# Schlussbericht zum DZIF-Vorhaben

**TI 07.001 - Clinical leave programme Freya Wellhöner**

**Koordinierende Einrichtung:**

Medizinische Hochschule Hannover

**Beteiligte Einrichtung(en):**

Medizinische Hochschule Hannover

# Executive Summary/Abstract

Gallenwegserkrankungen wie die primär sklerosierende Cholangitis (PSC) stellen Kliniker hinsichtlich Diagnostik und Therapie vor große Herausforderungen. Der genaue Pathomechanismus der Entstehung dieser Erkrankung ist noch unklar, und eine kurative Therapie gibt es noch nicht. Bei der Entstehung der Erkrankung scheint sowohl das intestinale als auch das biliäre Mikrobiom eine wesentliche Rolle zu spielen. In vitro Studien zeigen, dass der Verlust der Sialinsäure - den terminalen Teil der Cholangiozyten-Glykokalyx - auf der Zelloberfläche einer Cholangiozyten-Zelllinie, zu einer Destabilisierung der Cholangiozyten führt. Im Vorfeld dieser Arbeit wurden Bakterien des biliären Mikrobioms aus Patientenproben isoliert, kultiviert und sequenziert. Im Mikrobiom von PSC Patienten fanden sich Bakterien, die Information zur Expression einer Sialidase im Genom zeigten. Mit der Hypothese, dass die Bakterien eine Sialidase exprimieren, die zur Pathogenese beiträgt, wurde in dieser Arbeit zunächst gezeigt, dass die aus Galleproben von Patienten mit PSC isolierten Bakterien eine Sialidase exprimieren und dass die Gallengänge in vivo sialyliert sind. Eine Sialidase Aktivität in der Galle von PSC Patienten konnte nachgewiesen werden. In vivo lag bei PSC-Patienten eine über das Gallenwegssystem inhomogene Sialylierung mit α2,6 verknüpfter Sialinsäure vor. Die bakterielle Sialidase wurde rekombinant exprimiert und aufgereinigt und die Aktivität in vitro bestimmt. Im Cholangiozyten-Organoid Modell führte eine Desialylierung mit der aufgereinigten Sialidase aus dem biliären Mikrobiom zu einer gesteigerten Suszeptibilität gegenüber des physiologisch toxischen Gallenwegsmillieus. Der Verlust der Sialinsäure führt zu einem Verlust der negativen Ladung sowie einer Destabilisierung des sogenannten „Bicarbonate-umbrellas“, einer Schutzschicht aus Bicarbonat-Ionen gegen Gallensäuren, die durch die Sialinsäure nah der apikalen Membran der Cholangiozyten gehalten werden.

