1-4HSC and HSC-T6 vs. APC was quantified by ELISA (Figure 5C). The amount of $\text{A}\beta_{42}$ internalized by human stellate cells (cell line LX-2) increased with the number of cells in culture (Figure 5D).

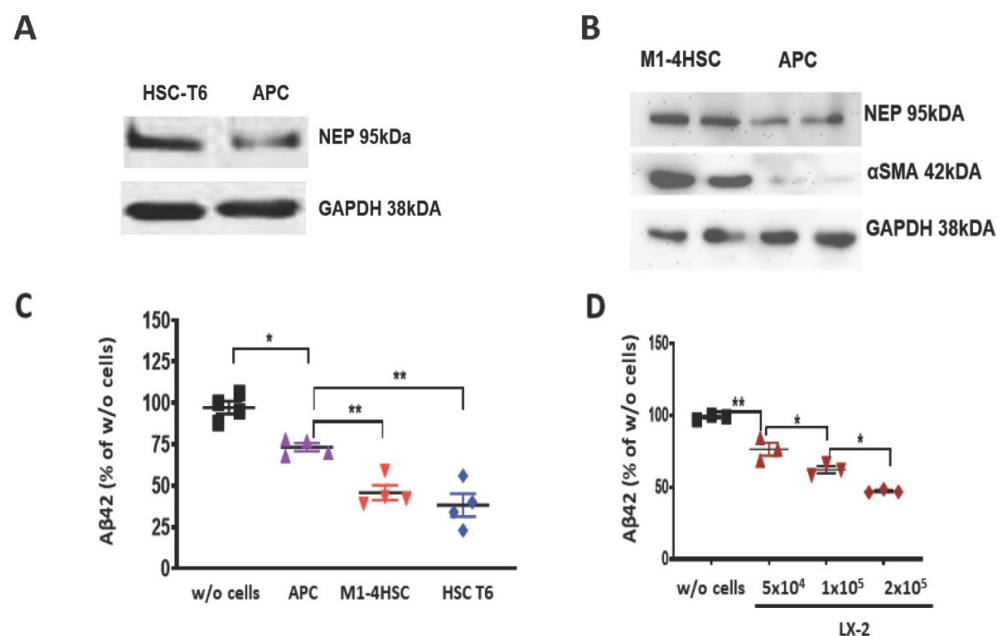


Figure 5. Comparison of $\text{A}\beta$ degrading potency of rat and mouse α -SMA-positive HSC cell lines and astrocytes. (A,B) Western blots of NEP and α -SMA in lysates of HSC-T6, M1-4HSC and astroglial primary culture (APC). (C) $\text{A}\beta_{42}$ ELISA of cell culture supernatants from APC, M1-4HSC and HSC-T6 ($n = 4$ in each group) vs. control samples without cells (w/o cells) after administration of 1000 pg/mL $\text{A}\beta_{42}$. (D) $\text{A}\beta_{42}$ ELISA of cell culture supernatants from LX-2 with increasing number of cells after administration of 1000 pg/mL $\text{A}\beta_{42}$. Statistics were generated using a one way ANOVA with post hoc Bonferroni's multiple comparison test. The data are shown as means \pm SEM, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, respectively.

To investigate whether $\text{A}\beta$ simply accumulates or undergoes enzymatic degradation by the cells, the activities of zinc-dependent $\text{A}\beta$ -degrading enzymes known to be present in HSC were blocked by 5 mM EGTA in M1-4HSC cell lysates. After 30 and 60 min of incubation, the level of $\text{A}\beta$ was reduced to 50% and 25% respectively, compared to the initial level in control samples without cell lysates (Figure 6A,B). This confirmed the enzymatic degradation of $\text{A}\beta$ by M1-4HSC rather than its nonspecific loss that can occur in cell lysates [38]. The use of the specific NEP inhibitor LBQ657 established that enzymatic $\text{A}\beta$ metabolism in HSC can be ascribed primarily to the activity of NEP. In the presence of LBQ657, the utilization of $\text{A}\beta_{40}$ and $\text{A}\beta_{42}$ from the medium was inhibited by 75% compared to

samples without LBQ657, as evidenced by the increased level of A β peptides in the supernatants (Figure 6C,D).

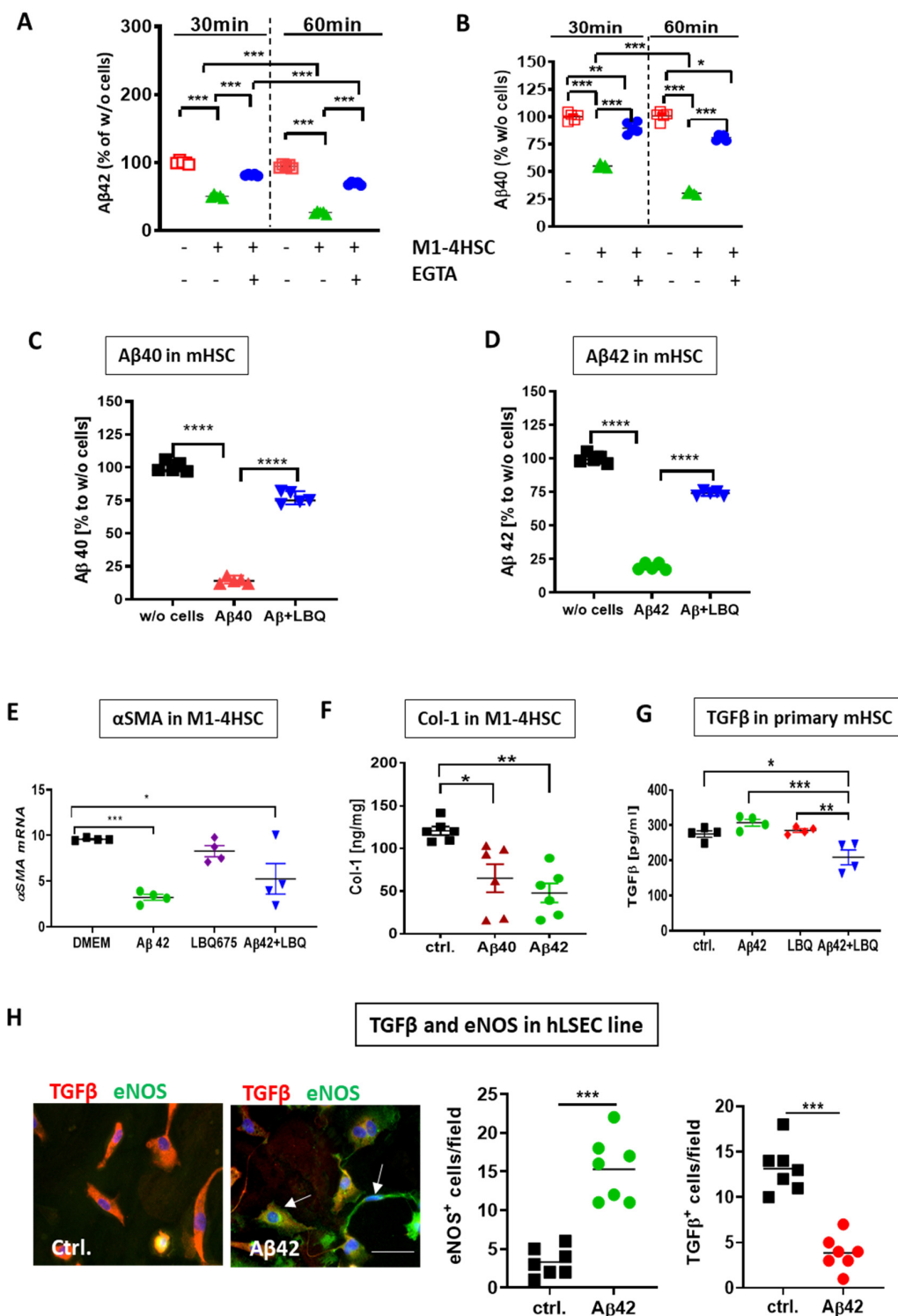


Figure 6. Effects of NEP inhibitors on uptake and degradation of A β and the expression of fibrotic markers in HSC and human liver sinusoidal endothelial cells (hLSEC). (A,B) Time-dependent degradation of A β 42 and A β 40 by M1-4HSC lysates ($n = 5$) assessed by ELISA 30 and 60 min after incubation with A β . The degradation of both A β fragments by M1-4HSC lysates was inhibited in the presence of EGTA (cf. M1-4HSC vs. EGTA+M1-4HSC in A and B). The concentrations of A β 42/40

in cell-containing samples were normalized to their respective time-specific controls without cell lysates and EGTA (-/- in (A) and (B)). (C,D) Degradation of A β 40 (C) and A β 42 (D) exposed to the respective A β fragment with and without LBQ657 (1 μ M) by primary mHSC ($n = 5$) assessed by ELISA. The concentrations of A β 42/40 in cell-containing samples were normalized to their respective time-specific controls without (w/o) cells (C,D). (E) Expression of α -SMA mRNA in M1-4HSC 48h after incubation with A β 42 and/or LBQ657. (F) ELISA of Col-1 in M1-4HSC incubated with A β 40 and A β 42; (G) TGF- β release by primary murine HSC in presence of A β and/or LBQ657 vs. control (ctrl.) assessed by ELISA; (H) TGF- β (red) and eNOS (green) staining in hLSEC cell line upon treatment with A β 42. Cell nuclei are stained with DAPI; Scale bar for both images in H: 100 μ m. Quantification of eNOS and TGF- β in hLSEC. Statistics were generated using a one way ANOVA with post hoc Bonferroni's multiple comparison test in (A–G) and two-tailed Student's t -test in (H). The data are shown as means \pm SEM, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, respectively.

To test whether A β suppresses the activation of HSC, we examined the expression of the fibrotic hallmark proteins α -SMA, TGF- β , and collagen I (Col-1 [39]) in HSCs. A β markedly reduced α -SMA mRNA in M1-4HSC (Figure 6E). Furthermore, α -SMA mRNA decreased in M1-4HSC after incubation of cells with A β and LBQ657 (Figure 6E). Both A β 42 and A β 40 reduced Col-1 production (Figure 6F) in M1-4HSC. In primary mHSC, A β 42 decreased the release of TGF- β into the culture supernatant only upon simultaneous incubation of cells with LBQ657 (Figure 6G). A β applied alone did not decrease TGF- β (Figure 6G, cf. ctrl. Vs. A β 42). This can be ascribed to A β 's rapid degradation by primary HSC (in contrast to M1-4HSC), whereas in combination with an agent preventing its degradation, LBQ657, A β showed efficacious downregulation of TGF- β -release by HSC.

The increasing number of data shows that human LSEC constitutively produce high levels of TGF- β [40] that, in turn, activates HSC. The antifibrotic effects of A β were further confirmed by the inhibition of TGF- β production in immortalized human liver sinusoidal endothelial cell line (hLSEC), as shown by immunofluorescence analysis and quantification of TGF- β - and eNOS-positive cells (Figure 6H).

To explore the role of A β on the factors increasing the permeability of liver endothelial cells, its influence on the expression of eNOS, the marker of sinusoidal permeability, in immortalized hLSEC was evaluated. The decrease of TGF- β correlated inversely with eNOS in hLSEC, as demonstrated by an intense staining of eNOS in cells barely expressing TGF- β by immunofluorescence images (arrows in Figure 6H) and quantification of eNOS- vs. TGF- β -positive cells (Figure 6H).

We assessed the expression of eNOS in the livers of 3 \times Tg-AD and 5XFAD transgenic mice, which have been previously well-characterized as models of AD [19,20]. In these mice, A β production in the brain and its systemic level were increased [41,42]. Immunofluorescence of A β 42 (Figure 7A) and multiplex analysis of A β 40 and A β 42 (Figure 7B) displayed stronger immunoreaction of A β 42 in liver sections and homogenates of 5XFAD compared to the wild type (WT) mice. In addition, a decrease in the expression of Col-1 and α -SMA was observed in 5XFAD mice (Figure 7A). As a reflection of A β 's influence on sinusoidal permeability, there were 1.6- and 2.2-fold increases in eNOS detected by WB in livers of 5XFAD and 3 \times Tg-AD mice, respectively, compared to corresponding age matched nontransgenic controls (Figure 7C).

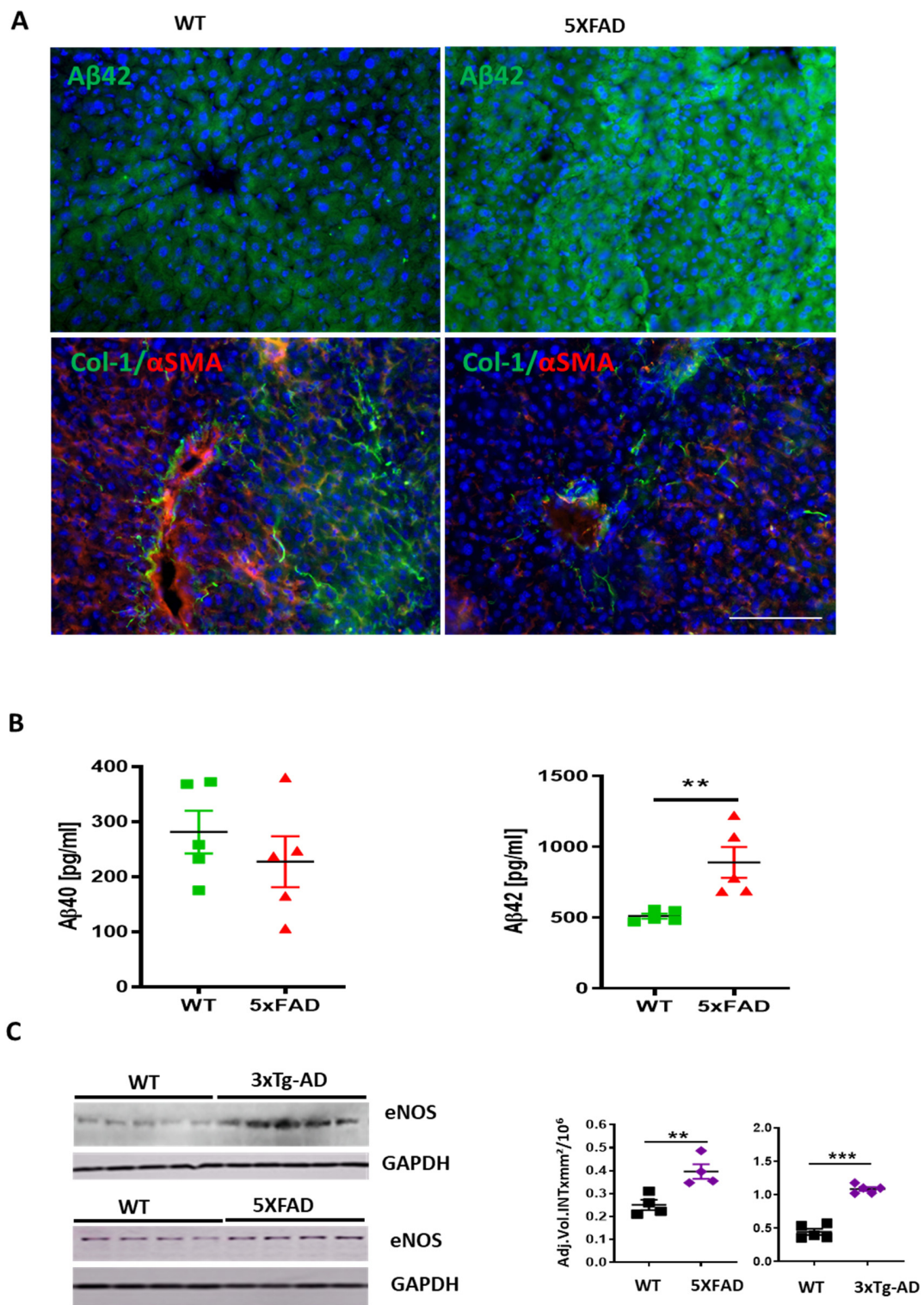


Figure 7. Up-regulation of Aβ and eNOS in the liver of 5xFAD and 3xTg-AD mice. (A) Immune fluorescence analysis showing Aβ42 immunoreaction (green in upper row), α-SMA (red) and Col-1 (green in lower row) in 5xFAD vs. WT mouse sections. Scale bar of 100 μm applies to all images in A. (B) Multiplex analysis of soluble murine Aβ40 and Aβ42 in liver homogenates of 5xFAD mice vs. WT controls. (C) Western blot analysis and densitometry of eNOS in 5xFAD and 3xTg-AD mice vs. WT age matched controls (*n* = 4–5). Two-tailed Student’s *t*-test. The data are shown as means ± SEM, ** *p* < 0.01, *** *p* < 0.001.

The brain of 3×Tg-AD mice exhibits high content of soluble A β 40, A β 42 concomitant with increased expression of eNOS (Figure 8A,B). High brain levels of A β simultaneous to upregulation of eNOS have been reported in another transgenic model of AD with impaired BBB function [43]. This, together with our results, may hint at a blood-tissue modulating function of A β , which, in the brain, leads to the impairment of the BBB, while in the liver, its high content assures the facilitated blood-liver exchange supporting normal liver function.

