

Aus der
Kinderklinik und Kinderpoliklinik
im Dr. von Haunerschen Kinderspital
Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Dr. Christoph Klein

***Expression von Interleukin-37
bei autoimmunen Lebererkrankungen im Kindes- und
Jugendalter***

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Lucas Griessmair

aus

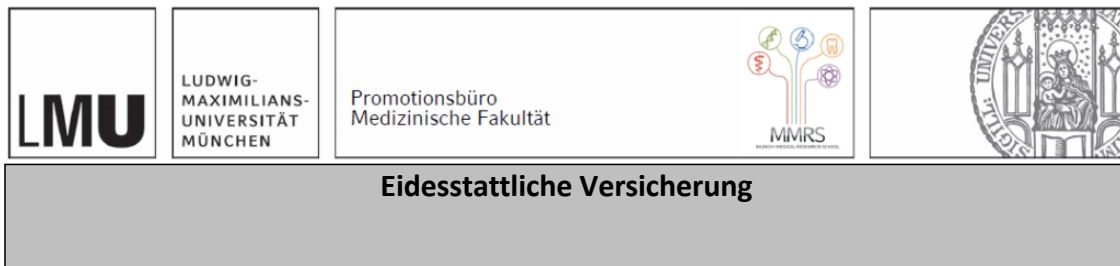
München

Jahr

2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Philip Bufler
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Alexander L. Gerbes PD Dr. Jutta Nagel
Dekan:	Prof. Dr. Thomas Gudermann
Tag der mündlichen Prüfung:	09.11.2023

Affidavit

Griessmair, Lucas
Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

**Expression von Interleukin-37
bei autoimmunen Lebererkrankungen im Kindes- und Jugendalter**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Berlin, 13.12.2023
Ort, Datum

Lucas Griessmair
Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

Inhaltsverzeichnis

Affidavit	3
Abkürzungsverzeichnis (alphabetisch).....	5
Publikationsliste.....	6
Erklärung zu den Eigenanteilen	6
Publikation 1	6
Publikation 2	7
Einleitung.....	8
1. Übersicht.....	8
2. Autoimmune Lebererkrankungen im Kindes- und Jugendalter	8
2.1. Primär sklerosierende Cholangitis	8
2.2. Autoimmunhepatitis	10
2.3. Autoimmun sklerosierende Cholangitis	10
3. Leberinflammation und Leberfibrose	11
4. Zytokine und Liganden der Interleukin-1-Familie.....	11
5. Interleukin-37	12
5.1. Entdeckung und Struktur	12
5.2. IL-37, ein Zytokin mit intra- und extrazellulärem Wirkort.....	12
5.3. Funktionelle Bedeutung von IL-37 in humanen peripheren mononukleären Blutzellen und transfizierten Zelllinien	13
5.4. Funktionelle Bedeutung von IL-37 in Mausmodellen	13
5.5. Studien im Menschen zur Expression von IL-37.....	15
6. Hypothese und Zielsetzungen der vorgestellten Arbeiten	15
7. Visueller Überblick.....	17
Zusammenfassung.....	18
Abstract	19
Literaturverzeichnis	20
Danksagung	26

Abkürzungsverzeichnis (alphabetisch)

AILD	(engl. Autoimmune liver disease) Autoimmune Lebererkrankungen
AIH	Autoimmunhepatitis
ASC	Autoimmun sklerosierende Cholangitis
ANA	Anti-nukleäre Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
ConA	Concanavalin A
CU	Colitis ulcerosa
DC	(engl. Dendritic cells) Dendritische Zellen
DAMPs	(engl. Damage-associated molecular patterns) Alarmine
DNA	(engl. Desoxyribonucleic Acid) Desoxyribonukleinsäure
DSS	2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonsäure
ECM	(engl. Extracellular matrix) Extrazelluläre Matrix
ERCP	Endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie
GM-CSF	(engl. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
GT	Glutamyl-Transferase
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HSC	(engl. Hepatic stellate cells) Hepatische Sternzellen
IgG	Immunglobulin G, Gammaglobulin
IFN	Interferon
IL-	Interleukin
(IL-1)F	-Familie
(IL-1)R	-Rezeptor
(IL-1)RA	-Rezeptor-Antagonist
(IL-18)BP	-Bindeprotein
KC	(engl. Kupffer cells) Kupfferzellen
(anti-)LKM	(engl. Liver kidney microsome) Leber-Nieren-Mikrosom
LPS	Lipopolysaccharide
MC	Morbus Crohn
MIP	engl. Macrophage inflammatory protein
MRCP	Magnetresonanz-Cholangiopankreatikographie
PBMC	(engl. Peripheral blood mononuclear cell) Periphere mononukleäre Blutzellen
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
RNA	(engl. Ribonucleic acid) Ribonukleinsäure
si-	small interfering-
m-	messenger-
(anti-) SMA	(engl. Smooth muscle antibody) Antikörper gegen glatte Muskulatur
Smad	engl. Sma and Mad-related proteins
SIGIRR	engl. single immunoglobulin IL-1-related receptor
TGF	(engl. Transforming growth factor) Transformierender Wachstumsfaktor
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor

Publikationsliste

Publikation 1:

Griessmair L, Pirringer L, Mountford S, Sendelhofert A, Makeschin MC, Koletzko S, Mayr D, Bufler P. Expression of IL-37 Correlates With Immune Cell Infiltrate and Fibrosis in Pediatric Autoimmune Liver Diseases. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2022;74:742-49.

DOI: 10.1097/MPG.0000000000003443

Publikation 2:

Mountford S, Effenberger M, Noll-Puchta H, Griessmair L, Ringleb A, Haas S, Denk G, Reiter FP, Mayr D, Dinarello CA, Tilg H, Bufler P. Modulation of Liver Inflammation and Fibrosis by Interleukin-37. *Front Immunol* 2021;12:603649.

DOI: 10.3389/fimmu.2021.603649

Erklärung zu den Eigenanteilen

Der Verfasser (Lucas Griessmair, LG) dieser Promotionsarbeit ist Erstautor der Publikation 1 und Ko-Autor der Publikation 2. Der Leistungsanteil an der Publikation 1 nimmt dementsprechend mehr Raum ein als an der zweiten, vorgelegten Publikation. Die Eigenanteile werden im Folgenden dargelegt.

Publikation 1

LG erweiterte die von Ko-Doktorandin Laura Pirringer etablierte Datenbank von Kindern und Jugendlichen mit autoimmunen Lebererkrankungen. Dies beinhaltete den Einschluss weiterer Patienten und die Ergänzung der Patientendaten nach kritischer Durchsicht der klinischen und histologischen Befunde. In Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie der Ludwig-Maximilians-Universität München (Prof. Dr. Doris Mayr) erfolgte die Auswahl der Marker für die immunhistochemischen Färbungen des Entzündungsinfiltrates. LG bereitete die histologischen Schnitte für die automatisierte Färbung am Institut für Pathologie vor und entwickelte die objektive Auswertestrategie der Färbungen nach eigenhändiger Digitalisierung der gefärbten, histologischen Präparate mit dem EDV-Programm *Image J*. Die immunhistochemische Färbung gegen IL-37 als Immunfluoreszenz-Methode erfolgte durch LG. Die Planung, Etablierung und Durchführung der Doppelfärbungen erfolgten ebenfalls durch LG im Labor der Arbeitsgruppe Bufler, ebenso wie die Anfertigung der digitalisierten histologischen Bilder. Die Verfassung und Einreichung des Manuskriptes erfolgte in enger Zusammenarbeit von LG und dem Erstbetreuer Prof. Dr. Philip Bufler.

Publikation 2

LG leistete beratende und technische Unterstützung bei der Planung, Durchführung und Auswertung der histologischen Färbungen an Lebergewebe von Mäusen. Hierunter fielen die Auswahl der Chemikalien und Vorbereitungen der Schnitte für die Färbungen im eigenen Labor der Arbeitsgruppe, die Auswahl der Antikörper für die Färbungen sowie die Durchführung der Färbungen gemeinsam mit Dr. Steffeni Mountford, Heidi Noll-Puchta und Andrea Ringleb. Die Digitalisierung und Erstellung der histologischen Fotos wurden analog zu der Methodik in Publikation 1 angewendet. LG beteiligte sich am Verfassen des Manuskripts einschließlich kritischer Durchsicht vor Einreichung.

Einleitung

1. Übersicht

Chronische Entzündungsvorgänge der Leber führen bei Kindern und Erwachsenen zu fortschreitender Leberfibrose, Leberzirrhose und letztlich zum Organversagen. Die Therapie der Grunderkrankung, beispielsweise die Viruselimination bei chronischer Hepatitis C oder die antientzündliche Therapie bei autoimmunen Lebererkrankungen im Kindesalter, die Fokus dieser Arbeit sind, kann lediglich die Inflammation als Auslöser der Leberfibrose unterdrücken. Die direkte Modulation beziehungsweise Hemmung der Leberfibrogenese durch Medikamente ist derzeit noch nicht möglich. Die Induktion der Leberfibrose basiert auf dem komplexen Zusammenspiel zellulärer und humoraler Faktoren, in dem Zytokine der Interleukin-1-Familie eine wichtige Rolle spielen. Dieser Familie gehört auch Interleukin-37 (IL-37) an, dem als hemmendes Zytokin angeborener und erworbener Immunmechanismen vermutlich auch in der Leberfibrogenese eine funktionelle Rolle zukommt.