***Medizinische Hochschule Hannover***

# Kapitel 1: Kurzbericht (wird veröffentlicht)

## a) Ursprüngliche Aufgabenstellung und wissenschaftlicher/technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Gallenwegserkrankungen wie die primär sklerosierende Cholangitis (PSC), die sekundär sklerosierende Cholangitis (SSC) und das cholangiozelluläre Karzinom (CCC) stellen den Kliniker aufgrund der limitierten Möglichkeiten in Therapie und Diagnostik vor große Herausforderungen. Die genaue Pathogenese der Entwicklung der PSC sowie die Faktoren, die den klinischen Verlauf beeinflussen, sind bisher nicht vollständig geklärt [1,2,3]. Die Gallenwege beherbergen ein Mikrobiom und ein Zusammenhang zwischen PSC und biliären Mikrobiom ist bereits in unterschiedlichen Studien diskutiert [4,5,6]. Wir vermuten einen Zusammenhang zwischen bestimmten bakteriellen Enzymen und dem klinischen Verlauf von Patienten mit PSC. Bestimmte biliäre Bakterien besitzen Sialidasen, Enzyme, die den Abbau von Sialinsäure katalysieren, dies ist insbesondere für den Darm beschrieben [7,8,9]. Cholangiozyten sind im physiologischen Zustand durch eine dünne, etwa 20-40nm dicke Schicht aus Glykolipiden und Glykoproteinen, die auch als biliäre Glykokalyx bekannt ist und die die Sialinsäure in terminaler Position trägt, geschützt [10,11]. Ziel des Projektes ist die genauere Analyse der Interaktionen zwischen bakteriellen Sialidasen und der biliären Glykokalyx. Ursprünglich geplant war eine in vivo Analyse von Leberbiopsien von Patienten mit unterschiedlichen Gallenwegserkrankungen sowie Lebererkrankungen, die nicht primär die Gallenwege betreffen, beispielweise die Virushepatitis. Hierzu waren histochemische Färbungen mit Alcianblau und unterschiedlichen Lektinen zur Darstellung der Glykokalyx in vivo auf humanen Leberproben geplant. Aufgrund der Probenmasse wurde sich für eine genauere Analyse der PSC-Patienten beschränkt. Da die Sensitivität der Alcianblau Färbung für die Analysen nicht ausreichend war, erfolgte eine quantifizierbare Färbung der Sialinsäure zur besseren Analyse der Sialylierung innerhalb der Proben. Zur detaillierteren Analyse der Interaktion zwischen Cholangiozyten-Glykokalyx und biliären Bakterien war eine Ko-Kultivierung von unterschiedlichen biliären Bakterien und einer Cholangiozyten Zelllinie geplant. Aufgrund schwieriger Kultivierungsmöglichkeiten und großen Unterschieden im Anspruch an die Kultivierung von Zellen und Bakterien konnte diese im Rahmen der Arbeit noch nicht erfolgreich durchgeführt werden. Stattdessen erfolgte die Klonierung und Aufreinigung von drei weiteren Sialidasen aus anderen biliären Bakterienspezies, welche anschließend in der Zellkultur verwendet werden konnten. Eine geplante massenspektrometrische Analyse der biliären Glykokalyx war aufgrund fehlender Referenzglykane aufgrund des bisher sehr unerforschten Gebiets der biliären Glykokalyx sowie aufgrund einer hohen Anzahl an benötigten Zellen nicht möglich.
Zusätzlich ergänzt wurde die Etablierung eines Sialidase Aktivitätsassays, mit dem die Sialidase-Aktivität in humanen Galleproben bestimmt werden kann mit dem Ziel langfristig eine Risikostratifizierung der Patienten zu ermöglichen.

1. Hessheimer AJ, Cárdenas A, García-Valdecasas JC, Fondevila C: Can we prevent ischemic-type biliary lesions in donation after circulatory determination of death liver transplantation? Liver Transpl. 2016 Jul;22(7):1025-33
2. Op den Dries S, Sutton ME, Lisman T, Porte RJ: Protection of bile ducts in liver transplantation: looking beyond ischemia. Transplantation. 2011 Aug 27;92(4):373-9
3. Nakazawa T, Notohara K, Tazuma S, Tanaka A, Isayama H, Tsuyuguchi T, Mori T, Takikawa H: The 2016 diagnostic criteria for primary sclerosing cholangitis. J Gastroenterol. 2017 Jul;52(7):838-844

