

ABSCHLUSSBERICHT

1 Allgemeine Angaben

DFG-Geschäftszeichen: HE 7032/1-1 und HE 7032/1-3

Projektnummer: AOBJ 606423 und AOBJ 662763

Titel des Projekts:

Teil 1: „Bedeutung der induzierbaren mPGES1 für die Entwicklung einer Prostaglandin- und Cytokin-vermittelten hepatischen Insulinresistenz bei Diät-induzierter nicht-alkoholischer Fettlebererkrankung (NAFLD)“

Teil 2: „Bedeutung von Cyclooxygenase 2-vermittelt gebildetem Prostaglandin E₂ und anderen Prostanoiden für die Entwicklung einer Diät-induzierten nicht-alkoholischen Steatohepatitis“

Name(n) des/r Antragstellenden: Dr. Janin Henkel-Oberländer

Dienstanschrift/en:

Bisher: Universität Potsdam, Institut für Ernährungswissenschaft, Lehrstuhl für Biochemie der Ernährung; Arthur-Scheunert-Alle 114-116, 14558 Nuthetal;

Seit 01/2024: Universität Bayreuth, Fakultät für Lebenswissenschaften: Lebensmittel, Ernährung und Gesundheit, Lehrstuhl für Biochemie der Ernährung; Fritz-Hornschuch-Straße 13, 95326 Kulmbach

Name(n) der Mitverantwortlichen: (Prof. Dr. Gerhardt Paul Püschel, Universität Potsdam, Institut für Ernährungswissenschaft, Lehrstuhl für Biochemie der Ernährung; Lehrstuhlinhaber)

Name(n) der Kooperationspartnerinnen und –partner:

- Prof. Dr. Korinna Jöhrens, Institut für Pathologie, Charité Universitätsmedizin, Berlin bzw. später Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, Dresden [*1, *2];
 - Prof. Dr. Tim Julius Schulz, Adipozyten-Entwicklung und Ernährung, Deutsches Institut für Ernährungsforschung, Nuthetal [*1, *2];
 - Prof. Dr. Thomas Siegfried Weiss, KUNO, Universitätsklinikum Regensburg [*1]
 - Prof. Dr. André Kleinridders, Zentrale Regulation des Metabolismus, Deutsches Institut für Ernährungsforschung, Nuthetal bzw. später Molekulare und experimentelle Ernährungsmedizin, Institut für Ernährungswissenschaft, Universität Potsdam, Nuthetal [*1]
 - Dr. Linda Hammerich, Medizinische Klinik m. S. Hepatologie und Gastroenterologie, Charité Universitätsmedizin, Berlin [*2]
 - Prof. Dr. Oliver Werz, Pharmazeutische/Medizinische Chemie, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Jena [*2]
 - Prof. Dr. Susanne Baldermann, Leibniz-Institut für Gemüse und Zierpflanzen, Großbeeren bzw. später Food Metabolome, Universität Bayreuth, Kulmbach [*2]
 - Prof. Dr. Jörg Müller, Angewandte Informatik VIII, Universität Bayreuth, Bayreuth [*2]
- [*1] Projektteil HE7032/1-1; [*2] Projektteil HE7032/1-3

Berichtszeitraum (gesamte Förderdauer):

Teil 1: Genehmigung 9/2013, Projektzeitraum 10/2014 – 8/2018

Teil 2: Genehmigung 10/2019, Projektzeitraum 05/2020 – 11/2023

This is an open access article under the terms of the [Deed - Attribution 4.0 International - Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

DOI: 10.15495/EPub_UBT_00008603

2 Zusammenfassung / Summary

Die Stoffwechsel-bedingte steatotische Lebererkrankung (*metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease*, MASLD, früher NAFLD) wird als hepatische Manifestation des Metabolischen Syndroms angesehen und ist inzwischen die häufigste Ursache für Leberfunktionsstörungen weltweit. Die Erkrankung umfasst sowohl die benigne hepatische Steatose (Fettleber) als auch die progressive Form der Steatohepatitis (*metabolic dysfunction associated steatohepatitis*, MASH), bei der die Steatose von Entzündung und Fibrose begleitet ist. Die Ausbildung einer MASH erhöht das Risiko, irreversible Leberzirrhose und ein hepatozelluläres Karzinom (HCC) zu entwickeln. Nahrungsbestandteile wie Cholesterin und Fett-reiche Diäten werden als mögliche Faktoren diskutiert, die den Übergang einer einfachen Fettleber zur schweren Verlaufsform der Steatohepatitis begünstigen. Fettleibigkeit, unter der weltweit 40% der Bevölkerung leiden, wird von Insulinresistenz und einer niedrig-gradigen chronischen Entzündung des Fettgewebes begleitet. Neben Endotoxinen aus dem Darm gelangen demnach auch Entzündungsmediatoren aus dem Fettgewebe zur Leber. Als Folge werden residente Makrophagen der Leber (Kupfferzellen), aktiviert, die eine Entzündungsantwort initiieren und weitere inflammatorische Mediatoren wie Cytokine, Chemokine und Prostaglandine wie Prostaglandin E₂ (PGE₂) freisetzen. Im Rahmen dieses Projektes soll aufgeklärt werden, welchen Beitrag Lipidmediatoren wie PGE₂ an der Ausbildung von hepatischer Steatose, Entzündung und metabolischer Dysregulation im Rahmen von Diät-induzierter MASH haben.

In primären murinen Makrophagen und humanen Makrophagen-Zelllinien wurde ein komplexes Zusammenspiel von PGE₂ und anderen metabolischen und inflammatorischen Parametern nachgewiesen. So steigerte neben Endotoxinen, Fettsäuren und Cholesterin auch Insulin, das durch die kompensatorischen Hyperinsulinämie bei Insulinresistenz erhöht ist, die Expression der PGE₂-generierenden Enzyme sowie die Bildung des Lipidmediators. PGE₂ wiederum induzierte die Bildung von Immunzell-rekrutierenden Chemokinen und Cytokinen. Gleichzeitig hemmte es die Bildung des potenten pro-inflammatorischen Cytokins Tumornekrosefaktor α (TNF α). Die Sensitivität, mit der PGE₂ die Bildung von TNF α unterdrücken konnten, war in Makrophagen-Populationen, die bei der Immunzellinfiltration im Prozess der MASH-Entwicklung relevant sind, höher als in Kupfferzellen. Dies deutete auf eine anti-inflammatorische Funktion von PGE₂ bei der Progression von MASLD hin. Um den Einfluss von PGE₂ *in vivo* zu untersuchen, wurde zunächst eine Hochfett-Hochcholesterin-Diät etabliert, die die hepatische Bildung von PGE₂ verstärkte und MASH induzierte. Sowohl die globale Deletion der mPGES1 als auch die Makrophagen-spezifische Deletion der COX2, den beiden Schlüsselenzymen der induzierten PGE₂-Synthese, resultierte in einer stärkeren Steatohepatitis, Zellschädigung und systemischer Insulinresistenz in Mäusen, die 20 Wochen mit der MASH-induzierenden Diät gefüttert wurden im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen. Zusammenfassend bestätigen die Ergebnisse die protektive Rolle von PGE₂ bei der Progression der MASH. Da unspezifische und spezifische COX-Inhibitoren häufig bei der Behandlung von entzündungsbegleiteten Erkrankungen eingesetzt werden, könnte sich dies negativ auf die Entwicklung der MASLD/MASH auswirken.

Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD, formerly NAFLD) is defined as the hepatic manifestation of metabolic syndrome and is now the most common cause of liver dysfunction worldwide. The disease includes both benign hepatic steatosis (fatty liver) and the progressive form of metabolic dysfunction-associated steatohepatitis (MASH), in which the steatosis is accompanied by inflammation and fibrosis. The development of MASH increases the risk of developing irreversible liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC). Dietary components such as cholesterol and high-fat diets are discussed as possible factors that favor the transition from a simple fatty liver to the severe form of steatohepatitis. Obesity, which affects 40% of the population worldwide, is accompanied by insulin resistance and low-grade chronic inflammation of the adipose tissue. In addition to endotoxins from the intestine, inflammatory mediators from the adipose tissue also reach the liver. As a result, resident macrophages of the liver (Kupffer cells) are activated, which initiate an inflammatory response and release further inflammatory mediators such as cytokines, chemokines and

prostanoids like prostaglandin E₂ (PGE₂). This project aims to elucidate the contribution of PGE₂ to the development of hepatic steatosis, inflammation and metabolic dysregulation in the context of diet-induced MASH.