In der folgenden Einleitung werden die oben angeschnittenen Themengebiete als Grundlage für die vorgestellten Arbeiten, sowie die zugrunde liegenden Hypothesen vorgestellt.

2. Autoimmune Lebererkrankungen im Kindes- und Jugendalter

Pädiatrische autoimmune Lebererkrankungen (engl. Autoimmune liver diseases, AILD) haben unbehandelt einen ungünstigen Verlauf mit raschem Fortschreiten von Inflammation zu Leberfibrose bis hin zum Leberversagen und dem erhöhten Risiko maligner Entartung. Gleichzeitig vorliegende Lebererkrankungen wie die nichtalkoholische Fettlebererkrankung als Confounder sind bei Kindern seltener als bei Erwachsenen [1]. Aus diesen Gründen eignen sich kindliche AILD besonders für Untersuchungen zur entzündlichen Pathogenese der Leberfibrose. In dieser Arbeit werden AILD in drei Entitäten eingeteilt: Primär sklerosierende Cholangitis (PSC), Autoimmunhepatitis (AIH) und als *Overlap*-Erkrankung die autoimmun sklerosierende Cholangitis (ASC).

2.1. Primär sklerosierende Cholangitis

Die primär sklerosierende Cholangitis (PSC) ist eine seltene, chronisch fortschreitende, fibrosierende Erkrankung der intra- und extrahepatischen Gallenwege [2]. Die Prävalenz ist regional unterschiedlich und erreicht je nach Studie bis zu 16/100.000 Einwohnern [3]. Klinisch präsentiert sich die PSC vor allem im frühen Krankheitsstadium asymptomatisch oder unspezifisch. Mögliche Symptome sind chronische Müdigkeit, rechtsseitige Oberbauchschmerzen, Juckreiz oder Gewichtsverlust. Symptome einer (terminalen) Leberinsuffizienz wie Enzephalopathie, Aszites oder Ösophagusvarizen können im späteren Verlauf auftreten. Laborchemisch imponieren erhöhte Cholestaseparameter wie alkalische Phosphatase (AP), Gamma-Glutamyl-Transferase (γ GT) oder direktes Bilirubin.

Die Diagnose kann durch Bildgebung mittels Magnetresonananz-Cholangiopankreatikographie (MRCP) oder endoskopisch retrograder Cholangiopankreatikographie (ERCP) gestellt werden, falls die großen Gallenwege betroffen sind. Typisch sind Kalibersprünge oder Abbrüche der dargestellten Gallenwege. Veränderungen der kleinen Gallenwege (engl. Small duct disease) sind hingegen nur durch eine Leberbiopsie diagnostizierbar, welche auch dann erforderlich wird, wenn andere Lebererkrankungen oder eine begleitende Autoimmunhepatitis ausgeschlossen werden sollen [4]. Histologisch zeigt sich eine periduktale, „zwiebelschalenartige“ Fibrose, begleitet von einem gemischtzelligen Entzündungsinfiltrat mit Lymphozyten, Plasmazellen und Granulozyten in den umliegenden Portalfeldern. Bei fortgeschrittener Erkrankung tritt ein fibrotischer oder zirrhotischer Umbau der Leberarchitektur auf [2]. Aufgrund des wenig spezifischen Entzündungsinfiltrates ist die Abgrenzung zu anderen entzündlichen Lebererkrankungen bisweilen schwierig. Ein spezifischer Auslöser der ätiologisch multifaktoriellen Erkrankung wurde bisher nicht ausgemacht. Diskutiert werden eine genetische Disposition in Form einer Assoziation mit dem humanen Leukozyten-Antigen-System (HLA). Hier scheint HLA-B am relevantesten zu sein, aber auch für Einflüsse von Klasse II finden sich Hinweise [5]. Eine Dysbiose des Darms in Verbindung mit der *leaky-gut*-Theorie als potenzieller Auslöser erscheint möglich, ebenso wie der Einfluss von Lebensstilfaktoren, welcher durch regionale Unterschiede in der Häufigkeit der Erkrankung naheliegt [2].

Die PSC hat eine starke Assoziation mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED). In einer multizentrischen Studie waren 76% der Kinder mit PSC auch von einer CED betroffen, Colitis ulcerosa (CU) trat dabei deutlich häufiger als Morbus Crohn (MC) auf (83% vs. 17%) [6]. Eine ähnliche Verteilung zeigt sich in unserem Patientenkollektiv. CU-Patienten mit gleichzeitig auftretender PSC haben einen spezifischen klinischen Phänotyp (CED-PSC). Im Gegensatz zur solitären CU treten häufiger Rechtsseitenkolitis, Pankolitis, *Backwash*-Ileitis und Aussparung der Schleimhautentzündung im Rektum auf. Meist ist bei CED-PSC-Patienten die allgemeine Entzündungsaktivität des Kolons milder [7]. Das Risiko für die Ausbildung eines kolorektalen Karzinoms ist bei gleichzeitigem Vorliegen einer PSC jedoch erhöht [8].

Für die PSC existiert bis dato keine kurative Therapie. Die verbreitet angewendete Therapie mit Ursodesoxycholsäure kann die Langzeitprognose nicht verbessern und die Therapie mit Immunsuppressiva oder -modulatoren zeigt keinen Vorteil. Die einzige definitive Heilungsmöglichkeit besteht in der Lebertransplantation, wobei das Risiko für ein Rezidiv der Erkrankung im Spenderorgan bis zu 25% beträgt [4]. Die Überlebensrate ohne Transplantation beträgt bei Kindern 70% nach 10 Jahren und ist damit höher als bei Erwachsenen. PSC-Patienten weisen ein signifikant höheres Risiko für die Entwicklung cholangiozellulärer

Karzinome auf, das 10-Jahresrisiko beträgt für Erwachsene bis zu 9% [9] und bei Kindern 1% [6].

2.2. Autoimmunhepatitis

Die Autoimmunhepatitis (AIH) ist eine entzündliche Lebererkrankung autoimmuner Genese, die durch ein typisches Entzündungsmuster des Leberparenchyms, erhöhte Transaminasen, eine Hypergammaglobulinämie (erhöhtes IgG im Serum) sowie dem Auftreten bestimmter Autoantikörper charakterisiert ist.

In Mittel- und Nordeuropa liegt die Prävalenz der AIH bei 1,07-1,9/100.000 Einwohnern. Basierend auf dem Autoantikörperprofil ergeben sich zwei Unterformen der kindlichen AIH: Typ 1 ist definiert durch den Nachweis anti-nukleärer Antikörper (ANA) und/oder Antikörpern gegen glatte Muskulatur (anti-SMA); Typ 2 ist definiert durch den Nachweis von Leber-Nieren-Mikrosomen-Antikörpern (anti-LKM). Bei kindlicher AIH sind die Serumtiter der Autoantikörper häufig niedriger als bei Erwachsenen und können in seltenen Fällen auch nicht detektierbar sein. Die Erkrankung kann sich in allen Altersgruppen manifestieren, das Geschlechterverhältnis (♀:♂) beträgt für Typ 1 4:1 und für Typ 2 10:1. Typ 2 tritt tendenziell in jüngerem Lebensalter auf, verläuft schwerer und kann zu akutem Leberversagen führen. Das klinische Erscheinungsbild der AIH ist generell variabel und reicht von unspezifischen Symptomen wie Gewichtsverlust, Müdigkeit, Oberbauchschmerzen, Juckreiz, Gelenkschmerzen oder Hautausschlägen bis zu Symptomen des terminalen Leberversagens [10]. Charakteristische histologische Veränderungen sind Grenzzonenhepatitis mit lymphoplasmazellulären Infiltraten [11].

Es existieren verschiedene Scores zur Diagnosestellung; in unserer Arbeit verwenden wir den vereinfachten AIH-Score (engl. Simplified AIH-Score) [12]. Die AIH spricht in der Regel gut auf eine immunmodulatorische Therapie an, wobei diese aufgrund von Rezidiven langfristig erfolgen muss. Eine Remission wird in 85% der Fälle erreicht. Die Langzeitprognose ist günstiger als bei der PSC, das 10-Jahres-Gesamt-Überleben beträgt über 90%, sogar im Falle einer zum Diagnosezeitpunkt bereits vorliegenden Leberfibrose. Dennoch sind fulminante oder therapieresistente Verläufe möglich, die eine Lebertransplantation erforderlich machen [10].

2.3. Autoimmun sklerosierende Cholangitis

Die autoimmun sklerosierende Cholangitis (ASC) ist die Mischform (engl. Overlap) zwischen PSC und AIH und wird vor allem bei Kindern beobachtet [13, 14]. Zusätzlich zu den die PSC definierenden makroskopischen oder mikroskopischen Gallenwegveränderungen zeigen sich histologisch eine AIH-typische Grenzzonenhepatitis und serologische Veränderungen wie erhöhte Transaminasen mit positivem Nachweis von Autoantikörpern [6, 15]. In einer großen multizentrischen Kohortenstudie wiesen bis zu 33% der Kinder und Jugendlichen mit PSC

AIH-typische Veränderungen auf [6]. Umgekehrt waren bei bis zu 50% der pädiatrischen AIH-Patienten Gallengangsveränderungen feststellbar [13]. Die Gesamtprognose der ASC ist dabei mit der PSC vergleichbar. Die korrekte Diagnosestellung einer ASC ist von klinischer Bedeutung, da eine immunsupprimierende Therapie effektiv die AIH-Komponente der ASC behandeln und den Krankheitsverlauf vermutlich positiv beeinflussen kann [16, 17].

