

Aus dem
CharitéCentrum für Innere Medizin
mit Gastroenterologie und Nephrologie CC 13

Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie
Direktor: Prof. Dr. med. Frank Tacke

Habilitationsschrift

Untersuchung der metabolisch-inflammatorischen Plastizität von Monozyten und Makrophagen in der nicht-alkoholischen Steatohepatitis (NASH) und Leberfibrose

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Innere Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Tobias Püngel

Eingereicht:	Januar 2023
Dekan:	Prof. Dr. med. Joachim Spranger, Berlin
1. Gutachter/in:	Prof. Dr. med. Ali Canbay, Bochum
2. Gutachter/in:	Prof. Dr. med. Heike Bantel, Hannover

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
1. Einführung in die Thematik	6
1.1. Definitionen NAFLD, NASH und Leberfibrose	6
1.2. Epidemiologie	7
1.3. Prognose	8
1.4. Therapeutische Strategien	9
1.5. Herkunft und Komposition der hepatischen Makrophagenpopulationen	11
1.6. Pathomechanismen in der Entstehung und Progress der NASH und Fibrose – Bedeutung des „Immun-Metabolismus“	12
1.7. Die Rolle von Makrophagen in der chronischen Leberschädigung	13
1.8. Polarisierung und funktionelle Plastizität hepatischer Makrophagen- populationen	14
1.9. Die Rolle von Makrophagen in der NAFLD	15
1.10. Zielsetzung der Arbeit	17
2. Ergebnisse eigener Arbeiten	18
2.1. Übersicht der Ergebnisse eigener Arbeiten	18
2.2. Monozyten und Makrophagen weisen beim Progress der NAFLD zur NASH einen charakteristischen und funktionell relevanten Phänotyp auf	19
2.3. Die therapeutische Inhibition der Rekrutierung pro-inflammatorischer Monozyten-abhängiger Makrophagen (Mo-M ϕ) verbessert NASH-Aktivität und Leberfibrose	35
2.4. Der Fettsäurerezeptor GPR84 vermittelt eine Rekrutierung myeloider Zellen wie Makrophagen - die therapeutische Inhibition verbessert NASH und Fibrose	52
2.5. pan-PPAR Agonisten vereinen und potenzieren günstige Effekte der selektiven PPAR-agonistischen Wirkung in der Behandlung von NASH und Leberfibrose	72
2.6. Die Kombination einer anti-inflammatorisch (CCR2/CCR5 Antagonist) und einer metabolisch wirksamen Substanz (FGF21 Analogon) zeigt synergistische Effekte in der Behandlung der NASH und Leberfibrose	90

3. Allgemeine Diskussion und Ausblick	110
4. Zusammenfassung	121
5. Literaturverzeichnis	122
Danksagung	128
Erklärung	129

Abkürzungsverzeichnis

APAP	Paracetamol (Acetaminophen)
CCl ₄	Tetrachlorkohlenstoff (Carbon tetrachloride)
CCL2	CC-Chemokine-Ligand 2 = (MCP1) monocyte chemotactic protein 1
CCR2	C-C Chemokine-Rezeptor Typ 2
CCL5	C-C Chemokine-Ligand 5
CCR5	C-C Chemokin-Rezeptor Typ 5
CDAHFD	Cholin-defiziente, Aminosäuren-definierte Hochfett Diät (choline-deficient L-amino acid defined high fat diet)
CVC	Cenicriviroc
CXCL1	CXC Chemokin-Ligand 1
DAMPs	Schaden-assoziierte molekulare Muster (Damage-associated molecular patterns)
FGF21	Fibroblasten-Wachstumsfaktor 21 (fibroblast growth factor 21)
FS	Fettsäuren (fatty acids = FA)
GPR84	G-Protein-gekoppelter Rezeptor 84 (G-protein coupled receptor 84)
HCC	Hepatozelluläres Karzinom (hepatocellular carcinoma)
HSC	Hepatische Sternzelle (hepatic stellate cell)
IL-6	Interleukin-6
IL-10	Interleukin-10
KC	Kupffer Zelle (kupffer cell)
LTX	Lebertransplantation
LPS	Lipopolysaccharid
LSEC	Leber-sinusoidale Endothelzelle (liver sinusoidal endothelial cells)
MAMPs	Metabolismus-assoziierte molekulare Muster (metabolism-associated molecular patterns)
MCD	Methionin- und cholinreduzierte Diät (methionine- and choline-deficient diet)
Mo	Monozyt
Mo-Mφ	Monozyten-abhängiger Makrophage (monocyte-derived macrophage = MoMF)
NAFLD	nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (nonalcoholic fatty liver disease)

NASH	nicht-alkoholische Steatohepatitis (nonalcoholic steatohepatitis)
NFκB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
PAMPs	Pathogen-assoziierte molekulare Muster (pathogen-associated molecular patterns)
PPAR	Peroxisom-Proliferator-Aktivierter-Rezeptor
scRNAseq	Single Cell RNA Sequencing
S100a8/a9	S100 calcium-binding protein A8/A9
TGFβ	Transforming growth factor β
TNF-α	Tumornekrosefaktor-alpha
WD	Western Diät (western diet)

1. Einführung in die Thematik

1.1 Definitionen NAFLD, NASH und Leberfibrose

Die Steatosis hepatis bzw. Verfettung von Hepatozyten kann durch verschiedene Ursachen ausgelöst werden, wobei eine hyperkalorische Ernährung und ein gestörter Metabolismus zu den häufigsten Ursachen zählen. Sofern kein signifikanter Alkoholkonsum vorliegt (pro Tag <20g bei Frauen bzw. <30g bei Männern) und weitere sekundäre Ursachen (z.B. Autoimmunhepatitis (AIH), Primär biliäre Cholangitis (PBC) etc.) ausgeschlossen werden können, spricht man von einer nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung (*non-alcoholic fatty liver disease*, NAFLD) [1]. Die Überladung von Hepatozyten mit Fettsäuren (FS) und weiteren Metaboliten führt zu chronischen, sterilen Entzündungsreaktionen, welche in der internationalen Literatur auch als „metaflammation“ beschrieben werden [2-4]. Die hierdurch progressive Verlaufsform der NAFLD wird als nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH) bezeichnet und kann durch bindegewebige Transformation des Leberparenchyms in einer Leberfibrose bzw. im Endstadium sogar in einer Leberzirrhose münden, welche durch einen zunehmenden Funktionsverlust gekennzeichnet ist. Bereits die NASH und Leberfibrose, aber insbesondere die Leberzirrhose ist mit dem Auftreten des hepatozellulären Karzinoms (HCC) assoziiert. Während die NASH und Leberfibrose als reversibel betrachtet werden, ist die (dekompensierte) Leberzirrhose nicht mehr umkehrbar [3]. Basierend auf den zugrundeliegenden Pathomechanismen und Begleiterkrankungen wie Typ-2-Diabetes mellitus, Adipositas, arterielle Hypertonie oder auch das metabolische Syndrom werden im internationalen Kontext weitere Begriffsdefinitionen wie „metabolic dysfunction associated fatty liver disease“ (MAFLD) diskutiert, ohne sich jedoch einheitlich durchgesetzt zu haben [5].

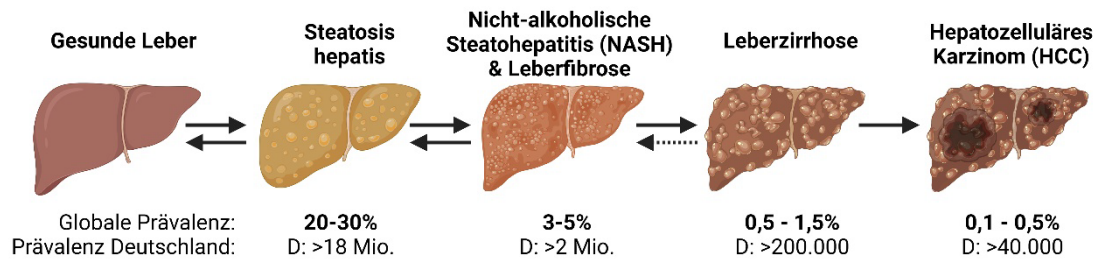


Abb. 1 Progress und Prävalenzen der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD). Die Entstehung der Steatosis hepatis bzw. reinen Leberverfettung kann verschiedene Ursachen haben, wobei die NAFLD meistens durch eine Kombination aus hyperkalorischer Ernährung und reduzierter körperlicher Aktivität entsteht. Ca. 25% der erwachsenen Bevölkerung sind weltweit von einer NAFLD betroffen, sodass die NAFLD die häufigste chronische Lebererkrankung darstellt. Die nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH) als progrediente Form der NAFLD ist durch chronische Entzündungsreaktionen gekennzeichnet, die letztlich auch in einer Leberfibrose bzw. -zirrhose resultieren können, die wiederum mit der Entstehung des hepatozellulären Karzinoms (HCC) assoziiert ist. Sowohl NASH als auch Leberfibrose und teilweise auch Stadien der Leberzirrhose werden als potentiell reversibel betrachtet. Die Abbildung wurde mit Hilfe von BioRender.com (2022) erstellt.

1.2 Epidemiologie

Die Prävalenz der NAFLD hat in den letzten beiden Dekaden stark zugenommen, sodass die NAFLD bereits die häufigste chronische Lebererkrankung darstellt und ca. 25% der weltweiten, erwachsenen Bevölkerung betrifft (in Deutschland ca. 18 Mio.). Entsprechend der Ätiologie (u.a. Ernährungsgewohnheiten mit hochprozessierter hyperkalorischer Nahrung in Kombination mit einer reduzierten körperlichen Belastung im Alltag) gibt es eine deutliche Häufung in der westlichen Welt. Neben einer genetischen Prädisposition (z.B. Risikoallele für *PNPLA3*, *MBOAT7*, *TM6SF2*) ist die NAFLD zudem eng mit metabolischen Komorbiditäten assoziiert [1]. Die Prävalenz der NAFLD ist unter Risiko-Patient*innen beispielsweise mit einem bekannten Typ-2-Diabetes mellitus noch deutlich höher: global 55,5 %, in Europa 68 % [5]. Die NASH als progressive Verlaufsform betrifft immer noch 3-5% der Gesamtbevölkerung (in Deutschland ca. 2 Mio.), wobei wiederum 10-15% dieser Patient*innen im Verlauf eine Leberfibrose oder -zirrhose entwickeln [6].

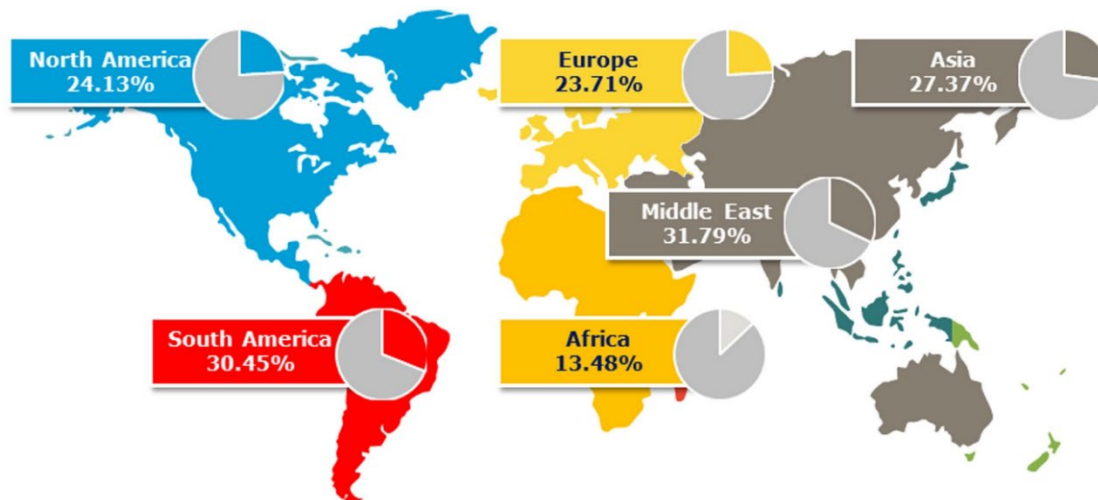


Abb. 2 Prävalenz und weltweite Verteilung der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD) in der erwachsenen Bevölkerung. (Quelle: Younossi et al. Hepatology. 2019 [6])

1.3 Prognose

Eine der entscheidenden, zukünftigen Strategien zur Behandlung der NAFLD wird die Risikostratifikation von Patient*innen sein. Aufgrund der hohen Prävalenz ist ein Screening der Allgemeinbevölkerung nicht praktikabel, sondern sollte auf Patient*innen mit Risikofaktoren (z.B. Typ-2-Diabetes mellitus, Adipositas, Arterieller Hypertonus und Metabolisches Syndrom) fokussiert werden. Klinische Beschwerden sind häufig unspezifisch (z.B. Unwohlsein, Leistungsminderung, Müdigkeit, Oberbauchbeschwerden, Verdauungsstörungen) oder fehlen gänzlich, sodass die Diagnose häufig erst in fortgeschrittenen Erkrankungsstadien gestellt wird. Im Umkehrschluss ist die differentialdiagnostische Abgrenzung der NAFLD von anderen Ursachen, die zu einer Steatosis hepatis führen, entscheidend (z.B. autoimmune Lebererkrankungen wie die Autoimmunhepatitis (AIH) oder die Primär biliäre Cholangitis (PBC) bzw. auch extrahepatische Erkrankungen wie die Hypothyreose, das Polyzystisches Ovarsyndrom oder auch medikamentös-toxische Nebenwirkungen). Auch die frühe NAFLD ohne zirrhotischen Umbau ist mit einer erhöhten Gesamtsterblichkeit verbunden, wobei nicht nur leberassoziierte Erkrankungen, sondern insbesondere auch kardiovaskuläre Erkrankungen und anderweitige Tumorerkrankungen die Hauptrisikofaktoren darstellen [1]. Entsprechend sollte neben der frühen Diagnosestellung auch eine kardiometabolische Umfelddiagnostik entsprechend der Leitlinie der

kardiologischen Fachgesellschaften erfolgen [1]. NASH-Aktivität, fortgeschrittene Leberfibrose (Fibrostadium \geq F3) und Leberzirrhose sind die entscheidenden prognoserelevanten Faktoren und sind mit hepatischen Komplikationen (z.B. hepatische Dekompensationen, Varizenblutung, Entstehung des HCC) sowie einer erhöhten Gesamtmorbidität und -mortalität assoziiert [7, 8]. Während vor allem die dekompensierte Leberzirrhose weiterhin häufig noch als irreversible Leberschädigung betrachtet wird, sind sowohl NASH als auch Leberfibrose vollständig reversibel [3]. Daher ist neben einer Stärkung des Bewusstseins für die NAFLD in der Allgemeinbevölkerung zur Primär- und Sekundärprophylaxe die zuverlässige Schweregradeinteilung bezogen auf die NASH-Aktivität und Stadium der Leberfibrose sowie die effektive Behandlung von besonderer Wichtigkeit.

1.4 Therapeutische Strategien

Die Grundlage aller Behandlungsstrategien der NAFLD besteht in einer Empfehlung zur Modifikation des Lebensstils der Patient*innen (nicht-medikamentöse Therapiestrategie):

- Gewichtsreduktion um mind. 5% bei zuvor bestehendem Übergewicht; idealerweise mind. 10%, da hierdurch bereits eine signifikante Reduktion der Leberfibrose zu erwarten ist;
- Hypokalorische Ernährungszufuhr, bestenfalls mediterrane Ernährungsgewohnheiten (wenig Kohlenhydrate, hoher Anteil an Proteinen, Reduktion zuckerhaltiger Getränke, Süßigkeiten und Snacks);
- Körperliche Aktivität als aerobes Training über mind. 3h pro Woche;
- Alkoholkarenz [1].