In primary murine macrophages and human macrophage cell lines, a complex interaction of PGE₂ and other metabolic and inflammatory parameters was demonstrated. In addition to endotoxins, fatty acids and cholesterol, insulin, which is increased by compensatory hyperinsulinemia in insulin resistance, increased the expression of PGE₂-generating enzymes and the formation of PGE₂. PGE₂ in turn induced the synthesis of immune cell-recruiting chemokines and cytokines. At the same time, it inhibited the formation of the potent pro-inflammatory cytokine tumor necrosis factor α (TNF α). The sensitivity with which PGE₂ was able to suppress the formation of TNF α was higher in macrophage populations relevant for immune cell infiltration in the process of MASH development, than in Kupffer cells. This suggests an anti-inflammatory function of PGE₂ in the progression of MASLD. To investigate the influence of PGE₂ *in vivo*, a high-fat-high-cholesterol diet was first established, which increased the hepatic formation of PGE₂ and induced MASH in rodents. Both global deletion of mPGES1 and macrophage-specific deletion of COX2, the two key enzymes of induced PGE₂ synthesis, resulted in more severe steatohepatitis, cell damage and systemic insulin resistance in mice fed the MASH-inducing diet for 20 weeks compared to wild-type controls. In summary, the data suggest a protective role of PGE₂ in the progression of MASH. Since non-specific and specific COX inhibitors are frequently used in the treatment of inflammation-associated diseases, this could have a negative impact on the development of MASLD/MASH.

3 Wissenschaftlicher Arbeits- und Ergebnisbericht

3.1 Ausgangsfragen und Zielsetzung des Projektes

Der alarmierende Anstieg von Übergewicht und Fettleibigkeit entwickelt sich immer mehr zu einem globalen gesundheitlichen Problem [1]. In Deutschland sind mehr als die Hälfte der Erwachsenen übergewichtig (*Body Mass Index* (BMI) > 25) oder sogar adipös (BMI > 30) eingestuft, wobei Männer mit 60,5 % mehr betroffen sind als Frauen (46,6 %) [2]. Auch im Kindesalter setzt sich ein Anstieg der Prävalenz von Übergewicht fort, aktuell ist fast jedes sechste Kind übergewichtig [3]. Die Ursachen sind vor allem auf einen ungesunden Lebensstil mit hoher Kalorienaufnahme und wenig körperlicher Aktivität zurückzuführen [4, 5]. Begleit- und Folgeerkrankungen von Übergewicht und Adipositas sind unter anderem die Stoffwechsel-bedingte steatotische Lebererkrankung (MASLD), die Entwicklung des Metabolischen Syndroms, Typ-2-Diabetes, Atherosklerose und anderen kardiovaskulären Störungen, die das Herzinfarkt- und Schlaganfall-Risiko erhöhen [4, 6, 7]. Die Stoffwechsel-bedingte steatotische Lebererkrankung (*metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease*, MASLD), die bis vor kurzem auch als nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD) bezeichnet wurde, stellt als hepatische Manifestation des Metabolischen Syndroms dar [8–10]. MASLD gilt inzwischen als weltweit häufigste Lebererkrankung, von der etwa 30% der Bevölkerung betroffen sind [9–11]. MASLD umfasst verschiedene Stadien: Die einfache Verfettung (Steatose) der Leber ist reversibel, jedoch entwickelt durchschnittlich jeder dritte Betroffene die schwere Verlaufsform der Steatohepatitis (*metabolic dysfunction-associated steatohepatitis*, MASH), bei der die Steatose von einer Infiltration von Immunzellen und Entzündungsprozessen begleitet ist [12, 13]. Die Progression zur MASH mit Fibrose erhöht das Risiko, ein hepatozelluläres Karzinom zu entwickeln und führt in bis zu 20 % der Fälle zu irreversibler Leberzirrhose und terminalem Organversagen [14–16]. Die Ursache der stoffwechselbedingten steatotischen Lebererkrankung (MASLD) ist multifaktoriell [9, 15]. Neben Fettsäure-reichen Diäten ist auch der Einfluss eines hohen Konsums von Fructose- haltigen Lebensmittels beschrieben [17, 18]. Unklar ist jedoch, welche Faktoren und molekularen Mechanismen bei der Progression von einer einfachen Fettleber zur Steatohepatitis verantwortlich sind.

Prostanoide wie Prostaglandin E₂ (PGE₂) sind Signalsubstanzen, die durch inflammatorische Mediatoren und Gewebeschädigung in Makrophagen-artigen Zellen vieler Gewebe gebildet werden. Sie erfüllen wichtige

regulatorische Funktionen im Immunsystem, der vaskulären Homöostase, bei Nierenfunktion und Knochenumbau, bei der Ausbildung des Fettgewebes sowie im Gastrointestinaltrakt, Reproduktions- und neuroendokrinen System [19, 20]. Auch in der (Patho-) Physiologie der Leber spielen Prostanoiden eine dominierende Rolle, da sie zur Regulation und Modulation von Blutglucose-Homöostase, sinusoidalem Blutfluss, transendothelialer Barrierefunktion sowie Fibrogenese, Regeneration und Akutphase-Antwort der Leber beitragen [21, 22]. Die residenten Makrophagen der Leber, die Kupfferzellen, stellen den größten Pool von Makrophagen im Organismus dar und bilden parallel zu anderen Entzündungsmediatoren vor allem das Prostanoid Prostaglandin E₂ (PGE₂), das aufgrund seiner geringen Halbwertszeit vor allem auf parakrine und autokrine Weise agiert [23–25].

Die Synthese von PGE₂ erfolgt aus der C₂₀-ungesättigten Fettsäure Arachidonsäure und kann daher grundsätzlich durch die Quantität und Qualität der Fettsäuren der Nahrung beeinflusst werden [23, 26]. Arachidonsäure wird durch zunächst durch Cyclooxygenasen (COX) zu dem instabilen Zwischenprodukt Prostaglandin H₂ (PGH₂) oxidiert [23, 27]. PGH₂ ist Substrat für spezifische Prostaglandin-Synthasen und reagiert durch die drei Isoformen der PGE-Synthasen (PGES) zu PGE₂ [28]. Während die Isoform COX1 und zwei Isoformen der PGES (cPGES und mPGES2) konstitutiv exprimiert werden und für die basale Verfügbarkeit von PGE₂ verantwortlich sind, werden die Cyclooxygenase 2 (COX2) und die mikrosomale PGE₂-Synthase 1 (mPGES1) durch pro-inflammatorische Stimuli induziert und daher für die gesteigerte Bildung von PGE₂ bei Entzündungsreaktionen verantwortlich [28–30]. PGE₂ kann dabei sowohl Entzündungsprozesse verstärken als auch abschwächen und Regenerationsprozesse initiieren [31, 32].

Eigene Daten und die anderer zeigen eine höher Expression von COX2 und mPGES1 in Lebern von Patientinnen und Patienten mit MASH ([33, 34] und weitere eigenen unveröffentlichte Daten). Andererseits wird die pharmakologische Hemmung der COX2 durch Langzeitgaben von nicht-steroidaler Antiphlogistika (NSAIDs) oder selektiven COX2-Inhibitoren (Coxibs) zur Therapie von Lipid-Induzierter Insulinresistenz und anderen chronisch entzündlichen Erkrankungen eingesetzt [35–38], was durchaus kritisch zu bewerten ist, da dies eine Beeinträchtigung der Bildung aller COX2-nachgeschalteter Prostanoiden – unter anderem auch PGE₂ – zur Folge hat und die regulatorischen Funktionen der Lipidmediatoren im physiologischen und pathophysiologischen Zustand beeinträchtigt.

Das grundsätzliche Ziel des Projektes ist es daher, den Beitrag von PGE₂ bei einer Diät-induzierten MASH zu charakterisieren. Im ersten Projektantrag (HE7032/1-1) sollte daher zunächst eine Diät zur Induktion einer Steatohepatitis (MASH) mit Adipositas und Insulinresistenz optimiert werden und diese dann in einen Fütterungsversuch mit Wildtyp- und mPGES1-defizienten Mäusen eingesetzt werden, um die Rolle der mPGES1-abhängigen Generierung von PGE₂ *in vivo* zu verstehen. Parallele *in vitro*-Experimente mit isolierten Kupfferzellen und Peritonealmakrophagen aus den transgenen Tieren verdeutlichten dabei den Einfluss von PGE₂ bei autokrinen Regulations- und Kommunikationsprozessen. Im zweiten Projektantrag (HE7032/1-3) lag der Fokus auf der Gewebe-spezifischen Deletion der COX2 in Hepatozyten und Makrophagen, da im ersten Projektteil Limitationen durch die Verwendung eines Ganzkörper-Knockout-Modells verifiziert wurden. Daher sollte eine Interventionsstudie mit entsprechenden Kontrollen und transgenen Mäusen, deren COX2-Expression in Hepatozyten, myeloiden Zellen (Makrophagen) und in beiden Zelltypen deletiert war, zur Diät-induzierten Entwicklung einer MASH durchgeführt werden. Um die COX2-abhängig regulierten Mechanismen auf Zellebene nachzuweisen, erfolgten parallel zum Fütterungsversuch umfangreiche *in vitro*-Studien mit verschiedenen Makrophagen-Populationen und Hepatozyten aus den entsprechenden Genotypen. Außerdem sollte geprüft werden, inwiefern sich die Zusammensetzung des Makrophagen-Pools innerhalb der Ausbildung von Diät-induzierter NASH verändert, um Rückschlüsse auf die Sensitivität der Leber gegenüber Prostanoiden wie PGE₂ abzuschätzen.