3. Leberinflammation und Leberfibrose

Die Leberfibrose ist die Wundheilungsreaktion auf eine Leberschädigung jedweder Genese, sei sie toxischen, viralen oder autoimmunen Ursprungs [18]. Chronische Inflammation induziert die Ausschüttung extrazellulärer Matrixproteine (ECM) durch spezialisierte Immunzellen der Leber wie Myofibroblasten, die sich durch Transdifferenzierung aus hepatischen Sternzellen (HSC) entwickeln [19]. Die morphologischen Veränderungen durch die Ablagerung von ECM werden als Leberfibrose und im fortgeschrittenen, irreversiblen Stadium als Leberzirrhose bezeichnet. Das Vorliegen einer Leberzirrhose erhöht das Risiko für eine nachfolgende maligne Entartung um ein Vielfaches. Die exakten Signalwege, die zu Leberinflammation und Fibrose führen, sowie deren therapeutische Modulation sind bis heute nicht vollständig verstanden [20, 21]. In dieser Arbeit konzentrieren wir uns auf Mechanismen im Fibroseprozess, die möglicherweise durch Interleukin-37 moduliert werden. Auf zellulärer Ebene sind dies leberständige Zellen wie HSC, Kupfferzellen (KC), Hepatozyten und Cholangiozyten, sowie infiltrierende Immunzellen wie verschiedene Subtypen von Lymphozyten [20].

Für die Produktion von extrazellulärer Matrix (ECM) erfüllen HSC eine zentrale Funktion [19, 22]. HSC werden unter anderem durch KC zur Deposition extrazellulärer Matrixproteine angeregt, mediiert durch den Signalweg des transformierenden Wachstumsfaktor- β (TGF- β) [23]. TGF- β ist das am stärksten pro-fibrotisch wirkende Zytokin und entfaltet intrazellulär seine Wirkung über *Sma and Mad-related proteins* (Smad), unter anderem Smad3 [24]. Smad3 fungiert normalerweise als pro-fibrogenetisches Effektormolekül, welches als intranukleärer Transkriptionsfaktor die Fibrogenese aktivierenden Gene reguliert. Eine Depletion von Smad3 hat anti-fibrotische Effekte. Es existieren verschiedene Phosphorylierungsvarianten, von denen vor allem pSmad3L im inflammatorischen Milieu vorherrschend ist [25].

4. Zytokine und Liganden der Interleukin-1-Familie

Zytokine sind Polypeptide, die als immunologische Botenstoffe mannigfaltige Wirkung auf die jeweiligen Zielzellen entfalten. Interleukine sind eine Unterfamilie der Zytokine [26]. Hierunter befinden sich die Zytokine der Interleukin-1-Familie (IL-1F), wichtige Moleküle angeborener und erworbener Immunmechanismen. [27]. 10 Zytokine und 11 Rezeptoren der IL-1F sind derzeit bekannt. Die Rezeptoren der IL-1F weisen Ähnlichkeiten zu Toll-Like-Rezeptoren

(TLR) auf, da beide Gruppen eine charakteristische, zytosolische TLR-Domäne aufweisen. TLR erkennen Antigene wie Bakterien, Viren, Nukleinsäuren und Alarmine (engl. Damage-associated molecular patterns, DAMPs) und leiten Signale der Inflammation nach intrazellulär weiter. Zytokine der IL-1 Familie können pro-inflammatorisch, anti-inflammatorisch oder beides wirken, abhängig von der Bindung an bestimmte Rezeptoren [27]. IL-1 β wurde als erstes Interleukin beschrieben und moduliert in der Leber die Expression von Entzündungs- und Fibrose-auslösenden Genen [28]. IL-1 β wird durch proteolytische Abspaltung eines N-terminalen Peptids aktiviert. Die verantwortliche Protease *Interleukin-1-converting enzyme* bzw. Caspase-1 wird ähnlich der Gerinnungskaskade durch das sogenannte Inflammasom als zentrale Komponente zur Reifung und Freisetzung von IL-1 β aktiviert [29]. Die Aktivierung des Inflammasoms fördert die alkoholtoxisch induzierte Leberfibrose [30], während die Blockade von IL-1 β alkoholinduzierten Leberzellschaden reduziert [31]. In Modellen der nicht-alkoholischen Steatohepatitis (NASH) wurde gezeigt, dass IL-1 β die Entwicklung von Steatohepatitis und Fibrose fördert [32]. *Vice versa* wiesen IL-1 α und IL-1 β -defiziente Mäuse im Modell mit Hypercholesterinämie weniger Fibrose auf. Die IL-1 α -Defizienz in Mäusen resultierte in niedrigeren Werten von TGF- β und anderen pro-fibrotischen Zytokinen im Diät-induzierten Steatosismodell [33]. IL-33, ein weiteres Mitglied der IL-1-Zytokinfamilie, hat *in vivo* pro-fibrotischen Einfluss in Maus-Lebermodellen [34].

5. Interleukin-37

5.1. Entdeckung und Struktur

IL-37 (vormals bekannt als IL-1F7b) ist ein Zytokin der IL-1F und wurde im Jahr 2000 von verschiedenen unabhängigen Gruppen durch *in silico*-Forschung entdeckt [35]. Das Gen für IL-37 ist auf dem langen Arm des humanen Chromsoms 2q13 lokalisiert [36]. Es existieren fünf verschiedene Spleißformen, von denen IL-37b die längste und am weitesten erforschte Form ist. Sie enthält die Exons 1,2,4,5 und 6 der insgesamt sechs Exons [37]. Die Exons 1 und 2 formen eine N-terminale Prodomäne und beinhalten wie IL-1 β eine Caspase-1-Schnittstelle. Die Exons 4 bis 6 kodieren für die IL-1F-typische β -Faltblattstruktur [38].

5.2. IL-37, ein Zytokin mit intra- und extrazellulärem Wirkort

IL-37 entfaltet seine anti-inflammatorische Wirkung durch die Hemmung pro-inflammatorischer und die Aktivierung anti-inflammatorischer Signalwege. Dabei hat IL-37 ähnlich wie IL-1 α und IL-33 sowohl intra- als auch extrazelluläre Funktionalität [39, 40]. IL-37 wird sezerniert und bindet an die α -Kette des IL-18-Rezeptors (IL-18R) an der Zellmembran. Anders als IL-18 rekrutiert IL-37 jedoch nicht den IL-18R β als signaltransduzierende Rezeptorkette, sondern IL-1R8 (auch *single immunoglobulin IL-1R-related molecule*, SIGIRR) [40-42]. Versuche *in vivo* und *in vitro* zeigen, dass der bislang als *orphan receptor* beschriebene IL-1R8 für die

Vermittlung der anti-inflammatorischen Wirkung von IL-37 benötigt wird [42, 43]. Extrazelluläres IL-37 bindet außerdem an das IL-18-Bindungsprotein (IL-18BP). IL-18BP ist der natürliche Inhibitor von IL-18 und verhindert die Bindung von IL-18 an den Rezeptor [44]. Der aus IL-37 und IL-18BP bestehende Komplex hemmt durch konkurrierende Bindung an den IL-18R β die pro-inflammatorische Aktivität von IL-18 [41]. IL-37 bildet spontan Homo- oder Heterodimere [38, 45], wobei für IL-37 als Monomer eine größere anti-inflammatorische Wirkung gezeigt wurde [46]. Die Homo- oder Heterodimerisierung tritt bei erhöhter Proteinkonzentration von IL-37 ein und trägt damit zur Regulation der IL-37-Aktivität bei [47]. Intrazellulär transloziert IL-37 nach Caspase-1-induzierter Abspaltung eines N-terminalen Propeptids in den Zellkern [40]. Die Inaktivierung der Caspase-1-Spaltstelle hemmt die Translokation von IL-37 in den Zellkern und damit die Eigenschaft zur Unterdrückung der Expression pro-inflammatorischer Zytokine [48, 49]. Intrazelluläres IL-37 bindet an Smad3, eine Kinase des TGF- β -Signalweges mit zentraler funktioneller Bedeutung [42, 50]. Der *Knock-down* von Smad3 durch *small interfering* Ribonukleinsäure (siRNA) oder die Zugabe eines Smad3-Inhibitors hemmt die anti-inflammatorische Wirkung von IL-37 [51].