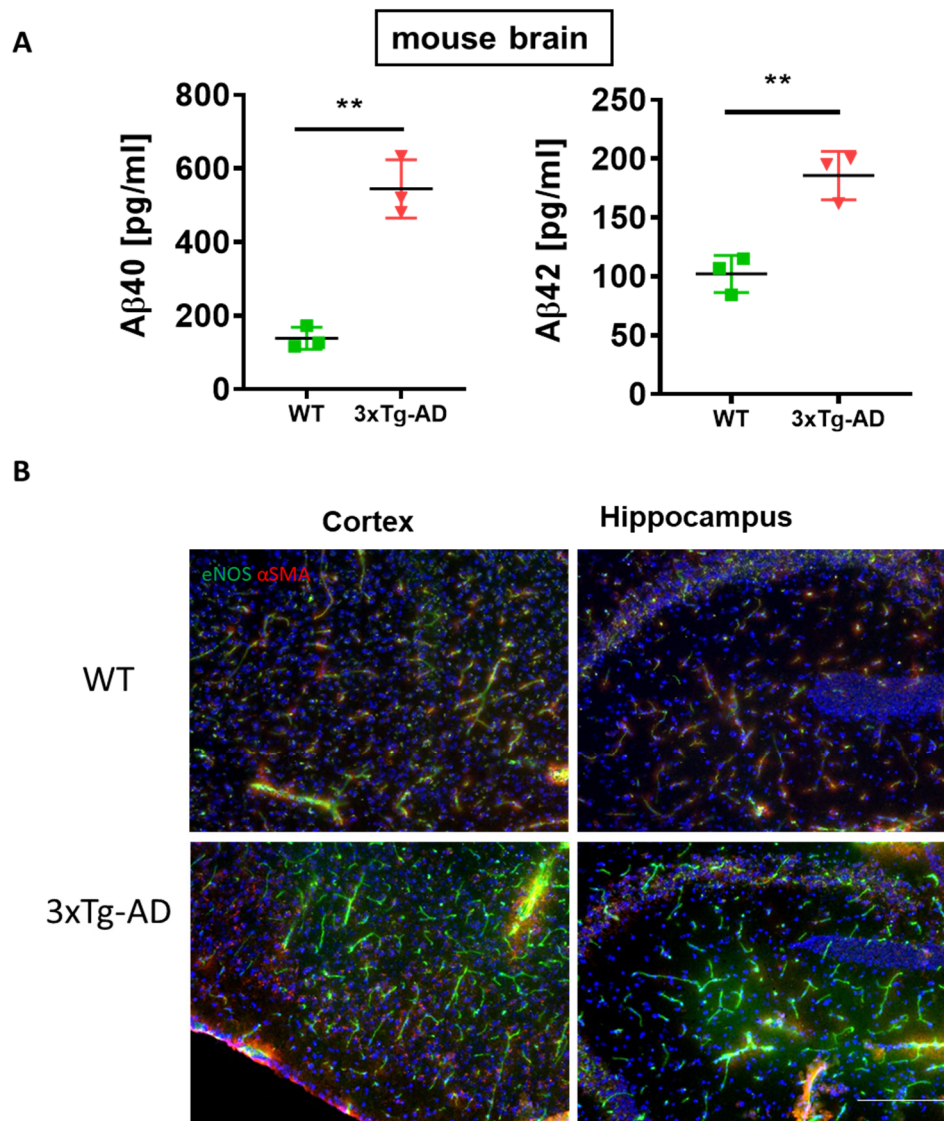


Figure 8. Correlation between generation of A β 42 and eNOS in the brain of 3×Tg-AD mice. **(A)** multiplex analysis of soluble A β 40 and A β 42 in 3×Tg-AD mouse brain homogenates vs. WT controls. Two-tailed Student's *t*-test. The data are shown as means \pm SEM, ** $p < 0.01$. **(B)** Increased expression of eNOS in the cortex and hippocampus of 3×Tg-AD mice vs. wild type (WT) controls. Brain sections taken from $n = 3$ mice per group were stained with eNOS (green) and α -SMA (red). Please note the increased expression of eNOS in the cortex and hippocampus of 3×Tg-AD mice. Scale bar of 200 μ m applies to all images in B.

Altogether, our data strongly supports the notion that A β plays an important role in the liver, maintaining sinusoidal permeability while exhibiting antifibrotic activity.

4. Discussion

Herein we describe the down-regulation of A β peptides in human and rodent fibrotic and cirrhotic livers and demonstrate A β -dependent regulation of liver sinusoidal permeability markers using different *in vitro* and *in vivo* models.

Activation and contraction of HSC in cirrhosis leads to increased extracellular matrix protein production resulting in defenestration of liver sinusoids [44] which limit blood-liver exchange and hepatic flow. We demonstrate that A β promotes the maintenance of a quiescent phenotype of HSC, as evidenced by its suppressive effects on α -SMA in activated HSC. Notably, in human cerebrovascular smooth muscle cells, A β induces the degradation of α -SMA [45].

Liver perfusion is regulated by NO, a powerful vasodilator produced in hepatocytes and endothelial cells [46]. The A β -induced inactivation of HSC reflected in downregulation of α -SMA and Col-1 and the increased production of NO in LSEC are similar to the effects of NO *in vivo*. Furthermore, HSC-targeted nanoparticle delivery of NO blocks hepatic Col-1 and α -SMA expression in rats with fibrosis and portal hypertension [47].

Our data suggest that A β exerts its antifibrotic function by both autocrine and paracrine effects on HSCs and LSECs: A β -suppressed TGF- β release and elevated NO-production by LSEC may inhibit Col-1 and α -SMA generation in HSC. The coordinated actions of A β and NO in the liver can be deduced from the functional link between them in neurochemical studies [15–18], and in our *in vitro* and *in vivo* studies demonstrating increased intracellular amounts of eNOS in A β -treated hLSEC, from high levels of A β and eNOS in the liver of TgAD mice, as well as from their simultaneous reduction in human and rodent cirrhosis. These results are consistent with the previously reported influence of A β fibrils on the generation of stable NO metabolites in the brain [48]. The causative relationship between the loss of A β and NO/eNOS in human and rodent cirrhotic/fibrotic liver shown here can be concluded from the established fact that NO positively regulates the expression of key enzymes of A β generation, BACE1, and PS1 [49]. Accordingly, the decrease of BACE1, PS1 and A β in human cirrhotic and rodent fibrotic liver explains the cross talk between A β - and NO-producing systems in healthy and diseased liver.

Another finding of this study is that cirrhosis down-regulates MBP, the main component of myelin sheaths which are significantly decreased during cirrhosis [35]. *In vitro*, MBP, together with A β and proinflammatory cytokines, strongly stimulate the expression of functional NO synthase-2 and the production of NO via activation of inducible NOS in adult human astrocytes [18]. Thus, it is likely that endothelial cell dysfunction during cirrhosis, characterized by poor permeability of liver sinusoids, is most likely partially caused by decreased MBP-stimulated production of NO.

Low levels of NEP and MBP in human cirrhosis may also decrease the hepatic clearance of A β delivered by the blood, leading to its increased plasma levels in cirrhotic patients [50]. The physiological significance of the rise of NEP in BDL is poorly understood. In view of the capacity of NEP to degrade A β , its upregulation in the BDL model of cirrhosis may exaggerate injury already promoted by low levels of PS1 and BACE1. From a physiological point of view, in the condition of low activity of A β -generating enzymes, a further decrease of A β by NEP degradation in BDL seems meaningless. High portal pressure in the BDL model is mainly ascribed to an excess of angiotensin (Ang) II generated from Ang I and catalyzed by ACE [51]. The contribution of NEP to increased portal pressure was disproved by vasoconstrictor effects of thiorphan, the specific inhibitor of NEP [52]. The increase of NEP in BDL liver could be a counter-regulatory mechanism contributing to generation of Ang-(1–7), a vasorelaxant that is increased in BDL to counteract the vasoconstrictor effects of ACE and Ang II [51].

Our findings (as outlined in Figure 9) highlight A β as a coordinator of multiple signals and interactions between hepatocytes, HSC, and LSEC, which are summarized in the following scenario: Healthy hepatocytes generate large amounts of A β via amyloidogenic proteolysis of APP by BACE and PS1 [6,53]. A β released into the extracellular space prevents fibrosis and increases vascular permeability. The importance of A β for liver-specific functions is particularly evident from its reduction in cirrhosis. During cirrhosis, the decreased expression of APP and its cleaving enzymes BACE1 and PS1, which

are regulated by NO [49], results in a dramatic intrahepatic decrease of A β . In cirrhosis, impaired synthesis of MBP, which mimics the effects of A β in increasing the production of NO [15–18] may further reduce sinusoidal permeability and damage hepatic nerves. A β controls the phenotype of HSC and LSEC by suppressing α -SMA, TGF- β , and Col-1, and by reverting activated HSC to quiescence. The A β -mediated cross talk between HSC and LSEC further promotes the permeability of LSEC via upregulation of eNOS and decreased Col-1 production by HSC.

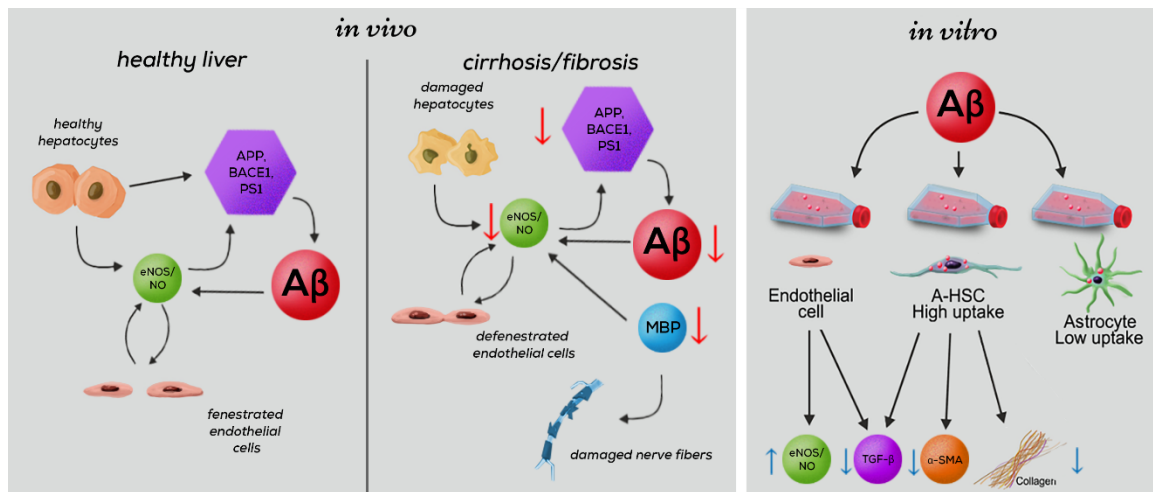


Figure 9. Influence of A β on the liver-specific functions associated with the permeability of liver sinusoids. A β -related activities in normal liver (left panel) and changes in cirrhosis affected liver (middle panel) based on *in vivo* results of this study. Summarized results showing the decrease of A β and proteins involved in its generation (APP, BACE-1, PS1) and degradation (NEP, MBP) during cirrhosis. Damage to nerve fibers through impaired production of MBP. Influence of impaired A β generation on the permeability of liver sinusoids via reduced eNOS. Summary of *in-vitro* results (right panel): A β -associated activities of cultured liver endothelial cells, activated HSC (A-HSC) and astrocytes. Schematic presentation of A β (pink circles) uptake by HSC and astrocytes. In our experiments, a greater capacity for internalization of A β by A-HSC vs. astrocytes was shown. Antifibrotic effects of A β on HSC and endothelial cells: decreased synthesis of TGF- β , α -SMA and collagen 1 by A-HSC; decreased production of TGF- β and increased synthesis of eNOS by liver endothelial cells.

The clinical implications of our findings can be summarized as follows: Because A β may have opposing effects in brain and liver, efforts to lower its accumulation in the brain could have adverse effects on the liver. This would need to be considered in any clinical trials utilizing A β antibodies, as well as BACE and γ -secretase inhibitors, which may influence the systemic A β concentration [54,55]. Therefore, more tailored treatment approaches, such as vaccination against brain-specific forms of A β , may be required, especially in patients with concurrent liver disease. One of these strategies targeting a posttranslationally modified A β [56] is currently under clinical evaluation.

Furthermore, our data suggest that A β constructs that specifically bind to HSC, either alone or in combination with an approach targeting IFN γ [57] and/or NO [46], might be a potential therapeutic option for the treatment of advanced stages of cirrhosis. These three target molecules are known to regulate the permeability of blood-tissue interfaces [58–60].

Author Contributions: G.H.B. conceived the project; G.H.B. and L.D. oversaw the entire project, analysed, interpreted the data and wrote the manuscript; R.W., T.S.W., W.M. and H.C. acquired and analysed the data and provided professional advice; T.S., M.F., B.P., M.G., A.L., U.S., M.B., R.T., and E.B.-K. performed experiments; S.L.F., R.G., F.G., T.L., E.S., M.S., C.H.G. and W.H.F.II revised and commented on the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by Interfaculty Centre for Pharmacogenomics and Pharma Research (ICEPHA) Graduate school Tuebingen-Stuttgart and the Robert Bosch Stiftung, Stuttgart, Germany. SLF is supported by NIH Grant RO1 DK-56621.

Acknowledgments: The authors thank Tigran Arakelyan (On-Off Studio, Yerevan, Armenia) for drawing of Figure 9 and Lisa Häslér/Jonas Neher (DZNE Tübingen) for assistance with A β V-plex analysis. We acknowledge support by Open Access Publishing Fund of University of Tübingen.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Ghiso, J.; Shayo, M.; Calero, M.; Ng, D.; Tomidokoro, Y.; Gandy, S.; Rostagno, A.; Frangione, B. Systemic catabolism of Alzheimer's A β 40 and A β 42. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 45897–45908. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Friedman, S.L. Hepatic stellate cells: Protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol. Rev.* **2008**, *88*, 125–172. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Buniatian, G.H.; Gebhardt, R.; Mecke, D.; Traub, P.; Wiesinger, H. Common myofibroblastic features of newborn rat astrocytes and cirrhotic rat liver stellate cells in early cultures and in vivo. *Neurochem. Int.* **1999**, *35*, 317–327. [[CrossRef](#)]
4. Buniatian, G.H.; Hartmann, H.J.; Traub, P.; Weser, U.; Wiesinger, H.; Gebhardt, R. Acquisition of blood-tissue barrier-supporting features by hepatic stellate cells and astrocytes of myofibroblastic phenotype. Inverse dynamics of metallothionein and glial fibrillary acidic protein expression. *Neurochem. Int.* **2001**, *38*, 373–383. [[CrossRef](#)]
5. Pihlaja, R.; Koistinaho, J.; Kauppinen, R.; Sandholm, J.; Tanila, H.; Koistinaho, M. Multiple cellular and molecular mechanisms Are involved in human A β clearance by transplanted adult astrocytes. *Glia* **2011**, *59*, 1643–1657. [[CrossRef](#)]
6. Huse, J.T.; Byant, D.; Yang, Y.; Pijak, D.S.; D'Souza, I.; Lah, J.J.; Lee, V.M.Y.; Doms, R.W.; Cook, D.G. Endoproteolysis of β -secretase (β -site amyloid precursor protein-cleaving enzyme) within its catalytic domain: A potential mechanism for regulation. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 17141–17149. [[CrossRef](#)]
7. Butterfield, D.A.; Boyd-Kimball, D. Amyloid β -Peptide (1-42) Contributes to the oxidative stress and neurodegeneration found in Alzheimer disease brain. *Brain Pathol.* **2006**, *14*, 426–432. [[CrossRef](#)]
8. Sutcliffe, J.G.; Hedlund, P.B.; Thomas, E.A.; Bloom, F.E.; Hilbush, B.S. Peripheral reduction of β -amyloid is sufficient to reduce brain β -amyloid: Implications for Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res.* **2011**, *89*, 808–814. [[CrossRef](#)]
9. Roher, A.E.; Esh, C.L.; Kokjohn, T.A.; Castaño, E.M.; Van Vickle, G.D.; Kalback, W.M.; Patton, R.L.; Luehrs, D.C.; Daus, I.D.; Kuo, Y.M.; et al. Amyloid beta peptides in human plasma and tissues and their significance for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement.* **2009**, *5*, 18–29. [[CrossRef](#)]
10. Shirotani, K.; Tsubuki, S.; Iwata, N.; Takaki, Y.; Harigaya, W.; Maruyama, K.; Kiryu-Seo, S.; Kiyama, H.; Iwata, H.; Tomita, T.; et al. Neprilysin degrades both amyloid β peptides 1-40 and 1-42 most rapidly and efficiently among thiorphan- and phosphoramidon-sensitive endopeptidases. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 21895–21901. [[CrossRef](#)]
11. Nakamura, T. Changes in expression of bile canalicular CD10 and sinusoidal CD105 (endoglin) in peritumoral hepatic tissue. *Tumori* **2009**, *95*, 495–500. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. DeLeve, L.D. Liver sinusoidal endothelial cells in hepatic fibrosis. *Hepatology* **2015**, *61*, 1740–1746. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Fung, J.; Mochida, S.; Inao, M.; Matsui, A.; Fujiwara, K. VEGF can act as vascular permeability factor in the hepatic sinusoids through upregulation of porosity of endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *280*, 481–485. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Argaw, A.T.; Asp, L.; Zhang, J.; Navrazhina, K.; Pham, T.; Mariani, J.N.; Mahase, S.; Dutta, D.J.; Seto, J.; Kramer, E.G.; et al. Astrocyte-derived VEGF-A drives blood-brain barrier disruption in CNS inflammatory disease. *J. Clin. Invest.* **2012**, *122*, 2454–2468. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Hartz, A.M.S.; Bauer, B.; Soldner, E.L.B.; Wolf, A.; Boy, S.; Backhaus, R.; Mihaljevic, I.; Bogdahn, U.; Klünemann, H.H.; Schuierer, G.; et al. Amyloid- β contributes to blood-brain barrier leakage in transgenic human amyloid precursor protein mice and in humans with cerebral amyloid angiopathy. *Stroke* **2012**, *43*, 514–523. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