3.2 Beschreibung der projektspezifischen Ergebnisse und Erkenntnisse

3.2.1 Projektteil HE7032/1-1

Um die präzisen pathogenen Mechanismen der Progression von einer einfachen Fettleber zur progressiven Steatohepatitis (MASH) zu untersuchen, sind entsprechend geeignete Tiermodelle notwendig. Viele der aktuell verwendeten Nagermodelle entwickeln jedoch nicht alle klinischen, biochemischen und morphologischen Parameter, durch die eine humane NASH im Metabolischen Syndrom charakterisiert ist [18, 39]. Genetisch adipöse Modelle und die Fütterung mit hauptsächlich Schmalz-basierten Hochfett-Diäten verursachen Adipositas, Insulinresistenz und Steatose, jedoch konnten in den Lebern der Tiere meist keine oder nur geringe Anzeichen von Entzündung und Fibrose nachgewiesen werden [39]. Andererseits entwickeln Nager, die zur Induktion einer NASH mit einer Methionin-Cholin-defizienten Diät gefüttert werden, bereits nach wenigen Wochen eine Lebersteatose mit Entzündung und Fibrose, jedoch sind diese Tiere weder insulinresistent noch adipös, sondern weisen oft sogar ein reduziertes Körpergewicht auf [40]. Im Rahmen dieses Projektes wurde zunächst eine Pilotstudie mit C57BL/6J-Mäusen durchgeführt, die für 20 Wochen mit einer Kontrolldiät, einer Sojaöl-basierten Hochfett-diät (Sojaöl hat einen hohen Anteil an n-6-ungesättigten Fettsäuren als Substrat der PGE₂-Synthese) ohne und mit dem Zusatz von 0,75% Cholesterol sowie einer Schmalz-basierten Hochfett-diät mit Fructose gefüttert wurden. Die Ergebnisse sind unter Henkel *et al.* 2017 [41] publiziert. Während wie erwartet die Schmalz-basierte Hochfett-diät zu Fettleibigkeit, Glucose-Intoleranz und der Entwicklung einer Steatose führte, blieben die Mäuse nach Fütterung einer Sojaöl-basierten Hochfett-diät schlank und zeigten kaum Lipideinlagerungen in der Leber. Überraschenderweise führte die Fütterung der Wildtyp-Mäuse mit einer Sojaöl-basierten Hochfett-diät in Kombination mit 0,75% Cholesterol zu einer massiven Schädigung der Leber mit Steatose, Infiltration von Immunzellen und Entzündung sowie beginnenden fibrotischen Veränderungen. Die diagnostizierte Steatohepatitis (MASH) wurde von Fettleibigkeit und Glucose-Intoleranz begleitet und die Mäuse spiegelten somit einen ähnlichen Phänotyp wieder wie Patientinnen und Patienten mit MASH im Metabolischen Syndrom [41].

Diese MASH-induzierende Diät wurde dann in einem Fütterungsversuch mit transgenen Mäusen mit einer globalen mPGES1-Defizienz eingesetzt, um den Einfluss der mPGES1-vermittelten PGE₂-Bildung zu untersuchen. Diese Fütterungsinterventionsstudie wurde jedoch aufgrund der Ergebnisse der Pilotstudie um zwei weitere Diäten erweitert, die die Rolle des Nahrungs-Cholesterols spezifizierter erklären sollte. Neben einer Standarddiät und der bereits beschriebenen Sojaöl-basierten Hochfett-diät mit 0,75% Cholesterol erhielten ein Teil der Mäuse beider Genotypen auch eine Standarddiät mit 0,75% Cholesterol oder eine Schmalz-basierte Hochfett-diät mit 0,75% Cholesterol. Die Ergebnisse der Interventionsstudie sind unter Henkel *et al.* 2018a [42] publiziert. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass nur die Kombination von Sojaöl und Cholesterol zu einer exzessiven Akkumulation von Cholesterol in den Hepatozyten führte. Begleitende *in vitro*-Experimente in Hepatozyten (nur in Teilen publiziert) zeigten, dass dies auf die Hemmung von spezifischen hepatischen Cholesterol-Transportern durch n-6-ungesättigte Fettsäuren zurückzuführen war. Die Akkumulation von Cholesterol führte zu mitochondrialer Schädigung, oxidativem Stress und schließlich zur Apoptose der Hepatozyten und konnte daher als weiterer Schlüsselfaktor in der Progression zur Steatohepatitis bestätigt werden [42]. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. André Kleinriders wurde außerdem untersucht, inwieweit die Kombination von Fettsäuren und Cholesterol einen Einfluss auf die mitochondriale Funktion und den neuronalen Metabolismus im Gehirn haben. Die unter Schell *et al.* 2020 publizierten Daten [43] zeigten unter anderem, dass zwar die Kombination von Sojaöl und Cholesterol zu geringen Stressreaktionen und leichten Veränderungen einzelner mitochondrialer Atmungskettenkomplexe im Gehirn führte, jedoch vor allem die gesättigten Fettsäuren in der Schmalz-basierten Hochfett-diät eine mitochondriale Schädigung verursachten [43].

Während die verschiedenen Cholesterol-haltigen Diäten wie unter [42] beschrieben in unterschiedlichem Maße zur Ausbildung von MASLD in Kontroll-Mäusen beitrugen, entwickelten Mäuse mit globaler Deletion der mPGES1 ebenfalls nur nach Fütterung der Sojaöl- und Cholesterol-haltigen Diät einen veränderten Phänotyp,

der sich jedoch von dem der Wildtyp-Kontrollen unterschied. Die Ergebnisse sind unter Henkel *et al.* 2018b publiziert [33] und im Folgenden zusammengefasst: Die Deletion der mPGES1 reduzierte die durch die Sojaölbasierte Hochfettdiät induzierte Bildung von PGE₂ in den Lebern der Mäuse. Während der NAS (*NASH Activity Score*) nicht verändert war, führte die Fütterung der MASH-induzierenden Diät in mPGES1-defizienten Tieren zu einer signifikant stärkeren Expression des potenten pro-inflammatorischen Cytokins TNF α im Vergleich zu den genetischen Kontrollen, da die negative Rückkopplungshemmung durch PGE₂ in den mPGES1-defizienten Tieren gestört war. Nachgeschaltet waren auch anderen Cytokine wie IL-1 β , die sowohl durch PGE₂ als auch durch TNF α reguliert werden können, erhöht, was entsprechend mechanistisch beschrieben wurde [33]. Die verstärkte hepatische Bildung von TNF α in Lebern von mPGES1-defizienten Tieren im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen verursachte in höherem Ausmaß eine Zellschädigung und Apoptose der Hepatozyten. Die mPGES1-vermittelte Bildung von PGE₂ hatte daher eine schützende Wirkung auf schädigende TNF α -abhängige Prozesse bei Diät-induzierter MASH [33].

Weitere Kooperationspartner im Projekt waren die Pathologin Prof. Dr. Korinna Jöhrens, die die pathologische Beurteilung der immunhistologische Leberpräparate durchführte; Prof. Dr. Tim Schulz, der Messkapazität für die basale Untersuchung des Serums bereitstellte; sowie Prof. Dr. Thomas Siegfried Weiss, der RNA von Leberproben von Patientinnen und Patienten mit Steatose und MASH sowie entsprechende Kontrollen zur Verfügung stellte.