4. Nicoletti A, Ponziani FR, Nardella E, Ianiro G, Gasbarrini A, Zileri Dal Verme L: Biliary tract microbiota: a new kid on the block of liver diseases? Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2020 Mar;24(5):2750-2775
5. Chen B, Fu SW, Lu L, Zhao H: A Preliminary Study of Biliary Microbiota in Patients with Bile Duct Stones or Distal Cholangiocarcinoma. Biomed Res Int. 2019 Sep 25;2019:1092563.
6. Petrov VA, Fernández-Peralbo MA, Derks R, Knyazeva EM, Merzlikin NV, Sazonov AE, Mayboroda OA, Saltykova IV: Biliary Microbiota and Bile Acid Composition in Cholelithiasis. Biomed Res Int. 2020 Jul 1;2020:1242364.
7. McGuckin MA, Lindén SK, Sutton P, Florin TH: Mucin dynamics and enteric pathogens. Nat Rev Microbiol. 2011 Apr;9(4):265-78.
8. Sellmeier M, Weinhold B, Münster-Kühnel A. CMP-Sialic Acid Synthetase: The Point of Constriction in the Sialylation Pathway. Top Curr Chem. 2015;366:139-67
9. Juge N, Tailford L, Owen CD. Sialidases from gut bacteria: a mini-review. Biochem Soc Trans. 2016 Feb;44(1):166-75. doi: 10.1042/BST20150226. PMID: 26862202; PMCID: PMC4747158.
10. Hohenester S, Maillette de Buy Wenniger L, Jefferson DM, Oude Elferink RP, Beuers U: A biliary HCO 3 – umbrella constitutes a protective mechanism against bile acid-induced injury in human cholangiocytes. Hepatology 2012;55:173–183
11. Maillette de Buy Wenniger LJ, Hohenester S, Maroni L, van Vliet SJ, Oude Elferink RP, Beuers U: The Cholangiocyte Glycocalyx Stabilizes the 'Biliary HCO3 Umbrella': An Integrated Line of Defense against Toxic Bile Acids. Dig Dis. 2015;33(3):397-407.

***Medizinische Hochschule Hannover***

## b) Ablauf des Vorhabens

Zur Bearbeitung der oben genannten Fragestellung erfolgten beschriebene in vivo und in vitro Analysen.

<u>Arbeitspaket 1: Leberbiopsien und histochemische Analyse:</u>

Leberbiopsien von Patienten mit primär sklerosierender Cholangitis (PSC) sowie Kontrollproben von Patienten mit Zustand nach Lebertransplantation wurden mithilfe histochemischer Färbungen untersucht, um die Glykokalyx der Gallengänge zu charakterisieren. Mit Hilfe einer H&E Färbung konnte die Morphologie der Gallengänge sichtbar gemacht werden, um Gallengänge zu detektieren. Ergänzt wurde eine Alcianblau Färbung, mit deren Hilfe die Glykokalyx in Dicke und Ladung visualisiert werden sollte. Hier ergab sich, dass die Dicke der biliären Glykokalyx der meisten kleinen Gallengänge nicht ausreichend ist für eine Positivität für Alcianblau, d.h. die Sensitivität der Methode war nicht ausreichend hoch.

Zur spezifischen Analyse von Glykostrukturen wurden histochemische Färbungen mit Lektinen an humanen Biopsien etabliert. Dies sind Proteine, die an bestimmte Glykostrukturen binden. Es erfolgte Färbungen mit S*ambucus nigra* Agglutinin (SNA), *Maackia amurensis* Lectin (MAL-II), *Erythrina cristagalli* Lectin (ECL) und Peanut Agglutinin (PNA). Erstere färben terminale Sialinsäure in unterschiedlicher Verknüpfung, letztere terminale Galaktose. Unterschiede anhand der zugrundeliegenden Mikrobiomstruktur konnten mit einer DAB Farbreaktion jedoch nicht visualisiert werden. Da die DAB Farbintensität nicht direkt linear zur Menge des gebundenen Antigens ist, optimierten wir die Färbung mit SNA als Sialinsäure färbendes Lektin daher mit einer

quantifizierbaren Farbreaktion. Die Intensität der VectorRed-Färbung verhält sich linear zur Menge der Sialinsäure, sodass die Signalintensität ausgewertet werden konnte. Ursprünglich war eine Analyse auch weiterer Gallenwegserkrankungen geplant. Aufgrund der Komplexität der Analysen und der Ergänzung weiterer Färbungen haben wir uns bisher auf die PSC als Grunderkrankung konzentriert.