Zusätzlich können Verfahren der metabolischen Chirurgie (z.B. Sleeve-Gastrektomie) oder Endoskopie (z.B. intragastrale Ballonanlage) insbesondere bei höhergradiger Adipositas evaluiert werden, die bei NAFLD-Patient*innen mit dekompensierter Zirrhose und portaler Hypertension wiederum nicht etabliert bzw. sogar kontraindiziert sind [1]. Darüber hinaus gibt es keine zugelassenen, medikamentösen Therapieansätze zur Behandlung der NAFLD bzw. der fortgeschrittenen Erkrankungsstadien. Über die letzten Jahre konnten zahlreiche Pathomechanismen, welche sowohl zur Entstehung als auch dem Progress zur

NASH und Fibrose beitragen, identifiziert werden [9, 10]. Parallel haben diese Entdeckungen wiederum zur Entwicklung neuer pharmakologischer Substanzen geführt, die ihre potentielle Wirksamkeit zur Behandlung der Steatohepatitis bzw. Leberfibrose in vielen präklinischen Studien unter Beweis gestellt haben. Von besonderer Bedeutung sind diejenigen pharmakologischen Substanzen, die Entzündungsmechanismen modulieren, den gestörten Metabolismus oder die Darm-Leber-Achse günstig beeinflussen, Zellstress oder -tod inhibieren bzw. die Aktivierung von pro-fibrotischen hepatischen Sternzellen (HSCs) blockieren [10]. Es gibt zahlreiche Beispiele für klinische Studien der Phase 2b und 3, in denen vielversprechende Substanzen getestet wurden, die in der Monotherapie zwar günstige Effekte zeigten, den Erwartungen bezogen auf patientenrelevante Endpunkte wie eine anhaltende Reduktion der Leberfibrose oder NASH-Aktivität jedoch nicht standhalten konnten [11]. Aktuelle Bestrebungen gehen daher in die Richtung mehrere Signalwege gleichzeitig zu modulieren, wobei sowohl Einzelsubstanzen, die verschiedene Signalwege modulieren (z.B. Lanifibranor als pan-Peroxisom-Proliferator-Aktivierender-Rezeptor (pan-PPAR) Agonist), als auch Kombinationen unterschiedlicher Substanzen getestet werden [12]. Beispielhaft sind hier vielversprechende Präparate verschiedener Substanzklassen aufgelistet, die sich aktuell in Phase 3 der Zulassungsstudien befinden:

- Lanifibranor (pan-PPAR Agonist)
- Obeticholsäure (selektiver Farnesoid-X Rezeptor-Agonist (FXR))
- Resmetirom (selektiver Schilddrüsenhormonrezeptor β Agonist, THR- β)
- Semaglutid (Glucagon-like Peptid 1 (GLP1)-Rezeptor-Agonist)
- Aramchol (Stearoyl-CoA desaturase (SCD-1) Inhibitor) [13].

Gemäß der aktuellen deutschen Leitlinie sollte die Therapie mit NASH-spezifischen Medikamenten daher im Rahmen klinischer Studien individuell eingeschätzt werden und adressiert vor allem Patient*innen mit fortgeschrittener Leberfibrose (Stadium \geq F3) oder deutlicher Risikokonstellation (Stadium \geq F2 und hoher NASH-Aktivität bzw. schwerwiegenden, kardiometabolischen Begleiterkrankungen) [1]. Eine weitere Möglichkeit in Abhängigkeit von Komorbiditäten und Fibroestadien besteht im Einsatz von Medikamenten wie Glucagon-like Peptid 1 (GLP1) Rezeptor-Agonisten, die in Kombination mit Metformin für die Therapie des Typ-2-Diabetes mellitus oder Adipositas

zugelassen sind und in klinischen Studien positive Effekte auf das Körpergewicht und Aspekte der NAFLD zeigen [14, 15]. Bei Vorliegen einer Leberzirrhose und eines HCC sollte außerdem die Evaluation zur Lebertransplantation (LTX) geprüft werden. Weltweit nimmt die NASH als Indikation zur LTX deutlich zu; Hochrechnungen erwarten die NASH zeitnah sogar als die häufigste Indikation zur LTX. Entsprechend sind weitere Grundlagenarbeiten zur Verbesserung unseres Verständnisses der Erkrankung auch zur Entwicklung neuer medikamentöser Therapiestrategien entscheidend.

1.5 Herkunft und Komposition der hepatischen Makrophagen-Populationen

Kupffer Zellen (KC) sind residente Lebermakrophagen und stellen mit ca. 30% die größte, hepatische Immunzellpopulation dar [16]. Sie wandern während der frühen Embryogenese in die fetale Leber ein und stellen eine selbsterhaltende und lokal proliferierende Zellpopulation dar. KC sind hauptsächlich periportal auf der luminalen Seite der Endothelzellen in den Lebersinusoiden lokalisiert und über den Blutstrom im engen Kontakt mit verschiedenen Signalen, bspw. Alarmine aus dem Darm kommend. Darüber hinaus können KC lokale Immunantworten regulieren und kontrollieren die Gewebsintegrität [17]. Von den residenten Lebermakrophagen können eingewanderte Makrophagen, sogenannte Monozyten-abhängige Makrophagen (Mo-M ϕ), monozytären Ursprungs unterschieden werden. Mo-M ϕ stammen von hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark ab. Monozytäre Vorläuferzellen wandern aus dem Knochenmark heraus, verteilen sich über den Blutstrom im gesamten Körper und können u.a. die Leber infiltrieren, wo sie zu Mo-M ϕ differenzieren. Beide Zellpopulationen exprimieren ein jeweils charakteristisches Profil an intrazellulären und Oberflächenmarkern (gängige Marker in der Maus):

- KC: CD11b⁺, F4/80⁺⁺, CD68, CLEC4F und TIM-4
- Mo-M ϕ : CD11b⁺⁺ and F4/80⁺, CCR2, CX3CR1, CSF1R und LY6C.

1.6 Pathomechanismen in der Entstehung und Progress der NASH und Fibrose - Bedeutung des „Immun-Metabolismus“

Die NAFLD ist eng mit dem metabolischen Syndrom assoziiert und zugrundeliegende Pathomechanismen gehen weit über isolierte Leberpathologien hinaus. Im Sinne der „multiple-hit Theorie“ wird angenommen, dass viele Signalwege gleichzeitig gestört sind und zur Entstehung der NAFLD beitragen. Einerseits spielen Ernährungs- und Umweltfaktoren durch ein Überangebot beispielsweise an ungesättigten FS und Cholesterol, eine gestörte Insulinresistenz, Proliferation und Dysfunktion von Adipozyten sowie Veränderung im Darm-Mikrobiom eine große Rolle [18]. Die Verknüpfung von Signalen aus dem Darm und der Einfluss auf die Leberpathologie wird auch als Darm-Leber-Achse beschrieben - eine gestörte Darmbarriere und bakterielle Stoffwechselprodukte wie Lipopolysaccharide (LPS) aus dem veränderten Mikrobiom unterstützen pro-inflammatorische Prozesse und tragen zu einer vermehrten Leberverfettung bei [19]. Insbesondere Insulinresistenz oder auch ein vorbekannter und schlecht eingestellter Typ-2-Diabetes mellitus induzieren einerseits eine Lipolyse, die zur Freisetzung von freien Fettsäuren, Adipokinen und pro-inflammatorischen Zytokinen führt, andererseits wird auch die hepatische *de-novo*-Lipogenese stimuliert. Im metabolisch gestressten Hepatozyt entsteht eine exzessive Akkumulation von FS, die β -Oxidation, Speicherung und Transport von FS ist dysreguliert, was weitere pro-inflammatorische Prozesse aktiviert: Endoplasmatischer Retikulum (ER)-Stress, oxidativer Stress und Inflammasom-Aktivierung [20]. Zelluläre Stresssignale können auf unterschiedliche Weise zum Zelltodführen: Apoptose, Nekrose oder Nekroptose; wodurch u.a. reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species = ROS), DNA und DAMPs freigesetzt werden. Diese können wiederum eine Aktivierung bzw. pro-inflammatorische Polarisation von Immunzellen, insbesondere residente Makrophagen wie Kupffer Zellen (KC), induzieren. Diese enge Verknüpfung des gestörten Metabolismus und Induktion immunologischer Prozesse wird häufig auch als „Immun-Metabolismus“ beschrieben [21, 22]. Bei akuten, inflammatorischen Reaktionen zum Beispiel auf dem Boden einer bakteriellen Infektion wird eine sehr starke Immunantwort ausgelöst, gefolgt von einer raschen Pathogen-Elimination und Resolution der Entzündungsreaktionen. Metabolisch-inflammatorische Prozesse wie bei der NASH unterscheiden sich deutlich und sind durch eine anhaltende, eher gering

ausgeprägte, sterile Entzündungsreaktion charakterisiert, welche in der internationalen Literatur häufig auch als „metaflammation“ bezeichnet wird [4, 23].

1.7 Die Rolle von Makrophagen in der chronischen Leberschädigung

KC übernehmen wichtige Aufgaben im Sinne einer „Wächterfunktion“ der Leber, indem sie über verschiedene Rezeptoren Alarmine erkennen. Hierzu zählen beispielsweise endogene Moleküle wie DAMPs, welche bei Gewebsverletzungen, also Zelltod von Hepatozyten, freigesetzt werden oder auch pathogen-assoziierte molekulare Strukturen (PAMPs; zum Beispiel Lipopolysaccharide (LPS) oder Endotoxine) als Ausdruck einer bakteriellen oder viralen Infektion. Die Aktivierung von residenten Makrophagen erfolgt durch das Erkennen solcher Alarmine über Toll-like-Rezeptoren (TLR-4 oder -9) und initiiert eine intrazelluläre Signalkaskade (z.B. via NF- κ B), die u.a. zur Expression und Synthese pro-inflammatorischer bzw. pro-fibrotischer Zytokine (z.B. TNF- α , IL-1, IL-6, IL-18 und TGF β) und Chemokine (z.B. CCL1, CXCL1, CCL2, CCL5 und CXCL10) führt [17]. Diese Signale resultieren in einem Einstrom von zirkulierenden Immunzellen wie Monozyten, Neutrophilen und auch Lymphozyten (z.B. T-Zellen, Natürliche Killerzellen (NK Zellen), Natürliche Killer-T-Zellen (NKT-Zellen)) aus dem Blutstrom in die Leber. Bezogen auf Monozyten und Mo-M ϕ stellen die CCR2/CCL2-Achse sowie die CXCR3/CXCL10-Achse die wichtigsten Rekrutierungssignale dar [24-28]. Entlang der Chemokingradienten infiltrieren CCR2⁺ / CXCR3⁺ Monozyten die Leber, akkumulieren in den Regionen der Leberschädigung und differenzieren lokal zu monozyten-abhängigen Makrophagen (Mo-M ϕ) [29]. Hierbei entwickeln Mo-M ϕ ein charakteristisches Polarisationsprofil abhängig von ihrer unmittelbaren Umgebung aber auch verschiedener inflammatorischer Stimuli. In dieser Phase der Leberschädigung nimmt der Anteil residenter Makrophagen (KC) rapide ab, während der Anteil und somit auch die funktionelle Bedeutung von Mo-M ϕ deutlich zunimmt. Zwischen den lokalen Immunzellen besteht ein überaus komplexer interzellulärer Austausch, welcher pro-inflammatorische Immunreaktionen noch verstärken kann. Aktivierte Mo-M ϕ können wiederum pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1 β und TNF α oder auch ROS sezernieren, die weitere Immunzellen zum Ort der Leberschädigung rekrutieren. HSCs sind nach Aktivierung und Differenzierung zu Myofibroblasten die Hauptquelle extrazellulärer

Matrix (ECM) wie Kollagen und somit besonders wichtig für die Ausbildung einer Leberfibrose. An der Aktivierung von HSCs sind aktivierte bzw. pro-inflammatorisch Makrophagen durch direkte Zell-Zell-Interaktionen und auch freigesetzte Chemokine und Zytokine maßgeblich beteiligt [30, 31].

1.8 Polarisation und funktionelle Plastizität hepatischer Makrophagenpopulationen

Im Rahmen der Leberschädigung wurde über lange Zeit ein sehr simplifiziertes dichotomes Modell von hepatischen Makrophagen vermittelt, die entweder einen pro-inflammatorischen (M1) oder anti-inflammatorischen (M2) Phänotyp besitzen. Insbesondere technische Entwicklungen der letzten Jahre wie Single Cell RNA Sequencing (scRNAseq) konnten jedoch belegen, dass die phänotypische Vielfalt, Plastizität und funktionelle Anpassungsfähigkeit von Makrophagen weitaus komplexer sind [32]. Hepatische Makrophagen adaptieren sich an ihre Umwelt und können beispielsweise ein pro-inflammatorisches Polarisationsprofil aufweisen und Entzündungsprozesse aufrechterhalten bzw. vorantreiben. Umgekehrt übernehmen Makrophagen jedoch auch wichtige Aufgaben während der Regressionsphase im Anschluss an die Leberschädigung und vollziehen einen komplexen phänotypischen Wechsel. Solche „gereiften“ Makrophagen helfen beispielsweise bei der Resolution der Leberfibrose durch Phagozytose von Zelldetritus oder auch Expression von Matrix-Metalloproteasen (MMP) und Wachstumsfaktoren [33-36]. Interessanterweise können Mo-M ϕ unter experimentellen Bedingungen bei einer vollständigen KC-Depletion unterschiedliche Funktionen von KC übernehmen [37]. Grundsätzlich kann der Polarisationsstatus von Makrophagen mit Hilfe von typischen Markern näherungsweise erfasst werden:

- Pro-inflammatorische Marker: iNOS, CD86, IL-1 β , IL-6, TNF- α , CCL2 und CXCL1
- anti-inflammatorische Marker: CD206, CD301, VEGF, MMP-12, MMP-13, IL-10 und IL-13 [17, 38-41].

1.9 Die Rolle von Makrophagen in der NAFLD

Entstehung der NAFLD und Progress zur NASH und Leberfibrose sind i.d.R. multifaktoriell ausgelöst, wobei Immunzellen und insbesondere Makrophagen eine zentrale Rolle einnehmen [42]. So ist die Erweiterung der hepatischen Makrophagenpopulationen ein typisches Kennzeichen der NASH sowohl in der Maus [24, 43], als auch im Menschen [44, 45]. Einerseits führt die Überladung von Hepatozyten mit Fettsäuren als Resultat einer unausgewogenen und hyperkalorischen Ernährung zu einer erhöhten Lipotoxizität und chronischen inflammatorischen Prozessen, andererseits können inflammatorische Makrophagen eine Steatosis hepatis aber auch verursachen, indem sie die *de-novo*-Lipogenese in Hepatozyten initiieren [46]. Verschiedene Stimuli als Ausdruck des gestörten Glucose- oder Lipidmetabolismus wie ungesättigte FS im Rahmen der NAFLD können direkt oder indirekt zur pro-inflammatorischen Polarisation von Makrophagen beitragen. Aktivierte KCs und eingewanderte Mo-M ϕ können bei persistierenden, inflammatorischen Stimuli den Progress der NAFLD zu NASH und Leberfibrose beispielsweise durch Sekretion von Zytokinen wie IL-1 β , TNF- α und CCL2 unterstützen und sogar vorantreiben [47, 48]. Entsprechend ist die Depletion oder auch pharmakologische Inhibition der Einwanderung von Monozyten bzw. Mo-M ϕ protektiv im Rahmen der NASH- und Fibroseentwicklung und stellt neben der Inhibition der Aktivierung als auch der günstigen Modulation der Polarisation von Makrophagen ein vielversprechendes Ziel für therapeutische Therapiestrategien dar [24-27].

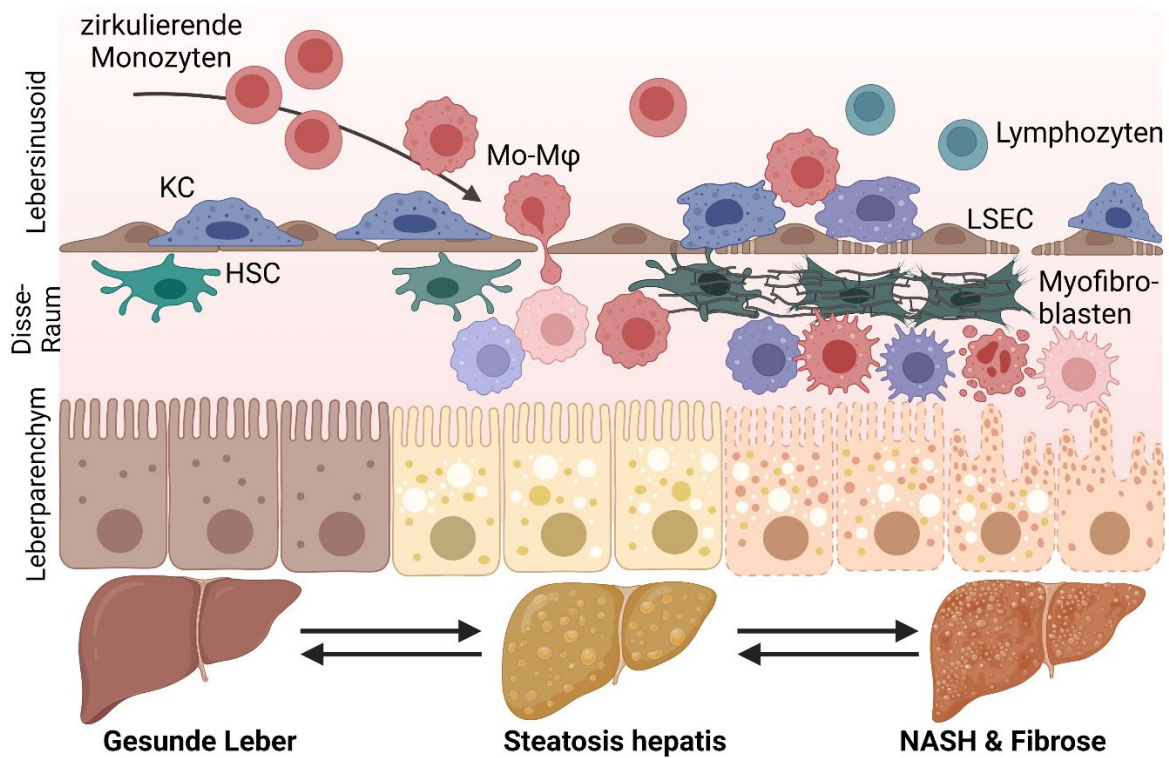


Abbildung 3. Die Rolle von Monozyten und Makrophagen bei Progression der NAFLD zu NASH und Leberfibrose. Die Überladung von Hepatozyten mit Fettsäuren führt zur Nekrose und Freisetzung von Alarminen wie DAMPs, welche wiederum zur Aktivierung von residenten Makrophagen bzw. Kupfer Zellen (KC) führen. Die Aktivierung führt zur Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen wie CCL2 - entlang dieser Chemokingradienten können CCR2⁺ Monozyten und Makrophagen (Mo-Mφ) die Leber infiltrieren und in Regionen der Schädigung akkumulieren. Mo-Mφ können durch eine pro-inflammatorische Polarisation Entzündungsreaktionen aufrechterhalten und tragen so zur Progression der NAFLD zu NASH und Leberfibrose bei. Die Abbildung wurde mit Hilfe von BioRender.com (2022) erstellt.