Parallel zum Tierversuch wurden *in vitro*-Studien mit primären Hepatozyten und Kupfferzellen durchgeführt, um den Einfluss von PGE₂ bei der intrahepatischen Kommunikation zu bestätigen ([33] und nicht-publizierte Daten). Während Medienüberstände aus Lipopolysaccharid (LPS)-aktivierten Kupfferzellen grundsätzlich die Aktivierung der Insulinrezeptor-Signalkette negativ modulierte, war dies durch den Genotyp nicht beeinflusst. Außerdem war die LPS-abhängige Expression von TNF α und anderen Cytokinen und Chemokinen in Wildtyp- und mPGES1-defizienten Kupfferzellen identisch, obwohl die parallele Inkubation mit exogenem PGE₂ zu einer signifikanten Reduktion der LPS-induzierten Expression führte. Weiterführende Analysen zeigten, dass die LPS-vermittelte Bildung von PGE₂ in mPGES1-defizienten Kupfferzellen immer noch sehr hoch war und nur zu 20% reduziert im Vergleich zum Wildtyp, obwohl keine veränderten Expressionsmuster der anderen PGE-Synthase nachgewiesen werden konnten. Dosis-Wirkungskurven zeigten jedoch, dass Kupfferzellen im Vergleich zu anderen Makrophagen-Populationen wie Peritonealmakrophagen eine deutliche geringere Sensitivität für die PGE₂-vermittelte Hemmung der TNF α -Expression durch LPS hatten und stellen damit möglicherweise nicht die Makrophagen-Population dar, über die PGE₂ die MASH-Entwicklung reguliert [33]. Diese unerwarteten Ergebnisse beeinflussten den weiteren Projektverlauf insofern, dass zunächst Peritonealmakrophagen, die auch im Rahmen von MASH die Leber infiltrieren können, hinsichtlich autokriner PGE₂-abhängig regulierter Rückkopplungsschleifen charakterisiert wurden. Außerdem wurden experimentelle Bedingungen getestet, die die PGE₂-Bildung in Kupfferzellen modulieren können, ohne die Bildung anderer Prostanoiden maßgeblich zu beeinflussen. Dabei erwies sich die COX2 als beste Zielstruktur, da eine Indomethacin-vermittelte Hemmung der COX2 die LPS-abhängige Bildung von PGE₂ vollständig unterdrückte (siehe Folgeantrag für HE7032/1-3).

Zusammenfassend führte das Projekt HE7032/1-1 zu folgenden wichtigen Erkenntnissen: (1) Nicht nur die Quantität, sondern auch die Qualität von Fettsäuren und weiteren Nahrungslipiden wie Cholesterin könnten einen maßgeblichen Einfluss auf Entstehung bzw. Progression der MASH haben. (2) mPGES1-abhängig gebildetes PGE₂ schützte vor einer TNF α -basierten Schädigung bei Diät-induzierter MASH im Mausmodell. Dies war vor allem auf die PGE₂-vermittelte Hemmung der TNF α -Expression zurückzuführen. Im Rahmen des Projektes HE7032/1-1 entstanden vier Originalpaper und ein Review-Artikel (siehe 4.1).

Aufgrund der erhobenen Daten war der Projektverlauf geringfügig verändert im Vergleich zum Antrag. Zum einen wurde umfangreicher als ursprünglich geplant auf die Mechanismen der Leberschädigung durch Cholesterin fokussiert. Zum anderen wurde der Umfang der Arbeitspakete zur mechanistischen Untersuchung

der PGE₂-vermittelten Zell-Zell-Kommunikation in Co-Kulturmodellen reduziert, da nur eine geringe Veränderung der PGE₂-Bildung in mPGES1-defizienten Kupfferzellen nachgewiesen werden konnte. Dementsprechend wurden weitere neue Experimente als Vorarbeiten für den Folgeantrag durchgeführt. Außerdem sind zeitliche Aspekte zu nennen, da die beantragte Projektlaufzeit von drei Jahren bei der Projektgenehmigung auf zwei Jahre gekürzt wurde.

3.2.2 Projektteil HE70/32/1-3

Im Fokus des zweiten Projektes stand die Analyse der Bedeutung des Cyclooxygenase 2 (COX2) als zweites wichtiges Enzym, das im Rahmen von Entzündungsreaktionen induziert wird und maßgeblich zur Synthese von PGE₂ in der Leber beiträgt. Zunächst wurden verschiedenen transgene Mauslinien gezüchtet und entsprechend verpaart, um die Zell- bzw. Gewebe-spezifische Deletion zu ermöglichen und Limitationen durch globale *Knockout*-Modelle zu vermeiden: COX2^{fl/fl}-Mäuse [44] wurden zunächst auf einen C57BL/6JRj-Hintergrund zurückgezüchtet und anschließend mit Mäusen verpaart, die die Cre-Recombinase unter Kontrolle des Albumin-Promoters [45] oder im Genlocus von Lysozym M (LysM) [46] exprimierten bzw. deren Kombination. So entstanden transgene Linien mit Hepatozyten-spezifischer COX2-Defizienz (COX2^{ΔHC}), Makrophagen-spezifischer COX2-Defizienz (COX2^{ΔMφ}) und COX2-Defizienz in Hepatozyten und Makrophagen (COX2^{ΔHCΔMφ}). Als Kontrollen wurden neben den geflochten Cre-negativen Geschwistertieren (COX2^{fl/fl}) auch Mäuse verwendet, die nur die LysM-abhängige Cre-Rekombinase aufwiesen (COX2^{+/+}LysM-Cre^{+/-}), da in dieser Linie die heterozygote Cre-Expression gleichzeitig eine (heterozygote) Deletion von LysM bedeutete.

Während alle Tiere, die die MASH-induzierende Diät für insgesamt 20 Wochen erhielten, bereits nach wenigen Wochen ein höheres Körpergewicht aufwiesen als die Standarddiät (STD)-gefütterten Geschwistertiere, war die Gewichtszunahme in Mäusen mit der Makrophagen-spezifischen Deletion der COX2 (COX2^{ΔMφ} und COX2^{ΔHCΔMφ}) signifikant höher als in den anderen Genotypen. Dies war nur zum Teil auf eine höhere Fettmasse zurückzuführen, jedoch vor allem auf ein stark erhöhtes Lebergewicht. Im Einklang dazu war der HOMA-IR-Index als Parameter für Glucose-Intoleranz und Insulinresistenz in den transgenen Mauslinien mit Makrophagen-spezifischer COX2-Defizienz signifikant höher als in den anderen transgenen Linien nach Fütterung der MASH-induzierenden Diät. Sowohl die Menge der Lipide im Serum als auch der histologische Befund zur Diagnose der MASH durch den NAS, die wie auch im Projekt HE7032/1-1 in Kooperation mit Prof. Dr. Tim Schulz und Prof. Dr. Korinna Jöhrens gemessen wurden, waren zwar durch die Diät, jedoch nicht durch die Genotypen verändert. Weiterführende Untersuchungen der Leber zeigten, dass steatotische Veränderungen in Lebern mit COX2-Deletion in Makrophagen deutlich stärker waren als in Leber mit COX2-Deletion in Hepatozyten oder in den COX2-exprimierenden Kontrollen. Interessanterweise war die Diät-induzierte Menge von Kollagenfasern und Expression von Fibrosemarkern in Lebern von Mäusen mit COX2-Defizienz in Hepatozyten (COX2^{ΔHC}) deutlich geringer als in allen anderen Genotypen, was auch auf eine Rolle der COX2 bei fibrotischen Prozessen hinweist. Die MASH-vermittelte Entzündung wurden ebenfalls durch den Genotyp verändert. In Lebern von COX2^{ΔMφ}- und COX2^{ΔHCΔMφ}-Mäusen konnten im histologischen Präparat signifikant mehr F4/80-positive Zellen bzw. Flächenanteile nachgewiesen werden als in den Kontroll-Genotypen nach Fütterung der MASH-induzierenden Diät. Eine erweiterte Analyse der histologischen Präparate war durch die Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Jörg Müller möglich, der entsprechend trainierte neuronale Netzwerke zur Quantifizierung der Signale im mikroskopischen Bild einsetzte. Dies umfasste auch die differenzierte Analyse von Lipidtropfen-Anzahl, -Größe und -Verteilung und soll weiter optimiert werden. Parallel war die Diät-induzierte Expression von entzündungsfördernden Parametern wie den Cytokinen TNFα, IL-6 und Oncostatin M oder den Immunzell-rekrutierenden Chemokinen wie CXCL2 und CCL2 in Lebern von Mäusen mit COX2-Defizienz in Makrophagen tendenziell oder signifikant höher als in Lebern von Tieren mit COX2-Defizienz in Hepatozyten oder den Kontroll-Tieren. Die Daten legen nahe, dass die Veränderung der Entzündungsantwort auf die Aufhebung der PGE₂-vermittelten Hemmung der TNFα-Bildung in Makrophagen zurückzuführen war, die durch die zellspezifische COX2-Defizienz entsprechend moduliert wurde.