In Vorarbeiten hinsichtlich des biliären Mikrobioms in Lebererkrankungen konnten wir bereits zeigen, dass das Outcome von Patienten mit PSC in Hinblick auf die Entwicklung von Tumoren, den Bedarf einer Lebertransplantation und das Versterben signifikant mit der relativen Häufigkeit des Vorliegens von Bakterien, die eine Sialidase haben, korreliert. Aus Galleproben, welche bei -80°C gelagert waren, konnten leider nur noch Enterokokken als lebende Bakterien rekultiviert werden. Andere interessante bakterielle Genera wie Streptokokken oder Staphylokokken waren in den Proben nicht mehr lebend vorhanden. Um den Effekt der Desialylierung von Cholangiozyten durch bakterielle Sialidasen zu untersuchen, generierten wir eine biliäre Sialidase: Eine Genom-Sequenzierung der biliären Enterokokken aus Patientenproben erfolgte, um spezifisch nach dem Vorliegen von Sialidasen zu schauen. In einem Enterococcus faecalis Stamm (FR191) konnte das Vorliegen einer Sialidase sowie des kompletten Nan-Gene Clusters, dem Cluster, auf dem Sialinsäure metabolisierende Enzyme kodiert sind, gezeigt werden. Um zu zeigen, dass eine enzymatisch aktive Sialidase sekretiert werden kann, erstellten wir bakterielle Filtrate des Stammes. Als Vergleichsstamm wurde ein Enterokokkus (FR143) genutzt, der die größte Ähnlichkeit hinsichtlich der Sequenz zu FR191 hatte, jedoch keine Sialidase im Genom kodiert hatte. Die Stämme wurden in Spezialmedium unter Zugabe von Sialinsäure kultiviert, um die Expression der Sialidasen zu aktivieren. Der Überstand der Bakterienkultur wurde ankonzentriert und mittels spektrophotometrischem Assay wurde eine Messung der Sialidase Aktivität mit 2-O-(p-nitrophenyl)]-α-D-N-Acetylneuraminsäure als Substrat durchgeführt.

Ein weiteres Ziel war die Analyse des Einflusses der Sialidasen unterschiedlicher biliärer Bakterien auf Cholangiozyten. Hierfür war eine Ko-Kultivierung von Cholangiozyten und spezifischen biliären Bakterien geplant. Da die Bedingungen der Kultivierung von Cholangiozyten und Bakterien sehr unterschiedlich war, was eine Ko-Kultivierung schwierig macht und nach aktuellem Forschungsstand unklar war, welche weiteren Enzyme einen potenziell toxischen Effekt auf die Cholangiozyten haben, entschieden wir uns für die Arbeit mit einer aufgereinigten biliären Sialidase. Daher wurde oben genannte Sialidase aus FR191 kloniert. Hierfür wurde eine Aufreinigung etabliert. Schlussendlich wurde die DNA-Sequenz mit einem 6xHIS-Tag in einen Vektor kloniert und das entstandene Plasmid in *E. coli* vervielfältigt. Nach Transformation in einen Protein-produzierenden kompetenten E. coli Stamm erfolgte eine affinitätschromatographische Aufreinigung des generierten Proteins über das 6xHIS Tag. Zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Enterokokkus Sialidase des Stammes FR191 (EF-Sialidase) nutzten wir oben beschriebenen photometrischen Assay. Die Aktivität der Sialidase wurde ebenfalls auf den Leberbiopsien untersucht.