1.10. Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser kumulativen Habilitationsschrift besteht darin, die Rolle von Monozyten und Makrophagen im Rahmen der Pathogenese der NAFLD und insbesondere der progressiven Formen NASH und Leberfibrose zu charakterisieren. Hierbei lag der Fokus auf der Interaktion (Immun-Metabolismus) zwischen inflammatorischen Prozessen, dem gestörten Metabolismus und der funktionellen Plastizität von Immunzellen. Im Rahmen der Arbeit wurden sowohl experimentelle Mausmodelle mit Techniken der Grundlagenforschung als auch Patientendaten analysiert. Wir haben die Effekte metabolischer Interventionen auf Makrophagen-Funktionalität sowie den Einfluss der Inhibition der Makrophagen-Rekrutierung auf den dysregulierten Metabolismus als charakteristisches Merkmal der NAFLD und des metabolischen Syndroms analysiert. Die Erkenntnisse unterstützen die Entwicklung neuer pharmakologischer Behandlungsstrategien zur Therapie von Patient*innen mit NASH und Leberfibrose.

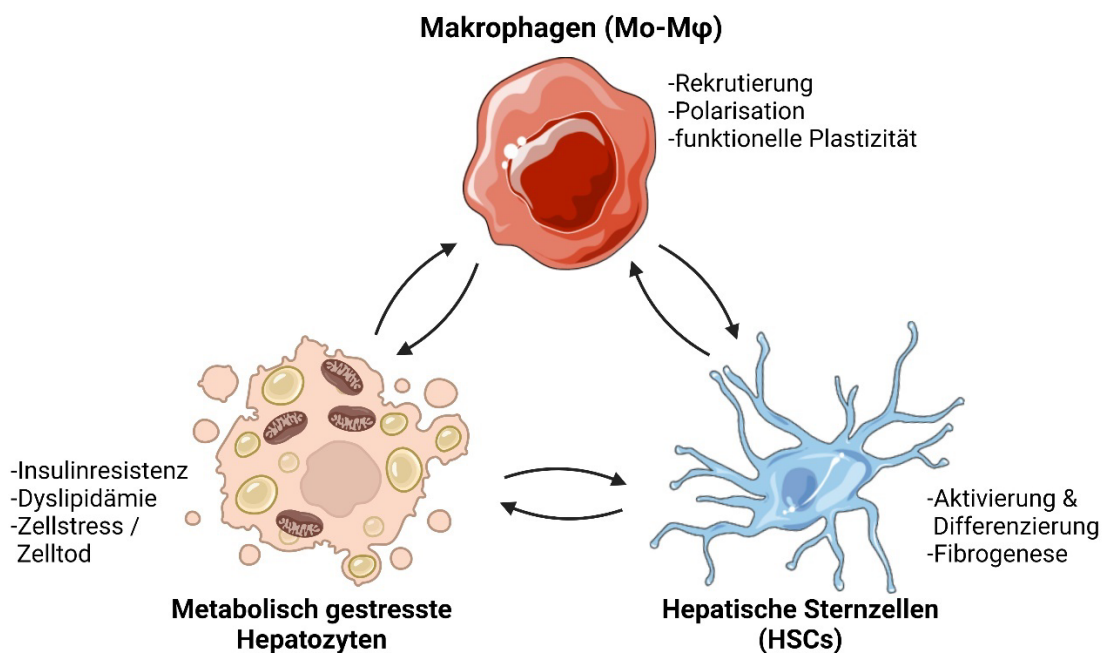


Abbildung 4. Die wechselseitigen Interaktionen von Makrophagen, Dysmetabolismus und weiteren Immunzellen bei NAFLD. Die Abbildung wurde mit Hilfe von BioRender.com (2022) sowie Servier Medical Art, zur Verfügung gestellt von Servier, lizenziert durch Creative Commons Attribution 3.0. unported license erstellt.

2. Ergebnisse eigener Arbeiten

2.1. Übersicht der Ergebnisse eigener Arbeiten

- Monozyten und Makrophagen weisen beim Progress der NAFLD zur NASH einen charakteristischen und funktionell relevanten Phänotyp auf
- Die therapeutische Inhibition der Rekrutierung pro-inflammatorischer Monozyten-abhängiger Makrophagen (Mo-Mφ) verbessert NASH-Aktivität und Leberfibrose
- Der Fettsäurerezeptor GPR84 vermittelt eine Rekrutierung myeloider Zellen wie Makrophagen, und dessen therapeutische Inhibition verbessert NASH und Fibrose
- pan-PPAR Agonisten vereinen und potenzieren günstige Effekte der selektiven PPAR-agonistischen Wirkung in der Behandlung von NASH und Leberfibrose
- Die Kombination einer anti-inflammatorisch (CCR2/CCR5 Antagonist) und einer metabolisch wirksamen Substanz (FGF21 Analogon) zeigt synergistische Effekte in der Behandlung der NASH und Leberfibrose

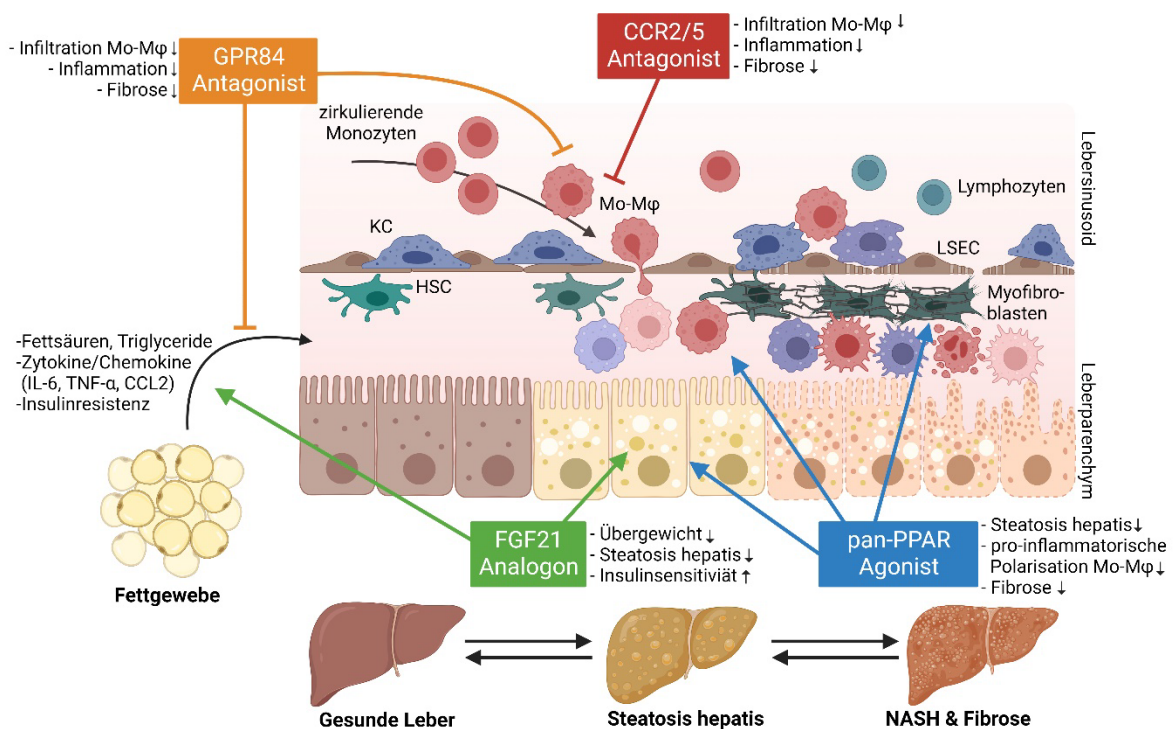


Abbildung 5. Graphische Übersicht der Ergebnisse eigener Arbeiten. Die Weiterentwicklung aus Abbildung 3 zeigt die Pathomechanismen der Entstehung und Progress der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD) zur nicht-alkoholischen Steatohepatitis (NASH) und Leberfibrose sowie ergänzend die pharmakologischen Ansatzpunkte und Effekte der getesteten Substanzen. Die Abbildung wurde mit Hilfe von BioRender.com (2022) erstellt.

2.2 - Monozyten und Makrophagen weisen beim Progress der NAFLD zur NASH einen charakteristischen und funktionell relevanten Phänotyp auf

Krenkel O, Hundertmark J, Abdallah AT, Kohlhepp M, Puengel T, Roth T, Branco DPP, Mossanen JC, Luedde T, Trautwein C, Costa IG, Tacke F. Myeloid cells in liver and bone marrow acquire a functionally distinct inflammatory phenotype during obesity-related steatohepatitis. *Gut*. 2020 Mar;69(3):551-563. doi: 10.1136/gutjnl-2019-318382. Epub 2019 May 10.

Abstrakt-Zitat [49]:

“Objective: Bone marrow-derived myeloid cells accumulate in the liver as monocytes and macrophages during the progression of obesity-related non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) to steatohepatitis (NASH). Myeloid cells comprise heterogeneous subsets, and dietary overnutrition may affect macrophages in the liver and bone marrow. We therefore aimed at characterising in depth the functional adaptations of myeloid cells in fatty liver. Design: We employed single-cell RNA sequencing to comprehensively assess the heterogeneity of myeloid cells in the liver and bone marrow during NAFLD, by analysing C57BL/6 mice fed with a high-fat, high-sugar, high-cholesterol ‘Western diet’ for 16 weeks. We also characterised NAFLD-driven functional adaptations of macrophages in vitro and their functional relevance during steatohepatitis in vivo. Results: Single-cell RNA sequencing identified distinct myeloid cell clusters in the liver and bone marrow. In both compartments, monocyte-derived populations were largely expanded in NASH-affected mice. Importantly, the liver myeloid compartment adapted a unique inflammatory phenotype during NAFLD progression, exemplarily characterised by downregulated inflammatory calprotectin (S100A8/A9) in macrophage and dendritic cell subsets. This distinctive gene signature was also found in their bone marrow precursors. The NASH myeloid phenotype was principally recapitulated by in vitro exposure of bone marrow-derived macrophages with fatty acids, depended on toll-like receptor 4 signalling and defined a characteristic response pattern to lipopolysaccharide stimulation. This imprinted and stable NASH myeloid immune phenotype functionally determined inflammatory responses following acute liver injury (acetaminophen poisoning) in vivo. Conclusion: Liver myeloid leucocytes and their bone marrow precursors adapt a common and functionally relevant inflammatory signature during NAFLD progression.”

Im Rahmen der Entstehung und des Fortschreitens der NAFLD zu NASH und Leberfibrose ist die Aktivierung verschiedener immunologischer Mechanismen ein zentraler Bestandteil, ausgelöst durch beispielsweise Lipotoxizität, Zellstress und Hepatozyten-Nekrose [50]. Auf die Aktivierung von residenten KC in der Leber folgt eine Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen, die zur Rekrutierung von Monozyten und Makrophagen aus dem Knochenmark heraus über den Blutstrom in die Leber führen [24]. Grundsätzlich ist bekannt, dass Makrophagen eine hohe phänotypische und funktionelle Plastizität besitzen und entsprechend komplex an ihre Umgebung adaptieren können [41, 51]. Freie Fettsäuren (FS) werden über die Nahrung aufgenommen, sodass die individuelle Zusammensetzung stark mit den Ernährungsgewohnheiten variieren kann. Auch mononukleäre Zellen wie Monozyten und Makrophagen können auf metabolische Stimuli (MAMPs = Metabolismus-assoziierte molekulare Muster) reagieren und beispielsweise FS erkennen – hierbei ist TLR-4 einer der bedeutendsten Rezeptoren und induziert eine NFκB-vermittelte Signalkaskade [52-54]. Xue et al. konnten zeigen, dass FS in humanen Makrophagen *in vitro* einen pro-inflammatorischen Phänotyp induzieren [32]. Zum Zeitpunkt der Bearbeitung des Projekts konnten erste Grundlagenstudien eine Verknüpfung zwischen metabolischer Dysregulation und einer inflammatorischen Polarisierung von Makrophagen herstellen [55]. Christ et al. konnten nachweisen, dass myeloide Immunzellen durch das Füttern einer experimentellen Western Diät (WD) verändert auf eine LPS-Stimulation reagieren [56].

In unserer Studie konnten wir u.a. mittels scRNAseq zeigen, dass diätetische Faktoren durch das Füttern einer NAFLD-induzierenden Diät (WD) Gen-Expressionsprofile von Monozyten und myeloiden Vorläuferzellen bereits im Knochenmark verändern. Diese genetischen Veränderungen bleiben auch in den differenzierten myeloiden Zellpopulationen wie Mo-Mφ erhalten und beeinflussen die hepatische Makrophagen-Funktionalität. Darüber hinaus bleibt die genetische Prägung auch in einem inflammatorischen Mikromilieu und Exposition gegenüber weiteren Stimuli grundsätzlich erhalten. Zwei besonders stark herunterregulierte Gene sind hierbei *S100A8* und *S100A9*, die die Expression von Calprotectin (heterodimeres Protein aus *S100A8* und *S100A9*) regulieren. Calprotectin ist ein inflammatorischer Mediator, der aus Immunzellen (Neutrophile, Monozyten, Makrophagen) freigesetzt wird und die Zytokinproduktion NFκB-vermittelt induzieren kann [57, 58]. Interessanterweise konnte

auch *in vitro* der „NASH-Phänotyp“ in myeloiden Zellen durch Stimulation mit verschiedenen FS induziert werden. Sowohl *in vitro* als auch in einem *in vivo* Mausmodell der akut auf chronischen Leberschädigung durch APAP blieben Polarisation myeloider Zellen durch eine zuvor gefütterte NAFLD-Diät (WD) erhalten und waren mit einer abgeschwächten Entzündungsreaktion assoziiert. Wir vermuten, dass diätetisch induzierte Adaptationen myeloider Zellen im Knochenmark und in der Leber eine überschießende Immunantwort bzw. Entzündungsreaktion verhindern können. Entsprechend wichtig scheint die Rolle myeloider Zellen und v.a. von Makrophagen während der Entstehung und des Progresses der NAFLD zu sein. Navarro et al. konnten beispielsweise in Arginase 2 defizienten Mäusen (Arg2(-/-)) zeigen, dass der hieraus entstehende Mangel an anti-inflammatorischen Makrophagen zu einer gesteigerten *de-novo*-Lipogenese führt und so zur Entstehung einer NASH auch unter normalen Ernährungsgewohnheiten beiträgt [46]. Weiterhin lässt sich durch diese Arbeit die Bedeutung der Leber als metabolisch relevantes Organ hervorheben, da frühzeitig Veränderungen durch eine Auseinandersetzung mit metabolischen Stimuli wie gesättigter oder ungesättigter FS aus der täglichen Ernährung auch auf Immunzellebene stattfinden.

<https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-318382>

2.3 - Die therapeutische Inhibition der Rekrutierung pro-inflammatorischer Monozyten-abhängiger Makrophagen (Mo-Mφ) verbessert NASH-Aktivität und Leberfibrose

Krenkel O, Puengel T*, Govaere O, Abdallah AT, Mossanen JC, Kohlhepp M, Liepelt A, Lefebvre E, Luedde T, Hellerbrand C, Weiskirchen R, Longerich T, Costa IG, Anstee QM, Trautwein C, Tacke F. Therapeutic inhibition of inflammatory monocyte recruitment reduces steatohepatitis and liver fibrosis. Hepatology. 2018 Apr;67(4):1270-1283. doi: 10.1002/hep.29544. Epub 2018 Feb 19.*

Abstrakt-Zitat [59]:

“Macrophages are key regulators of liver fibrosis progression and regression in nonalcoholic steatohepatitis (NASH). Liver macrophages comprise resident phagocytes, Kupffer cells, and monocyte-derived cells, which are recruited through the chemokine receptor C-C motif chemokine receptor 2 (CCR2). We aimed at elucidating the therapeutic effects of inhibiting monocyte infiltration in NASH models by using cenicriviroc (CVC), an oral dual chemokine receptor CCR2/CCR5 antagonist that is under clinical evaluation. Human liver tissues from NASH patients were analyzed for CCR2+ macrophages, and administration of CVC was tested in mouse models of steatohepatitis, liver fibrosis progression, and fibrosis regression. In human livers from 17 patients and 4 controls, CCR2+ macrophages increased parallel to NASH severity and fibrosis stage, with a concomitant inflammatory polarization of these cluster of differentiation 68+, portal monocyte-derived macrophages (MoMF). Similar to human disease, we observed a massive increase of hepatic MoMF in experimental models of steatohepatitis and liver fibrosis. Therapeutic treatment with CVC significantly reduced the recruitment of hepatic Ly-6C+ MoMF in all models. In experimental steatohepatitis with obesity, therapeutic CVC application significantly improved insulin resistance and hepatic triglyceride levels. In fibrotic steatohepatitis, CVC treatment ameliorated histological NASH activity and hepatic fibrosis. CVC inhibited the infiltration of Ly-6C+ monocytes, without direct effects on macrophage polarization, hepatocyte fatty acid metabolism, or stellate cell activation. Importantly, CVC did not delay fibrosis resolution after injury cessation. RNA sequencing analysis revealed that MoMF, but not Kupffer cells, specifically up-regulate multiple growth factors and cytokines associated with fibrosis progression, while Kupffer cells activated pathways related to inflammation

initiation and lipid metabolism. Conclusion: Pharmacological inhibition of CCR2+ monocyte recruitment efficiently ameliorates insulin resistance, hepatic inflammation, and fibrosis, corroborating the therapeutic potential of CVC in patients with NASH.”