Überraschenderweise konnte jedoch keine deutlich verminderte Diät-induzierte Bildung von PGE₂ in Lebern von Mäusen mit COX2-Deletion in Makrophagen nachgewiesen werden, sondern eher basal erhöhte Konzentrationen des Prostaglandins, die jedoch Diät-abhängig nicht mehr gesteigert wurden. Neben der etablierten Messung der hepatischen PGE₂-Konzentrationen durch einen spezifischen ELISA wurden die Proben zusätzlich mit präzisen analytischen Verfahren (UPLC-MS) durch den Kooperationspartner Prof. Dr. Oliver Wertz untersucht, um das veränderte Spektrum der Prostanoiden zu quantifizieren. Kurzgefasst konnte die Lipidomics-Analyse und nachgeschaltete *Principle Component Analysis* (PCA) nur geringe Unterschiede in der Metabolitenverteilung zwischen den Diäten nachweisen, deutete jedoch auf tendenzielle Veränderungen in Lebern von COX2^{ΔHCDMφ}-Mäusen hin, die in der Projektnachbearbeitung weiter untersucht werden sollen. Die Interventionsstudie zeigte außerdem, dass die Aktivierung der Insulinrezeptor-Signalkette in den Lebern der Mäuse nach Fütterung der MASH-induzierenden Diät gestört war, ohne jedoch Unterschiede zwischen den Genotypen zu verifizieren. Zelluläre Parameter wie die Expression der Komplexe der mitochondrialen Atmungskette oder der Menge oxidiertes Proteine wiesen jedoch auf eine signifikant stärkere Diät-induzierte Schädigung der Leber in Tieren mit Makrophagen-spezifischer COX2-Defizienz hin. Zusammenfassend zeigte die Fütterungsinterventionsstudie mit transgenen Mäusen, dass eine COX2-Defizienz in Makrophagen die Fettleibigkeit und vor allem die Entzündung und stressbedingte Schädigung der Leber bei Diät-induzierter MASH verstärkte und verdeutlicht die protektive Rolle von COX2-vermittelt gebildeten Lipidmediatoren bei steatotischen Lebererkrankungen. Ein Teil der Daten wurde bereits als Manuskript zusammengefasst [Manuskript Anhang B] und zur Publikation eingereicht.

Neben der Leber wurde auch das weiße Fettgewebe untersucht, da die Makrophagen-spezifische COX2-Defizienz auch hier zur veränderten Prostanoid-Synthese beitragen könnte. Die bisherigen Daten aus dem epididymalen Fettgewebe der Mäuse weisen lediglich auf eine Diät-abhängige Veränderung der Insulinsensitivität, der Expression von Adipokinen sowie der Bildung von entzündungsfördernden Cytokinen und Chemokinen hin, die jedoch in den verschiedenen transgenen Mauslinien nicht verändert ist. Im Gegensatz dazu weisen vorläufige Daten auf Diät- und Genotyp-abhängige Veränderungen im Skelettmuskel hin: Die Fütterung mit der MASH-induzierende Diät resultierte in Mäusen mit den Kontroll-Genotypen in einer Erhöhung des Körpergewichts und der Fettmasse, wobei jedoch die Muskelmasse reduziert war im Vergleich zu STD-gefütterten Mäusen. Diese spezifische Veränderung der Körperzusammensetzung war in COX2^{ΔHCDMφ}-Mäusen aufgehoben. Auch weibliche Geschwistertiere (COX2^{fl/fl}), die parallel mit der MASH-Diät gefüttert wurden, zeigten keine Diät-abhängige Reduktion der Muskelmasse. In histologischen Präparaten des *Musculus gastrocnemius* der Mäuse wurde ein geringerer Durchmesser und eine geringere Fläche sowie und eine leicht veränderte Zusammensetzung der Muskelfasern in Mäusen der Kontroll-Genotypen nach Fütterung der MASH-Diät im Vergleich zur STD detektiert, die jedoch nicht in COX2^{ΔHCDMφ}-Mäusen oder weiblichen Kontrollmäusen nachweisbar waren. Neben den histologischen Präparaten wurden auch Expressionsspiegel von Atropiemarkern und Myokinen gemessen, die jedoch keine Unterschiede zwischen den Genotypen zeigten. Um dieses Phänomen mechanistisch weiter aufzuklären, werden im Rahmen der Projektnachbearbeitung weitere Messungen erfolgen, u.a. zum Nachweis der Insulinsensitivität und mitochondrialen Biogenese im Skelettmuskel sowie weitere relevante Parameter der Leber-Muskel-Achse. Außerdem sollen die Untersuchungen auf alle Genotypen ausgeweitet werden. Um den Organ-Crosstalk spezifischer zu untersuchen und *post mortem* Hinweise für sekundäre Sarkopenie zu erhalten, wurde in einzelnen Tieren die Aminosäure-Einbauraten im *Musculus Quadriceps* quantifiziert, indem den Tieren deuteriertes Phenylalanin 30 min vor der Organentnahme injiziert wurde. Die vorläufigen Daten zeigen eine MASH-Diät-vermittelte Reduktion der Einbauraten in männlichen Mäusen des Kontroll-Genotyps, die in weiblichen Geschwistertieren noch deutlicher ausgeprägt war. Die Messungen erfolgen in Kooperation mit Prof. Dr. Susanne Baldermann und sollen zeitnah fortgesetzt und auf die anderen Genotypen ausgeweitet werden.

Parallel zur Fütterungsinterventionsstudie erfolgten umfangreiche *in vitro*-Studien mit primär isolierten Makrophagen-Populationen und Hepatozyten aus STD-gefütterten Mäusen der verschiedenen Genotypen.

Zunächst wurden aus Mäusen der Kontroll-Genotypen primäre Kupfferzellen (KC) als Modell für residente Lebermakrophagen sowie Peritonealmakrophagen (PM) und Knochenmark-assoziierte Makrophagen (BMDM) als Modell für infiltrierende Makrophagen bei Steatohepatitis kultiviert und hinsichtlich ihres M1/M2-Profiles vor und nach der Aktivierung mit LPS charakterisiert. KC exprimierten vor allem Gene, die einer alternativen (M2)-Polarisierung zuzuordnen sind, jedoch verursachte die Aktivierung mit LPS eine Veränderung der Expressionsmuster in Richtung M1-Polarisierung. In Gegensatz dazu war das Expressionsprofil verschiedener Stoffwechsel-assoziiierter und Oberflächen-Marker von PM und BMDM bereits im nicht-aktivierten Zustand klar in die pro-inflammatorisch aktivierte (M1)-Polarisierung einzuordnen. PM und BMDM reagierten stärker hinsichtlich einer Aktivierbarkeit zum pro-inflammatorischen Phänotyp und waren insgesamt deutlich plastischer in ihrer Polarisierung als KC. Dies spiegelte sich auch in der Expression der PGE₂-generierenden Enzyme mPGES1 und vor allem COX2 wider. Während KC bereits basal PGE₂ sezernierten und dies LPS-vermittelt weiter steigerten (4,5 nM versus 20 nM PGE₂ im Zellkulturmedium), sind vor allem PM als potentiell infiltrierende Makrophagen herauszustellen, die im Grundzustand zwar weniger PGE₂ als KC sezernierten, die Sekretion jedoch nach LPS-Aktivierung auf ähnliche Konzentrationen wie KC steigerten. In allen drei Makrophagen-Populationen hemmte exogenes PGE₂ dosis-abhängig die LPS-induzierte Gen- und Proteinexpression von TNF α . Jedoch reagierten KC nur bei vergleichsweise hohen Mengen von PGE₂ (IC₅₀ = 314 nM), während BMDM und PM (IC₅₀ = 38,6 nM und 3,7 nM) deutlich sensitiver waren. Auch die Expression anderer LPS-abhängig induzierter Cytokine und Chemokine wie IL-1 β , IL-6, IL-8 wurden in KC, PM und BMDM unterschiedlich durch PGE₂ beeinflusst. Auf molekularer Ebene konnten durch die absolute Quantifikation der vier EP-Rezeptor-Subtypen, über die PGE₂ intrazellulär Signalketten aktiviert und moduliert, Differenzen nachgewiesen werden, die durch die Desensibilisierbarkeit des EP4-Rezeptors die unterschiedliche Sensitivität der drei Makrophagen-Populationen gegenüber PGE₂ zumindest teilweise erklären.

Vergleichbare Experimente wurden auch in COX2^{AM ϕ} -Mäusen durchgeführt. Die Defizienz der COX2 resultierte nur in KC in einer leichten Induktion der COX1, während in allen drei Zelltypen die Expression der PGE- oder anderer Prostanoid-Synthase nicht kompensatorisch reguliert war. Dementsprechend war in den Makrophagen-Populationen nur eine geringen basale, jedoch keine LPS-vermittelte Bildung von PGE₂ nachzuweisen, was im klaren Unterschied zu den Ergebnissen in den mPGES1-defizienten Kupfferzellen stand (siehe HE7032/1-1). Wie erwartet, war durch die fehlende PGE₂-vermittelte Rückkopplungshemmung die LPS-abhängige Expression des pro-inflammatorischen Cytokins TNF α signifikant gesteigert in COX2-defizienten KC und PM im Vergleich zu den entsprechenden Wildtyp-Zellen. Dies war jedoch weniger stark in BMDM ausgeprägt. Andere TNF α -nachgeschaltete Cytokine verhielten sich ähnlich. Diese *in vitro*-Daten können daher in Teilen den Phänotyp der MASH-Diät gefütterten Mäuse mit COX2-Defizienz in Makrophagen erklären. Ein Teil der Daten wurde bereits als Manuskript zusammengefasst [Manuskript Anhang C] und zur Publikation eingereicht.