16. Thiel, V.E.; Audus, K.L. Nitric oxide and blood-brain barrier integrity. *Antioxidants Redox Signal.* **2001**, *3*, 273–278. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Cho, D.H.; Nakamura, T.; Fang, J.; Cieplak, P.; Godzik, A.; Gu, Z.; Lipton, S.A. β -Amyloid-related mitochondrial fission and neuronal injury. *Science* **2009**, *324*, 102–105. [[CrossRef](#)]
18. Chiarini, A.; Dal Pra, I.; Menapace, L.; Pacchiana, R.; Whitfield, J.F.; Armato, U. Soluble amyloid beta-peptide and myelin basic protein strongly stimulate, alone and in synergism with combined proinflammatory cytokines, the expression of functional nitric oxide synthase-2 in normal adult human astrocytes. *Int. J. Mol. Med.* **2005**, *16*, 801–807.
19. Oddo, S.; Caccamo, A.; Shepherd, J.D.; Murphy, M.P.; Golde, T.E.; Kaye, R.; Metherate, R.; Mattson, M.P.; Akbari, Y.; LaFerla, F.M. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles. *Neuron* **2004**, *39*, 409–421. [[CrossRef](#)]
20. Oakley, H.; Cole, S.L.; Logan, S.; Maus, E.; Shao, P.; Craft, J.; Guillozet-Bongaarts, A.; Ohno, M.; Disterhoft, J.; Van Eldik, L.; et al. Intra-neuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: Potential factors in amyloid plaque formation. *J. Neurosci.* **2006**, *26*, 10129–10140. [[CrossRef](#)]
21. Cholongitas, E.; Marelli, L.; Shusang, V.; Senzolo, M.; Rolles, K.; Patch, D.; Burroughs, A.K. A systematic review of the performance of the Model for End-Stage Liver Disease (MELD) in the setting of liver transplantation. *Liver Transplant.* **2006**, *12*, 1049–1061. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Arias, M.; Sauer-Lehnen, S.; Treptau, J.; Janoschek, N.; Theuerkauf, I.; Buettner, R.; Gressner, A.M.; Weiskirchen, R. Adenoviral expression of a transforming growth factor- β 1 antisense mRNA is effective in preventing liver fibrosis in bile-duct ligated rats. *BMC Gastroenterol.* **2003**, *3*, 29. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Tag, C.G.; Sauer-Lehnen, S.; Weiskirchen, S.; Borkham-Kamphorst, E.; Tolba, R.H.; Tacke, F.; Weiskirchen, R. Bile duct ligation in mice: Induction of inflammatory liver injury and fibrosis by obstructive cholestasis. *J. Vis. Exp.* **2015**, *96*, e52438. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Tag, C.; Weiskirchen, S.; Hittatiya, K.; Tacke, F.; Tolba, R.; Weiskirchen, R. Induction of experimental obstructive cholestasis in mice. *Lab. Anim.* **2015**, *49*, 70–80. [[CrossRef](#)]
25. Proell, V.; Mikula, M.; Fuchs, E.; Mikulits, W. The plasticity of p19ARF null hepatic stellate cells and the dynamics of activation. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.* **2005**, *1744*, 76–87. [[CrossRef](#)]
26. Vogel, S.; Piantedosi, R.; Frank, J.; Lalazar, A.; Rockey, D.C.; Friedman, S.L.; Blaner, W.S. An immortalized rat liver stellate cell line (HSC-T6): A new cell model for the study of retinoid metabolism in vitro. *J. Lipid Res.* **2000**, *41*, 882–893.
27. Xu, L.; Hui, A.Y.; Albanis, E.; Arthur, M.J.; O'Byrne, S.M.; Blaner, W.S.; Mukherjee, P.; Friedman, S.L.; Eng, F.J. Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: New tools for analysis of hepatic fibrosis. *Gut* **2005**, *54*, 142–151. [[CrossRef](#)]
28. Lourdmat, A.; Buniatian, G.H.; Paul, C.; Verleysdonk, S.; Buecheler, R.; Buadze, M.; Proksch, B.; Schwab, M.; Gleiter, C.H.; Danielyan, L. Age-dependent astroglial vulnerability to hypoxia and glutamate: The role for erythropoietin. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e77182. [[CrossRef](#)]
29. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408. [[CrossRef](#)]
30. Huang, H.; Bihaqi, S.W.; Cui, L.; Zawia, N.H. In vitro Pb exposure disturbs the balance between A β production and elimination: The role of A β PP and neprilysin. *Neurotoxicology* **2011**, *32*, 300–306. [[CrossRef](#)]
31. Guglielmotto, M.; Aragno, M.; Autelli, R.; Giliberto, L.; Novo, E.; Colombatto, S.; Danni, O.; Parola, M.; Smith, M.A.; Perry, G.; et al. The up-regulation of BACE1 mediated by hypoxia and ischemic injury: Role of oxidative stress and HIF1 α . *J. Neurochem.* **2009**, *108*, 1045–1056. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Bruce, K.D.; Sihota, K.K.; Byrne, C.D.; Cagampang, F.R. The housekeeping gene YWHAZ remains stable in a model of developmentally primed non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int.* **2012**, *32*, 1315–1321. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Weiskirchen, S.; Tag, C.G.; Sauer-Lehnen, S.; Tacke, F.; Weiskirchen, R. Isolation and culture of primary murine hepatic stellate cells. In *Methods in Molecular Biology*; Humana Press Inc.: New York, NY, USA, 2017; Volume 1627, pp. 165–191.
34. Liao, M.C.; Ahmed, M.; Smith, S.O.; Van Nostrand, W.E. Degradation of amyloid β protein by purified myelin basic protein. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 28917–28925. [[CrossRef](#)]

35. Nam, S.W.; Song, H.J.; Back, S.J.; Kim, T.H.; Cho, S.H.; Han, J.-Y.; Yoo, K.; Lee, Y.S.; Chung, K.W. Decreased hepatic nerve fiber innervation in patients with liver cirrhosis. *Gut Liver* **2010**, *1*, 165–170. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Takase, S.; Leo, M.A.; Nouchi, T.; Lieber, C.S. Desmin distinguishes cultured fat-storing cells from myofibroblasts, smooth muscle cells and fibroblasts in the rat. *J. Hepatol.* **1988**, *6*, 267–276. [[CrossRef](#)]
37. Buniatian, G.; Gebhardt, R.; Schrenk, D.; Hamprecht, B. Colocalization of three types of intermediate filament proteins in perisinusoidal stellate cells: Glial fibrillary acidic protein as a new cellular marker. *Eur. J. Cell Biol.* **1996**, *70*, 23–32.
38. Chauhan, A.; Ray, I.; Chauhan, V.P.S. Interaction of amyloid beta-protein with anionic phospholipids: Possible involvement of Lys28 and C-terminus aliphatic amino acids. *Neurochem. Res.* **2000**, *25*, 423–429. [[CrossRef](#)]
39. Friedman, S.L.; Roll, F.J.; Boyles, J.; Bissell, D.M. Hepatic lipocytes: The principal collagen-producing cells of normal rat liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 8681–8685. [[CrossRef](#)]
40. Karrar, A.; Broomé, U.; Uzunel, M.; Qureshi, A.R.; Sumitran-Holgersson, S. Human liver sinusoidal endothelial cells induce apoptosis in activated T cells: A role in tolerance induction. *Gut* **2007**, *56*, 243–252. [[CrossRef](#)]
41. Ou-Yang, M.H.; Van Nostrand, W.E. The absence of myelin basic protein promotes neuroinflammation and reduces amyloid β -protein accumulation in Tg-5xFAD mice. *J. Neuroinflammation* **2013**, *10*, 134. [[CrossRef](#)]
42. Cho, S.M.; Lee, S.; Yang, S.H.; Kim, H.Y.; Lee, M.J.; Kim, H.V.; Kim, J.; Baek, S.; Yun, J.; Kim, D.; et al. Age-dependent inverse correlations in CSF and plasma amyloid- β (1-42) concentrations prior to amyloid plaque deposition in the brain of 3 \times Tg-AD mice. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 20185. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Santhanam, A.V.R.; D’Uscio, L.V.; He, T.; Das, P.; Younkin, S.G.; Katusic, Z.S. Uncoupling of endothelial nitric oxide synthase in cerebral vasculature of Tg2576 mice. *J. Neurochem.* **2015**, *134*, 1129–1138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Xu, B.; Broome, U.; Uzunel, M.; Nava, S.; Ge, X.; Kumagai-Braesch, M.; Hultenby, K.; Christensson, B.; Ericzon, B.G.; Holgersson, J.; et al. Capillarization of hepatic sinusoid by liver endothelial cell-reactive autoantibodies in patients with cirrhosis and chronic hepatitis. *Am. J. Pathol.* **2003**, *163*, 1275–1289. [[CrossRef](#)]
45. Jung, S.S.; Van Nostrand, W.E. Humanin rescues human cerebrovascular smooth muscle cells from A β -induced toxicity. *J. Neurochem.* **2003**, *84*, 266–272. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. McNaughton, L.; Puttagunta, L.; Martinez-Cuesta, M.A.; Kneteman, N.; Mayers, I.; Moqbel, R.; Hamid, Q.; Radomski, M.W. Distribution of nitric oxide synthase in normal and cirrhotic human liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 17161–17166. [[CrossRef](#)]
47. Duong, H.T.T.; Dong, Z.; Su, L.; Boyer, C.; George, J.; Davis, T.P.; Wang, J. The use of nanoparticles to deliver nitric oxide to hepatic stellate cells for treating liver fibrosis and portal hypertension. *Small* **2015**, *11*, 2291–2304. [[CrossRef](#)]
48. Ishii, K.; Muelhauser, F.; Liebl, U.; Picard, M.; Kühl, S.; Penke, B.; Bayer, T.; Wiessler, M.; Hennerici, M.; Beyreuther, K.; et al. Subacute NO generation induced by Alzheimer’s β -amyloid in the living brain: Reversal by inhibition of the inducible NO synthase. *FASEB J.* **2018**, *14*, 1485–1489.
49. Nagai, N.; Ito, Y.; Shibata, T.; Kubo, E.; Sasaki, H. A positive feedback loop between nitric oxide and amyloid β (1-42) accelerates mitochondrial damage in human lens epithelial cells. *Toxicology* **2017**, *381*, 19–30. [[CrossRef](#)]
50. Wang, Y.R.; Wang, Q.H.; Zhang, T.; Liu, Y.H.; Yao, X.Q.; Zeng, F.; Li, J.; Zhou, F.Y.; Wang, L.; Yan, J.C.; et al. Associations between hepatic functions and plasma amyloid-beta levels—implications for the capacity of liver in peripheral amyloid-beta clearance. *Mol. Neurobiol.* **2017**, *54*, 2338–2344. [[CrossRef](#)]
51. Herath, C.B.; Lubel, J.S.; Jia, Z.; Velkoska, E.; Casley, D.; Brown, L.; Tikellis, C.; Burrell, L.M.; Angus, P.W. Portal pressure responses and angiotensin peptide production in rat liver are determined by relative activity of ACE and ACE2. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* **2009**, *297*, G98–G106. [[CrossRef](#)]
52. Ferro, C.J.; Spratt, J.C.; Haynes, W.G.; Webb, D.J. Inhibition of neutral endopeptidase causes vasoconstriction of human resistance vessels in vivo. *Circulation* **1998**, *97*, 2323–2330. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Steiner, H.; Haass, C. Intramembrane proteolysis by presenilins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2000**, *1*, 217–224. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Wisniewski, T.; Drummond, E. Developing therapeutic vaccines against Alzheimers disease. *Expert Rev. Vaccines* **2016**, *15*, 401–415. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

55. May, P.C.; Willis, B.A.; Lowe, S.L.; Dean, R.A.; Monk, S.A.; Cocke, P.J.; Audia, J.E.; Boggs, L.N.; Borders, A.R.; Brier, R.A.; et al. The potent BACE1 inhibitor LY2886721 elicits robust central A β pharmacodynamic responses in mice, dogs, and humans. *J. Neurosci.* **2015**, *35*, 1199–1210. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. DeMattos, R.B.; Lu, J.; Tang, Y.; Racke, M.M.; DeLong, C.A.; Tzaferis, J.A.; Hole, J.T.; Forster, B.M.; McDonnell, P.C.; Liu, F.; et al. A Plaque-specific antibody clears existing β -amyloid plaques in Alzheimer's disease mice. *Neuron* **2012**, *76*, 908–920. [[CrossRef](#)]
57. Bansal, R.; Prakash, J.; Post, E.; Beljaars, L.; Schuppan, D.; Poelstra, K. Novel engineered targeted interferon-gamma blocks hepatic fibrogenesis in mice. *Hepatology* **2011**, *54*, 586–596. [[CrossRef](#)]
58. Ng, C.T.; Fong, L.Y.; Sulaiman, M.R.; Moklas, M.A.M.; Yong, Y.K.; Hakim, M.N.; Ahmad, Z. Interferon-Gamma Increases Endothelial Permeability by Causing Activation of p38 MAP Kinase and Actin Cytoskeleton Alteration. *J. Interf. Cytokine Res.* **2015**, *35*, 513–522. [[CrossRef](#)]
59. Durán, W.N.; Beuve, A.V.; Sánchez, F.A. Nitric oxide, S-Nitrosation, and endothelial permeability. *IUBMB Life* **2013**, *65*, 819–826. [[CrossRef](#)]
60. Tai, L.M.; Holloway, K.A.; Male, D.K.; Loughlin, A.J.; Romero, I.A. Amyloid- β -induced occludin down-regulation and increased permeability in human brain endothelial cells is mediated by MAPK activation. *J. Cell. Mol. Med.* **2010**, *14*, 1101–1112. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Consequences of Amyloid- β Deficiency for the Liver

Gayane Hrachia Buniatian,* Ute Schwinghammer, Roman Tremmel, Holger Cynis, Thomas S. Weiss, Ralf Weiskirchen, Volker M. Lauschke, Sonia Youhanna, Isbaal Ramos, Maria Valcarcel, Torgom Seferyan, Jens-Ulrich Rahfeld, Vera Rieckmann, Kathrin Klein, Marine Buadze, Victoria Weber, Valentina Kolak, Rolf Gebhardt, Scott L. Friedman, Ulrike C. Müller, Matthias Schwab,* and Lusine Danielyan*

The hepatic content of amyloid beta ($A\beta$) decreases drastically in human and rodent cirrhosis highlighting the importance of understanding the consequences of $A\beta$ deficiency in the liver. This is especially relevant in view of recent advances in anti- $A\beta$ therapies for Alzheimer's disease (AD). Here, it is shown that partial hepatic loss of $A\beta$ in transgenic AD mice immunized with $A\beta$ antibody 3D6 and its absence in amyloid precursor protein (APP) knockout mice (APP-KO), as well as in human liver spheroids with APP knockdown upregulates classical hallmarks of fibrosis, smooth muscle alpha-actin, and collagen type I. $A\beta$ absence in APP-KO and deficiency in immunized mice lead to strong activation of transforming growth factor- β (TGF β), alpha secretases, NOTCH pathway, inflammation, decreased permeability of liver sinusoids, and epithelial-mesenchymal transition. Inversely, increased systemic and intrahepatic levels of $A\beta$ 42 in transgenic AD mice and neprilysin inhibitor LBQ657-treated wild-type mice protect the liver against carbon tetrachloride (CCl₄)-induced injury. Transcriptomic analysis of CCl₄-treated transgenic AD mouse livers uncovers the regulatory effects of $A\beta$ 42 on mitochondrial function, lipid metabolism, and its onco-suppressive effects accompanied by reduced synthesis of extracellular matrix proteins. Combined, these data reveal $A\beta$ as an indispensable regulator of cell-cell interactions in healthy liver and a powerful protector against liver fibrosis.

1. Introduction

Amyloid beta ($A\beta$) deposition in the brain is one of the main histopathological hallmarks of Alzheimer's disease (AD). To combat AD, various strategies directed at lowering cerebral $A\beta$ by targeting $A\beta$ itself or enzymes involved in amyloid precursor protein (APP) processing have been investigated in clinical trials.^[1] Among those, antibodies against different $A\beta$ species such as oligomers, and fibrils in amyloid plaques^[2] are considered promising, with Aducanumab and Lecanemab as FDA-approved antibodies to treat AD.^[3] The steady-state level of $A\beta$ depends on the turnover of APP, a type1 transmembrane protein, which is processed via sequential cleavage by three proteases: α -, β -, and γ -secretases.^[4] Cleavage of APP by β -secretase (BACE), results in the generation of APP CTF-99, from which $A\beta$ is cleaved by presenilin 1 (PSEN1), the catalytic subunit of the gamma-secretase complex.^[5]

The liver is a key player in $A\beta$ removal from the body, accounting for 60% of its

G. H. Buniatian, U. Schwinghammer, M. Buadze, V. Weber, V. Kolak, M. Schwab, L. Danielyan
Department of Clinical Pharmacology
University Hospital of Tuebingen
Auf der Morgenstelle 8, 72076 Tuebingen, Germany
E-mail: buniatian@web.de; matthias.schwab@ikp-stuttgart.de;
lusine.danielyan@med.uni-tuebingen.de

R. Tremmel, V. M. Lauschke, K. Klein, M. Schwab
Dr. Margarete Fischer-Bosch Institute of Clinical Pharmacology
Auerbachstr. 112, 70376 Stuttgart, Germany

R. Tremmel, V. M. Lauschke, K. Klein
University of Tuebingen
72074 Tuebingen, Germany

H. Cynis, J.-U. Rahfeld, V. Rieckmann
Department of Drug Design and Target Validation
Fraunhofer Institute for Cell Therapy and Immunology
Weinbergweg 22, 06120 Halle (Saale), Germany

H. Cynis
Junior Research Group, Immunomodulation in Pathophysiological Processes
Faculty of Medicine
Martin-Luther-University Halle-Wittenberg
Weinbergweg 22, 06120 Halle (Saale), Germany

T. S. Weiss
Children's University Hospital (KUNO)
University Hospital Regensburg
Franz-Josef-Strauss-Allee 11, 93053 Regensburg, Germany

 The ORCID identification number(s) for the author(s) of this article can be found under <https://doi.org/10.1002/advs.202307734>

© 2024 The Authors. Advanced Science published by Wiley-VCH GmbH. This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

DOI: 10.1002/advs.202307734

clearance in the periphery.^[6] A high level of A β in the healthy liver is generated by the production of A β by liver cells, in addition to its delivery by blood.^[7] The functional role of A β in the liver remains to date unknown.

Because several key players of A β generation and degradation are involved in different pro-fibrogenic pathways, we hypothesized that A β is essential for maintaining healthy liver function. For instance, PSEN1 is required for the cleavage and activation of NOTCH, which is characteristic of rodent and human fibrosis.^[8,9] This together with our previous discovery of decreased APP and A β in human and rodent cirrhotic liver^[10] led us to the hypothesis that reduced APP and BACE1 may shift the γ -secretase activity toward NOTCH cleavage thereby contributing to the loss of A β in fibrotic liver.

Another important crosslink between APP and NOTCH pathway is the dual activity of α -secretases cleaving APP to non-amyloidogenic APP α and NOTCH which is further processed by presenilin.

A β also decreases transforming growth factor- β (TGF β) in liver sinusoidal endothelial cells^[10] and reduces the activity of ubiquitin C-terminal hydrolase L1 (UCHL1) in neuronal cells.^[11] UCHL1 is a deubiquitinase with profibrogenic effects in the

liver that is strongly upregulated upon HSC activation and regulates their proliferation.^[12] These findings drove us to explore whether the loss of A β in APP knock-out (APP-KO) mice or its systemic decrease in anti-A β immunized mice can lead to the development of fibrosis. Furthermore, we investigated the hepatoprotective effects of A β by inducing liver fibrosis with carbon tetrachloride (CCl₄) in wild-type (WT) mice with normal levels of A β and in transgenic AD mice (3xTg-AD) with high systemic A β . To address the translational implications of maintaining high A β levels in the liver, we additionally tested the features of an A β -degrading enzyme (neprilysin) inhibitor to protect against CCl₄-induced fibrosis. The engagement of A β in cell-type specific functions of defense against liver fibrosis was investigated using a variety of primary cultures, cell lines, and human liver spheroids. This study provides the first direct evidence that A β protects against liver injury by targeting different key activators of hepatic fibrosis and determinants of liver sinusoidal permeability.