<u>Arbeitspaket 2: Zellkulturen und Organoide:</u>

Eine Cholangiozyten Zellkultur wurde etabliert. Wir verwendeten eine Zelllinie von MMNK1 Cholangiozyten. Zur Analyse der Sialylierung erfolgte eine Lektinfärbung mit anschließender Analyse in der Durchflusszytometrie.
Cholangiozyten-Organoide wurden durch weitere Kooperation mit der AG von Benjamin Heidrich aus Bürstenzytologien und Galleproben von Patienten mit PSC sowie Patienten ohne PSC generiert. Auch hier erfolgte eine Analyse der Glykosylierung mittels Lektinen vor und nach

Desialylierung mittels EF-Sialidase. Zur Analyse des Effektes der Desialylierung der Organoide bei Kontakt mit Galle wurde auch hier die zusätzliche Behandlung mit Gallensäuren (Glycochenodeoxycholic Acid, GCDC) getestet, um das physiologische biliäre Millieu nachzuahmen. Nach Desialylierung mittels EF-Sialidase erfolgte eine Behandlung mit GCDC und anschließende Analyse der Zellviabilität mittels MTT Assay sowie einer Analyse der Apoptose mittels AnnexinV staining.

Massenspektrometrische Analyse der Cholangiozyten (xCGE-LIF):
Die ersten Messungen der geplanten massenspektrometrischen Analyse der Cholangiozyten-Glykane der MMNK1 Zelllinie erfolgte im Juli 2022. Eine genauere Aufschlüsselung der einzelnen Glykane war aufgrund noch fehlender Referenzglykane nicht vollständig möglich. Zudem waren hohe Zahlen an Zellen notwendig, sodass die weiteren Analysen an Patientenmaterial nicht durchgeführt wurden.

Generierung weiterer bakterieller Sialidasen:
Zur Überprüfung der Ergebnisse, welche mittels der aufgereinigten EF-Sialidase generiert wurden, entschieden wir uns zur Klonierung und Aufreinigung weiterer bakterieller Sialidasen aus Galleproben der Patienten. Hierfür wurden zwei Streptokokkus Sialidasen ausgewählt, welche als gesamtes Plasmid mit 6xHIS-Tag im Vektor generiert und in *E. coli* vervielfältigt wurden. Anschließend erfolgte oben beschriebene Aufreinigung mit anschließender Bestätigung der enzymatischen Aktivität mit einem spektrophotometrischem Test mit 4-MU Sia als Substrat. Zudem erfolgte eine Lektinfärbung der MMNK1 Cholangiozyten vor und nach Desialylierung mittels der Sialidasen und anschließende Analyse in der Durchflusszytometrie.

NEU: Sialidase Aktivitätsmessung in Galleproben:
Aufgrund der klinischen Relevanz der Sialidase Aktivität in der Galle der Patienten wurde ein fluorimetrischer Assay mit 4-MU-Sia als Substrat zur Messung der Aktivität in besagten Proben etabliert. Insgesamt 30 Proben von Patienten mit primär sklerosierender Cholangitis wurden gemessen.

***Medizinische Hochschule Hannover***

## c) Wesentliche Ergebnisse und ggf. Zusammenarbeit mit anderen Forschungseinrichtungen

Im Rahmen dieses Projektes konnte ein genauerer Zusammenhang zwischen biliären bakteriellen Sialidasen und dem Schutz der Cholangiozyten im physiologischen Gallenwegsmillieu erleuchtet werden. Einerseits konnte die Sialylierung der Gallengänge in Leberbiopsien bestätigt werden. Zum anderen erfolgte eine Analyse in Geweben von Patienten mit PSC, in der sich ein Unterschied in der Sialylierung entsprechend des inhomogenen Krankheitsbildes bei Patienten mit PSC zeigte. Eine Korrelation mit Kontrollproben von Patienten ohne Gallenwegserkrankungen ist hier noch anzustreben. Zudem konnte sowohl  am Zellkulturmodell der MMNK1 Zellen als

auch an Cholangiozyten-Oragnoiden, die in der MHH generiert wurden, die höhere Empfindlichkeit der Cholangiozyten für Gallensäure-induzierten Schaden nach Desialylierung mittels biliärer bakterieller Sialidasen nachgewiesen werden.
Die Sezernierung von bakteriellen Sialidasen konnte bestätigt und Sialidase Aktivität auch in humanen Galleproben gezeigt werden.