Chronisch inflammatorische Prozesse führen zu einem Voranschreiten der NAFLD zur NASH und Leberfibrose. Da sowohl NASH-Aktivität als auch Grad der Leberfibrose (Fibrosegrad \geq F3) Risikoprädiktoren für leberassoziierte Komplikationen und Mortalität sind, ist einerseits die sichere diagnostische Einteilung und andererseits die Weiterentwicklung therapeutischer Strategien zur effektiven Fibroseverbesserung von entscheidender Bedeutung [7, 8, 60]. Sowohl in der akuten als auch chronischen Leberschädigung wie bei NAFLD wandern Monozyten aus dem Knochenmark über die systemische Zirkulation hauptsächlich entlang der CCR2/CCL2-Achse in die Leber ein und differenzieren zu Mo-M ϕ [38, 61]. Der molekulare Rekrutierungsmechanismus entlang der CCR2/CCL2-Achse besteht sowohl in der Maus als auch im Menschen [62]. Wie in der ersten Studie gezeigt, besitzen Makrophagen eine große funktionelle Plastizität und vermitteln u.a. eine HSC-Aktivierung und -Differenzierung zu Myofibroblasten, die dann vermehrt extrazelluläre Matrix (ECM) wie Kollagen produzieren und so maßgeblich zur Entstehung einer Leberfibrose beitragen [63]. Auf dieser Grundlage erscheint die pharmakologische Inhibition der CCR2/CCL2-Achse als vielversprechende Therapiestrategie, um die Einwanderung von Monozyten bzw. Mo-M ϕ zu blockieren und hierdurch inflammatorische Prozesse zu reduzieren und die Fibroseentstehung bzw. den Progress zu unterbinden. Cenicriviroc (CVC) ist ein oral verfügbarer, dualer CCR2/CCR5-Chemokinininhibitor. Zum damaligen Zeitpunkt war aus Mausmodellen bekannt, dass auch die Migration von Monozyten effektiv inhibiert werden kann – im Modell der chronischen Nierenschädigung konnte die renale Fibrose signifikant verbessert werden [64]. Außerdem wurde CVC im Laufe der Arbeit in klinischen Studien der Phase 2b an Patient*innen mit NASH und Fibrose untersucht und zeigte in den ersten Interimsanalysen positive Effekte bei einer sehr guten Verträglichkeit [65, 66].

In dieser Studie konnten wir bestätigen, dass inflammatorische CCR2⁺ Makrophagen im Rahmen der humanen NASH in der Leber akkumulieren und sogar mit dem Fibrosegrad korrelieren. In zwei voneinander unabhängigen Mausmodellen der Steatohepatitis und Leberfibrose (WD und MCD) konnte die Infiltration CCR2⁺ Mo-M ϕ

effektiv durch die therapeutische Applikation von CVC inhibiert werden. Die Reduktion von hepatischen, pro-inflammatorischen Mo-M ϕ war mit einer Verbesserung des Leberschadens, NASH-Aktivität und Leberfibrose assoziiert. Relevante Effekte auf Immunzellebene durch die CCR5-inhibitorische Komponente von CVC konnten ausgeschlossen werden. Entsprechend der ersten Studie konnten wir außerdem in beiden Modellen spezifische Polarisierungen im Sinne eines pro-inflammatorischen „NASH-Phänotyps“ nachweisen. Neben der Progression haben wir in dieser Studie auch die Regressionsphase nach Leberschädigung untersucht und konnten zeigen, dass immunologische Reparaturprozesse im Rahmen der CVC-Behandlung nicht durch die quantitativ reduzierte Makrophagenpopulation gestört werden.

<https://doi.org/10.1002/hep.29544>

2.4 Der Fettsäurerezeptor GPR84 vermittelt eine Rekrutierung myeloider Zellen wie Makrophagen - die therapeutische Inhibition verbessert NASH und Fibrose

Puengel T, De Vos S, Hundertmark J, Kohlhepp M, Guldiken N, Pujuguet P, Auberval M, Marsais F, Shoji KF, Saniere L, Trautwein C, Luedde T, Strnad P, Brys R, Clément-Lacroix P, Tacke F. The Medium-Chain Fatty Acid Receptor GPR84 Mediates Myeloid Cell Infiltration Promoting Steatohepatitis and Fibrosis. J Clin Med. 2020 Apr 16;9(4):1140. doi: 10.3390/jcm9041140.

Abstrakt-Zitat [67]:

Medium-chain fatty acids (MCFAs) have been associated with anti-steatotic effects in hepatocytes. Expression of the MCFAs receptor GPR84 (G protein-coupled receptor 84) is induced in immune cells under inflammatory conditions and can promote fibrogenesis. We aimed at deciphering the role of GPR84 in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis (NASH), exploring its potential as a therapeutic target. GPR84 expression is upregulated in liver from patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), correlating with the histological degree of inflammation and fibrosis. In mouse and human, activated monocytes and neutrophils upregulate GPR84 expression. Chemotaxis of these myeloid cells by GPR84 stimulation is inhibited by two novel, small molecule GPR84 antagonists. Upon acute liver injury in mice, treatment with GPR84 antagonists significantly reduced the hepatic recruitment of neutrophils, monocytes, and monocyte-derived macrophages (MoMF). We, therefore, evaluated the therapeutic inhibition of GPR84 by these two novel antagonists in comparison to selonsertib, an apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) inhibitor, in three NASH mouse models. Pharmacological inhibition of GPR84 significantly reduced macrophage accumulation and ameliorated inflammation and fibrosis, to an extent similar to selonsertib. In conclusion, our findings support that GPR84 mediates myeloid cell infiltration in liver injury and is a promising therapeutic target in steatohepatitis and fibrosis.

Wir unterscheiden FS nach molekularer Struktur in gesättigte und ungesättigte FS, nach Bioverfügbarkeit in essentielle und nicht-essentielle FS sowie nach Länge bzw. Anzahl an Kohlenstoffatomen - mittelkettige Fettsäuren besitzen zwischen 7 und 12 Kohlenstoffatome. FS, insbesondere ungesättigte FS, zählen zu den wichtigsten metabolischen Stimuli im Rahmen der Entstehung und des Progresses der NAFLD und können wie in unseren ersten beiden Studien gezeigt Polarisation und Funktionalität von myeloiden Immunzellen wie Makrophagen anhaltend verändern [49, 59]. Die spezielle Rolle mittelkettiger FS im Rahmen der NAFLD ist jedoch nicht umfänglich beschrieben, wobei eher anti-steatotische Effekte mit mittelkettigen FS in Zusammenhang gebracht werden [68]. GPR84 (G protein-coupled receptor 84) ist ein Rezeptor für mittelkettige FS und wird auf verschiedenen Immunzellen unter inflammatorischen Bedingungen sowohl in der Maus als auch im Menschen exprimiert [69]. In Makrophagen kann eine pro-inflammatorische Polarisation und gesteigerte Phagozytose GPR84-vermittelt induziert werden. GPR84-defiziente Mäuse entwickeln eine reduzierte Steatohepatitis unter einer Diät mit langkettigen Fettsäuren; im Modell der Adenin-induzierten Nierenfibrose kann bei GPR84-Defizienz eine reduzierte Fibrose beobachtet werden [70, 71].

Auf Grundlage dieser Informationen untersuchten wir die Bedeutung von GPR84 als Rezeptor für mittelkettige Fettsäuren im Rahmen der NASH und Leberfibrose, um hieraus neue therapeutische Strategien abzuleiten. Wir konnten zeigen, dass die GPR84-Expression unter inflammatorischen Bedingungen in der humanen und murinen NASH hochreguliert ist. Durch *in vitro* Chemotaxis Assays mit murinen und humanen Zellen konnte gezeigt werden, dass GPR84 ein chemotaktisches Potential für myeloide Zellen wie Neutrophile und Monozyten besitzt. Außerdem standen uns zwei GPR84-Inhibitoren (small molecules) zur Verfügung, die sich vor allem in ihrer Rezeptor-Bindungsaffinität unterschieden (Substanz B besitzt eine höhere Rezeptoraffinität als Substanz A). Das therapeutische Potential verglichen wir mit einem ASK-1 Inhibitor (Selonsertib), der zu diesem Zeitpunkt vielversprechende Daten im Mausmodell und klinischen Studien zeigen konnte. Im Mausmodell der akuten Leberschädigung mittels CCl₄ konnten beide GPR84 Inhibitoren die Infiltration von Neutrophilen und Makrophagen in die Leber inhibieren und den Leberschaden reduzieren. Die effektive pharmakologische Inhibition myeloider Zellen konnte unabhängig voneinander in der experimentellen NASH (MCD-induziert) sowie in der chronischen CCl₄-induzierten Leberfibrose nachgewiesen werden. Die Reduktion

inflammatorischer Makrophagen war in beiden Modellen (MCD und CCl₄) sowie einem dritten NASH-Modell (CDAHFD) mit einer signifikanten Reduktion der NASH-Aktivität und Leberfibrose assoziiert. Interessanterweise waren anti-inflammatorische und anti-fibrotische Effekte stärker ausgeprägt als die reine Steatosereduktion. Substanz B zeigte hierbei mutmaßlich aufgrund der höheren Rezeptoraffinität potentere Effekte als Substanz A – der therapeutische Effekt beider Substanzen war vergleichbar mit Selonsertib als Positivkontrolle.

<https://doi.org/10.3390/jcm9041140>

2.5 pan-PPAR Agonisten vereinen und potenzieren günstige Effekte der selektiven PPAR-agonistischen Wirkung in der Behandlung von NASH und Leberfibrose

Lefere S*, Puengel T*, Hundertmark J, Penners C, Frank AK, Guillot A, de Muynck K, Heymann F, Adarbes V, Defrêne E, Estivalet C, Geerts A, Devisscher L, Wettstein G, Tacke F. Differential effects of selective- and pan-PPAR agonists on experimental steatohepatitis and hepatic macrophages. *J Hepatol.* 2020 Oct;73(4):757-770. doi: 10.1016/j.jhep.2020.04.025. Epub 2020 Apr 29.

Abstrakt-Zitat [2]:

Background & aims: Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are essential regulators of whole-body metabolism, but also modulate inflammation in immune cells, notably macrophages. We compared the effects of selective PPAR agonists to those of the pan-PPAR agonist lanifibranor in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), and studied isoform-specific effects on hepatic macrophage biology. Methods: Lanifibranor or selective PPAR α (fenofibrate), PPAR γ (pioglitazone) and PPAR δ (GW501516) agonists were therapeutically administered in choline-deficient, amino acid-defined high-fat diet (CDAA-HFD)- and Western diet (WD)-fed mouse models of NAFLD. Acute liver injury was induced by carbon tetrachloride (CCl₄). The role of PPARs on macrophage functionality was studied in isolated hepatic macrophages, bone marrow-derived macrophages stimulated with palmitic acid, and circulating monocytes from patients with NAFLD. Results: Lanifibranor improved all histological features of steatohepatitis in CDAA-HFD-fed mice, including liver fibrosis, thereby combining and exceeding specific effects of the single PPAR agonists. Its potent anti-steatotic efficacy was confirmed in a 3D liver biochip model with primary cells. Infiltrating hepatic monocyte-derived macrophages were reduced following PPAR agonist administration, especially with lanifibranor, even after short-term treatment, paralleling improved steatosis and hepatitis. Lanifibranor similarly decreased steatosis, liver injury and monocyte infiltration in the WD model. In the acute CCl₄ model, neither single nor pan-PPAR agonists directly affected monocyte recruitment. Hepatic macrophages isolated from WD-fed mice displayed a metabolically activated phenotype. Lanifibranor attenuated the accompanying

inflammatory activation in both murine palmitic acid-stimulated bone marrow-derived macrophages, as well as patient-derived circulating monocytes, in a PPAR δ -dependent fashion. Conclusion: Pan-PPAR agonists combine the beneficial effects of selective PPAR agonists and may counteract inflammation and disease progression more potently. PPAR δ agonism and lanifibranor directly modulate macrophage activation, but not infiltration, thereby synergizing with beneficial metabolic effects of PPAR α/γ agonists.

Lay summary: Peroxisome proliferated-activated receptors (PPARs) are essential regulators of metabolism and inflammation. We demonstrated that the pan-PPAR agonist lanifibranor ameliorated all aspects of non-alcoholic fatty liver disease in independent experimental mouse models. Non-alcoholic fatty liver disease and fatty acids induce a specific polarization status in macrophages, which was altered by lanifibranor to increase expression of lipid handling genes, thereby decreasing inflammation. PPAR isoforms have differential therapeutic effects on fat-laden hepatocytes, activated hepatic stellate cells and inflammatory macrophages, supporting the clinical development of pan-PPAR agonists.

Peroxisome-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPARs) sind intrazelluläre bzw. nukleäre Rezeptoren, die auf FS und FS-Derivate reagieren. Es werden drei Isoformen unterschieden, PPAR α , PPAR γ und PPAR δ (β), die eine unterschiedliche Gewebeverteilung besitzen - alle drei Isoformen werden auch in der Leber exprimiert. PPARs sind in zahlreiche führend metabolisch relevante Prozesse integriert, zu den wichtigsten zählen Bindung und Transport von FS, zelluläre Aufnahme und Speicherung von FS, FS-Oxidation, Glukosestoffwechsel und Kontrolle metabolisch-inflammatorischer Prozesse. Es ist bekannt, dass die Expression der PPAR α mit der Entstehung der NASH korreliert, ein PPAR α -Agonist (Wy-14,643) zeigte positive Effekte in experimenteller NASH und Fibrose [72, 73]. PPAR γ ist führend im Fettgewebe exprimiert, agiert hier als Insulin-Sensitizer, verbessert den Glukosemetabolismus und reduziert die ektipe Fettakkumulation [74]. Die Bedeutung von PPAR δ (β) ist weniger gut verstanden, experimentelle Arbeiten deuten auf eine gesteigerte hepatische FS-Oxidation und Reduktion inflammatorischer Prozesse hin [75]. Außerdem können PPARs inflammatorische Signale über Immunzellen modulieren. PPAR γ und PPAR δ (β) beeinflussen eine anti-inflammatorische

Polarisation myeloider Zellen wie Makrophagen. Umgekehrt führt die experimentelle Deletion von PPAR γ und $\delta(\beta)$ in myeloiden Zellen zu einer gesteigerten Insulinresistenz und Steatosis hepatis [76-78]. Grundsätzlich erscheinen PPARs also als vielversprechende pharmakologische Angriffspunkte zur Behandlung der NASH und Fibrose. Selektive PPAR-Agonisten zeigten in klinischen Studien jedoch keine relevante Verbesserung der humanen NAFLD, sodass die Bestrebungen in Richtung dualer oder pan-PPAR-Agonisten gingen. Der duale PPAR α - und $\delta(\beta)$ -Agonist Elafibranor konnte die primären Endpunkte in einer klinischen Studie nicht erreichen, zeigte jedoch dosisabhängige Effekte auf eine Verbesserung der NASH-Aktivität [79]. Als pan-PPAR Agonist stand uns in unserem Projekt Lanifibranor zur Verfügung, eine Substanz, die zu diesem Zeitpunkt in zwei NAFLD-Modellen positive Effekte gezeigt hat [80]. Parallel wurde Lanifibranor auch bereits in klinischen Studien getestet, Ergebnisse einer Phase-2b Studie in NASH-Patient*innen wurden 2021 veröffentlicht und zeigte eine Verbesserung der Steatose, NASH-Aktivität und Fibrose [81]. Ziel unserer Studie war es einerseits die Rolle von PPARs auf funktioneller, immunologischer Ebene, insbesondere auf Makrophagen, besser zu verstehen und andererseits das therapeutische Potential eines pan-PPAR Agonisten im Vergleich zu selektiven, agonistischen Wirkung zu testen.