2. Results and Discussion

2.1. A β Regulates the Normal Function of Liver Endothelial Cells, Hepatocytes and Hepatic Stellate Cells

In line with previously shown A β uptake and degradation by hepatic stellate cells (HSC),^[10] here we demonstrate the utilization of A β by human liver sinusoidal endothelial cell (hLSEC) line (Figure 1A) and by HepG2 cells (Figure S1A, Supporting Information). In hLSEC, the uptake of A β contributed to increased permeability reflected by intracellular accumulation of FITC-dextran 150 kDa (Figure 1B,C), decreased production of collagen I (Col1a, Figure S1B, Supporting Information), laminin I and collagen IV (Figure 1D,E). As important components of the basement membrane, laminin, and collagen IV are acknowledged to raise the blood-tissue barrier during liver fibrosis.^[13] The pore-forming capacity of A β in brain capillaries leading to leakiness of the blood-brain barrier (BBB) has been established in vivo and in culture.^[14] During cirrhosis and in culture conditions the initially differentiated LSEC lose fenestrations and acquire a de-differentiated phenotype characterized by reduced capacity to produce nitric oxide (NO) and by increased expression of a marker of continuous endothelium CD31.^[15] A β induced NO generation in primary hLSEC and vascular endothelial growth factor (VEGF) release by primary human HSC (Figure 1F).

Furthermore, A β 40 and 42 (1000 pg mL⁻¹) reduced the proteolytic activation of TGF β in a hLSEC line shown by decreased liberation of the 12.5–13 kDa monomer and the active 25 kDa fragment of TGF β (Figure 1G) and downregulation of TGF β mRNA (Figure S1B, Supporting Information). Notably, the effect of A β 42 on TGF β was more prominent than that of A β 40 (Figure 1G). The above results suggest that A β may act as a potent mediator of paracrine signaling and crosstalk between hLSEC and HSC which is important for the transcellular exchange in liver sinusoids. Like primary murine HSCs,^[10] human primary HSCs responded to A β by reduced expression of smooth muscle alpha-actin (α SMA) mRNA (Figure 1H). Thus, A β may govern the activation of HSC by the direct action on TGF β expression

R. Weiskirchen

Institute of Molecular Pathobiochemistry
Experimental Gene Therapy and Clinical Chemistry
RWTH University Hospital Aachen
Pauwelsstr. 30, 52074 Aachen, Germany

V. M. Lauschke, S. Youhanna
Department of Physiology and Pharmacology Karolinska Institute
Stockholm 171 77, Sweden

I. Ramos, M. Valcarcel
Innovative Technologies in Biological Systems SL (INNOPROT)
Bizkaia, Derio 48160, Spain

T. Seferyan
H. Buniatian Institute of Biochemistry
National Academy of Sciences of the Republic of Armenia (NAS RA)
5/1 Paruir Sevak St., Yerevan 0014, Armenia

R. Gebhardt
Rudolf-Schönheimer Institute of Biochemistry
Faculty of Medicine
University of Leipzig
Johannisstraße 30, 04103 Leipzig, Germany

S. L. Friedman
Division of Liver Diseases
Icahn School of Medicine at Mount Sinai
1425 Madison Ave, New York, NY 10029, USA

U. C. Müller
Institute for Pharmacy and Molecular Biotechnology IPMB
Department of Functional Genomics
University of Heidelberg
Im Neuenheimer Feld 364, 69120 Heidelberg, Germany

M. Schwab, L. Danielyan
Departments of Biochemistry and Clinical Pharmacology
and Neuroscience Laboratory
Yerevan State Medical University
2- Koryun St, Yerevan 0025, Armenia

M. Schwab
Cluster of Excellence iFIT (EXC2180) "Image-guided and Functionally
Instructed Tumor Therapies"
University of Tübingen
72076 Tübingen, Germany

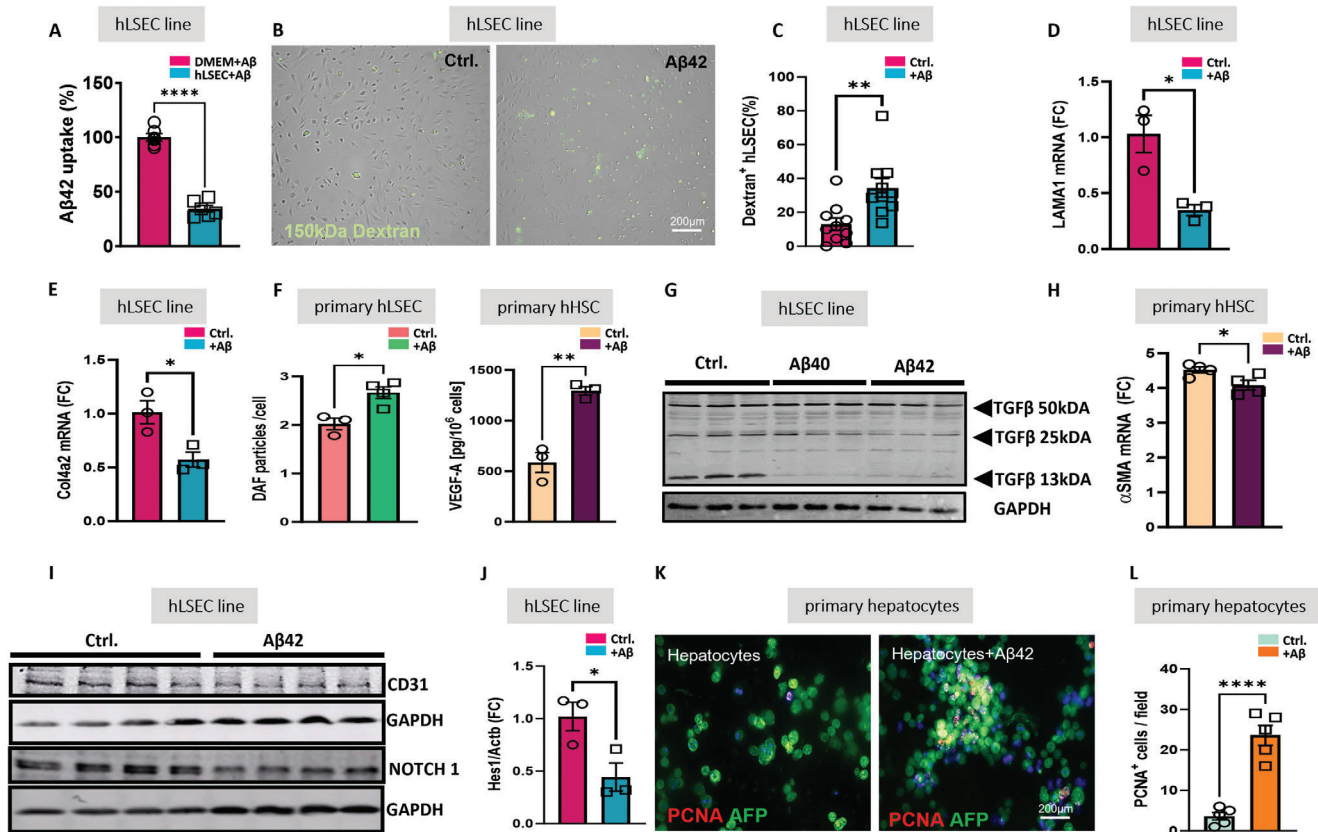


Figure 1. In vitro effects of Aβ42 on LSEC, HSC, and hepatocytes. A) Aβ42 utilization in human LSEC (hLSEC) line measured by a decrease of Aβ42 in cell culture supernatant normalized to culture medium without cells supplemented with Aβ42 (DMEM+ Aβ); B,C) live cell imaging and quantification of FITC-Dextran 150 kDa uptake by hLSEC line incubated 24 h with and without Aβ42 (3000 pg mL⁻¹, n = 10 per group); D) laminin 1 (LAMA1) mRNA qPCR in hLSEC line (n = 3 per group); E) collagen 4a (Col4a2) mRNA qPCR in hLSEC line (n = 3 per group); F) Assessment of NO by Difluorofluorescein Diacetate (DAF) in primary hLSEC (n = 4 per group) and VEGF in primary human HSC (hHSC) by immunofluorescence staining (n = 3 per group); G) Western Blot (WB) analysis of TGFβ in hLSEC line incubated with Aβ40 or Aβ42 (1000 pg mL⁻¹ each), GAPDH served as a loading control (n = 3 per group); H) αSMA mRNA qPCR in primary hHSC ±Aβ42 (n = 4 per group); I) WB of CD31 and NOTCH1 in hLSEC line +/- Aβ42 (n = 4 per group); J) Hes1 mRNA qPCR in hLSEC line ±Aβ42 (n = 3 per group); K) Immunofluorescence staining of PCNA in primary murine hepatocytes ±Aβ42 (1000 pg mL⁻¹; n = 5 per group) counterstained with AFP and DAPI; L) Quantification of PCNA⁺ hepatocytes ±Aβ42 (1000 pg mL⁻¹; n = 5 per group). The data are presented as means ± SEM. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.005, and ****p < 0.0001; two-tailed Student's t-test (A-F, H, J, L).

in HSC and indirectly via a paracrine effect by decreasing its production by LSEC.

Along with CD31 as a marker of continuous endothelium, Aβ reduced another hallmark of fibrosis/cirrhosis, NOTCH, and its downstream effector Hes 1 (Figure 1I,J). While activated during liver fibrosis, the NOTCH pathway is inhibited in the brain affected by AD pathology.^[16] The down-regulation of NOTCH 1 and Hes-1 in hLSEC by Aβ shown here hints at the ability of Aβ to suppress the NOTCH-cleaving activity of PSEN1. The activation of PSEN1 was observed in steatosis, inflammation, and liver fibrosis.^[17] Aβ also appears to downregulate the expression of TGFβ, NOTCH1, and alpha-fetoprotein (AFP) in HepG2 cells (Figure S1C, Supporting Information). Taken together, Aβ suppresses multiple mechanisms commonly linked to fibrosis and hepatocellular carcinoma (HCC), such as the myofibroblastic transformation of HSC, upregulation of ECM proteins, activation of TGFβ, NOTCH signaling pathway and epithelial-mesenchymal transition (EMT), which are all considered as harbingers of hepatocarcinogenesis.^[18]

The unique regenerative capacity of hepatocytes in vivo is strongly limited in culture except when endogenous pathways promoting their growth in a healthy liver milieu are activated, such as Wnt/ β-catenin.^[19] Aβ induced fivefold up-regulation of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in primary murine hepatocytes (Figure 1K,L) reflecting the requirement for this peptide to repair and maintain functional liver cell mass, which is lost in chronic liver diseases.^[20]

Indeed, this dependency of survival and functionality of hepatocytes on the Aβ production was confirmed in 3D human liver spheroids containing primary human hepatocytes (PHH) and primary HSC. Knock-down of APP (APP-KD) in this organotypic model resulted in a significant downregulation of APP transcripts (Figure 2A) leading to an upregulation of αSMA (p < 0.05) and a trend toward increased expression of COL1A1 (p = 0.067; Figure 2B,C). Furthermore, APP-KD increased infiltration of αSMA+ HSCs and EMT of hepatocytes shown by the strong reduction of CYP3A4+ hepatocytes and the appearance of CYP3A4+ αSMA+ cells (Figure 2D,E).

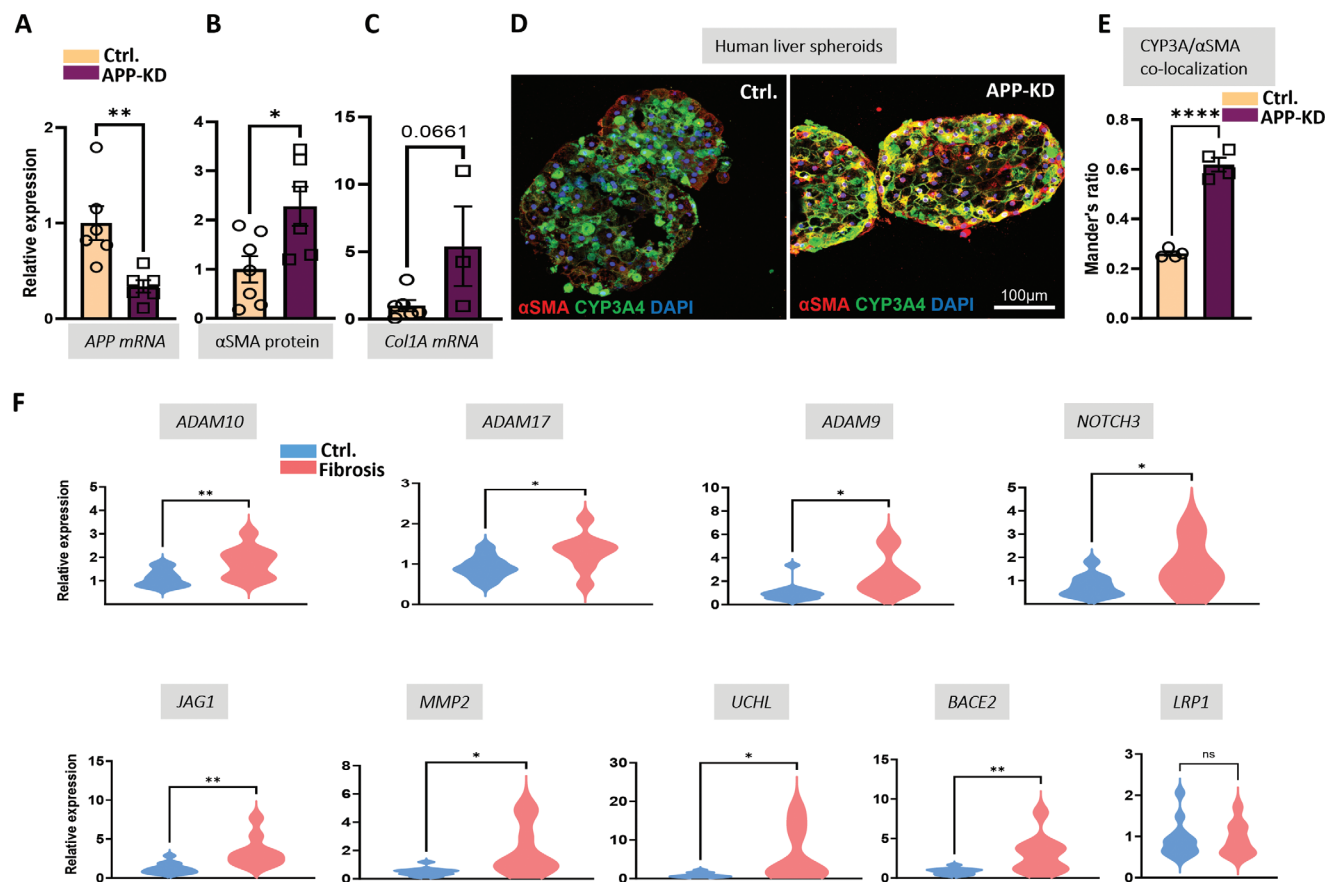


Figure 2. Phenotypic changes in APP knock-down human liver spheroids and expression of APP processing enzymes and NOTCH activation genes in human fibrotic liver. A–C), Expression of APP, α SMA, and COL1A1 are shown in control (Ctrl.) and APP knock-down (APP-KD) human spheroids consisting of primary hepatocytes and HSC ($n \geq 3$); D) representative immunofluorescent images of CYP3A4 and α SMA in APP-KD and control (Ctrl.) spheroids. Note that the overlap of α SMA and CYP3A4 drastically increases in APP-KD, indicative of epithelial-mesenchymal transition; E) quantification of the overlap of α SMA and CYP3A4 signals using Mander's Overlap Coefficient; F) qPCR of ADAM10, ADAM17, ADAM9, NOTCH3, JAG1, MMP2, UCHL, BACE2, and LRP-1 mRNA in normal (Ctrl.) and fibrotic (fibrosis) human liver tissue. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and **** $p < 0.001$ using a two tailed t -test (A–F), ns: not significant. For NOTCH3 and ADAM9 (in F) Mann–Whitney test was used.