5.3. Funktionelle Bedeutung von IL-37 in humanen peripheren mononukleären Blutzellen und transfizierten Zelllinien

IL-37 wird in humanen peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) und insbesondere in Monozyten, T-Zellen und myeloischen dendritischen Zellen (engl. *Dendritic cells*, DC) exprimiert [41, 52, 53]. Die Expression von IL-37 wird in humanen PBMC durch verschiedene proinflammatorische Mediatoren und Zytokine wie Lipopolysaccharid (LPS), Pam3CSK4, TGF- β , IL-18, Interferon gamma (IFN- γ), IL-1 β , Tumornekrosefaktor (TNF) und CpG induziert, während sie durch IL-4 und Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor (GM-CSF) gehemmt wird [51]. Die Hemmung der IL-37-Expression in humanen PBMC mittels siRNA steigert die Ausschüttung von IL-1 β , IL-6 und TNF nach Stimulation mit LPS [51]. Die Überexpression von humanem IL-37 in einer murinen Makrophagenzelllinie führt dagegen zur beinahe vollständigen Unterdrückung der pro-inflammatorischen Immunantwort [48, 51]. In PBMC von Patienten mit rheumatoider Arthritis, systemischem Lupus erythematodes und ankylosierender Spondylitis inhibiert rekombinantes IL-37-Protein die Expression von TNF- α , IL-6, IL-17 und IL-23 [54, 55].

5.4. Funktionelle Bedeutung von IL-37 in Mausmodellen

Bis heute wurde in Mäusen kein Ortholog zu humanem IL-37 (hIL-37) identifiziert [37, 47]. Um die *in vivo* Funktion von IL-37 im Rahmen von Entzündungsmodellen zu untersuchen, etablierte die Arbeitsgruppe um Charles A. Dinarello eine transgene Mauslinie, die humanes IL-37 unter der Transkriptionskontrolle des Promotors des Cytomegalievirus exprimiert [51].

Darüber hinaus wurden Krankheitsmodelle in Mäusen durchgeführt, denen rekombinantes hIL-37-Protein (rhIL-37) oder IL-37-exprimierendes Plasmid zur in vivo Expression verabreicht wurde.

Zusammengefasst schützt IL-37 Mäuse vor systemischer und organspezifischer Inflammation. Nach durch LPS-induziertem Schock weisen IL-37tg Mäuse eine deutlich geringere systemische Inflammation mit geringerer Endorganschädigung von Lunge und Leber im Vergleich zu Wildtyp (WT)-Mäusen auf [51]. Die intraperitoneale Verabreichung von rhIL-37 verbessert bei Mäusen, die systemischer Inflammation ausgesetzt sind deren motorische Ausdauer, dabei ist eine Reduktion pro-inflammatorischer Plasma- und Muskelzytokine, ähnlich wie nach IL-1-Blockade, feststellbar [56].

Im kardialen Ischämie-Reperfusion-Modell zeigen sich nach Verabreichung von rhIL-37 geringere Infarktgrößen, niedrigere Troponin T-Werte und bessere Herzfunktion. Im Myokard waren nach rhIL-37-Applikation histologisch geringere Infiltration neutrophiler Granulozyten feststellbar, was ein anti-inflammatorischeres Zytokinprofil und eine reduzierte Apoptoserate in Kardiomyozyten nach sich zog [57].

Nach Schädigungen des zentralen Nervensystems wirkt IL-37 protektiv. IL-37tg Mäuse weisen nach Rückenmarksverletzung eine geringere myeline Inflammation und Bewegungsdefizite auf [58]. Nach zerebraler Ischämie und Reperfusion sind die Konzentrationen pro-inflammatorischer Zytokine in IL-37tg Mäusen ebenfalls niedriger als in Wildtyp-Mäusen korrelierend mit geringerer Infarktgröße und reduzierter neurologischer Einschränkung [59]. IL-37tg Mäuse zeigen nach chemisch induzierter (mit dextran sulfate sodium, DSS) Kolitis bessere klinische und histologische Scores [60].

IL-37 kann im Mausmodell Entzündungsvorgänge allergischer Genese positiv beeinflussen. In einem kutanen Hypersensitivitätstest zeigte sich in IL-37tg Mäusen eine Suppression der Antigen-spezifischen, adaptiven Immunität durch die Induktion tolerogener DC. Mäuse, welche Hapten-sensitivierte DC von IL-37tg Mäusen erhielten, haben als Ausdruck eines geringeren inflammatorischen Milieus histologisch höhere Zahlen regulatorischer T-Zellen und weniger CD8-positive Lymphozyten in der Haut [61].

Die intranasale Applikation von rhIL-37 in WT-Mäusen verringert im Asthma-Modell die allergisch bedingte Inflammation der Luftwege, was klinisch mit geringerer pulmonaler Hyperreaktivität und Schleimproduktion korreliert. Zudem waren die Konzentrationen von IL-4, IL-5, IL-13 im broncho-alveolären Sekret und die Typ2-T-Helferzellantwort niedriger [43].

Die funktionelle Relevanz von IL-37 bei Lebererkrankungen wurde in verschiedenen Mausmodellen untersucht. Unsere Arbeitsgruppe zeigte, dass Mäuse, die mit IL-37 DNA-Plasmiden behandelt wurden, eine geringere lokale und systemische Inflammation bei Concanavalin A (ConA)-induzierter Hepatitis aufwiesen. Zudem waren die Werte pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1 α , IL-6, IL-5 und IL-9 im Serum niedriger [62]. Die Injektion

von rhIL-37 ist bei einem hepatischen Ischämie-Reperfusion-Modell mit geringerer Infiltration neutrophiler Granulozyten und hepatischer Schädigung sowie niedrigeren Serumwerten von Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- α), macrophage inflammatory protein 2 (MIP-2) und reduzierten Werten reaktiver Sauerstoffspezies assoziiert [63]. Interessanterweise hemmt Ethanol die hepatische Expression von IL-37 in IL-37tg Mäusen, sodass diese in ähnlicher Ausprägung wie WT-Mäuse eine Ethanol-induzierte Hepatitis entwickeln; dagegen hat die Verabreichung von rhIL-37 einen protektiven Effekt im Modell der Ethanol-induzierten Hepatitis [64].

5.5. Studien im Menschen zur Expression von IL-37

Beim Menschen wurde in Abhängigkeit der vorliegenden Erkrankung sowohl eine erhöhte als auch erniedrigte Expression von IL-37-mRNA oder -Protein im Serum, spezifischen Immunzellen oder erkranktem Gewebe nachgewiesen [47, 65]. Eine erhöhte Expression von IL-37 erklärt sich am ehesten als regulatorische Antwort auf eine gesteigerte Entzündungsaktivität, während eine Erniedrigung vermutlich eine inadäquate anti-inflammatorische Gegenregulation darstellt [47]. Bei CED ist im entzündeten Darmgewebe die epitheliale IL-37-Expression im Vergleich zu Gesunden erhöht [66, 67]. Bei Neugeborenen bzw. Frühgeborenen mit nekrotisierender Enterocolitis ist die IL-37-Expression in Darmbiopsien und in PBMC hingegen vermindert [68]. Im Lebergewebe wurde bei Patienten mit Hepatitis B und C eine vermehrte IL-37 Expression nachgewiesen [47]. Auch bei onkologischen Erkrankungen verdichten sich die Hinweise auf die funktionelle Bedeutung von IL-37. Die Expression von IL-37 ist im hepatozellulären Karzinom (HCC) geringer als in der gesunden Leber. Darüber hinaus korreliert eine geringere hepatische IL-37-Expression beim HCC mit einer schlechteren Prognose [69]. Ähnliche Beobachtungen wurden beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom gemacht. Hier wurde außerdem gezeigt, dass IL-37 das Tumorstadium durch Inhibition der Angiogenese hemmte [70]. Tumorsupprimierende Eigenschaften von IL-37 wurden auch beim Nierenzellkarzinom nachgewiesen [71].