Wir konnten in zwei voneinander unabhängigen NASH-Mausmodellen (CDAHFD und WD) zeigen, dass die einzelnen Effekte der selektiven PPAR-Agonisten kombiniert durch einen pan-PPAR Agonisten (Lanifibranor) erzielt werden können und teilweise synergistische Wirkung haben. PPAR-Agonisten reduzieren die hepatische Infiltration von Monozyten und Mo-M ϕ in der experimentellen NASH am ehesten indirekt über eine Reduktion des allgemeinen inflammatorischen Niveaus in der Leber. Über eine PPAR $\delta(\beta)$ -agonistische Wirkung konnte die inflammatorische Polarisation von Makrophagen durch FS günstig moduliert werden - insbesondere Gene im Zusammenhang mit Speicherung und Transport von Fettsäuren wurden verstärkt exprimiert. PPAR γ -vermittelt konnten wir zudem eine reduzierte Aktivierung von HSCs beobachten. In Kombination wurden Steatose, Inflammation, NASH-Aktivität und Leberfibrose signifikant reduziert. Lanifibranor als pan-PPAR Agonist zeigte hierbei potentere, therapeutische Effekte als die selektiven Agonisten.

<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.04.025>

2.6 Die Kombination einer anti-inflammatorisch (CCR2/CCR5 Antagonist) und einer metabolisch wirksamen Substanz (FGF21 Analogon) zeigt synergistische Effekte in der Behandlung der NASH und Leberfibrose

Puengel T, Lefere S, Hundertmark J, Kohlhepp M, Penners C, Van de Velde F, Lapauw B, Hoorens A, Devisscher L, Geerts A, Boehm S, Zhao Q, Krupinski J, Charles ED, Zinker B, Tacke F. Combined Therapy with a CCR2/CCR5 Antagonist and FGF21 Analogue Synergizes in Ameliorating Steatohepatitis and Fibrosis. Int J Mol Sci. 2022 Jun 15;23(12):6696. doi: 10.3390/ijms23126696.

Abstrakt-Zitat [82]:

(1) Background: With new potential drug targets emerging, combination therapies appear attractive to treat non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and fibrosis. Chemokine receptor CCR2/5 antagonists can improve fibrosis by reducing monocyte infiltration and altering hepatic macrophage subsets. Fibroblast growth factor 21 (FGF21) may improve NASH by modulating lipid and glucose metabolism. We compared effects of single drug to combination treatment as therapeutic strategies against NASH. (2) Methods: We analyzed serum samples and liver biopsies from 85 nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) patients. A CCR2/5 inhibitor (BMS-687681-02-020) and a pegylated FGF21 agonist (BMS-986171) were tested in male C57BL/6J mice subjected to dietary models of NASH and fibrosis (choline-deficient, L-amino acid-defined, high-fat diet (CDAHFD) up to 12 weeks; short- (2w) or long-term (6w) treatment). (3) Results: In NAFLD patients, chemokine CCL2 and FGF21 serum levels correlated with inflammatory serum markers, only CCL2 was significantly associated with advanced liver fibrosis. In rodent NASH, CCR2/5 inhibition significantly reduced circulating Ly6C⁺ monocytes and hepatic monocyte-derived macrophages, alongside reduced hepatic inflammation and fibrosis. FGF21 agonism decreased body weight, liver triglycerides and histological NASH activity. Combination treatment reflected aspects of both compounds upon short- and long-term application, thereby amplifying beneficial effects on all aspects of steatohepatitis and fibrosis. (4) Conclusions: CCR2/5 inhibition blocks hepatic infiltration of inflammatory monocytes, FGF21 agonism improves obesity-related metabolic disorders. Combined therapy ameliorates steatohepatitis and fibrosis more potently than single drug treatment in rodent NASH,

corroborating the therapeutic potential of combining these two approaches in NASH patients.

In den letzten Jahren konnten zahlreiche unterschiedliche Pathomechanismen, die zur Entstehung und Voranschreiten der NAFLD zu NASH und Leberfibrose beitragen, identifiziert werden. Gleichzeitig wurden so auch vielversprechende Ansatzpunkte für pharmakologisch wirksame Substanzen entdeckt. Allerdings konnten viele groß angelegte klinische Studien belegen, dass auch mutmaßlich vielversprechende Substanzen in der Monotherapie oftmals keine ausreichenden bzw. langanhaltenden therapeutischen Effekte vor allem auf patientenrelevante Endpunkte wie NASH-Aktivität und Fibrosereduktion zeigen [11]. Einer der Gründe liegt vermutlich in der pathomechanistischen Komplexität der NAFLD, sodass es, wie auch unserer vorangegangenen Studie gezeigt, aussichtsreich erscheint verschiedene Signalwege gleichzeitig bzw. kombiniert anzusteuern [20]. Hierbei erscheint eine Kombination von Substanzen vorteilhaft, die einerseits ein anti-inflammatorisches Potential besitzen und andererseits den gestörten Metabolismus der NAFLD positiv modulieren. In dieser Studie haben wir erneut auf einen CCR2/CCR5 Antagonisten (BMS-687681-02-020) zurückgegriffen, vergleichbar mit der pharmakologischen Substanz (Ceniciviroc) aus unserer zweiten Studie. Wir haben also eine anti-inflammatorische Wirkung durch eine Reduktion der hepatischen Infiltration pro-inflammatorischer Makrophagen erwartet. Als zweite Substanz stand uns ein Fibroblasten Wachstumsfaktor 21 (FGF21) Analogon (Pegbelfermin, BMS-986036) als Modulator des gestörten Metabolismus in der NAFLD zur Verfügung. FGF21 wird in der Leber synthetisiert und wirkt hauptsächlich hepatisch und im Fettgewebe [83, 84]. Arbeiten aus der Grundlagenforschung belegen eine Reduktion des Übergewichts, der Steatose, eine verbesserte Insulinsensitivität sowie Glukosemetabolismus [85-87]. Pegbelfermin wurde gleichzeitig in klinischen Studien u.a. in Patient*innen mit NASH und Leberfibrose untersucht. Auch hier konnte die Einzelsubstanz die primären Endpunkte nicht erreichen, allerdings wurde eine Reduktion der NASH-Aktivität und auch Leberfibrose zumindest im höhergradigen F3-Stadium beobachtet [88, 89].

In NAFLD-Patient*innen konnten wir zunächst zeigen, dass CCL2-Spiegel mit dem Stadium der Leberfibrose und FGF21-Serumlevel mit Biomarkern der NASH korrelieren und entsprechend belegen, dass beide Signalwege in der humanen NALFD relevant sind und unterschiedliche Funktionen übernehmen. Im Mausmodell der

akuten (CCl₄) und chronischen Leberschädigung (CDAHFD) blockierte der CCR2/CCR5 Antagonist effektiv die hepatische Infiltration pro-inflammatorischer Monozyten und Makrophagen. Über diesen Mechanismus konnte die NASH-Aktivität und Leberfibrose signifikant reduziert werden. Das FGF21 Analogon reduzierte Übergewicht, Ausmaß der Steatosis hepatis und auch den Leberschaden gemessen an Lebertransaminasen. Hervorzuheben ist, dass die gleichzeitige Therapie mit einem CCR2/5 Antagonisten und FGF21 Analogon synergistische Effekte über die Wirkung der Einzelsubstanzen hinaus zeigte. Die Behandlung über unterschiedliche Zeiträume konnte außerdem zeigen, dass die potentere Kombinationstherapie im Gegensatz zu den Einzelsubstanzen auch schon nach kurzer Behandlungsdauer positive Effekte auf NASH und Leberfibrose zeigt.

<https://doi.org/10.3390/ijms23126696>

3. Allgemeine Diskussion und Ausblick

Entstehung und Progress der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD) zur nicht-alkoholischen Steatohepatitis (NASH) und Leberfibrose sind bereits seit vielen Jahren Gegenstand intensiver Grundlagen- und klinischer Forschung. Die zugrundeliegenden Pathomechanismen sind jedoch weitaus komplexer als lange Zeit angenommen und lassen sich nicht nur auf die Leber beschränken. Die NAFLD ist eng mit dem metabolischen Syndrom und Komorbiditäten wie Diabetes-mellitus Typ 2 oder Adipositas verknüpft. Die systemische Kommunikation auf molekularer und Immunzellebene zwischen der Leber und anderen Organsystemen wie Darm (Darm-Leber-Achse) oder Fettgewebe (Lipid- und Glucosestoffwechsel) sind sehr komplex. In den letzten Jahren wurden zahlreiche Pathomechanismen der NAFLD, NASH und Fibrose sowie pharmakologische Ansatzpunkte identifiziert – zahlreiche, groß angelegte klinische Studien ergaben jedoch wiederholt unzureichende bzw. keine langanhaltende Effektivität einzelner Substanzen. Daher ist es für die Entwicklung zukünftiger Therapiestrategien der NAFLD besonders wichtig grundlegende Mechanismen noch besser zu verstehen, insbesondere die komplexe Kommunikation zwischen den Organsystemen zu untersuchen und vermutlich mehrere Signalwege gleichzeitig zu modulieren, um den Progress zur NASH und Leberfibrose zu unterbrechen bzw. sogar umzukehren. Da Monozyten und Makrophagen entscheidend an der Entwicklung und des Progresses der NAFLD zur NASH und Leberfibrose beteiligt sind, stellen diese Immunzellpopulationen ein attraktives, therapeutischen Ziel dar. Makrophagen-basierte Behandlungsstrategien zielen in der Regel darauf ab, entweder die Aktivierung von Makrophagen, insbesondere residenter Makrophagen (KCs) zu inhibieren, die Rekrutierung von Monozyten als auch Mo-M ϕ zum Ort der Leberschädigung zu unterdrücken oder die Polarisation eingewanderter Makrophagen günstig zu beeinflussen.

Mit den hier aufgeführten Arbeiten konnten wir einen Beitrag zum besseren Verständnis der Interaktion zwischen Inflammation, Metabolismus und Funktionalität bzw. Polarisierung von Immunzellen im Rahmen der NAFLD leisten. Wir konnten zeigen, dass metabolische Einflussfaktoren Makrophagen und Vorläuferzellen nicht nur in der Leber, sondern auch bereits im Knochenmark prägen und so funktionell anhaltend beeinflussen. Darüber hinaus haben wir

sowohl den Einfluss metabolischer Interventionen (PPAR-Agonisten, FGF21-Analogen) auf Makrophagen-Funktionalität und die chronische Leberschädigung untersucht, als auch Effekte der pharmakologischen Inhibition der hepatischen Makrophagen-Rekrutierung (CCR2/CCR5-Antagonist, GPR84-Antagonist) auf die metabolische Dysregulation in NASH und Leberfibrose getestet.

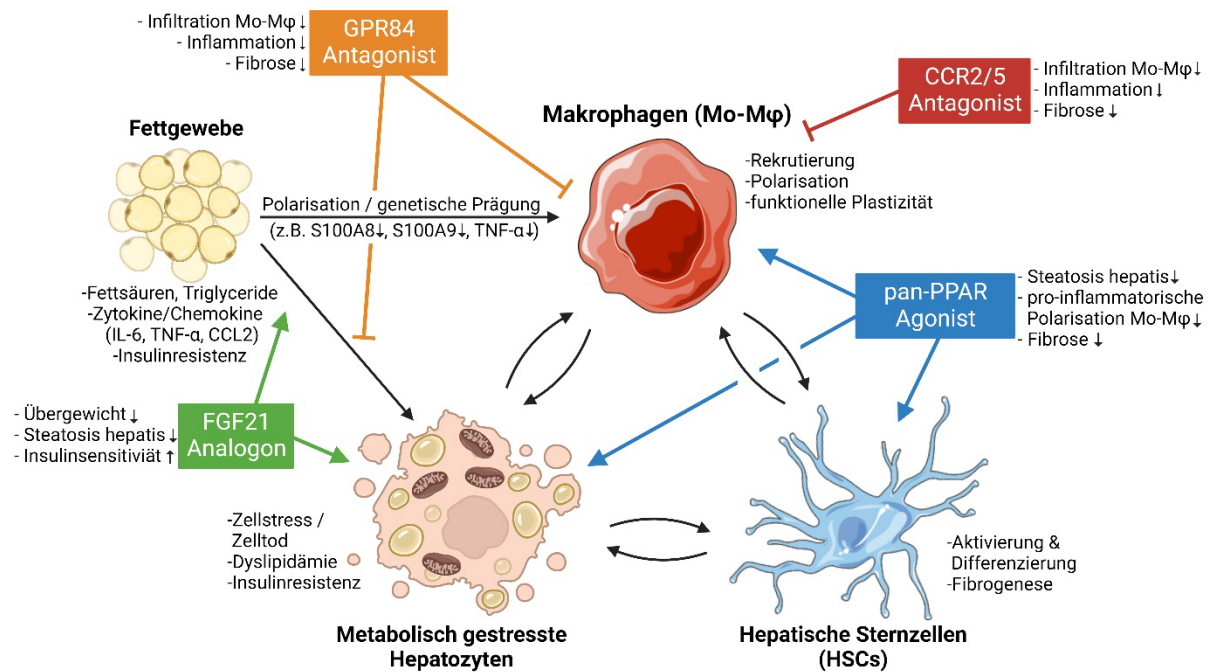


Abbildung 6. Die wechselseitigen Interaktionen von Makrophagen, Dysmetabolismus und weiteren Immunzellen bei NAFLD. Weiterentwicklung aus Abbildung 4 ergänzt durch die Ergebnisse aus eigenen Arbeiten. Die Abbildung wurde mit Hilfe von BioRender.com (2022) sowie Servier Medical Art, zur Verfügung gestellt von Servier, lizenziert durch Creative Commons Attribution 3.0. unported license erstellt.

Übergreifend über alle hier präsentierten Arbeiten wurden zahlreiche tierexperimentelle Modelle sowohl der akuten (CCl₄, APAP) als auch chronischen Leberschädigung (MCD, CDAHFD, WD) angewendet. Essentielle Signalwege wie Aktivierungsmechanismen von Makrophagen (z.B. TLR-4 und TLR-9 vermittelte Erkennung von DAMPs und PAMPs oder auch die Inflammasomaktivierung), die hepatische Rekrutierung von Monozyten und Mo-Mφ (z.B. via Chemokingradienten) sowie die kontext-abhängige, funktionelle Plastizität von Makrophagen sind sowohl in der Maus als auch im Menschen hoch konserviert.

Daher ist die Untersuchung jener Pathomechanismen in translationalen, präklinischen Mausmodellen prinzipiell möglich, birgt jedoch auch einige Limitationen. Weiterhin ist die Makrophagenbiologie sowohl in der Homöostase als auch in der akuten und chronischen Leberschädigung im Mausmodell deutlich besser charakterisiert als im Menschen. Immunologische Mechanismen im Rahmen der Leberschädigung, aber auch während der Regressionsphase, laufen in der Maus häufig deutlich schneller als im Menschen ab, was vermutlich auch einen nicht zu vernachlässigenden Einfluss auf die Polarisation von Makrophagen-Subpopulationen hat. Prinzipiell stehen wir auch heute noch vor dem Problem, dass der Zugang zu Probenmaterial (z.B. frisches Lebergewebe aus einer Leberbiopsie oder intraoperativ entnommenes Material) von Patient*innen sehr begrenzt ist. Insbesondere aus frühen Erkrankungsstadien der NAFLD liegt häufig kaum wissenschaftlich zugängliches Material vor, da es in der Regel keine medizinische Indikation zur Durchführung einer Leberbiopsie gibt. Zudem ist die Individualität und Heterogenität von Patient*innen deutlich größer als in Mausmodellen, was sowohl unveränderbare (z.B. genetische Variationen, Geschlecht oder Alter) als auch veränderbare Faktoren (z.B. Ernährung, Mikrobiom, Infektionen, multifaktorielle Genese der Leberschädigung) einschließt. Vermutlich ist die funktionelle Diversität von Makrophagen in der humanen NAFLD sogar noch deutlich größer als bisher angenommen [29]. Bis heute existiert zudem kein optimales Modell, welches die humane NAFLD in ihrer vollständigen Komplexität widerspiegeln kann, sodass häufig die gezielte Fragestellung des Projekts die Auswahl des Modells bedingt [90]. Die MCD-Diät wurde in vielen präklinischen Studien verwendet und induziert eine ausgeprägte Leberfibrose und NASH mit hoher Entzündungsaktivität. Gleichzeitig entwickeln die Tiere kaum andere systemische Aspekte der humanen NAFLD - die Tiere verlieren sogar an Gewicht und entwickeln keine Insulinresistenz. Das Modell ist wie alle anderen in unseren Studien vorgestellten Modelle der chronische Leberschädigung diätetisch und entsprechend einfach anwendbar. Der Leberschaden ist drastisch und entsteht in verhältnismäßig kurzer Fütterungszeit von ca. 6 - 8 Wochen. Die CDAHFD bewirkt die meisten hepatischen Effekte der MCD-Diät, wird allerdings mit Komponenten einer Hochfett-Diät (high fat diet = HFD) kombiniert, um den fehlenden Aspekten der humanen NAFLD entgegenzuwirken. Unter der CDAHFD entsteht etwas langsamer als in der MCD-Diät über ca. 8 - 12 Wochen ein ähnlich

drastischer Leberphänotyp. Die anteilige HFD bewirkt, dass die Tiere initial zwar abnehmen (vermutlich durch den Futterwechsel an sich), dann aber ihr Ausgangsgewicht wieder erreichen oder sogar leicht zunehmen. Beide Modelle, MCD und CDAHFD, sind durch ein ausgeprägtes Entzündungsniveau mit einer im Verlauf fortgeschrittenen Leberfibrose charakterisiert, sodass beide Modelle für uns gut geeignet waren, um Rekrutierungsmechanismen von Monozyten und Makrophagen sowie das anti-inflammatorische bzw. anti-fibrotische Potential der pharmakologischen Substanzen (CCR2/CCR5-Inhibitor, GPR84 Antagonist, PPAR Agonisten) zu testen. Die WD soll die typische westliche Ernährung widerspiegeln und besitzt eine hohen Kohlenhydrat- und Fettanteil. Die Mäuse entwickeln ein deutliches Übergewicht und über einen längerfristigen Verlauf von ca. 16 Wochen auch eine ausgeprägte Steatose. Allerdings ist die NASH-Aktivität gemessen an inflammatorischen Prozessen deutlich geringer, und die Tiere entwickeln keine bzw. nur eine geringgradige Leberfibrose. Daher ist dieses Schädigungsmodell gut geeignet, um metabolische Einflussfaktoren auf Makrophagen und auch metabolisch aktive Interventionen wie PPAR-Agonisten zu untersuchen. Es existiert eine große Zahl unterschiedlicher diätetischer und genetischer Tiermodelle, die jeweils jedoch nur Teilaspekte der humanen NAFLD reflektieren können [91]. Neben essentiellen Defiziten wie eine fehlende Ballonierung von Hepatozyten oder typische Veränderungen der Fettsäurezusammensetzung, fehlen meist auch weitere metabolische oder kardio-vaskuläre Komorbiditäten, die in der humanen NAFLD prognoserelevant sind. Im Sinne der guten wissenschaftlichen Praxis und dem 3R Prinzip (replacement, reduction, refinement) sollten zukünftige Projekte mit tierexperimentellen Modellen die Translationsfähigkeit in die humane Erkrankung kritisch hinterfragen und sofern möglich durch sinnvolle Alternativen ersetzt bzw. ergänzt werden.