2.2. Simultaneous Activation of NOTCH Signaling and Decreased BACE1 in Human Fibrotic Liver

Analysis of human fibrotic liver specimens provided the mechanistic background of the previously reported phenomenon of $A\beta_{42}$ loss in rodents and human liver fibrosis.^[10] Upregulation of A disintegrin and a metalloprotease 9 (ADAM9) and alpha secretases ADAM10 and ADAM17 in fibrotic human livers (Figure 2F) implicates reduced APP processing along the amyloidogenic pathway. Remarkably, besides its α -secretase activity for APP in non-neural cells,^[21] ADAM9 promotes the production of bioactive TGF β by cleaving the TGF β latency-associated peptide.^[22] Increased demand for NOTCH-cleaving activity by γ -secretase in human liver fibrosis is reflected by the upregulation of NOTCH3 and JAG1 mRNA (Figure 2F). Further on, upregulation of MMP-2 (gelatinase A) in fibrotic human tissue (Figure 2F), facilitates the degradation of $A\beta_{40}$ and $A\beta_{42}$.^[23] The next cause of $A\beta$ loss in fibrosis is the up-regulation of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 (UCHL1, Figure 2F) which is known to decrease the BACE catalyzed cleavage of an APP frag-

ment, C99, hereby reducing the $A\beta$ levels in vitro as shown previously in HUCH cells.^[24] Conversely, the upregulation of $A\beta_{42}$ decreases the activity of UCHL1 via activation of NF- κ B pathway and BACE1.^[11] The antagonistic relationship of UCHL1 to $A\beta$ and BACE explains the $A\beta$ loss. The next $A\beta$ reducing event in human fibrosis is the upregulation of BACE2 (Figure 2F). This homolog of BACE1 cleaves wild-type APP efficiently within the $A\beta$ region hereby limiting the production of $A\beta$ in BACE2-expressing tissues.^[25]

In addition to the impaired generation and increased degradation of $A\beta$, the hepatic content of $A\beta$ may also be influenced by the trans- and intracellular transport of the peptide delivered through the bloodstream. Among the $A\beta$ transporters, low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP-1) is responsible for $A\beta$ efflux from the brain and has been shown to significantly impact $A\beta$ uptake by the liver.^[26] Our data show that at least at the RNA level LRP-1 is not affected in pediatric patients with hepatic fibrosis (Figure 2F). However, acknowledging the existence of a great variety of other $A\beta$ transporters and $A\beta$ -binding proteins in the blood,^[27] the extent to which changes

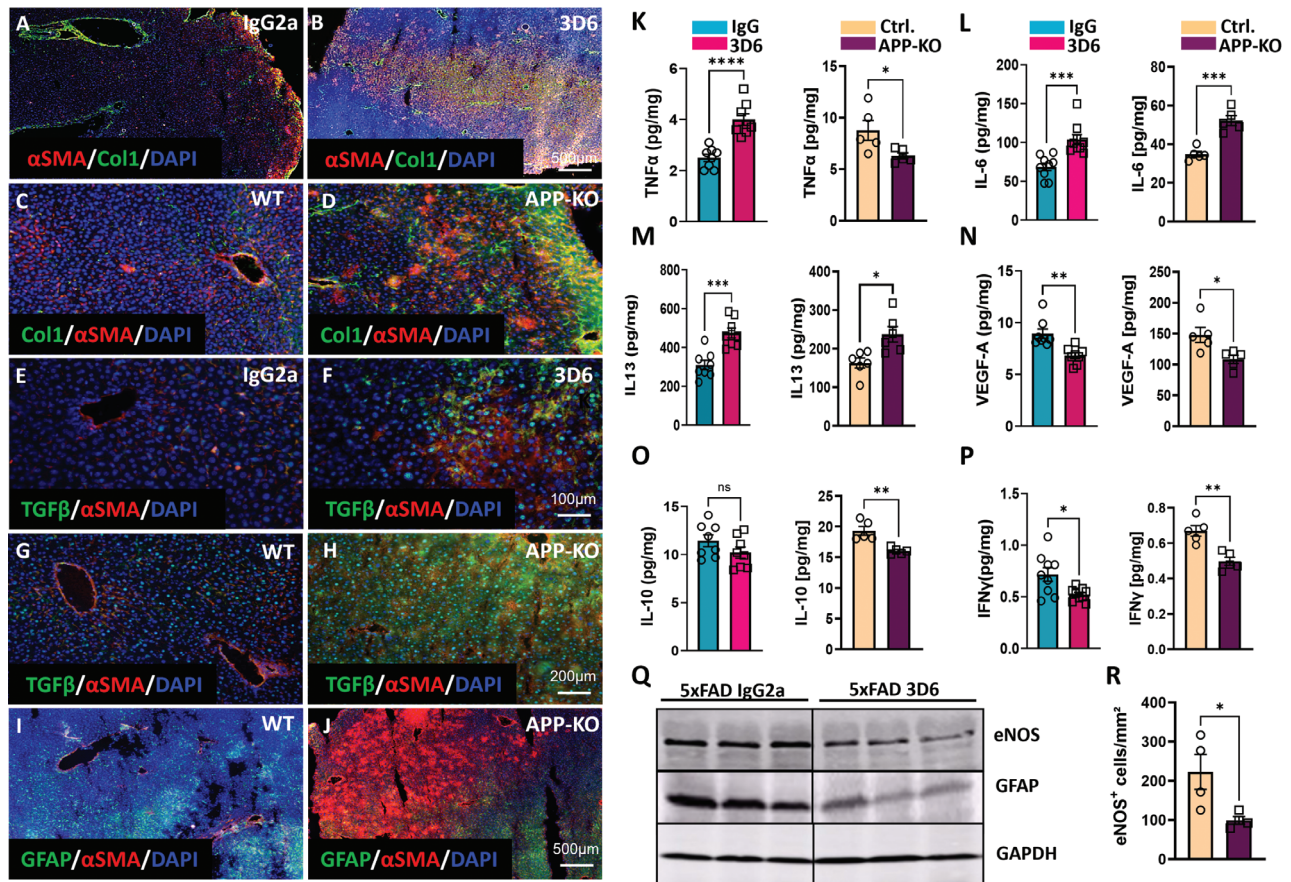


Figure 3. Assessment of fibrotic, inflammatory, and liver sinusoidal permeability markers in APP-KO and 3D6-immunized 5xFAD mice. A–J) Representative images of APP-KO versus WT and 5xFAD mouse liver sections after 8-month immunization with 3D6 versus IgG2a control antibodies. Immunofluorescence staining of (A–D) α SMA /Col1 /DAPI; E–H) TGF β / α SMA /DAPI; I, J) GFAP / α SMA /DAPI ($n = 4$ per group); K–P) Multiplex analysis of TNF α , IL-6, IL-13, VEGF-A, IL-10, and IFN γ in liver homogenates of APP-KO versus WT ($n = 5$ per group) and 5xFAD mice after 8-month immunization with 3D6 versus IgG2a control antibodies ($n = 9$ per group); Q) WB of eNOS and GFAP in liver homogenates of 5xFAD mice after 8-month immunization with 3D6 versus IgG2 control antibodies ($n = 3$ per group); R) Quantification of eNOS⁺ cells in liver sections of APP-KO versus WT mice in 10 liver slices from $n = 3$ mice per group. The data are presented as means \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, and **** $p < 0.001$; two-tailed Student's t -test (K–P, R).

in transporter systems contribute to the hepatic content of A β and the progression of fibrosis remains a subject for future investigations.

2.3. Passive A β Immunization and APP Knockout Lead to the Development of Liver Fibrosis

To explore the consequences of partial or complete loss of A β for liver function, we employed A β -neutralizing passive immunization and APP-KO models to deplete or reduce A β levels. For the partial loss of A β , mice with high and normal systemic levels of A β 42, 5xFAD, and wild type C57Bl/6J (WT) respectively, were immunized with the mouse monoclonal antibody against the N terminus of A β 42, 3D6. This antibody recognizes both soluble A β and insoluble A β in vivo and in vitro.^[28,29] 3D6 treatment led to a significant intrahepatic decrease of A β 42 in all immunized animals, starting from 6-week immunization in WT to 6-week and 8-month immunization in 5xFAD mice (Figure S2A–C, Supporting Information).

The unchanged A β 40 levels in response to immunization (Figure S2A–C, Supporting Information) are in line with previously reported ineffectiveness of 3D6 to lower A β 40 in the brain of the Tg2576 mouse model of AD.^[29] Surface plasmon resonance spectroscopy confirmed that 3D6, which is mainly directed to the human A β , binds murine A β 42 with a K_D of 185 nM (Figure S2D, Supporting Information). While in 3D6 immunized WT and 5xFAD mice the level of A β 42 is partially retained, the genetic deletion of APP in APP-KO mice, reflected by the absence of APP at the protein and mRNA level (Figure S3A, Supporting Information), is a dead-end situation for the production of A β , since APP is the only source of A β 42.

Partial loss of bioactive A β in immunized wild type and 5xFAD mice (i-WT and i-5xFAD) and the complete loss of A β in APP-KO mice resulted in the widely accepted signature of fibrosis illustrated by increased production of interstitial Col1, α SMA, and TGF β (Figure 3A–H; Figure S3B–D, Supporting Information), laminin positive microvessels and Col4 (Figure S3C,D, Supporting Information). In APP-KO livers, advanced fibrosis/cirrhosis is evident by structural heterogeneity of liver tissue, large areas

enriched with Col1 and inhabited by HSC strongly expressing α SMA, while largely lacking glial fibrillary acidic protein (GFAP, Figure 3I,J). Of note, the areas with α SMA-positivity were clearly delineated from GFAP+ areas (Figure 3J) representing the non-myofibroblastic phenotype of HSC.^[30] The changes in fibrotic, inflammatory, and endothelial permeability markers were evidenced by upregulation of α SMA, Col1, and TNF α in 6-week immunization in i-WT (Figure S4, Supporting Information) and additionally by IL-6, and IL-13 in 6-week i-5xFAD (Figure S5, Supporting Information) which remained elevated in 8-month immunized animals (Figure 3K–M). Reduced level of TNF α in APP-KO (Figure 3K) most likely reflects the sensitivity of this cytokine to A β levels and its engagement in A β production as shown for astroglia and neurons.^[31] Our data hint at possible A β associated TNF α activity in the liver that intensifies the amyloidogenic processing of APP, which cannot be realized in APP-KO. Besides deep morphological restructuring of the liver tissue, strong α SMA, Col1, TGF β expression, and inflammatory response reflected by IL-6 and IL-13, a higher degree of fibrosis in APP-KO livers, compared to i-5xFAD, is demonstrated by additionally decreased levels of IL-10 and IFN γ (Figure 3O,P). Both cytokines prevent chronic fibroproliferative diseases by inhibiting TGF β .^[32] IFN γ also inhibits HSC activation^[33] and like VEGF contributes to the permeability of liver sinusoids.^[34,35]

The impaired permeability of liver sinusoids in i-5xFAD, i-WT, and APP-KO mice was also evidenced by decreased production of VEGF (Figure 3N; Figure S5B, Supporting Information) and eNOS (Figure 3Q–R) and by abruptly decreased expression of GFAP (Figure 3I,J), which is associated with decreased barrier features of blood–liver and blood–brain interfaces.^[36] The synergistic activities and mutual inducibility of GFAP, A β , and NO have previously been demonstrated in mouse primary astrocytes.^[37]

Unlike the liver in which A β level correlates with eNOS that supports healthy organ function, in the brain some studies attribute the tissue damage and cognitive impairment to a deficit of eNOS,^[38] whereas others, find a link between upregulation of eNOS and increased deposits of A β during AD.^[39] In the brain of APP-KO mice, suppressed hippocampal expression of eNOS was paralleled by upregulation of TGF β (Figure S6A, Supporting Information). Opposite to its profibrogenic function in the liver, the brain TGF β is in demand for the development of neurons.^[40] Moreover, impairment of TGF β signaling leads to exacerbated deposition of A β .^[41] Also, the upregulation of laminin in the brains of APP-KO and Col IV in i-5xFAD (Figure S6A–C, Supporting Information), supports the physiological priorities of CNS to maintain the barrier function of the brain capillaries.^[42] Contrary to the BBB in a healthy brain, the establishment of the blood–liver barrier by extracellular matrix (ECM) proteins (Figures S3C,D and S6D, Supporting Information) followed by displacement of permeability markers, VEGF, IFN γ , and eNOS (Figure 3N,P–R) leads to the progression of liver fibrosis.

2.4. A β Reduction or Complete Loss is Linked to NOTCH Pathway Activation

In human and rodent fibrosis TGF β -signaling is accompanied by simultaneous activation of its partner pathway NOTCH.^[8,43]

The activation of NOTCH depends on its cleavage by alpha-secretases ADAM10 and ADAM 17 at site S2 and gamma-secretase-mediated (S3 cleavage) release of NOTCH intracellular domain (NICD) into the cytoplasm. NICD further translocates into the nucleus, where it activates transcription of its target genes including Hes1.^[44] Immunization of 5xFAD mice and APP-KO resulted in large areas populated with α SMA positive and negative cells with nuclear localization of NICD (Figure 4A–H). These areas also contained microvessels surrounded by multiple layers of α SMA⁺/NICD⁺ HSC (Figure 4H).

The synergism between NOTCH and TGF β is conditioned by direct interactions between NICD and an intracellular transducer of TGF β signals *Smad3*, resulting in Hes1 expression.^[45] Indeed, in i-5xFAD and APP-KO mice NOTCH-TGF β interactions are evidenced by the overall increase in Hes1+ cells (Figure 4I) and co-occurrence of Hes1 in areas populated by α SMA-positive HSC (Figure S3C,D, Supporting Information).

Another event common to fibrosis and carcinogenesis requiring the TGF β /NOTCH pathways' synergism is EMT.^[46,47] Notably, in areas frequently occurring in i-5xFAD and APP-KO livers, NICD appeared in binuclear hepatocyte-like cells strongly expressing α SMA (Figure 4C,D,G). Similar to our results on APP-KD in human liver spheroids, showing an ongoing EMT in hepatocytes (Figure 2D,E), in i-5xFAD, and in APP-KO mice α SMA/NICD positive binucleated cells are likely to reflect ongoing EMT in hepatocytes (arrowheads in Figure 4D,G).

Up-regulation of *Notch1* and *Adam10* in i-5xFAD and APP-KO livers (Figure 4J,K) indicates intense S2 cleavage and maturation of the NOTCH receptor.^[48] Additional upregulation of ADAM17 was seen only in APP-KO mice (Figure 4L) further supporting the notion of a higher degree of NOTCH activation in mice completely lacking the A β production. The propagation of NOTCH and TGF β signaling in APP-KO and i-5xFAD livers is further confirmed by strong staining of HSC for Hes1 and α SMA (Figure S3C,D, Supporting Information), the common targets of TGF β and NOTCH signaling.^[49]

In neural cells, increased TNF α leads to elevated β -secretase, A β ,^[31] and A β -associated γ -secretase activity,^[50] while the genetic deletion of TNF α in 5xFAD mice attenuates cerebral A β generation via reduction of functionally active PSEN1 and BACE1.^[51] Thus, enhanced production of TNF α (Figure 3K), Psen1, and BACE1 (Figure 4M,N) in i-5xFAD livers, seems to reflect an attempt to re-establish A β homeostasis as a defense mechanism against 3D6 caused loss of A β .

2.5. High Systemic and Intrahepatic Levels of A β in 3xTg-AD Mice Protect from Carbon Tetrachloride-Induced Liver Fibrosis

To explore putative protective features of A β against liver fibrosis in vivo, we assessed fibrosis in WT (BL/6) and 3xTg-AD mice harboring human APP/PSEN1 and tau mutations^[52] after 5-week CCl₄ treatment. In comparison to 3xTg-AD mice (3xTg-CCl₄), serum and intrahepatic levels of human and murine A β (Figure S7, Supporting Information) were decreased in CCl₄-treated WT mice (BL/6-CCl₄). This decrease was strongly counterbalanced by the overproduction of A β in transgenic 3xTg-AD mice (3xTg-CCl₄). According to our in vitro studies showing the effect of A β on HSC, LSEC, and hepatocytes, livers of 3xTg-AD with high

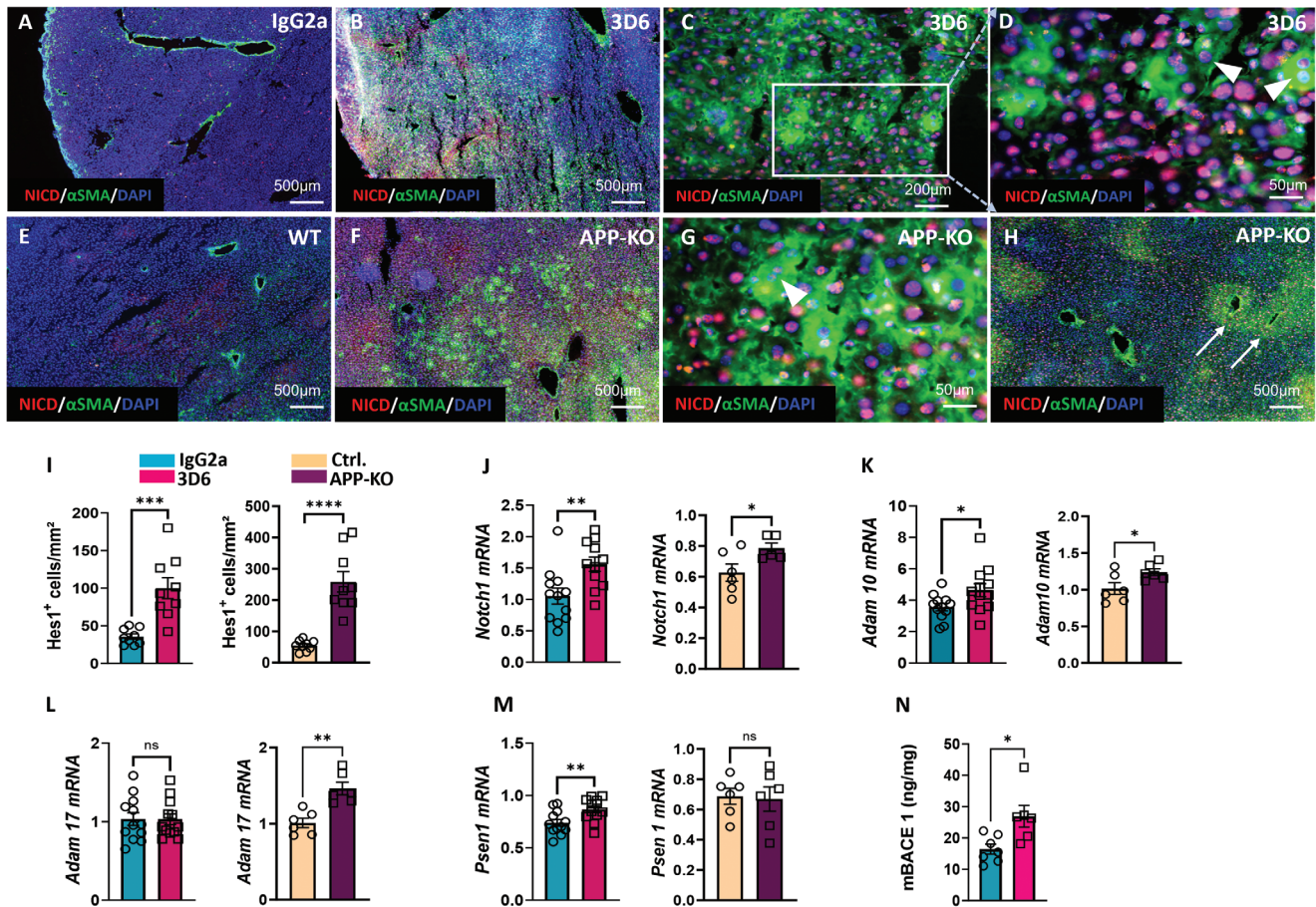


Figure 4. NOTCH pathway in APP-KO and 3D6-immunized 5xFAD mice. A–H) Representative images of APP-KO versus WT and 5xFAD mouse livers after 8-month immunization with 3D6 versus IgG2a control antibodies. Immunofluorescence staining of liver sections for NICD/ α SMA/DAPI, ($n = 4$ per group); Arrowheads in G and D indicate α SMA/NICD positive binucleated cells putatively reflecting the ongoing EMT in hepatocytes; Arrows in H indicate microvessels surrounded by multiple layers of α SMA+/NICD+ HSC; I) Quantification of Hes1+ cells in liver sections of APP-KO versus WT and 3D6 versus IgG2a treated 5xFAD mice from, $n = 9$ per group. J–M) qPCR of *Notch1*, *Adam-10*, *Adam-17*, and *Psen1* in liver samples of APP-KO versus WT ($n = 12$ per group) and 5xFAD mice after 8-month immunization with 3D6 versus IgG2a control antibodies ($n = 6$ per group); N) BACE1 protein assessed by ELISA in liver homogenates of 5xFAD mice after 8-month immunization with 3D6 versus IgG2a control antibodies ($n = 7$ per group). The data are presented as means \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and **** $p < 0.001$; two-tailed Student's t -test (I–N).