6. Hypothese und Zielsetzungen der vorgestellten Arbeiten

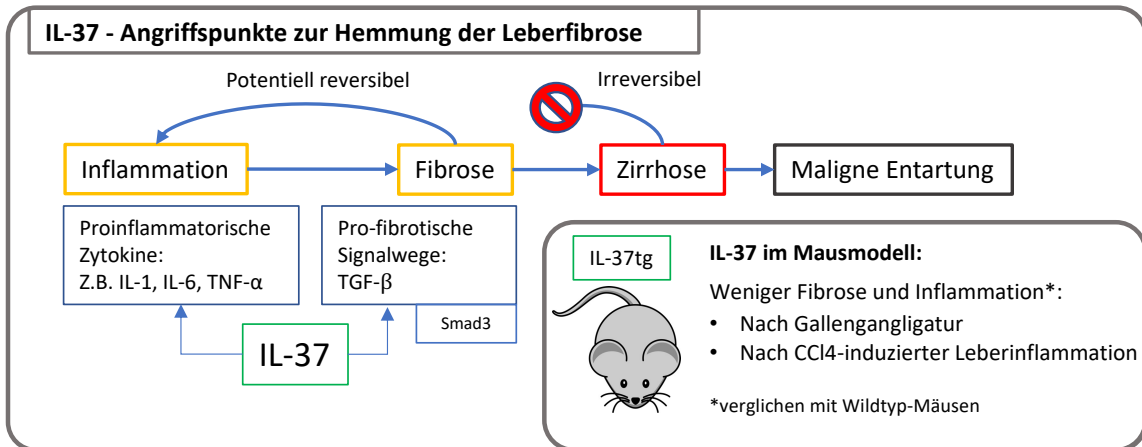
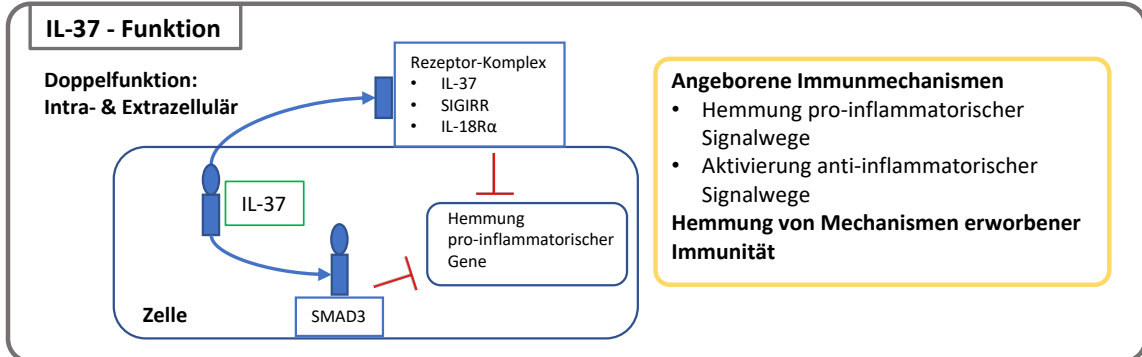
IL-37 ist ein anti-inflammatorisches Zytokin, das sowohl angeborene als auch erworbene Immunreaktionen moduliert. IL-37 bindet im Zellinneren an Smad3 als wichtiges Molekül des TGF- β -Signalwegs. TGF- β spielt eine zentrale Rolle bei der Induktion von Fibrose in verschiedenen Organen. In der Leber aktiviert TGF- β hepatische Sternzellen zur Transdifferenzierung in Myofibroblasten und Ausschüttung extrazellulärer Matrixproteine als Grundlage der Leberfibrogenese. Wir vermuten, dass IL-37 durch die Modulation von Entzündungsvorgängen und die Interaktion mit der TGF- β -Signalkaskade die Fibrogenese im Rahmen chronisch-entzündlicher Lebererkrankungen moduliert (siehe Abbildung unter 7.).

Zur Prüfung dieser Hypothese verfolgten wir in unseren Arbeiten einen methodisch mehrschichtigen Ansatz. Im Rahmen der dieser Arbeit zugrundeliegenden Hauptpublikation untersuchten wir die hepatische Expression von IL-37 in pädiatrischen AILD im Vergleich zu Kontrollpatienten. Wir korrelierten die histologische IL-37-Expression mit Markern der Leberzellschädigung im Serum und dem histologischen Fibrosegrad. Im nächsten Schritt wurde anhand von immunhistochemischen (Doppel-) Färbungen die Expression IL-37 auf zellulärer und subzellulärer Ebene analysiert und die Ko-Lokalisation von intranukleärem IL-37 und pSmad3L untersucht. In Rahmen der zweiten Publikation testeten wir den Einfluss von IL-37 in drei verschiedenen Mausmodellen für Leberfibrose. Zudem wurde im Zellversuch die funktionelle Bedeutung von IL-37 in HSC und KC als Haupteffektorzellen der Leberfibrogenese untersucht. Ergänzend wurden in einer Kohorte Erwachsener mit Alkohol-induzierter Lebererkrankung die IL-37-Serumspiegel mit dem Grad der Leberfibrose verglichen.

AILD bei Kindern sind chronische Erkrankungen, die häufig zu spät erkannt und unzureichend behandelt werden. Hinzu kommt, dass die einzelnen Krankheitsentitäten der AILD diagnostisch nur unzureichend voneinander abgrenzbar sind. Die korrekte Diagnosestellung ist jedoch essenziell für die Auswahl der geeigneten Therapie. So kann zum Beispiel bei der ASC, anders als bei der PSC, eine immunsupprimierende Therapie positiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf nehmen. Wir analysierten daher im Rahmen der vorgestellten Arbeiten zusätzlich mittels hochauflösender Analyse des zellulären Entzündungsinfiltrates die histologische Trennschärfe zwischen pädiatrischer PSC, ASC und AIH.

7. Visueller Überblick

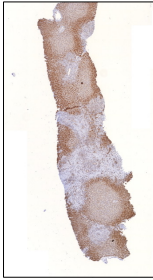
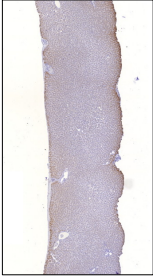
Diese Abbildung zeigt einen Überblick zur Funktion von IL-37 bei Entzündung und Fibrogenese der Leber im Rahmen pädiatrischer AILD sowie der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen.



IL-37 - Expression in der Leber

Modell: Autoimmune Lebererkrankungen bei Kindern (AILD)

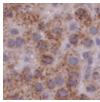
- Positive Korrelation zwischen IL-37-Expression und Entzündung
- Keine Unterschiede zwischen den Entitäten der AILD: PSC, ASC, AIH

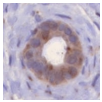
AILD Gesundes Lebergewebe

IL-37 auf zellulärer Ebene

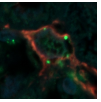
Methodik: Immunhistochemie und Immunfluoreszenz mit Doppelfärbungen



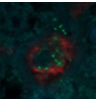
Hepatozyten



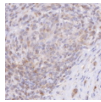
Cholangiozyten



Hepatische Sternzellen

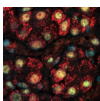


Kupfferzellen



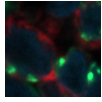
Portales Entzündungsinfiltrat

Lebereigene Zellen

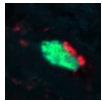


IL-37 + pSmad3L

- Expression in vielen Zelltypen, die Leberfibrose beeinflussen
- Ko-Lokalisation von IL-37 und pSmad3L in Zellkernen



T-Helferzellen



Regulatorische T-Zellen

Zusammenfassung

Interleukin 37 (IL-37) hemmt angeborene und erworbene Immunmechanismen und bindet im Zellkern an Smad3, eine zentrale Kinase des für die Leberfibrogenese entscheidenden TGF- β -Signalweges. In den hier vorgestellten Arbeiten beleuchten wir die Rolle von IL-37 bei pädiatrischen autoimmunen Lebererkrankungen (AILD) und analysieren das hepatische Entzündungsinfiltrat bei primär sklerosierenden Cholangitis, Autoimmunhepatitis und der autoimmun sklerosierenden Cholangitis. Darüber hinaus untersuchen wir *in vitro* und in verschiedenen Mausmodellen der Leberinflammation und -fibrose den Einfluss von IL-37.

IL-37 wird in der Leber in Hepatozyten, Cholangiozyten, hepatischen Stern- und Kupferzellen und in infiltrierenden Immunzellen exprimiert. Immunhistochemische Doppelfärbungen weisen IL-37 im Zytoplasma von T-Helferzellen und regulatorischen T-Zellen nach. IL-37 ist im Zellkern von Hepatozyten in entzündeten Lebern mit Smad3 ko-lokalisiert. Die Expression von IL-37 ist in entzündeten Lebern von Kindern mit AILD verglichen mit gesunden Lebern erhöht, unterscheidet sich jedoch nicht zwischen den verschiedenen Entitäten der AILD. Die IL-37-Expression bei AILD korreliert positiv mit der Anzahl infiltrierender Zellen und Serummarkern für Leberschädigung und der systemischen Entzündungsaktivität, sowie mit dem Grad der Leberfibrose. In einer unabhängigen Kohorte Erwachsener mit Leberfibrose unterschiedlicher Genese korrelieren die Serumwerte von IL-37 positiv mit der Ausprägung der Leberfibrose (CHILD-Pugh- und MELD-Scores). Im Mausmodell zeigen IL-37-transgene (IL-37tg) Mäuse nach operativer Gallengangligatur eine verbesserte Überlebensrate, weniger Leberschädigungsparameter im Serum, sowie histologisch geringer ausgeprägte Fibrose. Nach CCL4-induzierter toxischer Leberschädigung zeigen IL-37tg-Mäuse geringeren Gewichtsverlust sowie eine reduzierte TGF- β -Expression und ein somit weniger fibrogenes Zytokinprofil. In einer Zelllinie für humane hepatische Sternzellen reduziert die Überexpression von IL-37 die Expression der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 nach vorheriger Stimulation durch IL-1 β . Auch in murinen Kupffer- und Sternzellen verringert die transgene Expression von IL-37 die Expression pro-inflammatorischer Zytokine.

Zusammengefasst ist die Expression von IL-37 bei Leberfibrose erhöht. Die Versuche *in vivo* und *in vitro* legen einen anti-fibrotischen Einfluss von IL-37 nahe. Wir postulieren, dass IL-37 als Gegenregulation zum pro-inflammatorischen und -fibrotischen Milieu dieser Erkrankungen fungiert. Die intranukleäre Ko-Lokalisation mit Smad3 sowie die verringerte Expression von TGF- β im Zellversuch sind weitere Indizien für Interferenz mit dem pro-fibrotischen TGF- β -Signalweg. Wie sich eine erhöhte oder erniedrigte Expression von IL-37 bei menschlichen fibrotischen Lebererkrankungen auswirkt, ist in weiterführenden Studien zu untersuchen. Das Entzündungsinfiltrat der ASC hebt sich in unserer Kohorte durch ein granulozytenreiches Infiltrat in den Portalfeldern von der PSC und der AIH ab und dient möglicherweise als Unterscheidungsmerkmal zwischen den in der klinischen Praxis oft schwer abgrenzbaren Entitäten.