***Medizinische Hochschule Hannover***

# Kapitel 2: Eingehende Darstellung (wird veröffentlicht)

## a) Ausführliche Darstellung der erzielten Ergebnisse im Einzelnen

<u>Arbeitspaket 1: Leberbiopsien und histochemische Analyse:</u>
Mittels der histochemischen Färbungen konnten terminale Zucker in der biliären Glykokalyx visualisiert werden. Zunächst wurde mittels Alcianblaufärbung , die die negativen Ladungen an der Glykokalyx anfärbt, versucht, die Glykokalyx anzufärben und Veränderungen sichtbar zu machen. Mittels dieser Färbung sollte die Hypothese analysiert werden, dass die Desialylierung zu einem Verlust der negativen Ladung führt. Eine genauere Analyse bezüglich der Zusammensetzung, Dicke und Ausprägung war mithilfe der histochemischen Standard-Färbungen aufgrund der fehlenden Sensitivität nicht möglich.
Mittels ergänzter Lektinfärbung erfolgte die genauere Charakterisierung der biliären Glykokalyx. Wir konnten nachweisen, dass die humanen Cholangiozyten in einer α2,6-Verknüpfung sialyliert sind und Sialinsäure eine terminale Glykostruktur ist, was an der SNA Färbung ersichtlich wird. Ergänzend erfolgte eine Färbung mit MAL-II, die Cholangiozyten blieben hierfür negativ. Als unterliegende Glykostruktur konnte Galaktose in β1,3- oder β1,4-Verknüpfung detektiert werden, was durch die ECL beziehungsweise PNA Färbung visualisiert wurde (Bild 1).

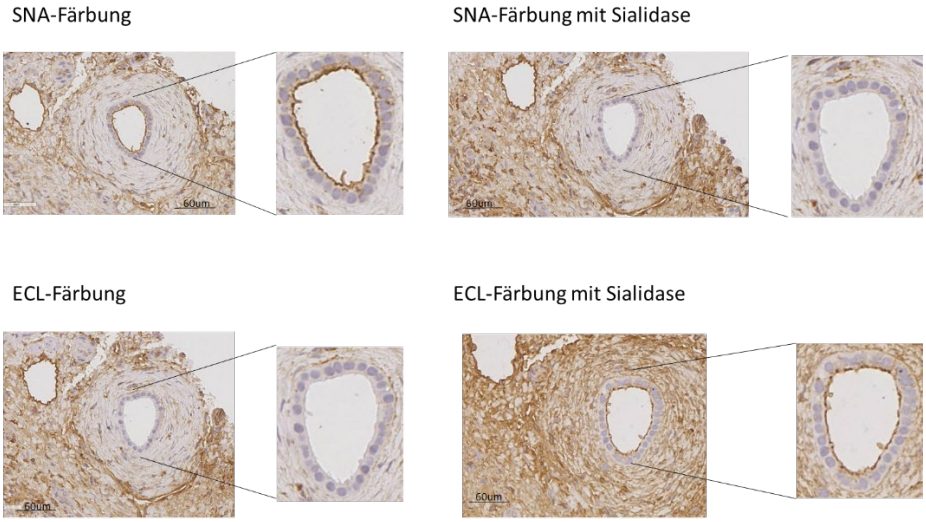


**Bild 1: Lektinfärbung exemplarisch: SNA und ECL Lektinfärbung**: Ohne Behandlung mit Sialidase zeigen die Cholangiozyten apikal eine SNA-Positivität, jedoch keine ECL-Positivität. Nach enzymatischer Desialylierung ist dies umgekehrt der Fall.