Auch die von uns eingesetzten dualen CCR2/5-Inhibitoren zeigen einige Limitationen tierexperimenteller Studien auf. CCR2 wird sowohl in der Maus als auch im Menschen exprimiert, entsprechend ist das Mausmodell zur Analyse prinzipiell geeignet [62]. Cenicriviroc (CVC) besitzt in der Maus allerdings eine Plasma-Halbwertszeit von nur ca. 2h, im Menschen hingegen ca. 30-40h [64]. Entsprechend ist die einmal tägliche Dosierung von CVC per Schlundsondierung vermutlich nicht optimal. Außerdem hat CVC in der Maus im Gegensatz zum

Menschen eine höhere Rezeptorbindungsaffinität für CCR2 als CCR5 [64]. Da CVC vor allem die Rekrutierung von einwandernden CCR2⁺ Monozyten und Makrophagen inhibiert, muss dieser Aspekt in der Translation in die humane NAFLD berücksichtigt werden. Ein weiterer Diskussionspunkt ist die duale Inhibition von CCR2 und CCR5. Während CCR2 hauptsächlich an der Rekrutierung von Monozyten entlang der CCR2/CCL2-Achse beteiligt ist, bindet CCR5 Chemokine wie CCL3, CCL4 und CCL5. CCR5 kann als Mediator pro-inflammatorischer Prozesse agieren und steuert unter anderem die hepatische Rekrutierung von Monozyten oder Lymphozyten und ist auch an der Aktivierung und Proliferation von matrixproduzierenden HSCs beteiligt [38, 92-96]. Sowohl in einer unserer früheren als auch in den zweiten hier präsentierten Studien konnten wir zeigen, dass die hepatische Expression von *Ccr2* und *Ccr5* unter CVC-Therapie signifikant herunterreguliert war, wohingegen die Chemokinkonzentrationen von CCL2 und CCL5 im Serum erhöht waren, was den reduzierten Einstrom CCR2⁺ Monozyten sowie die effektive Dosierung von CVC widerspiegelt [59, 97]. Interessanterweise konnten wir weder in der akuten noch in der chronischen Leberschädigung relevante Effekte durch die CVC-Applikation auf hepatische Lymphozytenpopulationen feststellen [59, 97]. Unbeantwortet bleibt die Frage, ob eine höhere Dosierung oder andere Applikationsformen wie eine intravenöse oder intraperitoneale Gabe stärkere, auch CCR5-vermittelte inhibitorische Effekte auf beispielsweise Lymphozytenpopulationen oder sogar HSC-Populationen gehabt hätten. In Zusammenschau aller Experimente gehen wir jedoch davon aus, dass das antifibrotische Potential der eingesetzten CCR2/CCR5-Inhibitoren wie CVC primär auf die pharmakologische Inhibition der hepatischen Rekrutierung und hieraus resultierenden reduzierten Akkumulation pro-inflammatorischer Mo-Mφ am Ort der Leberschädigung zurückzuführen ist.

Eine generelle Limitation präklinischer Studien besteht in den aktuell verfügbaren Methoden und Techniken zur Untersuchung von Immunzellen, sowohl in der Maus als auch in humanen Proben, die teilweise auch hier in dieser Arbeit präsentiert worden sind. Hepatische Makrophagen, insbesondere residente KCs und auch Mo-Mφ sind über das gesamte Lebergewebe hinweg verteilt und vor allem in den Lebersinusoiden lokalisiert. Insbesondere KCs können über Adhäsionsmoleküle fest an den dortigen leber-sinusoidalen Endothelzellen (LSECs) anhaften.

Aufgrund dieser räumlichen Besonderheiten kann sowohl die Anzahl an Makrophagen, aber auch das Polarisationsprofil, durch Anwendung verschiedener Isolationsmethoden beeinflusst werden. Zur Vorbereitung des frischen Lebergewebes für die Durchführung einer Durchflusszytometrie (= fluorescence-activated cell sorting (FACS)) wird in der Regel einer Perfusion mit einer kalten, isotonischen Kochsalzlösung durchgeführt, um die zellulären und plasmatischen Blutbestandteile aus der Leberprobe herauszuwaschen. Abhängig von den angewendeten Protokollen können die im Gegensatz zu anderen Immunzellen wie Lymphozyten eher fragilen Makrophagen während der Isolation geschädigt werden. Außerdem ist man zur Isolation von Immunzellen und Durchführung einer Durchflusszytometrie auf frisches Gewebe angewiesen. Vor allem bei der Verwendung von humanen Proben, beispielsweise aus einer Leberbiopsie, muss immer hinterfragt werden, ob das gewonnene Probenmaterial überhaupt für die gesamte Leber repräsentativ ist oder nur einen Teilausschnitt darstellt. In diesem Zusammenhang sind die aktuellen technischen Weiterentwicklungen im Bereich der „Multi-Omics“, künstlichen Intelligenz oder digitalen Pathologie von großer Bedeutung. Omics-Technologien dienen der Analyse von Genen, Proteinen und Stoffwechselprodukten und sind mittlerweile bis auf Einzelzellebene anwendbar, sodass auch Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Immunzellen unter Einbeziehung phänotypischer oder auch räumlicher Merkmale untersucht werden können. Aktuell sind diese Techniken noch kostenintensiv und nicht überall verfügbar, stellen allerdings neue Möglichkeiten dar, um die aktuellen Limitationen und Probleme zu überwinden und neue grundlegende Erkenntnisse auch im Bereich der Entstehung und Voranschreiten der NAFLD zur NASH und Leberfibrose zu gewinnen.

Basierend auf experimentellen Studien zur Untersuchung von Insulinresistenz, Typ-2-Diabetes mellitus und Übergewicht werden mittelkettige FS eher mit einer verbesserten Glukosetoleranz und anti-steatotischen Effekten in Verbindung gebracht [98-100]. Gleichzeitig belegen Studien pro-inflammatorische GPR84-vermittelte Effekte in der Leber [70, 71]. Wie auch in der ersten Studie und in der Literatur beschrieben, können FS Einfluss auf die Polarisation von myeloiden Zellen nehmen und inflammatorische Prozesse einleiten. Allerdings war es überraschend, dass wir sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in der akuten und

chronischen Leberschädigung eindeutige GPR84-vermittelte chemotaktische Effekte auf myeloide Zellen beobachten konnten. Vergleichbar mit den Auswirkungen der therapeutischen Gabe der CCR2/CCR5-Inhibitoren konnten wir eine Reduktion des Entzündungsniveaus und der Leberfibrose beobachten, wohingegen Steatose-reduzierende Effekte kaum nachweisbar waren. Die Expression von GPR84 war zudem auf myeloiden Immunzellen besonders stark ausgeprägt, und nur geringfügig auf Hepatozyten oder auch HSCs. Der mit der CCR2/CCR5-Inhibition vergleichbare Leber-Phänotyp sowie die dominante Expression auf Makrophagen spricht ebenfalls dafür, dass die therapeutischen Effekte der GPR84-Inhibition auf eine Reduktion der Einwanderung von Mo-M ϕ zurückzuführen sind. Ein gestörter Lipidmetabolismus mit einer erhöhten Lipotoxizität, welche zu einem erhöhten Entzündungsniveau führt, ist ein häufiges und charakteristisches Merkmal der humanen NAFLD. Generell erscheint es daher sehr naheliegend und attraktiv FS (insbesondere freie, ungesättigte und langkettige FS werden mit negativen Effekten im Rahmen der NAFLD in Zusammenhang gebracht) als medikamentösen Ansatzpunkt in der Behandlung der NAFLD zu wählen und möglicherweise stellen GPR84 Inhibitoren zukünftig eine mögliche Alternative in der individualisierten NAFLD Therapie dar.

In unserer ersten Studie konnten wir zeigen, dass Monozyten und von Monozyten abgeleitete Zellpopulationen wie Mo-M ϕ in der experimentellen NASH ein charakteristisches, inflammatorischen Gen-Expressionsprofil aufweisen. *S100A8* und *S100A9*, die den inflammatorischen Mediator Calprotectin (DAMP) exprimieren, waren die am stärksten regulierten Gene. Calprotectin ist TLR4/NF κ B-vermittelt an der Inflammation aktiviert, kann aber auch als FS-Rezeptor fungieren und ist möglicherweise an der Aufnahme ungesättigter FS in Neutrophile beteiligt [57, 58]. Die funktionelle Bedeutung von *S100A8* ist vielfältig. *S100A8* ist an der Rekrutierung von Monozyten ins Fettgewebe beteiligt und unterstützt so entzündliche Reaktionen im Fettgewebe [101]. Andererseits ist *S100A8* auch an anti-inflammatorischen Prozessen beteiligt – in Lungen-Epithelzellen und auch Makrophagen kann *S100A8* die Expression von IL-10 induzieren [102, 103]. Die von uns beobachtete Herunterregulation von *S100A8* und *S100A9* hängt möglicherweise mit den ungesättigten FS der Experimentaldiät

(WD) zusammen, da ungesättigte FS die Expression von *S100A8* und *S100A9* induzieren können [104]. Das Herunterregulieren dieser und auch anderer Gene (*SLPI*, *CXCL1*, *CXCL2* und *CXCL3*) könnte daher Ausdruck einer kompensatorischen, negativen Rückkopplung sein, um überschießende Entzündungsreaktionen zu bremsen. Diese Hypothese kann auch durch die Ergebnisse der akut-auf-chronischen Leberschädigung (NASH-Induktion durch WD-Fütterung, dann akute Schädigung durch APAP) gestützt werden. Hier konnten wir beobachten, dass die chronische diätetische Entzündungsreaktion eine „überschießende“ inflammatorische Reaktion nach akuter Schädigung durch APAP limitiert. Übertragen auf die humane NAFLD könnte man spekulieren, dass diese oder ähnliche Adaptionen des angeborenen Immunsystems exzessive Entzündungsreaktionen und so auch den Progress der NAFLD begrenzen könnten. Andererseits wurden aber auch Gene wie *RETNLG* verstärkt exprimiert, die eher pro-inflammatorische Prozesse unterstützen, was die Komplexität der Makrophagenpolarisation und Konsequenzen für die Funktionalität unterstreicht [105]. Da die beiden am stärksten regulierten Gene *S100A8* und *S100A9* in verschiedenen myeloiden Zellpopulationen, auch in den residenten KC, einheitlich im NASH-Modell herunterreguliert waren, könnte dies dafür sprechen, dass die Leber in der Homöostase zirkulierendes Calprotectin produziert bzw. freisetzt. Außerdem könnte Calprotectin eine Rolle in der Entstehung bzw. Progress der NAFLD spielen. Gleichzeitig betonen unsere Daten, dass Immunzellen wie Makrophagen, die zahlreichen metabolischen Stimuli wie FS über unsere Ernährung ausgesetzt sind, eine zentrale Rolle in der NAFLD und auch im metabolischen Syndrom einnehmen. In unserer Studie haben wir uns auf hepatische Makrophagen und die Konsequenzen für die NASH und Leberfibrose fokussiert. Da metabolische Stimuli eine genetische Prägung myeloider Vorläuferzellen bereits im Knochenmark verursachen können, ist es wahrscheinlich, dass ähnliche phänotypische und funktionelle Veränderungen myeloider Zellen auch in anderen metabolisch aktiven Geweben wie beispielsweise Fettgewebe zu beobachten sind.

Weiterhin belegen unsere Daten die hohe funktionelle Plastizität von Makrophagen im Rahmen der chronischen Leberschädigung. Zahlreiche Studien zeigen, dass ein zentraler Mechanismus der NAFLD-Progression in der Akkumulation von pro-

inflammatorischen Makrophagen besteht. Zellulärer Stress führt zum Zelltod von Hepatozyten und Freisetzung von Alarminen wie DAMPs oder DNA, was wiederum zu einer Aktivierung von Immunzellen wie residenten Makrophagen (KCs) führt. Diese sezernieren im aktivierten Zustand vermehrt Zytokine und Chemokine, die eine Rekrutierung weiterer Immunzellen wie Neutrophile, Monozyten bzw. Mo-M ϕ oder auch Lymphozyten veranlassen. Im Laufe der Leberschädigung können Makrophagen sowohl in pro- als auch anti-inflammatorischen Funktionen erfüllen, wobei die frühere, dogmatische Vorstellung von pro-inflammatorischen M1-Makrophagen und anti-inflammatorischen M2-Makrophagen die Plastizität dieser Immunzellpopulation nicht ausreichend reflektiert. Mo-M ϕ differenzieren abhängig von lokalen Signalen im Verlauf der Leberschädigung und exprimieren beispielsweise auch anti-inflammatorische Zytokine wie IL-10 und IL-13 oder auch Matrix-Metalloproteasen wie MMP-12 und MMP-13, die in der Resolution inflammatorischer Prozesse und Fibroseregression von Bedeutung sind [17, 34, 41].

Im Rahmen der NAFLD Entstehung und Progress zur NASH und Leberfibrose stellen Monozyten und Makrophagen ein attraktives therapeutisches Ziel dar, wobei neben der Spezifität auch Parameter wie ein optimales Timing und die Dosierung pharmakologischer Substanzen berücksichtigt werden sollten. Im Rahmen der APAP-induzierten akuten Leberschädigung im Mausmodell infiltrieren Neutrophile die Leber beispielsweise insbesondere in den ersten 6h, Monozyten folgen zeitlich etwas verzögert zwischen 6 und 12h nach APAP-Injektion [36, 61]. Der maximale Anstieg an Leukozyten wird sogar erst nach 18h erreicht, was verdeutlicht, dass die Relevanz immunologischer Reaktionen im Zeitverlauf sogar noch zunehmen. Wie in mehreren unserer Studien gezeigt, führt die pharmakologische Inhibition der Rekrutierung von inflammatorischen Makrophagen zu einer verbesserten NASH und Leberfibrose [59, 67, 82]. Da Makrophagen aber auch das Potential der Reduktion inflammatorischer Prozesse und sogar Fibrosereduktion besitzen, besteht die Gefahr, dass die pharmakologische Reduktion von einströmenden Makrophagen auch gegensätzliche Effekte bewirken könnte, die die Wundheilung behindern könnten. In unserer zweiten hier aufgeführten Studie haben wir daher auch die Regressionsphase nach chronischer Leberschädigung (MCD) untersucht und

konnten zeigen, dass die Reparaturprozesse ohne eine weitere Therapie und auch durch die fortgeführte pharmakologische Rekrutierungsblockade von Makrophagen mittels CCR2/CCR5-Inhibition nicht beeinträchtigt waren. Zudem war der Anteil an anti-inflammatorisch polarisierten Makrophagen (Ly-6C⁻) trotz der pharmakologischen Behandlung unverändert, während die Zahl pro-inflammatorisch polarisierter Makrophagen (Ly-6C⁺) moderat reduziert war. Zukünftig sollte dieses potentielle Risiko in der pharmakologischen Adressierung von Immunzellen jedoch weiterhin kritisch berücksichtigt werden. Gegebenenfalls müssen auch Variablen wie ein optimales Zeitfenster zur Therapie und eine Anpassung der Dosierung an den individuellen Patient*innen bezogen auf das Erkrankungsstadium evaluiert werden.