Abstract

Interleukin 37 (IL-37) inhibits innate and acquired immune mechanisms and binds intranuclearly to Smad3, a central kinase of the TGF- β pathway, which is crucial for liver fibrogenesis. Here, we highlight the role of IL-37 in paediatric autoimmune liver diseases (AILD) and analyze the hepatic inflammatory infiltrate in primary sclerosing cholangitis, autoimmune hepatitis and autoimmune sclerosing cholangitis. Furthermore, we investigate the influence of IL-37 *in vitro* and in different *in vivo* mouse models for liver inflammation and fibrosis.

IL-37 is expressed in liver-derived cells such as hepatocytes, cholangiocytes, hepatic stellate and Kupffer cells and also infiltrating immune cells. Immunohistochemistry double stainings detect IL-37 in the cytoplasm of T helper cells and regulatory T cells. IL-37 co-localizes with Smad3 in the nucleus of hepatocytes in inflamed livers. IL-37 expression is higher in inflamed livers of children with AILD compared to healthy individuals but does not differ between the different entities of AILD. There is a positive correlation between IL-37 expression with the number of infiltrating immune cells and serum markers of liver injury and general inflammation as well as the extent of liver fibrosis. In an independent cohort of adults with liver fibrosis of different etiologies, serum levels of IL-37 correlate positively with CHILD-Pugh and MELD scores and thus with the severity of liver fibrosis. In the mouse model, IL-37 transgenic (IL-37tg) mice show improved survival after surgical bile duct ligation, fewer liver damage parameters in serum, and histologically less pronounced fibrosis. After CCL4-induced toxic liver injury, IL-37tg mice show less weight loss as well as reduced TGF- β expression and thus a less fibrogenic cytokine profile. In a human hepatic stellate cell line, overexpression of IL-37 reduces expression of the pro-inflammatory cytokine IL-6 following prior stimulation by IL-1 β . In murine Kupffer and stellate cells, transgenic expression of IL-37 also reduces the expression of pro-inflammatory cytokines.

In summary, IL-37 expression is increased in liver fibrosis. Our *in vivo* and *in vitro* experiments suggest an anti-fibrotic influence of IL-37. We postulate, that IL-37 acts as a counter-regulator to the pro-inflammatory and -fibrotic milieu in chronic liver diseases. The intranuclear co-localization with Smad3, as well as the decreased expression of TGF- β in the cell experiments are further indicators of interference with the pro-fibrotic TGF- β pathway. The effect of increased or decreased expression of IL-37 in human fibrotic liver disease needs to be investigated in further studies. The periportal granulocytic inflammatory infiltrate of ASC in our cohort stands out from PSC and AIH and may serve as a distinguishing feature between these entities, which are often difficult to delineate in clinical practice.

Literaturverzeichnis

1. Gines P, Castera L, Lammert F, Graupera I, Serra-Burriel M, Allen AM, Wong VW, Hartmann P, Thiele M, Caballeria L, de Knecht RJ, Grgurevic I, Augustin S, Tsochatzis EA, Schattenberg JM, Guha IN, Martini A, Morillas RM, Garcia-Retortillo M, de Koning HJ, Fabrellas N, Pich J, Ma AT, Diaz MA, Roulot D, Newsome PN, Manns M, Kamath PS, Krag A, LiverScreen Consortium I. Population screening for liver fibrosis: Toward early diagnosis and intervention for chronic liver diseases. *Hepatology*. 2022;75(1):219-28.
2. Hirschfield GM, Karlsen TH, Lindor KD, Adams DH. Primary sclerosing cholangitis. *Lancet*. 2013;382(9904):1587-99.
3. Boonstra K, Beuers U, Ponsioen CY. Epidemiology of primary sclerosing cholangitis and primary biliary cirrhosis: a systematic review. *J Hepatol*. 2012;56(5):1181-8.
4. Dyson JK, Beuers U, Jones DEJ, Lohse AW, Hudson M. Primary sclerosing cholangitis. *Lancet*. 2018;391(10139):2547-59.
5. Liu JZ, Hov JR, Folseraas T, Ellinghaus E, Rushbrook SM, Doncheva NT, Andreassen OA, Weersma RK, Weismuller TJ, Eksteen B, Invernizzi P, Hirschfield GM, Gotthardt DN, Pares A, Ellinghaus D, Shah T, Juran BD, Milkiewicz P, Rust C, Schramm C, Muller T, Srivastava B, Dalekos G, Nothen MM, Herms S, Winkelmann J, Mitrovic M, Braun F, Ponsioen CY, Croucher PJ, Sterneck M, Teufel A, Mason AL, Saarela J, Leppa V, Dorfman R, Alvaro D, Floreani A, Onengut-Gumuscu S, Rich SS, Thompson WK, Schork AJ, Naess S, Thomsen I, Mayr G, Konig IR, Hveem K, Cleynen I, Gutierrez-Achury J, Ricano-Ponce I, van Heel D, Bjornsson E, Sandford RN, Durie PR, Melum E, Vatn MH, Silverberg MS, Duerr RH, Padyukov L, Brand S, Sans M, Annese V, Achkar JP, Boberg KM, Marschall HU, Chazouilleres O, Bowlus CL, Wijmenga C, Schrumph E, Vermeire S, Albrecht M, Consortium U-P, Rioux JD, Alexander G, Bergquist A, Cho J, Schreiber S, Manns MP, Farkkila M, Dale AM, Chapman RW, Lazaridis KN, International PSCSG, Franke A, Anderson CA, Karlsen TH, International IBDGC. Dense genotyping of immune-related disease regions identifies nine new risk loci for primary sclerosing cholangitis. *Nat Genet*. 2013;45(6):670-5.
6. Deneau MR, El-Matary W, Valentino PL, Abdou R, Alqoaer K, Amin M, Amir AZ, Auth M, Bazerbachi F, Broderick A, Chan A, Cotter J, Doan S, El-Youssef M, Ferrari F, Furuya KN, Gottrand M, Gottrand F, Gupta N, Homan M, Kamath BM, Kim KM, Kolho KL, Konidari A, Koot B, Iorio R, Ledder O, Mack C, Martinez M, Miloh T, Mohan P, O'Cathain N, Papadopoulou A, Ricciuto A, Saubermann L, Sathya P, Shteyer E, Smolka V, Tanaka A, Varier R, Venkat V, Vitola B, Vos MB, Woynarowski M, Yap J, Jensen MK. The natural history of primary sclerosing cholangitis in 781 children: A multicenter, international collaboration. *Hepatology*. 2017;66(2):518-27.
7. Ricciuto A, Kamath BM, Griffiths AM. The IBD and PSC Phenotypes of PSC-IBD. *Curr Gastroenterol Rep*. 2018;20(4):16.
8. Razumilava N, Gores GJ, Lindor KD. Cancer surveillance in patients with primary sclerosing cholangitis. *Hepatology*. 2011;54(5):1842-52.
9. Claessen MM, Vleggaar FP, Tytgat KM, Siersema PD, van Buuren HR. High lifetime risk of cancer in primary sclerosing cholangitis. *J Hepatol*. 2009;50(1):158-64.
10. Heneghan MA, Yeoman AD, Verma S, Smith AD, Longhi MS. Autoimmune hepatitis. *Lancet*. 2013;382(9902):1433-44.

11. Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, Bianchi L, Burroughs AK, Cancado EL, Chapman RW, Cooksley WG, Czaja AJ, Desmet VJ, Donaldson PT, Eddleston AL, Fainboim L, Heathcote J, Homberg JC, Hoofnagle JH, Kakumu S, Krawitt EL, Mackay IR, MacSween RN, Maddrey WC, Manns MP, McFarlane IG, Meyer zum Buschenfelde KH, Zeniya M, et al. International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol.* 1999;31(5):929-38.
12. Hennes EM, Zeniya M, Czaja AJ, Pares A, Dalekos GN, Krawitt EL, Bittencourt PL, Porta G, Boberg KM, Hofer H, Bianchi FB, Shibata M, Schramm C, Eisenmann de Torres B, Galle PR, McFarlane I, Dienes HP, Lohse AW, International Autoimmune Hepatitis G. Simplified criteria for the diagnosis of autoimmune hepatitis. *Hepatology.* 2008;48(1):169-76.
13. Gregorio GV, Portmann B, Karani J, Harrison P, Donaldson PT, Vergani D, Mieli-Vergani G. Autoimmune hepatitis/sclerosing cholangitis overlap syndrome in childhood: a 16-year prospective study. *Hepatology.* 2001;33(3):544-53.
14. Terziroli Beretta-Piccoli B, Vergani D, Mieli-Vergani G. Autoimmune sclerosing cholangitis: Evidence and open questions. *J Autoimmun.* 2018;95:15-25.
15. Mieli-Vergani G, Heller S, Jara P, Vergani D, Chang MH, Fujisawa T, Gonzalez-Peralta RP, Kelly D, Mohan N, Shah U, Murray KF. Autoimmune hepatitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2009;49(2):158-64.
16. Luth S, Kanzler S, Frenzel C, Kasper HU, Dienes HP, Schramm C, Galle PR, Herkel J, Lohse AW. Characteristics and long-term prognosis of the autoimmune hepatitis/primary sclerosing cholangitis overlap syndrome. *J Clin Gastroenterol.* 2009;43(1):75-80.
17. Zenouzi R, Lohse AW. Long-term outcome in PSC/AIH "overlap syndrome": does immunosuppression also treat the PSC component? *J Hepatol.* 2014;61(5):1189-91.
18. Iredale JP. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *J Clin Invest.* 2007;117(3):539-48.
19. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest.* 2005;115(2):209-18.
20. Seki E, Schwabe RF. Hepatic inflammation and fibrosis: functional links and key pathways. *Hepatology.* 2015;61(3):1066-79.
21. Kisseleva T, Brenner D. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2021;18(3):151-66.
22. Mederacke I, Hsu CC, Troeger JS, Huebener P, Mu X, Dapito DH, Pradere JP, Schwabe RF. Fate tracing reveals hepatic stellate cells as dominant contributors to liver fibrosis independent of its aetiology. *Nat Commun.* 2013;4:2823.
23. Krenkel O, Tacke F. Liver macrophages in tissue homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol.* 2017;17(5):306-21.
24. Moustakas A, Souchelnytskyi S, Heldin CH. Smad regulation in TGF-beta signal transduction. *J Cell Sci.* 2001;114(Pt 24):4359-69.
25. Murata M, Yoshida K, Yamaguchi T, Matsuzaki K. Linker phosphorylation of Smad3 promotes fibro-carcinogenesis in chronic viral hepatitis of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2014;20(41):15018-27.