Wir ergänzten die Färbung mit SNA als Sialinsäure färbendes Lektin mit einer quantifizierbaren Farbreaktion zur Einschätzung der Menge als vorliegender Sialinsäure. Die Intensität der Färbung verhält sich linear zur Menge der Sialinsäure, sodass die Signalintensität ausgewertet werden konnte. Hier zeigten sich bereits unterschiedliche Intensitäten in der Färbung innerhalb einer Biopsie

und somit eine unterschiedliche Dicke der Sialinsäureschicht. Dies passt zur bekannten Inhomogenität der Grunderkrankung über das Gallenwegssystem verteilt (Bild 2).

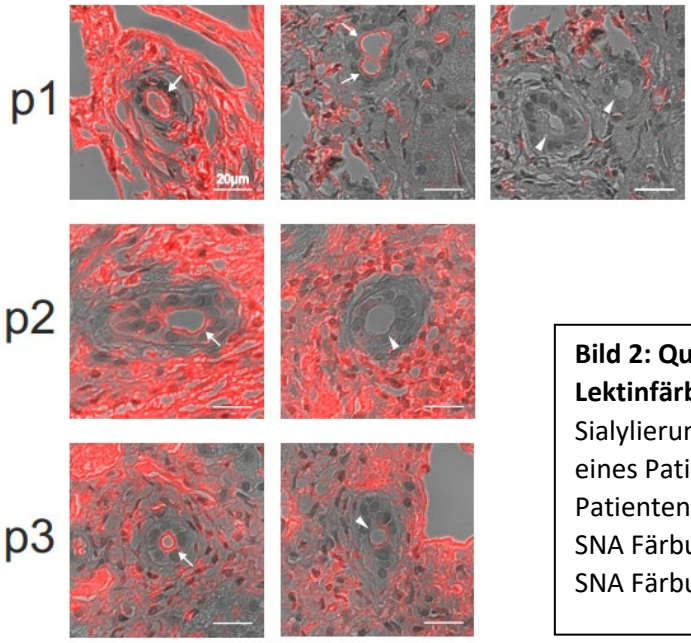


**Bild 2: Quantifizierbare SNA Lektinfärbung:** Inhomogene Sialylierung innerhalb der Gallenwege eines Patienten, exemplarisch drei Patienten aufgezeigt. Pfeile: Intensive SNA Färbung. Pfleilköpfe: schwache SNA Färbung. Patienten p1-p3.

Unsere Arbeitsgruppe hatte in Vorarbeiten bereits zeigen können, dass die Entwicklung eines Outcomes von Patienten mit PSC (Primär sklerosierender Cholangitis) in Hinblick auf die Entwicklung von Tumoren, den Bedarf einer Lebertransplantation und das Versterben signifikant mit der relativen Häufigkeit des Vorliegens von Bakterien, die eine Sialidase haben, korreliert. Es erfolgte daher die Kultivierung und Sequenzierung biliärer Bakterien aus den Patientenproben. Somit erfolgte nach Genom-Sequenzierung der biliären Enterokokken aus Patientenproben und der Analyse nach dem Vorliegen von Sialidasen eine Kultivierung der beiden Enterokokkus Stämme FR143 (Sialidase-negativ) und FR191 (Sialidase-positiv, EF-Sialdiase), welche eine hohe Sequenzähnlichkeit abseits des Vorliegens der Sialidase haben. Bakterielle Filtrate wurden aus den Kulturüberständen generiert, diese wurden ankonzentriert und mittels des oben beschriebenen spektrophotometrischen Assays konnte eine Sialidaseaktivität im bakteriellen Filtrat des FR191 nachgewiesen werden, nicht aber im Stamm FR143. Wir konnten somit zeigen, dass FR191 eine aktive Sialidase exprimiert und in den Überstand sekretiert. Zudem konnten wir - passend zu der Tatsache, dass sich vor der Sialidasesequenz ein Sialinsäure respondierender Promotor zeigte – zeigen, dass die Produktion dieser Sialidase durch das Hinzugeben von freier Sialinsäure gesteigert werden kann (Bild 3).