Um die Relevanz der unterschiedlichen Sensitivität der Makrophagen-Populationen gegenüber PGE₂ im Kontext der MASH-Pathogenese zu untersuchen, wurde eine weitere Fütterungsinterventionsstudie durchgeführt, bei der Kontroll-Mäuse (COX2^{fl/fl}) für unterschiedliche Zeiträume mit einer STD- oder MASH-induzierenden Diät gefüttert wurden. Wie an anderer Stelle beschrieben, konnte diese Studie pandemiebedingt erst deutlich später starten als ursprünglich geplant, so dass zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht alle Auswertungen abgeschlossen sind. Aus den Lebern der Tiere wurden Leukozyten isoliert und nach Färbung mit spezifischen Fluorophor-gekoppelten Antikörpern mittels Durchflusszytometrie analysiert. Diese Messungen wurden bei der Kooperationspartnerin Dr. Linda Hammerich durchgeführt, die auch bei der Optimierung der *Gating*-Strategie unterstützte. Die Makrophagen in den MASH-Lebern ließen sich allgemein als F4/80^{high}CD11b^{intermediate} residente Kupfferzellen und F4/80^{intermediate}CD11b^{high} infiltrierende, Monozyten-abgeleitete Makrophagen identifizieren, deren Gesamtpool in Abhängigkeit der Fütterungsdauer leicht anstieg. Die Zusammensetzung des hepatischen Makrophagen-Pools verändert sich dabei jedoch stark im Verlauf der Diät-induzierten Krankheitsprogression: der Anteil an Tim4⁺Clec4F⁺ -Kupfferzellen sank, wohingegen der

Anteil an Tim4-Clec4F⁻-Monozyten-abgeleiteten Makrophagen zunahm. Außerdem konnte eine dritte Makrophagen-Population der Tim4-Clec4F⁺-infiltrierenden, Monozyten-abgeleiteten Makrophagen mit Kupfferzell-ähnlichem Phänotyp nachgewiesen werden. Dies wurde bereits in einer anderen Studie publiziert, jedoch nur unter Anwendung einer Methionin-Cholin-defizienten Diät zur Induktion der MASH, bei der die Tiere nur den hepatischen Phänotyp der MASH, jedoch keine weiteren Anzeichen der komplexen MASH wie Adipositas und Glucose-Intoleranz entwickelten [47]. Die beiden infiltrierten Makrophagen-Populationen wiesen einen ähnlichen Phänotyp auf wie PM und vor allem differenzierte BMDM, die wie beschrieben sehr sensitiv auf PGE₂ als Signalmediator reagierten. Die Kultivierung und detaillierte Charakterisierung der verschiedenen sortierten Makrophagen-Populationen in MASH-Lebern und denen aus STD-gefütterten Mäusen konnte aufgrund methodischer Probleme nicht wie ursprünglich geplant erfolgen bzw. die erhobenen Daten waren aufgrund zu geringer Zellzahlen nicht auswertbar.

Die beschriebenen dynamischen Veränderungen der Makrophagen-Populationen bei MASH sind Teil des eingereichten Manuskriptes [Manuskript Anhang C] und lassen die Schlussfolgerung zu, dass PGE₂ als wichtiger Regulator der Entzündungsreaktion agiert, der vor allem TNF α -vermittelte pro-inflammatorische Signalketten in infiltrierenden Makrophagen abschwächt. Eine Hemmung der PGE₂-Bildung in diesen Makrophagen-Populationen, die sehr sensitiv auf das von aktivierten Kupfferzellen gebildete Prostanoid reagieren, könnte die inflammatorische Last der Leber erhöhen und die Progression der MASH zur schweren Verlaufsform fördern.

Weitere Erkenntnisse, die im Rahmen des Projektes generiert wurden, umfassen die LysM-Cre-transgene Mauslinie, die nicht nur in dieser, sondern auch bei vielen anderen Studien zur Makrophagen-spezifischen Deletion von Zielgenen verwendet wird, weil kaum Alternativen verfügbar sind. Da der Genlocus der Cre-Rekombinase im LysM-Gen liegt, führte die Expression der Cre-Rekombinase gleichzeitig zu einer Deletion von LysM. Für die Fütterungsstudie wurden daher nur Tiere mit einer heterozygoten Cre-Expression gezüchtet und nachgewiesen, dass die LysM-Expression nur geringfügig vermindert war, aber durch die Cre-Expression die COX2 in Makrophagen vollständig deletiert wurde. Zusätzlich wurden als zweite Genotyp-Kontrolle COX2-Wildtypiere mit LysM-Cre-Expression (COX2^{+/+} LysM-Cre^{+/-}) verwendet. *In vitro*-Studien mit Makrophagen-Populationen von homozygot-LysM-Cre exprimierenden Mäusen (COX2^{fl/fl}LysM-Cre^{+/+} oder COX2^{+/+}LysM-Cre^{+/+}) zeigten, dass diese im Vergleich zu Wildtypen und den im Projekt verwendeten heterozygoten LysM-Cre exprimierenden Mäusen (COX2^{fl/fl} oder COX2^{+/+}LysM-Cre^{+/-}) eine massive Störung in der Entzündungsantwort aufwiesen und daher für Untersuchungen von chronischen Entzündungskrankheiten nur sehr eingeschränkt verwendet werden sollten. Dies ist vor allem relevant, wenn als Kontrollen lediglich die gefloxtete Linie (^{fl/fl}) verwendet wird, was in vielen publizierten Studien der Fall ist. Die beschriebenen Daten sind bisher nicht veröffentlicht, sollen aber perspektivisch der Öffentlichkeit zugänglich gemacht werden, um die Einschränkungen bei der Verwendung dieses Modells transparent zu machen und Verzerrungen bei der Auswertung und Interpretation entsprechender Studien zu vermeiden.

Zusammenfassend führte das Projekt HE7032/1-3 zu folgenden wichtigen Erkenntnissen: (1) Die Deletion der COX2 in Makrophagen führte zu einer Progression von Diät-induzierter MASH im Mausmodell, die durch erhöhte Steatose und Entzündung gekennzeichnet war. (2) Bei der Entwicklung der MASH im Mausmodell erfolgten dynamische Veränderung der Makrophagen-Populationen. (3) Die Makrophagen-Populationen unterschieden sich in ihrer Sensitivität und Responsivität gegenüber Signalmediatoren wie PGE₂, wobei infiltrierende Makrophagen sensitiver reagierten als Kupfferzellen. Insgesamt bestätigen die Ergebnisse eine protektive Funktion von COX2-abhängig gebildeten Metaboliten wie PGE₂ bei Diät-induzierter MASH im Mausmodell. Im Rahmen des Projektes HE7032/1-3 entstanden bisher zwei Originalpaper (eingereichte Manuskripte, siehe Anhang B und C) und ein Review-Artikel (siehe 4.1).

Neben den bereits beschriebenen Veränderungen im Projektverlauf muss auf die massiven zeitlichen Verzögerungen durch die Corona-Pandemie und damit verbundenen Einschränkungen und Personalausfällen,

sowie auf Projekt-interne Veränderungen der Personalstruktur und den eigenen Arbeitsplatzwechsel hingewiesen werden (siehe 5.1). Die Isolierung von primären Hepatozyten aus humanen Leberresektaten konnte methodisch nicht erfolgreich optimiert werden und musste dann zum Beginn der Corona-Pandemie abgebrochen werden. Einige Untersuchungen, z.B. die Experimente mit COX2-defizienten Hepatozyten und die Aufarbeitung weiterer Organe aus den Fütterungsinterventionen konnten zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht abgeschlossen werden. Neben den genannten Verzögerungen ist dabei auch anzumerken, dass die beantragte Projektlaufzeit von drei Jahren bei der Projektgenehmigung auf zwei Jahre gekürzt wurde.