26. Tilg H, Diehl AM. Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med.* 2000;343(20):1467-76.
27. Mantovani A, Dinarello CA, Molgora M, Garlanda C. Interleukin-1 and Related Cytokines in the Regulation of Inflammation and Immunity. *Immunity.* 2019;50(4):778-95.
28. Barbier L, Ferhat M, Salame E, Robin A, Herbelin A, Gombert JM, Silvain C, Barbarin A. Interleukin-1 Family Cytokines: Keystones in Liver Inflammatory Diseases. *Front Immunol.* 2019;10:2014.
29. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell.* 2010;140(6):821-32.
30. Petrasek J, Csak T, Szabo G. Toll-like receptors in liver disease. *Adv Clin Chem.* 2013;59:155-201.
31. Mathews S, Gao B. Therapeutic potential of interleukin 1 inhibitors in the treatment of alcoholic liver disease. *Hepatology.* 2013;57(5):2078-80.
32. Miura K, Kodama Y, Inokuchi S, Schnabl B, Aoyama T, Ohnishi H, Olefsky JM, Brenner DA, Seki E. Toll-like receptor 9 promotes steatohepatitis by induction of interleukin-1beta in mice. *Gastroenterology.* 2010;139(1):323-34 e7.
33. Kamari Y, Shaish A, Vax E, Shemesh S, Kandel-Kfir M, Arbel Y, Olteanu S, Barshack I, Dotan S, Voronov E, Dinarello CA, Apte RN, Harats D. Lack of interleukin-1alpha or interleukin-1beta inhibits transformation of steatosis to steatohepatitis and liver fibrosis in hypercholesterolemic mice. *J Hepatol.* 2011;55(5):1086-94.
34. McHedlidze T, Waldner M, Zopf S, Walker J, Rankin AL, Schuchmann M, Voehringer D, McKenzie AN, Neurath MF, Pflanz S, Wirtz S. Interleukin-33-dependent innate lymphoid cells mediate hepatic fibrosis. *Immunity.* 2013;39(2):357-71.
35. Boraschi D, Lucchesi D, Hainzl S, Leitner M, Maier E, Mangelberger D, Oostingh GJ, Pfaller T, Pixner C, Posselt G, Italiani P, Nold MF, Nold-Petry CA, Bufler P, Dinarello CA. IL-37: a new anti-inflammatory cytokine of the IL-1 family. *Eur Cytokine Netw.* 2011;22(3):127-47.
36. Smith DE, Renshaw BR, Ketchum RR, Kubin M, Garka KE, Sims JE. Four new members expand the interleukin-1 superfamily. *J Biol Chem.* 2000;275(2):1169-75.
37. Taylor SL, Renshaw BR, Garka KE, Smith DE, Sims JE. Genomic organization of the interleukin-1 locus. *Genomics.* 2002;79(5):726-33.
38. Kumar S, Hanning CR, Brigham-Burke MR, Rieman DJ, Lehr R, Khandekar S, Kirkpatrick RB, Scott GF, Lee JC, Lynch FJ, Gao W, Gambotto A, Lotze MT. Interleukin-1F7B (IL-1H4/IL-1F7) is processed by caspase-1 and mature IL-1F7B binds to the IL-18 receptor but does not induce IFN-gamma production. *Cytokine.* 2002;18(2):61-71.
39. Bertheloot D, Latz E. HMGB1, IL-1alpha, IL-33 and S100 proteins: dual-function alarmins. *Cell Mol Immunol.* 2017;14(1):43-64.
40. Sharma S, Kulk N, Nold MF, Graf R, Kim SH, Reinhardt D, Dinarello CA, Bufler P. The IL-1 family member 7b translocates to the nucleus and down-regulates proinflammatory cytokines. *J Immunol.* 2008;180(8):5477-82.
41. Bufler P, Azam T, Gamboni-Robertson F, Reznikov LL, Kumar S, Dinarello CA, Kim SH. A complex of the IL-1 homologue IL-1F7b and IL-18-binding protein reduces IL-18 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(21):13723-8.

42. Nold-Petry CA, Lo CY, Rudloff I, Elgass KD, Li S, Gantier MP, Lotz-Havla AS, Gersting SW, Cho SX, Lao JC, Ellisdon AM, Rotter B, Azam T, Mangan NE, Rossello FJ, Whisstock JC, Bufler P, Garlanda C, Mantovani A, Dinarello CA, Nold MF. IL-37 requires the receptors IL-18R α and IL-1R8 (SIGIRR) to carry out its multifaceted anti-inflammatory program upon innate signal transduction. *Nat Immunol.* 2015;16(4):354-65.
43. Lunding L, Webering S, Vock C, Schroder A, Raedler D, Schaub B, Fehrenbach H, Wegmann M. IL-37 requires IL-18R α and SIGIRR/IL-1R8 to diminish allergic airway inflammation in mice. *Allergy.* 2015;70(4):366-73.
44. Dinarello CA. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol Rev.* 2018;281(1):8-27.
45. Ellisdon AM, Nold-Petry CA, D'Andrea L, Cho SX, Lao JC, Rudloff I, Ngo D, Lo CY, Soares da Costa TP, Perugini MA, Conroy PJ, Whisstock JC, Nold MF. Homodimerization attenuates the anti-inflammatory activity of interleukin-37. *Sci Immunol.* 2017;2(8).
46. Eisenmesser EZ, Gottschlich A, Redzic JS, Paukovich N, Nix JC, Azam T, Zhang L, Zhao R, Kieft JS, The E, Meng X, Dinarello CA. Interleukin-37 monomer is the active form for reducing innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(12):5514-22.
47. Cavalli G, Dinarello CA. Suppression of inflammation and acquired immunity by IL-37. *Immunol Rev.* 2018;281(1):179-90.
48. Bulau AM, Nold MF, Li S, Nold-Petry CA, Fink M, Mansell A, Schwerd T, Hong J, Rubartelli A, Dinarello CA, Bufler P. Role of caspase-1 in nuclear translocation of IL-37, release of the cytokine, and IL-37 inhibition of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(7):2650-5.
49. Li S, Amo-Aparicio J, Neff CP, Tengesdal IW, Azam T, Palmer BE, Lopez-Vales R, Bufler P, Dinarello CA. Role for nuclear interleukin-37 in the suppression of innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(10):4456-61.
50. Grimsby S, Jaensson H, Dubrovskaja A, Lomnytska M, Hellman U, Souchelnytskyi S. Proteomics-based identification of proteins interacting with Smad3: SREBP-2 forms a complex with Smad3 and inhibits its transcriptional activity. *FEBS Lett.* 2004;577(1-2):93-100.
51. Nold MF, Nold-Petry CA, Zepp JA, Palmer BE, Bufler P, Dinarello CA. IL-37 is a fundamental inhibitor of innate immunity. *Nat Immunol.* 2010;11(11):1014-22.
52. Pan G, Risser P, Mao W, Baldwin DT, Zhong AW, Filvaroff E, Yansura D, Lewis L, Eigenbrot C, Henzel WJ, Vandlen R. IL-1H, an interleukin 1-related protein that binds IL-18 receptor/IL-1R ρ . *Cytokine.* 2001;13(1):1-7.
53. Rudloff I, Cho SX, Lao JC, Ngo D, McKenzie M, Nold-Petry CA, Nold MF. Monocytes and dendritic cells are the primary sources of interleukin 37 in human immune cells. *J Leukoc Biol.* 2017;101(4):901-11.
54. Chen B, Huang K, Ye L, Li Y, Zhang J, Zhang J, Fan X, Liu X, Li L, Sun J, Du J, Huang Z. Interleukin-37 is increased in ankylosing spondylitis patients and associated with disease activity. *J Transl Med.* 2015;13:36.
55. Ye L, Ji L, Wen Z, Zhou Y, Hu D, Li Y, Yu T, Chen B, Zhang J, Ding L, Du J, Huang Z. IL-37 inhibits the production of inflammatory cytokines in peripheral blood mononuclear