Umfangreiche Studien konnten in den letzten Jahren zahlreiche Pathomechanismen in der Entstehung und Progress der NAFLD charakterisieren und haben potentielle pharmakologische Ansatzpunkte identifiziert [10, 50, 106]. Trotz dieser Entwicklungen haben klinische Studien gezeigt, dass vielversprechende Medikamente als Monotherapie in Personen mit NAFLD, NASH und Leberfibrose patientenrelevante Endpunkte wie eine Reduktion der NASH-Aktivität und Leberfibrose als prognoserelevante Risikofaktoren nicht erreicht haben [11]. Unsere Daten aus Mausmodellen der NAFLD sind hinweisend, dass eine aussichtsreiche Kombination aus Substanzen besteht, die einerseits den gestörten Metabolismus (Dyslipidämie, Überladung von Hepatozyten mit FS, Insulinresistenz etc.) modulieren, was vermutlich besonders in der frühen Phase der Entstehung der NAFLD wichtig ist, und andererseits ein anti-inflammatorisches bzw. anti-fibrotisches Potential besitzen, um vor allem langanhaltende, chronische Entzündungszustände zu durchbrechen [3, 12, 107]. Dies kann durch Kombination verschiedener Medikamente (z.B. wie in unserer Studie FGF21-Analoga mit CCR2/CCR5-Inhibitoren [82]) erreicht werden oder aber auch durch eine Substanz, die gleichzeitig mehrere Pathomechanismen moduliert (z.B. der pan-PPAR-Agonist Lanifibranor [2, 81]). Die „ideale“ Kombination pharmakologischer Substanzen zur individuellen Behandlung der NAFLD ist nicht bekannt und weitere präklinische und klinische Studien sind dringend notwendig. Gleichzeitig werden technische Fortschritte auf dem Gebiet der Multi-Omics, künstlichen Intelligenz und digitalen Pathologie neue Erkenntnisse generieren und sowohl translationale als

auch klinische Studien mitbestimmen. In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit wurden gepaarte Leberbiopsien einer Sub-Kohorte von NAFLD Patienten mit nachgewiesener F2- und F3-Leberfibrose im Rahmen einer klinischen Studie (FLIGHT-FXR Studie (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02855164)) mit Hilfe einer neuen Mikroskopie-Technik (Second harmonic generation/two-photon excitation fluorescence (SHG/TPEF)) sowie künstlicher Intelligenz re-analysiert [108]. Diese Herangehensweise konnte im Gegensatz zur herkömmlichen histopathologischen Untersuchung antifibrotische Effekte der in der Studie untersuchten Substanz (Tropifexor, ein FXR-Agonist) in den perisinusoidalen Räumen nachweisen. Dieser fibrose-reduzierende Effekt war vor allem in den fortgeschrittenen Stadien der Leberfibrose (F3) nachweisbar und auf eine dynamische Veränderung der Kollagenfasern während der Fibroseregression zurückzuführen. Die klinische Relevanz solcher Ergebnisse muss dennoch in Frage gestellt werden, da es bislang noch keine Untersuchungen bezüglich dem Auftreten von Komplikationen oder der Langzeitprognose im Zusammenhang mit solch subtilen histopathologischen Veränderungen gibt. Zukünftig sollten diese und weitere technische Neuerungen in bestehende Abläufe präklinischer und klinischer Studien integriert, gemeinsam angewendet und verglichen werden.

Die Prävalenz der NAFLD beträgt weltweit bereits 25% der erwachsenen Bevölkerung, Projektionen erwarten einen weiteren Anstieg [6]. Daher ist ein Screening der Allgemeinbevölkerung nicht praktikabel, sondern sollte auf Risikopatient*innen beschränkt werden [1, 7, 109]. Zukünftige Projekte sollten daher auch die Risikostratifizierung von Patient*innen bezogen auf Komorbiditäten und auch Schweregrad der Erkrankung, also NASH-Aktivität und Stadium der Leberfibrose, berücksichtigen. Vor dem Hintergrund der Komplexität und heterogenen Ausprägung der NAFLD (z.B. genetische Risikoprofile, Umweltfaktoren, metabolische Dysregulation, Inflammation, Veränderungen im Darm-Mikrobiom bzw. Dysbiose) werden zukünftig auch individuelle Behandlungsstrategien ein Schlüssel zur effektiven Behandlung darstellen.

4. Zusammenfassung

Die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD) ist die häufigste chronische Lebererkrankung und betrifft weltweit ca. 25% der erwachsenen Bevölkerung. Entstehung und Progress sind multifaktoriell bedingt, es besteht eine enge Verknüpfung mit metabolischen Risikofaktoren. Die nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH) stellt die progressive Form der NAFLD dar und ist durch chronische Entzündungsprozesse charakterisiert, die letztlich zum bindegewebigen Umbau, also zur Leberfibrose und Leberzirrhose, führen können. Obwohl zahlreiche Pathomechanismen und potentielle pharmakologische Ansatzpunkte in den letzten Jahren identifiziert werden konnten, gibt es keine zugelassene medikamentöse Therapie der NAFLD, über Lebensstilmodifikationen wie Gewichtsreduktion oder gesteigerte körperliche Aktivität hinaus. Ziel dieser Arbeit ist es, grundlegende Mechanismen in der Entstehung der NAFLD und dem Progress zur NASH und Leberfibrose besser zu charakterisieren. Da die NAFLD nicht als isolierte Lebererkrankung verstanden werden darf, liegt der Fokus auf der Untersuchung der komplexen Interaktion zwischen den beteiligten Organsystemen. Wir konnten zeigen, dass inflammatorische Prozesse eng mit dem gestörten Metabolismus verbunden sind und Einfluss auf Immunzellebene haben. Metabolische und Umweltfaktoren können direkt die Polarisation und damit die Funktionalität von Monozyten und Makrophagen modulieren. Diese Prozesse finden nicht nur in der Leber statt, sondern als anhaltende Prägung bereits auf myeloiden Vorläuferzellen im Knochenmark. Zudem haben wir sowohl den Einfluss der pharmakologischen Inhibition (CCR2/CCR5-Antagonist, GPR84-Antagonist) der Makrophagen-Rekrutierung in die Leber auf den gestörten Metabolismus untersucht, als auch die Effekte metabolischer Interventionen (PPAR-Agonisten, FGF21-Analogen) auf die Polarisation und Funktionalität von Makrophagen in NASH und Leberfibrose getestet. Unsere Ergebnisse unterstützen zudem das Konzept, das als rationale Strategie zur Behandlung der NAFLD verschiedene Signalwege gleichzeitig moduliert werden sollten, um die progressiven Formen der NASH und Leberfibrose effektiv und konsequent behandeln zu können.

5. Literaturverzeichnis

1. Tacke F, Canbay A, Bantel H et al. Updated S2k Clinical Practice Guideline on Non-alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) issued by the German Society of Gastroenterology, Digestive and Metabolic Diseases (DGVS) - April 2022 - AWMF Registration No.: 021-025. *Z Gastroenterol* 2022; 60: e733-e801. doi:10.1055/a-1880-2388
2. Lefere S, Puengel T, Hundertmark J et al. Differential effects of selective- and pan-PPAR agonists on experimental steatohepatitis and hepatic macrophages(). *J Hepatol* 2020; 73: 757-770. doi:10.1016/j.jhep.2020.04.025
3. Anstee QM, Reeves HL, Kotsiliti E et al. From NASH to HCC: current concepts and future challenges. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2019; 16: 411-428. doi:10.1038/s41575-019-0145-7
4. Hotamisligil GS. Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. *Nature* 2017; 542: 177-185. doi:10.1038/nature21363
5. Younossi ZM, Golabi P, de Avila L et al. The global epidemiology of NAFLD and NASH in patients with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *J Hepatol* 2019; 71: 793-801. doi:10.1016/j.jhep.2019.06.021
6. Younossi Z, Tacke F, Arrese M et al. Global Perspectives on Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology* 2019; 69: 2672-2682. doi:10.1002/hep.30251
7. Dulai PS, Singh S, Patel J et al. Increased risk of mortality by fibrosis stage in nonalcoholic fatty liver disease: Systematic review and meta-analysis. *Hepatology* 2017; 65: 1557-1565. doi:10.1002/hep.29085
8. Vilar-Gomez E, Calzadilla-Bertot L, Wai-Sun Wong V et al. Fibrosis Severity as a Determinant of Cause-Specific Mortality in Patients With Advanced Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Multi-National Cohort Study. *Gastroenterology* 2018; 155: 443-457 e417. doi:10.1053/j.gastro.2018.04.034
9. Reimer KC, Wree A, Roderburg C et al. New drugs for NAFLD: lessons from basic models to the clinic. *Hepatol Int* 2020; 14: 8-23. doi:10.1007/s12072-019-10001-4
10. Lambrecht J, van Grunsven LA, Tacke F. Current and emerging pharmacotherapeutic interventions for the treatment of liver fibrosis. *Expert Opin Pharmacother* 2020; 21: 1637-1650. doi:10.1080/14656566.2020.1774553
11. Rinella ME, Tacke F, Sanyal AJ et al. Report on the AASLD/EASL joint workshop on clinical trial endpoints in NAFLD. *J Hepatol* 2019; 71: 823-833. doi:10.1016/j.jhep.2019.04.019
12. Trauner M, Fuchs CD. Novel therapeutic targets for cholestatic and fatty liver disease. *Gut* 2022; 71: 194-209. doi:10.1136/gutjnl-2021-324305
13. Vuppalanchi R, Noureddin M, Alkhoury N et al. Therapeutic pipeline in nonalcoholic steatohepatitis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2021; 18: 373-392. doi:10.1038/s41575-020-00408-y
14. Newsome PN, Buchholtz K, Cusi K et al. A Placebo-Controlled Trial of Subcutaneous Semaglutide in Nonalcoholic Steatohepatitis. *N Engl J Med* 2021; 384: 1113-1124. doi:10.1056/NEJMoa2028395
15. Patel Chavez C, Cusi K, Kadiyala S. The Emerging Role of Glucagon-like Peptide-1 Receptor Agonists for the Management of NAFLD. *J Clin Endocrinol Metab* 2022; 107: 29-38. doi:10.1210/clinem/dgab578
16. Lopez BG, Tsai MS, Baratta JL et al. Characterization of Kupffer cells in livers of developing mice. *Comp Hepatol* 2011; 10: 2. doi:10.1186/1476-5926-10-2
17. Heymann F, Tacke F. Immunology in the liver--from homeostasis to disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2016; 13: 88-110. doi:10.1038/nrgastro.2015.200
18. Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism* 2016; 65: 1038-1048. doi:10.1016/j.metabol.2015.12.012
19. Marra F, Svegliati-Baroni G. Lipotoxicity and the gut-liver axis in NASH pathogenesis. *J Hepatol* 2018; 68: 280-295. doi:10.1016/j.jhep.2017.11.014

20. Powell EE, Wong VW, Rinella M. Non-alcoholic fatty liver disease. *Lancet* 2021; 397: 2212-2224. doi:10.1016/S0140-6736(20)32511-3
21. Krenkel O, Tacke F. Macrophages in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Role Model of Pathogenic Immunometabolism. *Semin Liver Dis* 2017; 37: 189-197. doi:10.1055/s-0037-1604480
22. Stienstra R, Netea-Maier RT, Riksen NP et al. Specific and Complex Reprogramming of Cellular Metabolism in Myeloid Cells during Innate Immune Responses. *Cell Metab* 2017; 26: 142-156. doi:10.1016/j.cmet.2017.06.001
23. Lefere S, Tacke F. Macrophages in obesity and non-alcoholic fatty liver disease: Crosstalk with metabolism. *JHEP Rep* 2019; 1: 30-43. doi:10.1016/j.jhepr.2019.02.004
24. Baeck C, Wehr A, Karlmark KR et al. Pharmacological inhibition of the chemokine CCL2 (MCP-1) diminishes liver macrophage infiltration and steatohepatitis in chronic hepatic injury. *Gut* 2012; 61: 416-426. doi:10.1136/gutjnl-2011-300304
25. Mulder P, van den Hoek AM, Kleemann R. The CCR2 Inhibitor Propagermanium Attenuates Diet-Induced Insulin Resistance, Adipose Tissue Inflammation and Non-Alcoholic Steatohepatitis. *PLoS One* 2017; 12: e0169740. doi:10.1371/journal.pone.0169740
26. Baeck C, Wei X, Bartneck M et al. Pharmacological inhibition of the chemokine C-C motif chemokine ligand 2 (monocyte chemoattractant protein 1) accelerates liver fibrosis regression by suppressing Ly-6C(+) macrophage infiltration in mice. *Hepatology* 2014; 59: 1060-1072. doi:10.1002/hep.26783
27. Tomita K, Freeman BL, Bronk SF et al. CXCL10-Mediates Macrophage, but not Other Innate Immune Cells-Associated Inflammation in Murine Nonalcoholic Steatohepatitis. *Sci Rep* 2016; 6: 28786. doi:10.1038/srep28786
28. Zhang X, Han J, Man K et al. CXC chemokine receptor 3 promotes steatohepatitis in mice through mediating inflammatory cytokines, macrophages and autophagy. *J Hepatol* 2016; 64: 160-170. doi:10.1016/j.jhep.2015.09.005
29. Tacke F. Targeting hepatic macrophages to treat liver diseases. *J Hepatol* 2017; 66: 1300-1312. doi:10.1016/j.jhep.2017.02.026
30. Wells RG, Schwabe RF. Origin and function of myofibroblasts in the liver. *Semin Liver Dis* 2015; 35: e1. doi:10.1055/s-0035-1554915
31. Krenkel O, Hundertmark J, Ritz TP et al. Single Cell RNA Sequencing Identifies Subsets of Hepatic Stellate Cells and Myofibroblasts in Liver Fibrosis. *Cells* 2019; 8. doi:10.3390/cells8050503
32. Xue J, Schmidt SV, Sander J et al. Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. *Immunity* 2014; 40: 274-288. doi:10.1016/j.immuni.2014.01.006
33. N AG, Quintana JA, Garcia-Silva S et al. Phagocytosis imprints heterogeneity in tissue-resident macrophages. *J Exp Med* 2017; 214: 1281-1296. doi:10.1084/jem.20161375
34. Ramachandran P, Pellicoro A, Vernon MA et al. Differential Ly-6C expression identifies the recruited macrophage phenotype, which orchestrates the regression of murine liver fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: E3186-3195. doi:10.1073/pnas.1119964109
35. Graubardt N, Vugman M, Mouhadeb O et al. Ly6C(hi) Monocytes and Their Macrophage Descendants Regulate Neutrophil Function and Clearance in Acetaminophen-Induced Liver Injury. *Front Immunol* 2017; 8: 626. doi:10.3389/fimmu.2017.00626
36. Zigmund E, Samia-Grinberg S, Pasmanik-Chor M et al. Infiltrating monocyte-derived macrophages and resident kupffer cells display different ontogeny and functions in acute liver injury. *J Immunol* 2014; 193: 344-353. doi:10.4049/jimmunol.1400574
37. Scott CL, Zheng F, De Baetselier P et al. Bone marrow-derived monocytes give rise to self-renewing and fully differentiated Kupffer cells. *Nat Commun* 2016; 7: 10321. doi:10.1038/ncomms10321
38. Marra F, Tacke F. Roles for chemokines in liver disease. *Gastroenterology* 2014; 147: 577-594 e571. doi:10.1053/j.gastro.2014.06.043