$A\beta$ levels should better withstand profibrotic influences of CCl_4 compared to WT. Indeed, in 3xTg- CCl_4 , the profibrotic markers, i.e., collagen (Figure 5A–C), liver enzymes (Figure 5D), α SMA (Figure 5E), osteopontin (OPN) and TGF β (Figure 5F), along with the key components of the NOTCH pathway, NICD, Notch1 and Hes1 (Figure 5G–I, M) were all suppressed compared to CCl_4 -BL/6 in which serum and liver $A\beta$ level were 50% lower (Figure S7, Supporting Information).

In a healthy liver glutamine synthetase (GS) an enzyme converting glutamate and ammonia into glutamine is strongly expressed in specialized pericentral hepatocytes arranged in 2–3 rows around the central venules (Figure 5L), a zone that has been found to be sensitive to CCl_4 toxicity.^[53] Accordingly, in BL/6- CCl_4 livers GS expression was nearly absent from the pericentral hepatocytes (Figure 5J) while in 3xTg- CCl_4 livers (Figure 5K) an energy-consuming production of glutamine by perivenous cells was still maintained, however it was reduced to one layer in comparison to the oil-treated BL/6 control (Figure 5L). Consistent with the notion that TGF β induces EMT in hepatocytes, hall-

marked by a decrease in E-cadherin (E-Cad) expression and acquisition of myofibroblastic markers,^[54] reduced E-Cad and appearance of E-Cad/ α SMA positive cells were present only in BL/6- CCl_4 mouse liver in contrast to a higher expression and clear α SMA-negativity of E-Cad in pericentral hepatocytes in 3xTg- CCl_4 and in the vehicle (corn oil) treated BL/6 (Figure S8A–C, Supporting Information).

Oxidative stress is a well-recognized precipitant of liver injury during fibrosis. There is a decrease in antioxidant superoxide dismutases including SOD1 in several models of rodent fibrosis including CCl_4 .^[55] Consistent with other hepatoprotective features of $A\beta$, the 3xTg- CCl_4 group displayed increased SOD1 and downregulated DNA oxidation products 8-OH-dG (Figure S8D–F, Supporting Information). In line with data from APP-KO and i-5xFAD models, high level of $A\beta$ in 3xTg- CCl_4 led to decreased CD31 (Figure 5M), TNF α , IL-6, IL-13, and elevated IFN γ and VEGF (Figure 5N). Because metalloproteinase 9 (MMP-9) is known for its pronounced profibrotic and $A\beta$ -degrading activities,^[56] the drastically decreased levels of MMP-9

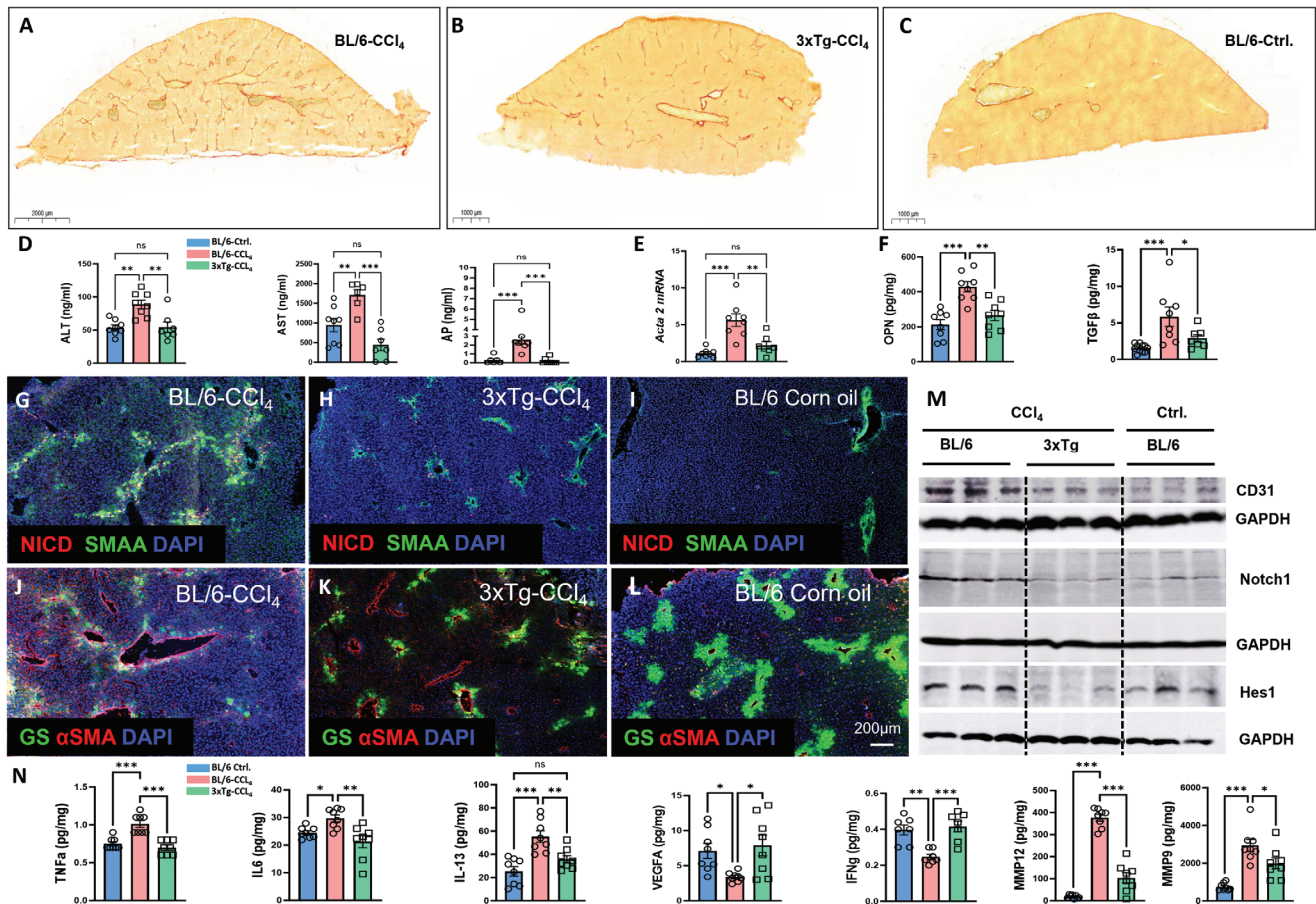


Figure 5. $A\beta$ protects 3xTg-AD mice from CCl_4 -induced fibrosis. Data sets acquired from liver samples of CCl_4 -treated 3xTg-AD (3xTg- CCl_4) versus BL/6 (BL/6- CCl_4) and Corn oil treated BL/6 controls (BL/6-Ctrl.) after 5 weeks of CCl_4 versus corn oil treatment; A–C) Representative images of Sirius Red staining ($n = 4$ per group); D) plasma liver enzymes (AST, ALT, and AP), $n = 8$ per group; E) qPCR of α SMA (acta2) mRNA ($n = 8$ per group); F) Multiplex Analysis of Osteopontin (OPN) and TGF β ($n = 8$ per group); G–L) Immunofluorescence staining of liver sections for (G–I) NICD/ α SMA/DAPI, ($n = 4$ per group); J–L) glutamine synthetase (GS)/ α SMA/ DAPI, ($n = 4$ per group); M) Western Blot of CD31, Notch1, Hes1 ($n = 3$ per group); N) TNF α , IL-6, IL-13, VEGF-A, IFN γ , MMP-12, and MMP-9 multiplex analysis of liver homogenates ($n = 8$ per group). The data are presented as means \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, and **** $p < 0.001$; One-way ANOVA with Bonferroni's post hoc test (D–F, N) and Kruskal–Wallis for AP analysis (in D).

in CCl_4 -3xTg versus BL/6- CCl_4 (Figure 5N) represent a plausible explanation for very mild fibrosis in 3xTg animals with $A\beta$ -excess and constantly elevated intrahepatic levels of $A\beta$. Also, MMP-12 which can control liver inflammation and IL-13-induced fibrosis^[57] was downregulated in 3xTg- CCl_4 mice along with IL-13 decrease (Figure 5N).

To gain insights into signaling pathways involved in hepatoprotective effects of $A\beta$ excess in 3xTg-AD mice, the liver transcriptome of solvent (corn oil)- and CCl_4 -treated WT (BL/6) was compared to that of CCl_4 -treated 3xTg-AD mice ($n = 3$ per group). A hierarchical cluster analysis of the transcriptomic data showed clustering of each group of three mice (Figure S9A, Supporting Information). Compared to the corn oil control (BL/6-ctrl), 110 genes were strongly deregulated in BL/6- CCl_4 (Figure 6A). As expected, in BL/6 mice CCl_4 treatment affected inflammation, fibrogenesis, oncogenesis markers (HCC), and genes involved in lipid and glucose metabolism (Figure 6B).

Out of 26 differentially expressed genes (DEGs) in 3xTg- CCl_4 mice in comparison to BL/6- CCl_4 (Figure 6A), the Cyp2b fam-

ily genes (Cyp2b9, Cyp2b10, and Cyp2b13) were among those exclusively downregulated in 3xTg-AD- CCl_4 mice (Figure 6B,C). Irrespective of the notion that these changes are likely to reflect a strain effect rather than CCl_4 -treatment, this subfamily of genes being sex-biased contributes to the promotion of fibrosis in female mice. A study with Cyp2b-null mice reported resistance to diet-induced steatotic disease in females provided by Cyp2b9, 10, and 13 deficiencies, while in males it was associated with higher susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD).^[58] Across the preselected genes involved in fibrotic ECM remodeling, tissue inhibitor matrix metalloproteinase 1 (Timp1), and Mmp12 were significantly decreased in 3xTg- CCl_4 (Figure 6B,C).

Among carcinogenesis markers, an onco-suppressor Hao2 which is decreased in HCC^[59] was upregulated, while the HCC- and EMT-promoting marker, T-cell lymphoma invasion and metastasis 2 gene (TIAM2), was prominently downregulated in 3xTgAD- CCl_4 (Figure 6B,C). The notion of the onco-suppressive effect of high $A\beta$ levels in the liver of 3xTg-AD mice is fur-

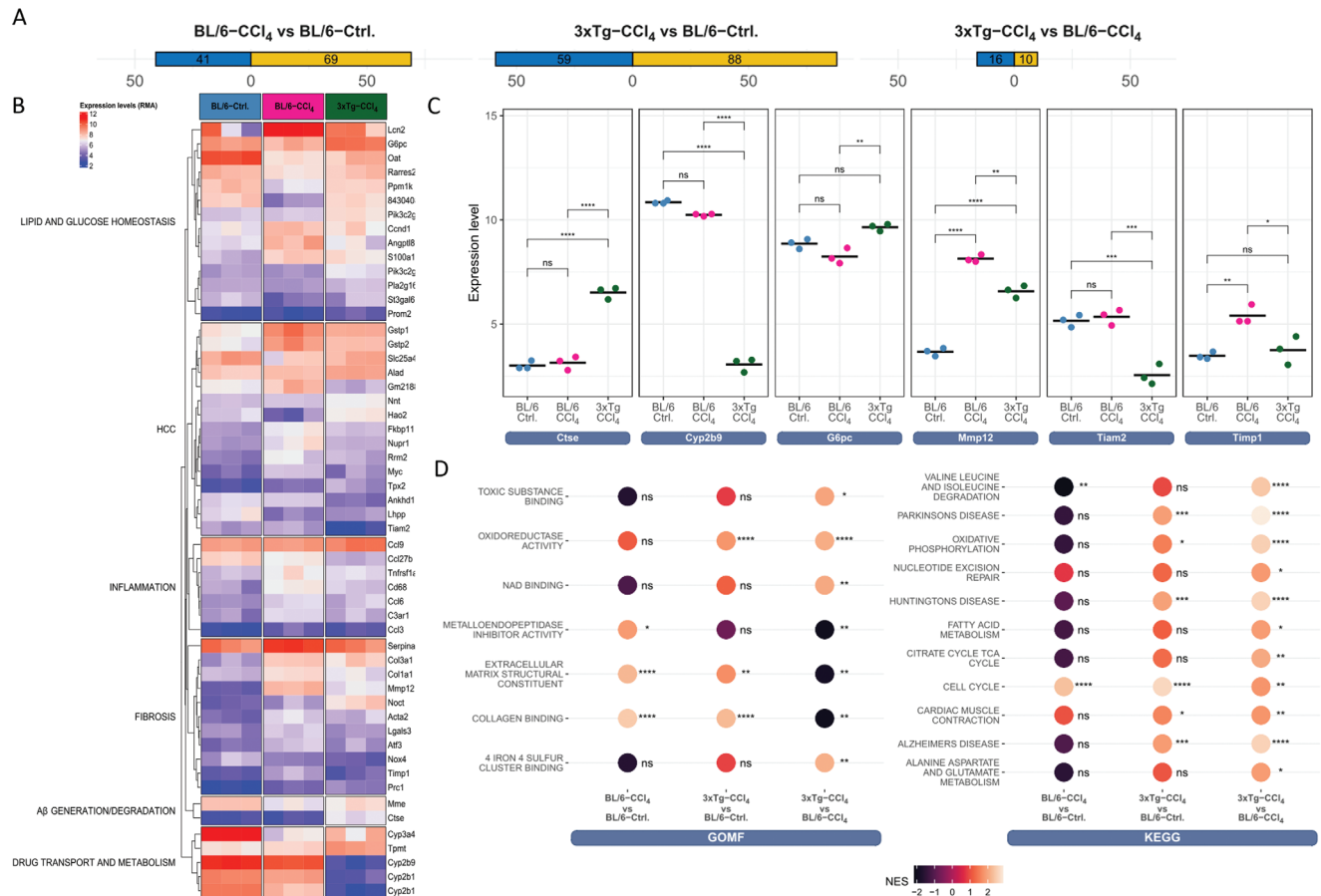


Figure 6. Transcriptome analysis of CCl_4 -treated BL/6 and 3xTg-AD mouse livers. A–C) Liver samples from CCl_4 -treated BL/6 and 3xTg and corn oil-treated BL/6 control mice were analyzed using Clariom S arrays. A) Number of differentially expressed genes (DEGs) using RMA and limma analysis. Results were filtered for FDR p-value < 0.05 and absolute $\log_{2}\text{FC} > 1.5$. B) Heatmap of selected DEGs categorized into lipid and glucose homeostasis, hepatocellular carcinoma (HCC), inflammation, fibrosis, $\text{A}\beta$ generation and degradation, and drug transport and metabolism; C) Microarray gene expression of fibrosis markers; D) Enriched Gene Ontology (GO) molecular function and KEGG pathways. The color legend indicates the degree of normalized enrichment score (NES). Significance is reflected by $p^{****} = 10^{-4}$, $*** = 10^{-3}$, $** = 10^{-2}$, $* = 0.05$, and ns = not significant.

ther supported by decreased expression of lipocalin 2 (Lcn2), adipokine that plays a prominent role in lipogenesis and at the same time a reliable marker of poor prognosis of HCC. Lcn2 is upregulated in nonalcoholic steatohepatitis (NASH), NAFLD, and liver cirrhosis and in mice upon CCl_4 injury as an indicator of liver damage.^[60] DEGs in 3xTg- CCl_4 involved in $\text{A}\beta$ production and metabolism were represented by MME encoding $\text{A}\beta$ -degrading enzyme neprilysin and ctse encoding cathepsin E. Cathepsin E has been recently shown to regulate BACE-1 expression and induce BACE1-mediated production of $\text{A}\beta$ in the brain.^[61] While MME expression was nearly equal in BL/6- CCl_4 and 3xTg- CCl_4 , the increase in ctse in 3xTg- CCl_4 may additionally hint at the higher capacity of liver cells to generate $\text{A}\beta$ in these mice. Strikingly, 3xTg- CCl_4 livers displayed an increased glucose-6-phosphatase α (g6pc) expression in comparison to BL/6- CCl_4 (Figure 6B,C). G6pc is the rate-limiting enzyme of gluconeogenesis, the deficiency of which is the primary cause of glycogen storage disease type Ia (GSDI) in humans. GSDI is characterized by hypoglycemia, hepatic glycogen accumulation, and lipo-

genesis leading to steatosis and cirrhosis, tumorigenesis, and impaired oxidative phosphorylation (OxPhos) in the liver.^[62] In this sense, the G6pc serves as a crossing point of several pathways including lipogenesis, fatty acid metabolism, OxPhos, and β -oxidation which all are differentially regulated in 3xTg- CCl_4 livers compared to BL/6- CCl_4 (Figure 6C; Figure S9B, Supporting Information).

According to GO and KEGG analysis (Figure 6C; Figure S9B, Supporting Information), pathways strongly associated with human and rodent liver fibrosis, such as extracellular matrix structural constituents, collagen binding organization and metabolism, metalloproteinase activity, cytokine-mediated signaling, TNF superfamily cytokines, TGF β activation, fatty acid metabolism, and apoptotic cell clearance were all downregulated in 3xTg- CCl_4 group in comparison to BL/6- CCl_4 (Figure 6C; Figure S9B, Supporting Information). This is also in line with results presented in Figure 5 showing significant changes in the expression of key components and/or regulators of some of these pathways (TNF α , TGF β , Col1, MMP12, and 9) at the protein level.