- cells of patients with systemic lupus erythematosus: its correlation with disease activity. *J Transl Med.* 2014;12:69.
56. Cavalli G, Justice JN, Boyle KE, D'Alessandro A, Eisenmesser EZ, Herrera JJ, Hansen KC, Nemkov T, Stienstra R, Garlanda C, Mantovani A, Seals DR, Dagna L, Joosten LA, Ballak DB, Dinarello CA. Interleukin 37 reverses the metabolic cost of inflammation, increases oxidative respiration, and improves exercise tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(9):2313-8.
57. Wu B, Meng K, Ji Q, Cheng M, Yu K, Zhao X, Tony H, Liu Y, Zhou Y, Chang C, Zhong Y, Zhu Z, Zhang W, Mao X, Zeng Q. Interleukin-37 ameliorates myocardial ischaemia/reperfusion injury in mice. *Clin Exp Immunol.* 2014;176(3):438-51.
58. Coll-Miro M, Francos-Quijorna I, Santos-Nogueira E, Torres-Espin A, Bufler P, Dinarello CA, Lopez-Vales R. Beneficial effects of IL-37 after spinal cord injury in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(5):1411-6.
59. Patel FJ, Volkmann DT, Taylor GW, Hansson MA, Anderson JF, Zhou Y, Scoazec LM, Hartford CV, Hainz DL. Retracted: IL-37 reduces inflammatory response after cerebral ischemia and reperfusion injury through down-regulation of pro-inflammatory cytokines. *Cytokine.* 2014;69(2):234-9.
60. McNamee EN, Masterson JC, Jedlicka P, McManus M, Grenz A, Collins CB, Nold MF, Nold-Petry C, Bufler P, Dinarello CA, Rivera-Nieves J. Interleukin 37 expression protects mice from colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(40):16711-6.
61. Luo Y, Cai X, Liu S, Wang S, Nold-Petry CA, Nold MF, Bufler P, Norris D, Dinarello CA, Fujita M. Suppression of antigen-specific adaptive immunity by IL-37 via induction of tolerogenic dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(42):15178-83.
62. Bulau AM, Fink M, Maucksch C, Kappler R, Mayr D, Wagner K, Bufler P. In vivo expression of interleukin-37 reduces local and systemic inflammation in concanavalin A-induced hepatitis. *ScientificWorldJournal.* 2011;11:2480-90.
63. Sakai N, Van Sweringen HL, Belizaire RM, Quillin RC, Schuster R, Blanchard J, Burns JM, Tevar AD, Edwards MJ, Lentsch AB. Interleukin-37 reduces liver inflammatory injury via effects on hepatocytes and non-parenchymal cells. *J Gastroenterol Hepatol.* 2012;27(10):1609-16.
64. Grabherr F, Grandner C, Adolph TE, Wieser V, Mayr L, Enrich B, Macheiner S, Sangineto M, Reiter A, Viveiros A, Zoller H, Bufler P, Moschen AR, Dinarello CA, Tilg H. Ethanol-mediated suppression of IL-37 licenses alcoholic liver disease. *Liver Int.* 2018;38(6):1095-101.
65. Su Z, Tao X. Current Understanding of IL-37 in Human Health and Disease. *Front Immunol.* 2021;12:696605.
66. Imaeda H, Takahashi K, Fujimoto T, Kasumi E, Ban H, Bamba S, Sonoda H, Shimizu T, Fujiyama Y, Andoh A. Epithelial expression of interleukin-37b in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol.* 2013;172(3):410-6.
67. Weidlich S, Bulau AM, Schwerdt T, Althans J, Kappler R, Koletzko S, Mayr D, Bufler P. Intestinal expression of the anti-inflammatory interleukin-1 homologue IL-37 in pediatric inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2014;59(2):e18-26.
68. Cho SX, Rudloff I, Lao JC, Pang MA, Goldberg R, Bui CB, McLean CA, Stock M, Klassert TE, Slevogt H, Mangan NE, Cheng W, Fischer D, Gfroerer S, Sandhu MK, Ngo

- D, Bujotzek A, Lariviere L, Schumacher F, Tiefenthaler G, Beker F, Collins C, Kamlin COF, Konig K, Malhotra A, Tan K, Theda C, Veldman A, Ellisdon AM, Whisstock JC, Berger PJ, Nold-Petry CA, Nold MF. Characterization of the pathoimmunology of necrotizing enterocolitis reveals novel therapeutic opportunities. *Nat Commun.* 2020;11(1):5794.
69. Zhao JJ, Pan QZ, Pan K, Weng DS, Wang QJ, Li JJ, Lv L, Wang DD, Zheng HX, Jiang SS, Zhang XF, Xia JC. Interleukin-37 mediates the antitumor activity in hepatocellular carcinoma: role for CD57+ NK cells. *Sci Rep.* 2014;4:5177.
70. Ge G, Wang A, Yang J, Chen Y, Yang J, Li Y, Xue Y. Interleukin-37 suppresses tumor growth through inhibition of angiogenesis in non-small cell lung cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2016;35:13.
71. Jiang Y, Wang Y, Liang L, Gao Y, Chen J, Sun Y, Cheng Y, Xu Y. IL-37 mediates the antitumor activity in renal cell carcinoma. *Med Oncol.* 2015;32(11):250.

Danksagung

An dieser Stelle gilt es zurückzublicken auf eine durchaus lange Periode der Entstehung dieser Arbeit. Während dieser Zeit entstand eine (beinahe) ebenso lange Liste an Personen, denen ich an dieser Stelle danken möchte.

An erster Stelle sei **Prof. Dr. Philip Bufler** gedankt für die Begleitung meiner gesamten wissenschaftlichen Laufbahn, sowohl in fachlicher Hinsicht, aber auch auf menschlicher Ebene als Mentor. Angefangen in München mit der Betreuung der vorgelegten Arbeit und aktuell in Berlin mit aufregenden neuen Projekten. Ich hoffe, unsere Zusammenarbeit dauert noch lange an.

Zu Beginn der Arbeiten traf die Bezeichnung „Anfänger“ bezogen auf meine Erfahrungen mit der Arbeit im Labor zu. Das änderte sich durch das Laborteam der AG Bufler, namentlich **Dr. Steffeni Papukchieva** (geb. Mountford), **Andrea Ringleb** und **Heidi-Noll-Puchta**, die mir alle Grundlagen in einer Atmosphäre zum Wohlfühlen nahebrachten. **Dr. Steffeni Papukchieva** möchte ich außerdem danken, dass ich Teil ihres großartigen wissenschaftlichen Projektes (Publikation 2) sein durfte.

Ohne die Methodik der Immunhistochemie wäre ein Großteil der vorangegangenen Seiten leer geblieben. Deswegen gilt dem Institut der Pathologie der Ludwig-Maximilians-Universität München mein Dank. **Prof. Dr. Doris Mayr** unterstützte mich maßgeblich, von der Auswahl der Marker, über Fehlerbehebung unserer nicht immer erfolgreichen Versuche, bis hin zur Visualisierung der histologischen Bilder. Des Weiteren sei **Andrea Sendelhofert** und **Anja Heier** für den Basis-Kurs und den Einblick in die Welt der Immunhistochemie gedankt.

Die Entstehung der Arbeit wäre ebenso unmöglich gewesen ohne die Vorarbeit von **Laura Pirringer** und **Marie-Christine Makeshin**, auf deren erstelltes und charakterisiertes Patient:innenkollektiv wir zurückgreifen durften. **Prof. Dr. Herbert Tilg** und **Dr. Maria Effenberger** aus Innsbruck danken wir für das Einbringen ihrer Daten zum erwachsenen Patientenkollektiv. Ebenso wichtig war der Beitrag zur Durchführung der Experimente und wissenschaftlichen Evaluation und Einordnung der Ergebnisse durch **Dr. Sonja Haas**, **Prof. Dr. Gerald Denk**, **Dr. Florian P. Reiter** und nicht zuletzt **Prof. Dr. Sibylle Koletzko**.

Ich danke außerdem **Prof. Dr. Roland Kappler** und **Prof. Dr. Daniel Kotlarz** für die wissenschaftliche Begleitung im Rahmen des FöFole-Programmes sowie der Arbeitsgruppe um **Prof. Dr. Christoph Klein** für die Einführung und Unterstützung des konfokalen Mikroskops.

Ohne den Rahmen, sowohl durch die begleitende Lehre als auch die finanzielle Unterstützung des **Förderprogramms für Forschung und Lehre Programmes (FöFoLe)** wäre diese Arbeit nicht entstanden, dem gesamten Team sei hiermit gedankt.

Auch außerhalb der Ludwig-Maximilians-Universität erfuhren wir Unterstützung. Ich danke **Prof. Dr. Charles A. Dinarello** und **Dr. Alexander Miethke** für den regen, kritischen und immer hilfreichen Austausch über die Fortschritte unserer Forschungsarbeiten.

Abschließend danke ich meiner Familie und Freunden, die alle bereits wissen, wobei und wofür sie mich unterstützen.