3.3 Beschreibung des Umgangs mit im Projekt entstandenen Forschungsdaten sowie Maßnahmen zur Wissenschaftskommunikation

Die erhobenen Forschungsdaten, die vor allem Messdaten und Laborwerte umfassen, wurden immer digital erfasst und regelmäßig durch die Projektmitarbeitenden und die Projektleiterin qualitativ geprüft. Eine Sicherung während des Projektverlaufs erfolgte durch entsprechende Backup-Systeme sowie sichere geteilte Speichermöglichkeiten, die auch gemeinsame Datennutzung und -bearbeitung ermöglichen (UP-Box der Universität Potsdam). Eine entsprechende Nachnutzung der erhobenen Daten ist ebenfalls gewährt. Vor allem die Daten aus den Mausinterventionsstudien sollen perspektivisch auch für die Nachnutzung durch andere zur Verfügung gestellt werden. Das Forschungsdatenmanagement der Universität Bayreuth stellt hierfür eine entsprechende Infrastruktur zur Verfügung, die die Erfassung, Verarbeitung und Sicherung von Forschungsdaten umfasst sowie die langfristige Speicherung nach Projektabschluss.

Das primäre Ziel ist es jedoch, möglichst alle erhobenen Daten im *open access* und *peer reviewed* Fachzeitschriften zu publizieren und somit der Öffentlichkeit zugänglich zu machen. Dazu zählen auch Vorträge und Seminare im Rahmen von Fachkongressen und anderen wissenschaftlichen Veranstaltungen. Ein Teil der Ergebnisse wurden auch bereits in Vorlesungen und Seminar der Projektleiterin integriert, um Studierenden als wissenschaftlichen Nachwuchs für diesen Themenkomplex zu begeistern und sie an wissenschaftliches Arbeiten heranzuführen.

3.4 Literaturverzeichnis

Das ausführliche Literaturverzeichnis befindet sich im Anhang A zum Abschlussbericht.

4 Veröffentlichte Projektergebnisse

4.1 Publikationen mit wissenschaftlicher Qualitätssicherung

- [Henkel J*](#), Coleman CD, Schraplau A, Jöhrens K, Weber D, Castro JP, Hugo M, Schulz TJ, Krämer S, Schürmann A, Püschel GP (2017): Induction of steatohepatitis (NASH) with insulin resistance in wildtype B6 mice by a western-type diet containing soybean oil and cholesterol. *Mol Med.* 2017 Mar 21;23. (doi: 10.2119/molmed.2016.00203, #)
- Püschel GP & [Henkel J](#) (2018): Cholesterol Dietary cholesterol does not break your heart but kills your liver. *Porto Biomed. J.* 2018 Aug 3(1):e12. (doi: 10.1016/j.pbj.000000000000012, #)
- [Henkel J*](#), Alfine E, Saín J, Jöhrens K, Weber D, Castro JP, König J, Stuhlmann C, Vahrenbrink M, Jonas W, Kleinridders A, Püschel GP (2018): Soybean Oil-Derived Poly-Unsaturated Fatty Acids Enhance Liver Damage in NAFLD Induced by Dietary Cholesterol. *Nutrients* 2018 Sep 18;10(9). pii: E1326 (doi: 10.3390/nu10091326, #)
- [Henkel J*](#), Coleman CD, Schraplau A, Jöhrens K, Weiss TS, Jonas W, Schürmann A, Püschel GP (2018): Augmented liver inflammation in a microsomal prostaglandin E synthase 1 (mPGES1)-deficient diet-induced mouse NASH model. *Sci Rep* 2018 Oct 31;8(1):16127 (doi:10.1038/s41598-018-34633-y, #)

- Schell M, Chudoba C, Leboucher A, Alfine E, Flore T, Ritter K, Weiper K, Wernitz A, Henkel J^{#*}, Kleinridders A[#] (2020): Interplay of dietary fatty acids and cholesterol impacts brain mitochondria and insulin action. *Nutrients*. 2020 May 23;12(5):1518. (doi: 10.3390/nu12051518, #)
- Püschel GP, Klaunder J, Henkel J^{*} (2022): Macrophages, Low-Grade Inflammation, Insulin Resistance and Hyperinsulinemia: A Mutual Ambiguous Relationship in the Development of Metabolic Diseases. *J Clin Med*. 2022 Jul 27;11(15):4358. (doi: 10.3390/jcm11154358, #)
- Kuipers S, Vahrenbrink M, Dittrich S, Schjeide BM, Schädel P, König A, Werz O, Müller J, Jöhrens K, Schulz T, Püschel GP, Henkel J^{*} (2025): Cyclooxygenase-2 deletion in macrophages amplifies diet-induced metabolic dysfunction-associated steatohepatitis in mice. Submitted in *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, Anhang B.
- Vahrenbrink M, Coleman CD, Kuipers S, Lurje I, Hammerich L, Kunkel D, Keye J, Dittrich S, Schjeide BM, Püschel GP, Henkel J^{*} (2025): Dynamic changes in macrophage populations and resulting alterations in Prostaglandin E₂ sensitivity in mice with diet-induced MASH. Submitted in *Cell Communication and Signaling*, Anhang C.

* Corresponding author

open access; Alle Veröffentlichungen erfolgen in *open access* Journalen.

4.2 Weitere Publikationen und öffentlich gemachte Ergebnisse

Kongressbeiträge mit DOI:

- Henkel J, Lieske S, Camargo RG, Schanze N, Sauer I, Birkenfeld AL, Püschel GP: The vicious circle of prostaglandin- and cytokine-dependent hepatic insulin resistance: a key role of prostaglandin E₂. *Z Gastroenterol* 2015; 53 - A1_49 (DOI: 10.1055/s-0034-1397090)
- Henkel J, Coleman CD, Jöhrens K, Kuna M, Grüner I, Püschel GP: Development of a new modified western diet to induce NASH with obesity and insulin resistance in mice. *Z Gastroenterol* 2015; 53 - A3_3 (DOI: 10.1055/s-0035-1568023)
- Wieloch J, Lemme M, Henkel J, Püschel GP: Direct impact of fructose on hepatic lipid and glycogen metabolism. *Z Gastroenterol* 2022; 60(01): e3-e4 (DOI: 10.1055/s-0041-1740655)
- Vahrenbrink M, Kuipers S, Kuna M, Schjeide BM, Dittrich S, Püschel GP, Henkel-Oberländer J: Dynamic changes in macrophage populations in MASLD and its influence on prostaglandin E₂-mediated signaling. *Z Gastroenterol* 2025; 63(01): e39-e40 (DOI: 10.1055/s-0044-1801111)

Weitere (Kongress) Beiträge:

- In den Jahren 2015 bis 2024 wurden jährlich aktuelle Ergebnisse aus dem Projekt als Vortrags- oder Posterbeitrag durch mich oder meine Doktorandinnen und Doktoranden im Rahmen der wissenschaftlichen Tagung der Deutschen Gesellschaft für Ernährung (DGE) präsentiert
- Ein Teil der Daten wurde bei öffentlichen Fachvorträgen, z.B. bei Kolloquien und wissenschaftlichen Seminaren präsentiert und diskutiert

4.3 Patente (angemeldete und erteilte)

Aus dem Projekt sind keine Patente hervorgegangen.

Literaturverzeichnis

(eigene Publikationen, die im Abschlussbericht zitiert wurden, sind farbig hervorgehoben)

1. WHO. Overweight and Obesity. 2022. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
2. Schienkiewitz A, Kuhnert R, Blume M, Mensink GB. Übergewicht und Adipositas bei Erwachsenen in Deutschland - Ergebnisse der Studie GEDA 2019/2020-EHIS 2022. doi:10.25646/10292.
3. Robert Koch-Institut. Übergewicht und Adipositas im Kindes- und Jugendalter in Deutschland – Querschnittergebnisse aus KiGGS Welle 2 und Trends: RKI-Bib1 (Robert Koch-Institut); 2018.
4. Saklayen MG. The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. *Curr Hypertens Rep.* 2018;20:12. doi:10.1007/s11906-018-0812-z.
5. Teng ML, Ng CH, Huang DQ, Chan KE, Tan DJ, Lim WH, et al. Global incidence and prevalence of nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Mol Hepatol.* 2023;29:S32-S42. doi:10.3350/cmh.2022.0365.
6. Saltiel AR. Insulin resistance in the defense against obesity. *Cell Metab.* 2012;15:798–804. doi:10.1016/j.cmet.2012.03.001.
7. Gotto AM, Blackburn GL, Dailey GE, Garber AJ, Grundy SM, Sobel BE, Weir MR. The metabolic syndrome: a call to action. *Coron Artery Dis.* 2006;17:77–80. doi:10.1097/00019501-200602000-00013.
8. Rinella ME, Lazarus JV, Ratziu V, Francque SM, Sanyal AJ, Kanwal F, et al. A multisociety Delphi consensus statement on new fatty liver disease nomenclature. *Hepatology.* 2023;78:1966–86. doi:10.1097/HEP.0000000000000520.
9. Younossi ZM, Golabi P, Paik JM, Henry A, van Dongen C, Henry L. The global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and nonalcoholic steatohepatitis (NASH): a systematic review. *Hepatology.* 2023;77:1335–47. doi:10.1097/HEP.0000000000000004.
10. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice guideline by the American Gastroenterological Association, American Association for the Study of Liver Diseases, and American College of Gastroenterology. *Gastroenterology.* 2012;142:1592–609. doi:10.1053/j.gastro.2012.04.001.
11. Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011;34:274–85. doi:10.1111/j.1365-2036.2011.04724.x.
12. Conlon BA, Beasley JM, Aebersold K, Jhangiani SS, Wylie-Rosett J. Nutritional management of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Nutrients.* 2013;5:4093–114. doi:10.3390/nu5104093.
13. Loomba R, Sanyal AJ. The global NAFLD epidemic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2013;10:686–90. doi:10.1038/nrgastro.2013.171.
14. Brunt EM, Wong VW-S, Nobili V, Day CP, Sookoian S, Maher JJ, et al. Nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Dis Primers.* 2015;1:15080. doi:10.1038/nrdp.2015.80.
15. Dowman JK, Tomlinson JW, Newsome PN. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *QJM.* 2010;103:71–83. doi:10.1093/qjmed/hcp158.
16. Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology.* 2006;43:S99-S112. doi:10.1002/hep.20973.
17. Lim JS, Mietus-Snyder M, Valente A, Schwarz J-M, Lustig RH. The role of fructose in the pathogenesis of NAFLD and the metabolic syndrome. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2010;7:251–64. doi:10.1038/nrgastro.2010.41.
18. Longato L. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a tale of fat and sugar? *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2013;6:14. doi:10.1186/1755-1536-6-14.