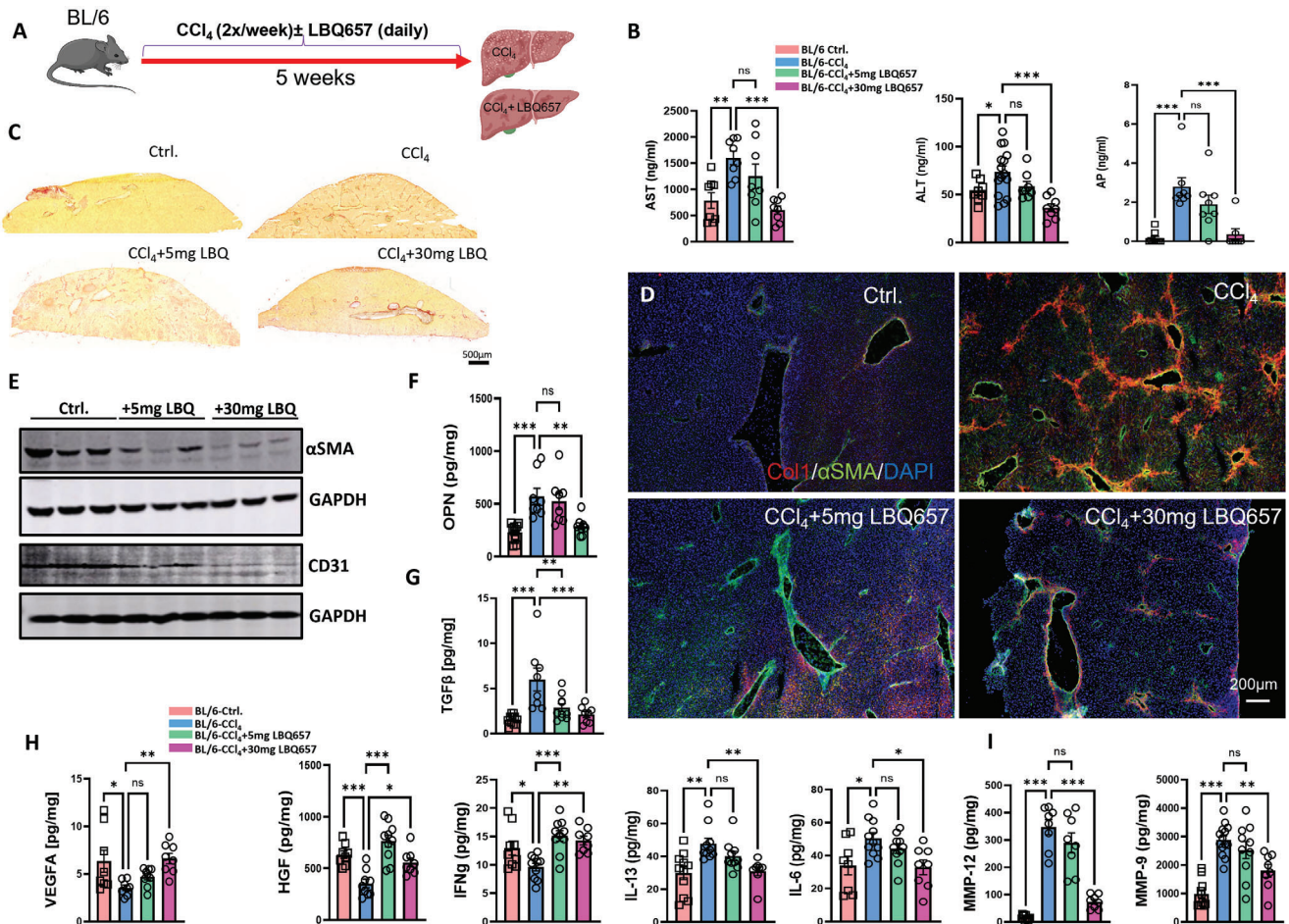


Figure 7. Inhibition of nephrilysin protects BL/6 mice from CCl_4 -induced fibrosis. A) Schematic presentation of treatment timeline: 5-week CCl_4 -treatment (2x/week) of BL/6 mice \pm two different dosages of neprilysin inhibitor sacubitrilat (LBQ657), 5 mg or 30 mg kg^{-1} body weight versus corn oil-treated BL/6 controls (BL/6-Ctrl.); B) plasma liver enzymes (AST, ALT, and AP), $n = 8$ per group; C) Sirius Red staining ($n = 4$ per group); D) Immunofluorescence staining of liver sections for Col1/ α SMA/DAPI, ($n = 4$ per group); E) Western Blot of α SMA and CD31 ($n = 3$ per group); F–I) Multiplex analysis of Osteopontin (OPN), $\text{TGF}\beta$, TNF α , IL-6, IL-13, VEGF-A, IFN γ , MMP-12, and MMP-9 in liver homogenates ($n = 8$ per group); The data are presented as means \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, and **** $p < 0.001$; One-way ANOVA with Bonferroni's post hoc test (B, F–I) and Kruskal–Wallis test for AP analysis (in B).

Importantly, the appearance of Alzheimer's, Parkinson's (PD), and Huntington's disease (HD) among top KEGG pathways differentially regulated in 3xTg- CCl_4 accounted primarily for the strong abundance of key genes of OxPhos (several subunits of complex I, III and IV) in all three disease pathways. In 3xTg- CCl_4 , OxPhos was significantly upregulated in comparison to both BL/6- CCl_4 and BL/6-corn oil controls (Figure 6D). Apparently, in contrast to the brain, where downregulated OxPhos is the common characteristic of AD, PD, and HD pathology, in humans^[63] and in 3xTg-AD mice,^[64] the livers of 3xTg-AD mice have high OxPhos activity which is in demand for normal liver function and it is impaired across fibrosis-associated liver diseases.^[65] Moreover, findings by Santacatterina et al. have shown that the liver with reduced OxPhos is prone to the development of cancer.^[66]

Overall, the transcriptome of 3xTg- CCl_4 favored a strong representation of genes involved in lipid metabolism, enhanced OxPhos and β -oxidation, and downregulation of ECM components, inflammasome, fibrogenic, and HCC markers.

2.6. Inhibition of $\text{A}\beta$ Degradation Prevents CCl_4 -Induced Fibrosis

The dual-action drug LCZ696 (brand name Entresto), comprising the neprilysin (NEP) inhibitor sacubitril and the angiotensin receptor antagonist valsartan has been safely used for more than a decade in the therapy of heart failure. LBQ657 which is the active metabolite of sacubitril has been previously reported to decrease $\text{TGF}\beta$ -induced cardiac fibrosis.^[67] Recently, the administration of sacubitril/valsartan or the knockout of NEP ameliorated CCl_4 -induced liver fibrosis in mice.^[68] These effects were however ascribed to the combined action of sacubitril/valsartan to diminish the profibrotic effects of angiotensin II and NPY receptor in the liver. Our previous in vitro results demonstrated a downregulation of $\text{TGF}\beta$ and α SMA in HSC exposed to LBQ657. However, this action of LBQ657 was completely dependent on the presence of $\text{A}\beta$ 42.^[10] Here, we sought to explore whether the sole inhibition of neprilysin by LBQ657 may slow down the progression of CCl_4 -induced fibrosis in BL/6 mice.

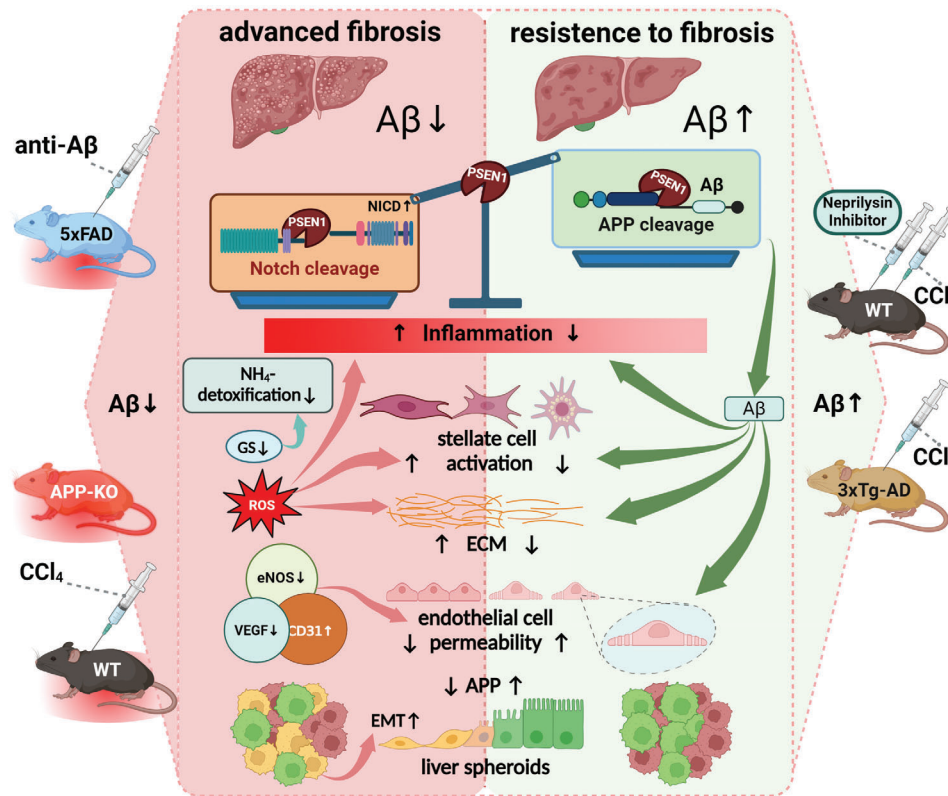


Figure 8. Schematic presentation of processes regulated by $A\beta$ in the liver. APP- and NOTCH-cleaving enzyme PSEN1 favors NOTCH processing in the situation of decreased hepatic levels of $A\beta$ during fibrosis. Left panel: neutralization of $A\beta$ by 3D6-antibody treatment (anti- $A\beta$) or induction of liver fibrosis in wild type (WT) mice by CCl_4 or amyloid precursor protein (APP) knockout (APP-KO) results in downregulation of $A\beta$ in the liver leading to decreased ammonia detoxification by glutamine synthetase (GS), HSC activation, extracellular matrix (ECM) deposition, decreased liver endothelial cell (LSEC) permeability reflected by downregulation of eNOS and VEGF and an increased expression of CD31 in transgenic 5xFAD, CCl_4 -treated wild type (WT) and APP-KO mice; knockdown of APP in human liver spheroids induces epithelial-mesenchymal transition (EMT) of hepatocytes. Right panel: high systemic and hepatic levels of $A\beta$ in 3xTg-AD mice and treatment of BL/6 mice with the neprilysin inhibitor sacubitrilat provide protection against liver fibrosis, normalizing the processes presented in the right panel. High hepatic $A\beta$ level is accompanied by an overweight of PSEN1-mediated APP cleavage over its NOTCH-cleaving function. The figure was created with BioRender.com.

Chronic administration of LBQ657 over a period of 5-week CCl_4 -treatment (Figure 7A) ameliorated the entire set of fibrotic markers including liver enzymes, collagen, α SMA, OPN, TGF β (Figure 7B–G), and inflammatory markers (Figure 7H). Similar to the effect of increased systemic/intrahepatic level of $A\beta$ in 3xTg-AD mice, inhibition of $A\beta$ degradation by LBQ657 enhanced the hepatocyte growth factor (HGF) and IFN γ (Figure 7H).

Most of the effects of LBQ657 were dose-dependent, except for HGF, IFN γ , and TGF β which were effectively modified by both, low- and high-dose LBQ657. Improved liver sinusoidal permeability by LBQ657 was evident from reduced CD31 expression (Figure 7E) and increased VEGF to the level of vehicle control (Figure 7H). This leads to speculation that LBQ657 when acting on the liver endothelium, may enhance the permeability of LSEC. As a result, blood-derived $A\beta$ is delivered more efficiently to the liver parenchyma.

Consistent with our data on CCl_4 -treated 3xTg-AD mice, the suppression of metalloproteinases MMP-9 and -12 could also be achieved in BL/6- CCl_4 treated with LBQ657 (Figure 7I). Besides its $A\beta$ -degrading function, MMP-9 activates the latent TGF β , with subsequent HSC activation and collagen deposition.^[69]

Moreover, increased expression of MMP-9 is associated with EMT.^[46] The MMP-9 inhibiting effect of LBQ657 has been previously observed in a model of TGF β -induced cardiac fibrosis,^[67] which, however, was mainly attributed to the inhibitory effect on the transient receptor potential melastatin-like 7 (TRPM7) channel.

In summary, the data obtained on LBQ657 in the CCl_4 model allowed to establish the inhibition of $A\beta$ degradation as a feasible approach to promote the anti-fibrotic effects of $A\beta$. The notion that increased systemic and intrahepatic $A\beta$ levels in 3xTg-AD mice and treatment of CCl_4 -exposed WT mice with LBQ657 exert effects opposite to those observed in APP-KO and 3D6-immunized mice reinforces the essential role of $A\beta$ in liver defense against fibrosis.

3. Conclusion

This study identifies soluble $A\beta_{42}$ as a highly potent endogenous regulator of hepatic cell response to fibrogenic cues. Being delivered by blood as well as locally generated in the liver, $A\beta$ counteracts fibrosis by reversing or suppressing a multitude of interconnected processes such as activation of NOTCH-, TGF β -,

TNF α /IL-6/IL-13 pathways subsequently leading to alleviated inflammation, ECM reorganization, activation of HSC, epithelial-mesenchymal transition, and hepatocyte damage by oxidative stress (Figure 8). By mediating autocrine and paracrine signals between HSC and LSEC, A β maintains liver sinusoidal permeability, thereby promoting nutrient supply to and detoxification function of hepatocytes. Acknowledging the recent developments in AD therapy aimed at reducing A β deposition in the brain, our results suggest that antibodies that do not deplete peripheral sources of A β will allow circumventing its deficiency in the liver, which could lead to the development of fibrosis over time. Another translational implication of A β function in the liver herein is that a high hepatic level of A β may provide powerful protection against liver fibrosis. The anti-fibrotic features of A β explain why the inhibitor of neprilysin ameliorates liver fibrosis. Our data also suggest that during liver fibrosis cleavage activities of γ -secretase strongly favor the activation of NOTCH rather than cleaving APP to produce A β . To this end, liver-targeted gene therapy to enhance the expression of APP and BACE1 may help restore the balance in cleavage activities of γ -secretase during fibrosis.

4. Experimental Section

Animal Models and Treatments—A β Antibody Treatment of WT and 5xFAD Mice: Six-month-old female 5xFAD mice harboring five familial AD (FAD) mutations [APP K670N/M671L (Swedish) + I716V (Florida) + V717I (London) and PS1 M146L+ L286V]^[70] were bred heterozygous on a C57BL/6J background. Female 5xFAD and wild type (WT, C57BL/6J) littermates were treated with weekly intraperitoneal injections of A β -specific antibody 3D6 (IgG2a subtype, 20 mg kg⁻¹) or an IgG2a isotype control for 6 weeks. For 8-month immunization, 3–4-month-old 5xFAD animals were used. In an 8-month immunization study, the applied dose was 12 mg kg⁻¹ per injection for both antibodies. Animals were sacrificed by CO₂ and isolated livers were stored at –80 °C until use.

Animal Models and Treatments—APP-KO Mice: APP-KO mice were described previously^[71] and maintained on a C57BL/6 background. For assessment of fibrotic-like changes in the liver, 28–37 weeks old male and female APP-KO mice and their WT controls (C57BL/6) were euthanized under CO₂ anesthesia. The livers were shock-frozen and kept at –80 °C until further processing with immunohistochemistry, Western Blots, and Multiplex analyses.

Carbon Tetrachloride-Induced Fibrosis and LBQ657 Treatment: Carbon tetrachloride (CCl₄, Sigma, Deisenhofen, Germany) was diluted in corn oil (Sigma). Female and male 3xTg-AD mice harboring PS1_{M146V}, APP_{Swe}, and tau_{P301L} transgenes^[72] (Jackson Laboratories) and their WT controls (C57BL/6J) were injected intraperitoneally with 50 μ L CCl₄ in a final dose of 0.7 μ L g⁻¹ body weight twice a week ($n = 12$ per group). Control BL/6 animals were injected with the solvent (corn oil) only. Two groups of BL/6 mice ($n = 8$) received either 5 or 30 mg kg⁻¹ body weight sacubitrilat (LBQ657, Hoelzel Diagnostika GmbH, Germany), injected daily over the entire period of 5-week CCl₄ treatment. All animals were euthanized under CO₂ anesthesia. Blood was obtained by cardiac puncture and centrifuged after 30 min with 4.000 g at 4 °C for 10 min. Blood plasma and tissue samples were frozen at –80 °C until use.

Cell Culture: Human SV40-immortalized hepatic sinusoidal endothelial cells (hLSEC, Applied Biological Materials, Richmond, BC, Canada), immortalized human hepatic stellate cells (LX2), HepG2 (ATCC), mouse primary hepatocytes, human primary hepatic stellate cells (Innoprot), primary human liver sinusoidal endothelial cells (Innoprot) were cultivated as indicated in Supporting Information.

Human Liver Spheroids: Cryopreserved primary human hepatocytes (PHH) (BioIVT) and primary human stellate cells (HSCs; Lonza) were cocultured in ultra-low attachment plates (Sigma) at a ratio 4:1 as previously described.^[73] Spheroids were treated for 1 week with a mixture of oleic and

palmitic acid (400 μ M of each). For APP knock-down experiments, cells were transfected with ON-TARGETplus Human APP (351) siRNA (Dharmacon) at a final concentration of 50 nM. Thereafter the spheroids were processed for qPCR and immunofluorescence analyses as described in Supporting Information.

Human Liver Samples: Pediatric liver tissues for mRNA expression analysis were histologically examined for patients with fibrosis ($n = 9$) and without fibrosis ($n = 12$) (for tissue characteristics see Table S2, Supporting Information). Tissue samples were obtained either during surgical resections or as snap-frozen biopsy samples. Surgery or biopsies were done because of hepatoblastoma ($n = 5$), idiopathic hepatopathy ($n = 5$), congenital liver fibrosis ($n = 5$), or other diseases ($n = 6$), and as controls without fibrosis, only non-affected tissue was used.

Statistical Analyses: All normally distributed data were analyzed by One-way ANOVA analysis with post hoc Bonferroni's multiple comparison test or two-tailed Student's t -tests for single comparisons. For non-normally distributed data, appropriate non-parametric analyses (Mann–Whitney or Kruskal–Wallis tests) were employed as specified in the respective Figure legends. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism Software (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA) and significance was defined as $p < 0.05$.