39. Csak T, Pillai A, Ganz M et al. Both bone marrow-derived and non-bone marrow-derived cells contribute to AIM2 and NLRP3 inflammasome activation in a MyD88-dependent manner in dietary steatohepatitis. *Liver Int* 2014; 34: 1402-1413. doi:10.1111/liv.12537
40. Ma PF, Gao CC, Yi J et al. Cytotherapy with M1-polarized macrophages ameliorates liver fibrosis by modulating immune microenvironment in mice. *J Hepatol* 2017; 67: 770-779. doi:10.1016/j.jhep.2017.05.022
41. Krenkel O, Tacke F. Liver macrophages in tissue homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol* 2017; 17: 306-321. doi:10.1038/nri.2017.11
42. Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology* 2010; 52: 1836-1846. doi:10.1002/hep.24001
43. Miura K, Yang L, van Rooijen N et al. Hepatic recruitment of macrophages promotes nonalcoholic steatohepatitis through CCR2. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012; 302: G1310-1321. doi:10.1152/ajpgi.00365.2011
44. Gadd VL, Skoien R, Powell EE et al. The portal inflammatory infiltrate and ductular reaction in human nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2014; 59: 1393-1405. doi:10.1002/hep.26937
45. Kazankov K, Barrera F, Moller HJ et al. The macrophage activation marker sCD163 is associated with morphological disease stages in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 2016; 36: 1549-1557. doi:10.1111/liv.13150
46. Navarro LA, Wree A, Povero D et al. Arginase 2 deficiency results in spontaneous steatohepatitis: a novel link between innate immune activation and hepatic de novo lipogenesis. *J Hepatol* 2015; 62: 412-420. doi:10.1016/j.jhep.2014.09.015
47. Miura K, Yang L, van Rooijen N et al. Toll-like receptor 2 and palmitic acid cooperatively contribute to the development of nonalcoholic steatohepatitis through inflammasome activation in mice. *Hepatology* 2013; 57: 577-589. doi:10.1002/hep.26081
48. Negrin KA, Roth Flach RJ, DiStefano MT et al. IL-1 signaling in obesity-induced hepatic lipogenesis and steatosis. *PLoS One* 2014; 9: e107265. doi:10.1371/journal.pone.0107265
49. Krenkel O, Hundertmark J, Abdallah AT et al. Myeloid cells in liver and bone marrow acquire a functionally distinct inflammatory phenotype during obesity-related steatohepatitis. *Gut* 2020; 69: 551-563. doi:10.1136/gutjnl-2019-318382
50. Friedman SL, Neuschwander-Tetri BA, Rinella M et al. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat Med* 2018; 24: 908-922. doi:10.1038/s41591-018-0104-9
51. Chakarov S, Lim HY, Tan L et al. Two distinct interstitial macrophage populations coexist across tissues in specific subtissular niches. *Science* 2019; 363. doi:10.1126/science.aau0964
52. Hubler MJ, Kennedy AJ. Role of lipids in the metabolism and activation of immune cells. *J Nutr Biochem* 2016; 34: 1-7. doi:10.1016/j.jnutbio.2015.11.002
53. Wang X, Wang Y, Antony V et al. Metabolism-Associated Molecular Patterns (MAMPs). *Trends Endocrinol Metab* 2020; 31: 712-724. doi:10.1016/j.tem.2020.07.001
54. Montserrat-de la Paz S, Rodriguez D, Cardelo MP et al. The effects of exogenous fatty acids and niacin on human monocyte-macrophage plasticity. *Mol Nutr Food Res* 2017; 61. doi:10.1002/mnfr.201600824
55. Liu A, Chen M, Kumar R et al. Bone marrow lympho-myeloid malfunction in obesity requires precursor cell-autonomous TLR4. *Nat Commun* 2018; 9: 708. doi:10.1038/s41467-018-03145-8
56. Christ A, Gunther P, Lauterbach MAR et al. Western Diet Triggers NLRP3-Dependent Innate Immune Reprogramming. *Cell* 2018; 172: 162-175 e114. doi:10.1016/j.cell.2017.12.013
57. Sunahori K, Yamamura M, Yamana J et al. The S100A8/A9 heterodimer amplifies proinflammatory cytokine production by macrophages via activation of nuclear factor kappa B and p38 mitogen-activated protein kinase in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2006; 8: R69. doi:10.1186/ar1939

58. Simard JC, Cesaro A, Chapeton-Montes J et al. S100A8 and S100A9 induce cytokine expression and regulate the NLRP3 inflammasome via ROS-dependent activation of NF-kappaB(1.). *PLoS One* 2013; 8: e72138. doi:10.1371/journal.pone.0072138
59. Krenkel O, Puengel T, Govaere O et al. Therapeutic inhibition of inflammatory monocyte recruitment reduces steatohepatitis and liver fibrosis. *Hepatology* 2018; 67: 1270-1283. doi:10.1002/hep.29544
60. Wiering L, Tacke F. Treating inflammation to combat non-alcoholic fatty liver disease. *J Endocrinol* 2022. doi:10.1530/JOE-22-0194. doi:10.1530/JOE-22-0194
61. Mossanen JC, Krenkel O, Ergen C et al. Chemokine (C-C motif) receptor 2-positive monocytes aggravate the early phase of acetaminophen-induced acute liver injury. *Hepatology* 2016; 64: 1667-1682. doi:10.1002/hep.28682
62. Zimmermann HW, Seidler S, Nattermann J et al. Functional contribution of elevated circulating and hepatic non-classical CD14CD16 monocytes to inflammation and human liver fibrosis. *PLoS One* 2010; 5: e11049. doi:10.1371/journal.pone.0011049
63. Weiskirchen R, Tacke F. Liver Fibrosis: From Pathogenesis to Novel Therapies. *Dig Dis* 2016; 34: 410-422. doi:10.1159/000444556
64. Lefebvre E, Moyle G, Reshef R et al. Antifibrotic Effects of the Dual CCR2/CCR5 Antagonist Cenicriviroc in Animal Models of Liver and Kidney Fibrosis. *PLoS One* 2016; 11: e0158156. doi:10.1371/journal.pone.0158156
65. Friedman S, Sanyal A, Goodman Z et al. Efficacy and safety study of cenicriviroc for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis in adult subjects with liver fibrosis: CENTAUR Phase 2b study design. *Contemp Clin Trials* 2016; 47: 356-365. doi:10.1016/j.cct.2016.02.012
66. Friedman SL, Ratziu V, Harrison SA et al. A randomized, placebo-controlled trial of cenicriviroc for treatment of nonalcoholic steatohepatitis with fibrosis. *Hepatology* 2018; 67: 1754-1767. doi:10.1002/hep.29477
67. Puengel T, De Vos S, Hundertmark J et al. The Medium-Chain Fatty Acid Receptor GPR84 Mediates Myeloid Cell Infiltration Promoting Steatohepatitis and Fibrosis. *J Clin Med* 2020; 9. doi:10.3390/jcm9041140
68. Wang B, Li L, Fu J et al. Effects of Long-Chain and Medium-Chain Fatty Acids on Apoptosis and Oxidative Stress in Human Liver Cells with Steatosis. *J Food Sci* 2016; 81: H794-800. doi:10.1111/1750-3841.13210
69. Recio C, Lucy D, Purvis GSD et al. Activation of the Immune-Metabolic Receptor GPR84 Enhances Inflammation and Phagocytosis in Macrophages. *Front Immunol* 2018; 9: 1419. doi:10.3389/fimmu.2018.01419
70. Du Toit E, Browne L, Irving-Rodgers H et al. Effect of GPR84 deletion on obesity and diabetes development in mice fed long chain or medium chain fatty acid rich diets. *Eur J Nutr* 2018; 57: 1737-1746. doi:10.1007/s00394-017-1456-5
71. Gagnon L, Leduc M, Thibodeau JF et al. A Newly Discovered Antifibrotic Pathway Regulated by Two Fatty Acid Receptors: GPR40 and GPR84. *Am J Pathol* 2018; 188: 1132-1148. doi:10.1016/j.ajpath.2018.01.009
72. Francque S, Verrijken A, Caron S et al. PPARalpha gene expression correlates with severity and histological treatment response in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 2015; 63: 164-173. doi:10.1016/j.jhep.2015.02.019
73. Ip E, Farrell G, Hall P et al. Administration of the potent PPARalpha agonist, Wy-14,643, reverses nutritional fibrosis and steatohepatitis in mice. *Hepatology* 2004; 39: 1286-1296. doi:10.1002/hep.20170
74. Moran-Salvador E, Titos E, Rius B et al. Cell-specific PPARgamma deficiency establishes anti-inflammatory and anti-fibrogenic properties for this nuclear receptor in non-parenchymal liver cells. *J Hepatol* 2013; 59: 1045-1053. doi:10.1016/j.jhep.2013.06.023
75. Fuchs CD, Traussnigg SA, Trauner M. Nuclear Receptor Modulation for the Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Semin Liver Dis* 2016; 36: 69-86. doi:10.1055/s-0036-1571296

76. Kang K, Reilly SM, Karabacak V et al. Adipocyte-derived Th2 cytokines and myeloid PPARdelta regulate macrophage polarization and insulin sensitivity. *Cell Metab* 2008; 7: 485-495. doi:10.1016/j.cmet.2008.04.002
77. Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Goforth MH et al. Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature* 2007; 447: 1116-1120. doi:10.1038/nature05894
78. Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Red Eagle A et al. Alternative M2 activation of Kupffer cells by PPARdelta ameliorates obesity-induced insulin resistance. *Cell Metab* 2008; 7: 496-507. doi:10.1016/j.cmet.2008.04.003
79. Ratziu V, Harrison SA, Francque S et al. Elafibranor, an Agonist of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-alpha and -delta, Induces Resolution of Nonalcoholic Steatohepatitis Without Fibrosis Worsening. *Gastroenterology* 2016; 150: 1147-1159 e1145. doi:10.1053/j.gastro.2016.01.038
80. Wettstein G, Luccarini JM, Poekes L et al. The new-generation pan-peroxisome proliferator-activated receptor agonist IVA337 protects the liver from metabolic disorders and fibrosis. *Hepatology* 2017; 65: 524-537. doi:10.1002/hep4.1057
81. Francque SM, Bedossa P, Ratziu V et al. A Randomized, Controlled Trial of the Pan-PPAR Agonist Lanifibranor in NASH. *N Engl J Med* 2021; 385: 1547-1558. doi:10.1056/NEJMoa2036205
82. Puengel T, Lefere S, Hundertmark J et al. Combined Therapy with a CCR2/CCR5 Antagonist and FGF21 Analogue Synergizes in Ameliorating Steatohepatitis and Fibrosis. *Int J Mol Sci* 2022; 23. doi:10.3390/ijms23126696
83. Ritchie M, Hanouneh IA, Nouredin M et al. Fibroblast growth factor (FGF)-21 based therapies: A magic bullet for nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD)? *Expert Opin Investig Drugs* 2020; 29: 197-204. doi:10.1080/13543784.2020.1718104
84. Markan KR, Naber MC, Ameka MK et al. Circulating FGF21 is liver derived and enhances glucose uptake during refeeding and overfeeding. *Diabetes* 2014; 63: 4057-4063. doi:10.2337/db14-0595
85. Kharitonov A, Shiyanova TL, Koester A et al. FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J Clin Invest* 2005; 115: 1627-1635. doi:10.1172/JCI23606
86. Samms RJ, Murphy M, Fowler MJ et al. Dual effects of fibroblast growth factor 21 on hepatic energy metabolism. *J Endocrinol* 2015; 227: 37-47. doi:10.1530/JOE-15-0334
87. Coskun T, Bina HA, Schneider MA et al. Fibroblast growth factor 21 corrects obesity in mice. *Endocrinology* 2008; 149: 6018-6027. doi:10.1210/en.2008-0816
88. Sanyal A, Charles ED, Neuschwander-Tetri BA et al. Pegbelfermin (BMS-986036), a PEGylated fibroblast growth factor 21 analogue, in patients with non-alcoholic steatohepatitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2a trial. *Lancet* 2019; 392: 2705-2717. doi:10.1016/S0140-6736(18)31785-9
89. Abdelmalek MF, Charles ED, Sanyal AJ et al. The FALCON program: Two phase 2b randomized, double-blind, placebo-controlled studies to assess the efficacy and safety of pegbelfermin in the treatment of patients with nonalcoholic steatohepatitis and bridging fibrosis or compensated cirrhosis. *Contemp Clin Trials* 2021; 104: 106335. doi:10.1016/j.cct.2021.106335
90. Farrell G, Schattenberg JM, Leclercq I et al. Mouse Models of Nonalcoholic Steatohepatitis: Toward Optimization of Their Relevance to Human Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology* 2019; 69: 2241-2257. doi:10.1002/hep.30333
91. Imajo K, Yoneda M, Kessoku T et al. Rodent models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *Int J Mol Sci* 2013; 14: 21833-21857. doi:10.3390/ijms141121833
92. Choi DY, Ban JO, Kim SC et al. CCR5 knockout mice with C57BL/6 background are resistant to acetaminophen-mediated hepatotoxicity due to decreased macrophages migration into the liver. *Arch Toxicol* 2015; 89: 211-220. doi:10.1007/s00204-014-1253-3

93. Moreno C, Gustot T, Nicaise C et al. CCR5 deficiency exacerbates T-cell-mediated hepatitis in mice. *Hepatology* 2005; 42: 854-862. doi:10.1002/hep.20865
94. Ajuebor MN, Wondimu Z, Hogaboam CM et al. CCR5 deficiency drives enhanced natural killer cell trafficking to and activation within the liver in murine T cell-mediated hepatitis. *Am J Pathol* 2007; 170: 1975-1988. doi:10.2353/ajpath.2007.060690
95. Berres ML, Koenen RR, Rueland A et al. Antagonism of the chemokine Ccl5 ameliorates experimental liver fibrosis in mice. *J Clin Invest* 2010; 120: 4129-4140. doi:10.1172/JCI41732
96. Seki E, De Minicis S, Gwak GY et al. CCR1 and CCR5 promote hepatic fibrosis in mice. *J Clin Invest* 2009; 119: 1858-1870. doi:10.1172/jci37444
97. Puengel T, Krenkel O, Kohlhepp M et al. Differential impact of the dual CCR2/CCR5 inhibitor cenicriviroc on migration of monocyte and lymphocyte subsets in acute liver injury. *PLoS One* 2017; 12: e0184694. doi:10.1371/journal.pone.0184694
98. Shinohara H, Ogawa A, Kasai M et al. Effect of randomly interesterified triacylglycerols containing medium- and long-chain fatty acids on energy expenditure and hepatic fatty acid metabolism in rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 2005; 69: 1811-1818. doi:10.1271/bbb.69.1811
99. Montgomery MK, Turner N. Mitochondrial dysfunction and insulin resistance: an update. *Endocr Connect* 2015; 4: R1-R15. doi:10.1530/EC-14-0092
100. St-Onge MP, Ross R, Parsons WD et al. Medium-chain triglycerides increase energy expenditure and decrease adiposity in overweight men. *Obes Res* 2003; 11: 395-402. doi:10.1038/oby.2003.53
101. Sekimoto R, Fukuda S, Maeda N et al. Visualized macrophage dynamics and significance of S100A8 in obese fat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112: E2058-2066. doi:10.1073/pnas.1409480112
102. Hiroshima Y, Hsu K, Tedla N et al. S100A8 induces IL-10 and protects against acute lung injury. *J Immunol* 2014; 192: 2800-2811. doi:10.4049/jimmunol.1302556
103. Hsu K, Chung YM, Endoh Y et al. TLR9 ligands induce S100A8 in macrophages via a STAT3-dependent pathway which requires IL-10 and PGE2. *PLoS One* 2014; 9: e103629. doi:10.1371/journal.pone.0103629
104. Shah RD, Xue C, Zhang H et al. Expression of Calgranulin Genes S100A8, S100A9 and S100A12 Is Modulated by n-3 PUFA during Inflammation in Adipose Tissue and Mononuclear Cells. *PLoS One* 2017; 12: e0169614. doi:10.1371/journal.pone.0169614
105. Jamaluddin MS, Weakley SM, Yao Q et al. Resistin: functional roles and therapeutic considerations for cardiovascular disease. *Br J Pharmacol* 2012; 165: 622-632. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01369.x
106. Tacke F, Weiskirchen R. An update on the recent advances in antifibrotic therapy. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2018; 12: 1143-1152. doi:10.1080/17474124.2018.1530110
107. Puengel T, Liu H, Guillot A et al. Nuclear Receptors Linking Metabolism, Inflammation, and Fibrosis in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Int J Mol Sci* 2022; 23. doi:10.3390/ijms23052668
108. Naoumov NV, Brees D, Loeffler J et al. Digital pathology with artificial intelligence analyses provides greater insights into treatment-induced fibrosis regression in NASH. *J Hepatol* 2022; 77: 1399-1409. doi:10.1016/j.jhep.2022.06.018
109. Kanwal F, Shubrook JH, Adams LA et al. Clinical Care Pathway for the Risk Stratification and Management of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 2021; 161: 1657-1669. doi:10.1053/j.gastro.2021.07.049

Danksagung

Ich möchte allen Beteiligten danken, die zum erfolgreichen Abschluss dieser Habilitationsarbeit beigetragen haben.

Zunächst möchte ich mich besonders bei Prof. Dr. Frank Tacke, Direktor der Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie - Charité Universitätsmedizin Berlin, für sein Vertrauen und seine kontinuierliche Unterstützung bedanken. Ich bedanke mich für die hervorragende Betreuung, die eröffneten Möglichkeiten und die gesammelten Erfahrungen bereits während meiner Promotionsarbeit in Aachen und auch während der Durchführung dieses Projekts. Ich freue mich auf die weitere zukünftige Zusammenarbeit.

Ich danke Prof. Dr. Trautwein, Direktor der Klinik für Gastroenterologie, Stoffwechselerkrankungen und Internistische Intensivmedizin, Uniklinik RWTH Aachen. Ich habe meine klinische Ausbildung 2018 in Aachen in seiner Klinik beginnen dürfen und konnte durch seine große Unterstützung meine Forschungsprojekte ungehindert umsetzen.

Außerdem gilt mein Dank allen Kollegen und Freunden, die mich während dieser Arbeit begleitet haben, insbesondere möchte ich mich bei Prof. Dr. Alexander Koch, Dr. Oliver Krenkel, Marlene Kohlhepp, Jana Hundertmark und Sander Lefere bedanken.

Ganz besonders möchte ich meiner Familie danken - meinen Eltern, Irmgard und Johannes Püngel und meinem Bruder, Stephan. Ich danke meiner Frau Céline, sie ist meine größte Unterstützerin, die Basis und der wichtigste Antrieb meiner Arbeit.

Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

16.01.2023

Datum

Unterschrift