19. Serhan CN, Levy B. Success of prostaglandin E2 in structure-function is a challenge for structure-based therapeutics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:8609–11. doi:10.1073/pnas.1733589100.
20. Sugimoto Y, Narumiya S. Prostaglandin E receptors. *J Biol Chem*. 2007;282:11613–7. doi:10.1074/jbc.R600038200.
21. Dieter P, Scheibe R, Bezugla Y, Matthé E, Schuch S, Treffkorn L, et al. The regulatory role of prostaglandin E2 in liver (patho) physiology is controlled at its site of synthesis and its action on the receptors. *Comp Hepatol*. 2004;3 Suppl 1:S35. doi:10.1186/1476-5926-2-S1-S35.
22. Hespeling U, Jungermann K, Püschel GP. Feedback-inhibition of glucagon-stimulated glycogenolysis in hepatocyte/Kupffer cell cocultures by glucagon-elicited prostaglandin production in Kupffer cells. *Hepatology*. 1995;22:1577–83.
23. Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science*. 2001;294:1871–5. doi:10.1126/science.294.5548.1871.
24. Breinig M, Rieker R, Eiteneuer E, Wertenbruch T, Haugg AM, Helmke BM, et al. Differential expression of E-prostanoid receptors in human hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*. 2008;122:547–57. doi:10.1002/ijc.23098.
25. Tilley SL, Coffman TM, Koller BH. Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *J Clin Invest*. 2001;108:15–23. doi:10.1172/JCI13416.
26. Zhou Y, Khan H, Xiao J, Cheang WS. Effects of Arachidonic Acid Metabolites on Cardiovascular Health and Disease. *Int J Mol Sci* 2021. doi:10.3390/ijms222112029.
27. Murakami M, Kudo I. Recent advances in molecular biology and physiology of the prostaglandin E2-biosynthetic pathway. *Prog Lipid Res*. 2004;43:3–35. doi:10.1016/s0163-7827(03)00037-7.
28. Ricciotti E, FitzGerald GA. Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31:986–1000. doi:10.1161/ATVBAHA.110.207449.
29. Sampey AV, Monrad S, Crofford LJ. Microsomal prostaglandin E synthase-1: the inducible synthase for prostaglandin E2. *Arthritis Res Ther*. 2005;7:114–7. doi:10.1186/ar1748.
30. Samuelsson B, Morgenstern R, Jakobsson P-J. Membrane prostaglandin E synthase-1: a novel therapeutic target. *Pharmacol Rev*. 2007;59:207–24. doi:10.1124/pr.59.3.1.
31. Das UN. Essential Fatty Acids and Their Metabolites in the Pathobiology of Inflammation and Its Resolution. *Biomolecules*. 2021;11:1873. doi:10.3390/biom11121873.
32. Cheng H, Huang H, Guo Z, Chang Y, Li Z. Role of prostaglandin E2 in tissue repair and regeneration. *Theranostics*. 2021;11:8836–54. doi:10.7150/thno.63396.
33. [Henkel J, Coleman CD, Schraplau A, Jöhrens K, Weiss TS, Jonas W, et al. Augmented liver inflammation in a microsomal prostaglandin E synthase 1 \(mPGES-1\)-deficient diet-induced mouse NASH model. *Sci Rep*. 2018;8:16127. doi:10.1038/s41598-018-34633-y.](#)
34. Giannitrapani L, Ingraio S, Soresi M, Florena AM, La Spada E, Sandonato L, et al. Cyclooxygenase-2 expression in chronic liver diseases and hepatocellular carcinoma: an immunohistochemical study. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1155:293–9. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.03698.x.
35. Möhlig M, Freudenberg M, Bobbert T, Ristow M, Rochlitz H, Weickert MO, et al. Acetylsalicylic acid improves lipid-induced insulin resistance in healthy men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91:964–7. doi:10.1210/jc.2005-1889.
36. Hundal RS, Petersen KF, Mayerson AB, Randhawa PS, Inzucchi S, Shoelson SE, Shulman GI. Mechanism by which high-dose aspirin improves glucose metabolism in type 2 diabetes. *J. Clin. Invest*. 2002;109:1321–6. doi:10.1172/JCI14955.
37. González-Ortiz M, Martínez-Abundis E, Balcázar-Muñoz BR, Robles-Cervantes JA. Inhibition of cyclooxygenase-1 or -2 on insulin sensitivity in healthy subjects. *Horm Metab Res*. 2001;33:250–3. doi:10.1055/s-2001-14949.

38. González-Ortiz M, Pascoe-González S, Esperanzamartínez-Abundis, Kam-Ramos AM, Hernández-Salazar E. Effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2-specific inhibitor, on insulin sensitivity, C-reactive protein, homocysteine, and metabolic profile in overweight or obese subjects. *Metab Syndr Relat Disord.* 2005;3:95–101. doi:10.1089/met.2005.3.95.
39. Sanches SCL, Ramalho LNZ, Augusto MJ, da Silva DM, Ramalho FS. Nonalcoholic Steatohepatitis: A Search for Factual Animal Models. *Biomed Res Int.* 2015;2015:574832. doi:10.1155/2015/574832.
40. Reid DT, Eksteen B. Murine models provide insight to the development of non-alcoholic fatty liver disease. *Nutr Res Rev.* 2015;28:133–42. doi:10.1017/S0954422415000128.
41. Henkel J, Coleman CD, Schraplau A, Jöhrens K, Weber D, Castro JP, et al. Induction of steatohepatitis (NASH) with insulin resistance in wildtype B6 mice by a western-type diet containing soybean oil and cholesterol. *Mol Med.* 2017;23:70–82. doi:10.2119/molmed.2016.00203.
42. Henkel J, Alfine E, Saín J, Jöhrens K, Weber D, Castro JP, et al. Soybean Oil-Derived Poly-Unsaturated Fatty Acids Enhance Liver Damage in NAFLD Induced by Dietary Cholesterol. *Nutrients* 2018. doi:10.3390/nu10091326.
43. Schell M, Chudoba C, Leboucher A, Alfine E, Flore T, Ritter K, Henkel J et al. Interplay of Dietary Fatty Acids and Cholesterol Impacts Brain Mitochondria and Insulin Action. *Nutrients* 2020. doi:10.3390/nu12051518.
44. Ishikawa T-O, Oshima M, Herschman HR. Cox-2 deletion in myeloid and endothelial cells, but not in epithelial cells, exacerbates murine colitis. *Carcinogenesis.* 2011;32:417–26. doi:10.1093/carcin/bgq268.
45. Postic C, Magnuson MA. DNA excision in liver by an albumin-Cre transgene occurs progressively with age. *Genesis.* 2000;26:149–50. doi:10.1002/(sici)1526-968x(200002)26:2<149::aid-gene16>3.0.co;2-v.
46. Clausen BE, Burkhardt C, Reith W, Renkawitz R, Förster I. Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res.* 1999;8:265–77. doi:10.1023/a:1008942828960.
47. Devisscher L, Scott CL, Lefere S, Raevens S, Bogaerts E, Paridaens A, et al. Non-alcoholic steatohepatitis induces transient changes within the liver macrophage pool. *Cell Immunol.* 2017;322:74–83. doi:10.1016/j.cellimm.2017.10.006.