Ethics Approval Statements: All animal experiments were approved by the local authorities of Animal Welfare in Tübingen (Regierungspräsidium Tübingen), Heidelberg (Regierungspräsidium Karlsruhe), and Halle (Landesverwaltungsamt Halle, approval number 42502-2-1369) conducted in accordance with the German federal law regarding the protection of animals and “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (National Institutes of Health publication 8th Edition, 2011). Collection and use of human liver tissue samples and clinical data for this study were approved by the local Ethical Review Committee of the University of Regensburg (ethics statement 21-2417-101, University of Regensburg, Germany), with all patients providing informed consent for participation. All participant recruitment and informed consent processes were conducted in compliance with nationally accepted practice and in accordance with the World Medical Association Declaration of Helsinki 2018.

Supporting Information

Supporting Information is available from the Wiley Online Library or from the author.

Acknowledgements

The authors wish to thank Luisa Scholz, Michael Glaser, Julia Gobbert, and Barbara Proksch for their excellent technical assistance. Antje Decker and Igor Liebermann are gratefully acknowledged for excellent technical expertise and assistance concerning qPCR and microarrays. The authors are also grateful to Mathias Schenk and Nadine Taudte (Fraunhofer IZI) for the preparation of 3D6 and IgG2a isotype control antibody, to Dr. Martin Kleinschmidt (Fraunhofer IZI) for SPR measurement as well as Dr. M. Toelge (Microbiomix) for Luminex analyses of cytokines. The authors also acknowledge support from the Open Access Publication Fund of the University of Tübingen. L.D. and R.T. acknowledge support from the Interfaculty Centre for Pharmacogenomics and Pharma Research (ICEPHA) Graduate School. R.T., M.S., and K.K. were supported in part by the Robert Bosch Stiftung Stuttgart, Germany. M.S. was additionally supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) under Germany's Excellence Strategy-EXC 2180–390900677. S.L.F. was supported by NIH grants: 5R01DK128289-03, 5R01 DK121154-04, and 5P30CA196521-08. Schematic drawings were generated by BioRender.com.

Open access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

Conflict of Interest

Eberhard Karls University of Tübingen in conjunction with the University Hospital of Tübingen has filed a patent covering A β -enhancing strategies

for the treatment of liver fibrosis where G.H.B, R.W., T.S.W, M.S., and L.D. are listed as inventors. V.M.L is a co-founder, CEO, and shareholder of HepaPredict AB. All other authors declare no conflict of interest.

Author Contributions

G.H.B. conceived the idea. G.H.B. and L.D. wrote the manuscript. L.D. and M.S. supervised the project. G.H.B., L.D., and U.S. designed the experiments. L.D., U.S., R.T., H.C., T.S.W., V.L., S.Y., I.R., M.V., J.-U.R., V.R., M.B., V.W., and V.K. conducted experiments. G.H.B., L.D., U.S., R.T., H.C., T.S.W., V.L., S.Y., I.R., M.V., T.S., K.K., and V.K. performed data analysis. U.C.M., R.W., and S.L.F. provided materials, discussed the results, and provided constructive comments on the manuscript. L.D., R.T., and M.S. contributed to the funding acquisition. V.L., R.G., S.L.F., U.C.M., and M.S. revised the manuscript for important intellectual content. All authors read and approved the manuscript.

Data Availability Statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Keywords

5x3AD, eNOS, neprilysin, presenilin, TGF β , VEGF, β -secretase 1

Received: October 15, 2023

Revised: January 27, 2024

Published online: March 2, 2024

- [1] P. S. Aisen, J. Cummings, R. Doody, L. Kramer, S. Salloway, D. J. Selkoe, J. Sims, R. A. Sperling, B. Vellas, *J. Prev. Alzheimer's Dis.* **2020**, 7, 146.
- [2] L. Söderberg, M. Johannesson, P. Nygren, H. Laudon, F. Eriksson, G. Osswald, C. Möller, L. Lannfelt, *Neurotherapeutics* **2023**, 20, 195.
- [3] J. Cummings, *Drugs* **2023**, 83, 569.
- [4] R. J. O'Brien, P. C. Wong, *Annu. Rev. Neurosci.* **2011**, 34, 185.
- [5] U. C. Müller, T. Deller, M. Korte, *Nat. Rev. Neurosci.* **2017**, 18, 281.
- [6] J. Ghiso, M. Shayo, M. Calero, D. Ng, Y. Tomidokoro, S. Gandy, A. Rostagno, B. Frangione, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 45897.
- [7] C. L. Maarouf, J. E. Walker, L. I. Sue, B. N. Dugger, T. G. Beach, G. E. Serrano, *PLoS One* **2018**, 13, e0203659.
- [8] R. Bansal, J. Van Baarlen, G. Storm, J. Prakash, *Sci. Rep.* **2016**, 5, 18272.
- [9] C. Zhu, K. J. Kim, X. Wang, A. Bartolome, M. Salomao, P. Dongiovanni, M. Meroni, M. J. Graham, K. P. Yates, A. M. Diehl, R. F. Schwabe, I. Tabas, L. Valenti, J. E. Lavine, U. B. Pajvani, *Sci. Transl. Med.* **2018**, 10, eaat0344.
- [10] G. H. Buniatian, R. Weiskirchen, T. S. Weiss, U. Schwinghammer, M. Fritz, T. Seferyan, B. Proksch, M. Glaser, A. Lourhmati, M. Buadze, E. Borkham-Kamphorst, F. Gaunitz, C. H. Gleiter, T. Lang, E. Schaeffeler, R. Tremmel, H. Cynis, W. H. Frey, R. Gebhardt, S. L. Friedman, W. Mikulits, M. Schwab, L. Danielyan, *Cells* **2020**, 9, 452.
- [11] M. Guglielmo, D. Monteleone, M. Boido, A. Piras, L. Giliberto, R. Borghi, A. Vercelli, M. Fornaro, M. Tabaton, E. Tamagno, *Aging Cell* **2012**, 11, 834.
- [12] C. L. Wilson, L. B. Murphy, J. Leslie, S. Kendrick, J. French, C. R. Fox, N. S. Sheerin, A. Fisher, J. H. Robinson, D. G. Tiniakos, D. A. Gray, F. Oakley, D. A. Mann, *J. Hepatol.* **2015**, 63, 1421.
- [13] P. S. Marcatò, G. Bettini, L. D. Salda, M. Galeotti, *J. Comp. Pathol.* **1998**, 119, 95.
- [14] C. Di Scala, N. Yahi, S. Boutemeur, A. Flores, L. Rodriguez, H. Chahinian, J. Fantini, *Sci. Rep.* **2016**, 6, 28781.
- [15] L. D. DeLeve, X. Wang, Y. Guo, *Hepatology* **2008**, 48, 920.
- [16] S. Zhang, P. Wang, L. Ren, C. Hu, J. Bi, *Alzheimers Res. Ther.* **2016**, 8, 40.
- [17] Z. Q. Fang, B. Ruan, J. J. Liu, J. L. Duan, Z. S. Yue, P. Song, H. Xu, J. Ding, C. Xu, G. R. Dou, L. Wang, *Hepatology* **2022**, 76, 742.
- [18] B. Dewidar, C. Meyer, S. Dooley, N. Meindl-Beinker, *Cells* **2019**, 8, 1419.
- [19] N. Oliva-Vilarnau, S. U. Vorrink, M. Ingelman-Sundberg, V. M. Lauschke, *Adv. Sci.* **2020**, 7, 2000248.
- [20] T. Luedde, N. Kaplowitz, R. F. Schwabe, *Gastroenterology* **2014**, 147, 765.
- [21] N. Hotoda, H. Koike, N. Sasagawa, S. Ishiura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, 293, 800.
- [22] M. Umeda, N. Yoshida, R. Hisada, C. Burbano, S. Y. K. Orite, M. Kono, V. C. Kytтарыs, S. Krishfield, C. A. Owen, G. C. Tsokos, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2021**, 118, 2023230118.
- [23] A. E. Roher, T. C. Kasunic, A. S. Woods, R. J. Cotter, M. J. Ball, R. Fridman, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, 205, 1755.
- [24] M. Zhang, Y. Deng, Y. Luo, S. Zhang, H. Zou, F. Cai, K. Wada, W. Song, *J. Neurochem.* **2012**, 120, 1129.
- [25] M. Farzan, C. E. Schnitzler, N. Vasilieva, D. Leung, H. Choe, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 9712.
- [26] C. Tamaki, S. Ohtsuki, T. Iwatsubo, T. Hashimoto, K. Yamada, C. Yabuki, T. Terasaki, *Pharm. Res.* **2006**, 23, 1407.
- [27] R. Ullah, E. J. Lee, *Exp. Neurobiol.* **2023**, 32, 216.
- [28] K. Gnoth, A. Piechotta, M. Kleinschmidt, S. Konrath, M. Schenk, N. Taudte, D. Ramsbeck, V. Rieckmann, S. Geissler, R. Eichentopf, S. Barendrecht, M. Hartlage-Rübsamen, H. U. Demuth, S. Roßner, H. Cynis, J. U. Rahfeld, S. Schilling, *Alzheimers Res. Ther.* **2020**, 12, 149.
- [29] J. P. Fuller, J. B. Stavenhagen, S. Christensen, F. Kartberg, M. J. Glennie, J. L. Teeling, *Acta Neuropathol.* **2015**, 130, 699.
- [30] G. Buniatian, B. Hamprecht, R. Gebhardt, *Biol. Cell.* **1996**, 87, 65.
- [31] M. Yamamoto, T. Kiyota, M. Horiba, J. L. Buescher, S. M. Walsh, H. E. Gendelman, T. Ikezu, *Am J. Pathol.* **2007**, 170, 680.
- [32] K. Breitkopf, S. Haas, E. Wiercinska, M. V. Singer, S. Dooley, *Alcohol Clin. Exp. Res.* **2005**, 29, 1215.
- [33] D. C. Rockey, J. J. Maher, W. R. Jarnagin, G. Gabbiani, S. L. Friedman, *Hepatology* **1992**, 16, 776.
- [34] C. T. Ng, L. Y. Fong, M. R. Sulaiman, M. A. M. Moklas, Y. K. Yong, M. N. Hakim, Z. Ahmad, *J. Interferon Cytokine Res.* **2015**, 35, 513.
- [35] H. Yokomori, M. Oda, K. Yoshimura, T. Nagai, M. Ogi, M. Nomura, H. Ishii, *Liver Int.* **2003**, 23, 467.
- [36] G. H. Buniatian, H. J. Hartmann, P. Traub, U. Weser, H. Wiesinger, R. Gebhardt, *Neurochem. Int.* **2001**, 38, 373.
- [37] S. Brahmachari, Y. K. Fung, K. Pahan, *J. Neurosci.* **2006**, 26, 4930.
- [38] L. An, Y. Shen, M. Chopp, A. Zacharek, P. Venkat, Z. Chen, W. Li, Y. Qian, J. Landschoot-Ward, J. Chen, *Aging Dis.* **2021**, 12, 732.
- [39] H. J. Lüth, M. Holzer, U. Gärtner, M. Staufienbiel, T. Arendt, *Brain Res.* **2001**, 913, 57.
- [40] L. M. Farkas, N. Dünker, E. Roussa, K. Unsicker, K. Kriegstein, *J. Neurosci.* **2003**, 23, 5178.
- [41] L. D. Estrada, L. Oliveira-Cruz, D. Cabrera, *Curr. Protein Pept. Sci.* **2018**, 19, 1180.
- [42] M. S. Thomsen, S. Birkelund, A. Burkhart, A. Stensballe, T. Moos, *J. Neurochem.* **2017**, 140, 741.
- [43] J. L. Duan, B. Ruan, X. C. Yan, L. Liang, P. Song, Z. Y. Yang, Y. Liu, K. F. Dou, H. Han, L. Wang, *Hepatology* **2018**, 68, 677.
- [44] C. Brou, F. Logeat, N. Gupta, C. Bessia, O. LeBail, J. R. Doedens, A. Cumano, P. Roux, R. A. Black, A. Israël, *Mol. Cell* **2000**, 5, 207.

- [45] A. Blokzijl, C. Dahlqvist, E. Reissmann, A. Falk, A. Moliner, U. Lendahl, C. F. Ibáñez, *J. Cell Biol.* **2003**, 163, 723.
- [46] S. Lamouille, J. Xu, R. Derynck, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, 15, 178.
- [47] Q. Zhou, Y. Wang, B. Peng, L. Liang, J. Li, *BMC Cancer* **2013**, 13, 244.
- [48] R. O. Alabi, J. Lora, A. B. Celen, T. Maretzky, C. P. Blobel, *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, 22, 8762.
- [49] K. Zhang, Y. Q. Zhang, W. B. Ai, Q. T. Hu, Q. J. Zhang, L. Y. Wan, X. L. Wang, C. B. Liu, J. F. Wu, *World J. Gastroenterol.* **2015**, 21, 878.
- [50] Y. F. Liao, B. J. Wang, H. T. Cheng, L. H. Kuo, M. S. Wolfe, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 49523.
- [51] E. Paouri, O. Tzara, S. Zenelak, S. Georgopoulos, *J. Alzheimer's Dis.* **2017**, 60, 165.
- [52] S. Oddo, A. Caccamo, J. D. Shepherd, M. P. Murphy, T. E. Golde, R. Kaye, R. Metherate, M. P. Mattson, Y. Akbari, F. M. LaFerla, *Neuron* **2003**, 39, 409.
- [53] A. Ghallab, M. Myllys, C. H. Holland, A. Zaza, W. Murad, R. Hassan, Y. A. Ahmed, T. Abbas, E. A. Abdelrahim, K. M. Schneider, M. Matz-Soja, J. Reinders, R. Gebhardt, M. L. Berres, M. Hatting, D. Drasdo, J. Saez-Rodriguez, C. Trautwein, J. G. Hengstler, *Cells* **2019**, 8, 1556.
- [54] A. Kaimori, J. Potter, J. Y. Kaimori, C. Wang, E. Mezey, A. Koteish, *J. Biol. Chem.* **2007**, 282, 22089.
- [55] Y. J. Liao, Y. H. Wang, C. Y. Wu, F. Y. Hsu, C. Y. Chien, Y. C. Lee, *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, 22, 2934.
- [56] M. Hernandez-Guillamon, S. Mawhirt, S. Blais, J. Montaner, T. A. Neubert, A. Rostagno, J. Ghiso, *J. Biol. Chem.* **2015**, 290, 15078.
- [57] S. K. Madala, J. T. Pesce, T. R. Ramalingam, M. S. Wilson, S. Minnicozzi, A. W. Cheever, R. W. Thompson, M. M. Mentink-Kane, T. A. Wynn, *J. Immunol.* **2010**, 184, 3955.
- [58] M. M. Heintz, R. McRee, R. Kumar, W. S. Baldwin, *PLoS One* **2020**, 15, e0229896.
- [59] S. Mattu, F. Fornari, L. Quagliata, A. Perra, M. M. Angioni, A. Petrelli, S. Menegon, A. Morandi, P. Chiarugi, G. M. Ledda-Columbano, L. Gramantieri, L. Terracciano, S. Giordano, A. Columbano, *J. Hepatol.* **2016**, 64, 891.
- [60] A. Asimakopoulou, S. Weiskirchen, R. Weiskirchen, *Front. Physiol.* **2016**, 7, 00430.
- [61] Z. Xie, J. Meng, W. Kong, Z. Wu, F. Lan, Narengaowa, Y. Hayashi, Q. Yang, Z. Bai, H. Nakanishi, H. Qing, J. Ni, *Aging Cell* **2022**, 21, e13565.
- [62] B. L. Farah, R. A. Sinha, Y. Wu, B. K. Singh, A. Lim, M. Hirayama, D. J. Landau, B. H. Bay, D. D. Koerber, P. M. Yen, *Sci. Rep.* **2017**, 7, 44408.
- [63] E. Area-Gomez, C. Guardia-Laguarta, E. A. Schon, S. Przedborski, *J. Clin. Invest.* **2019**, 129, 34.
- [64] J. Yao, R. W. Irwin, L. Zhao, J. Nilsen, R. T. Hamilton, R. D. Brinton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, 106, 14670.
- [65] P. Middleton, N. Vergis, *Ther. Adv. Gastroenterol.* **2021**, 14, 31394.
- [66] F. Santacatterina, L. Sánchez-Cenizo, L. Formentini, M. A. Mobasher, E. Casas, C. B. Rueda, I. Martínez-Reyes, C. N. de Arenas, J. García-Bermúdez, J. M. Zapata, M. Sánchez-Aragó, J. Satrústegui ángela, M. Valverde, J. M. Cuezva, *Oncotarget* **2016**, 7, 490.
- [67] T. Jia, X. Wang, Y. Tang, W. Yu, C. Li, S. Cui, J. Zhu, W. Meng, C. Wang, Q. Wang, *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, 9, 760035.
- [68] C. Ortiz, S. Klein, W. H. Reul, F. Magdaleno, S. Gröschl, P. Dietrich, R. Schierwagen, F. E. Uschner, S. Torres, C. Hieber, C. Meier, N. Kraus, O. Tyc, M. Brol, S. Zeuzem, C. Welsch, M. Poglitsch, C. Hellerbrand, M. Alfonso-Prieto, F. Mira, U. auf dem Keller, A. Tetzner, A. Moore, T. Walther, J. Trebicka, *Cell Rep.* **2023**, 42, 112059.
- [69] Q. Yu, I. Stamenkovic, *Genes Dev.* **2000**, 14, 163.
- [70] H. Oakley, S. L. Cole, S. Logan, E. Maus, P. Shao, J. Craft, A. Guillozet-Bongaarts, M. Ohno, J. Disterhoft, L. Van Eldik, R. Berry, R. Vassar, *J. Neurosci.* **2006**, 26, 10129.
- [71] F. Magara, U. Müller, Z. W. Li, H. P. Lipp, C. Weissmann, M. Stagljar, D. P. Wolfer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 4656.
- [72] S. Oddo, A. Caccamo, J. D. Shepherd, M. P. Murphy, T. E. Golde, R. Kaye, R. Metherate, M. P. Mattson, Y. Akbari, F. M. LaFerla, *Neuron* **2004**, 39, 409.
- [73] C. C. Bell, D. F. G. Hendriks, S. M. L. Moro, E. Ellis, J. Walsh, A. Renblom, L. Fredriksson Puigvert, A. C. A. Dankers, F. Jacobs, J. Snoeys, R. L. Sison-Young, R. E. Jenkins, Å. Nordling, S. Mkrтчian, B. K. Park, N. R. Kitteringham, C. E. P. Goldring, V. M. Lauschke, M. Ingelman-Sundberg, *Sci. Rep.* **2016**, 6, 25187.