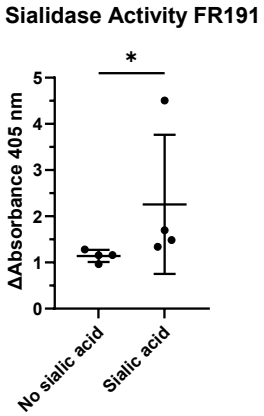


**Bild 3: Sialidase Aktivität in bakteriellen Filtraten:** Sialidase Aktivität in bakteriellen Filtraten von Enterokokkus faecalis FR191 mit und ohne Zugabe von Sialinsäure, Substrat: 2-O-(p-nitrophenyl)]-α-D-N-Acetylneuraminsäure; . (mean delta absorbance ± standard deviation 1.14 ± 0.11 vs. 2.26 ± 1.3; n = 4; p = 0.0286)

Zur weiteren biochemischen Charakterisierung wurde die oben beschriebene EF-Sialidase rekombinant in *E.coli* exprimiert und affinitätschromatographisch bis zur Homogenität aufgereinigt (Bild 4). Hierfür wurde die DNA-Sequenz mit einem 6xHIS-Tag in einen Vektor kloniert und das entstandene Plasmid in *E. coli* vervielfältigt. Nach Transformation in einen Protein-produzierenden kompetenten E. coli Stamm erfolgte eine affinitätschromatographische Aufreinigung des generierten Proteins über das HIS Tag mittels Nickel Chromatographie. Die oben beschriebene Aufreinigung der EF-Sialidase erfolgte zur weiteren Nutzung. Eine Enzymaktivität von 1,75U/mg Protein konnte nachgewiesen werden. Die Sialidase wurde zudem auf Leberbiopsien getestet und es konnte nachgewiesen werden, dass die Sialidase in der Lage ist, die alpha2,6-Sialylierung der humanen Cholangiozyten zu entfernen.

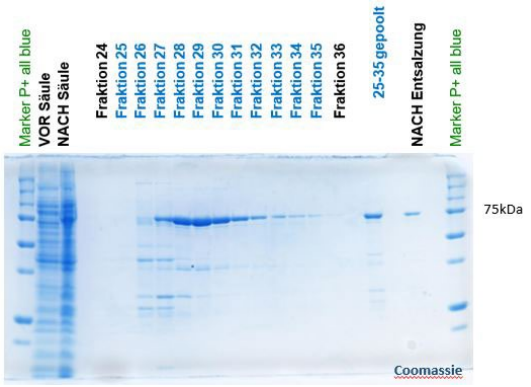


**Bild 4: SDS Page der EF-Sialidase Aufreinigung über die HIS Säule:** Erwartete Bande des Proteins bei 75kDa. Proteinnachweis in den Fraktionen 25-35 der Aufreinigung.

<u>Arbeitspaket 2: Zellkulturen und Organoide:</u>

Mittels Lektinfärbung konnte in der Immunfluoreszenz gezeigt werden, dass die MMNK1 Cholangiozyten eine α2,3-Sialylierung mit β1,3 und β1,4 veknüpfter Galaktose als unterliegenden Zucker zeigten. Nach Behandlung mit der EF-Sialidase waren die Zellen negativ für Sialinsäure-spezifische Lektine. In der zusätzlich ergänzten Lektinfärbung der Cholangiozyten-Organoide, welche aus Galle von Patienten ohne PSC generiert wurden, zeigte sich eine α2,3- sowie auch α2,6-Sialylierung mit β1,3 und β1,4 veknüpfter Galaktose als unterliegenden Zucker. Hier zeigt sich anhand der MAL-II Färbung, welche besagte α2,3-Sialylierung fährt, ein Unterschied zu den Ergebnissen der Lektinfärbungen in den Patientenbiopsien, da diese keine Färbung mit MAL-II gezeigt haben (Bild 5).

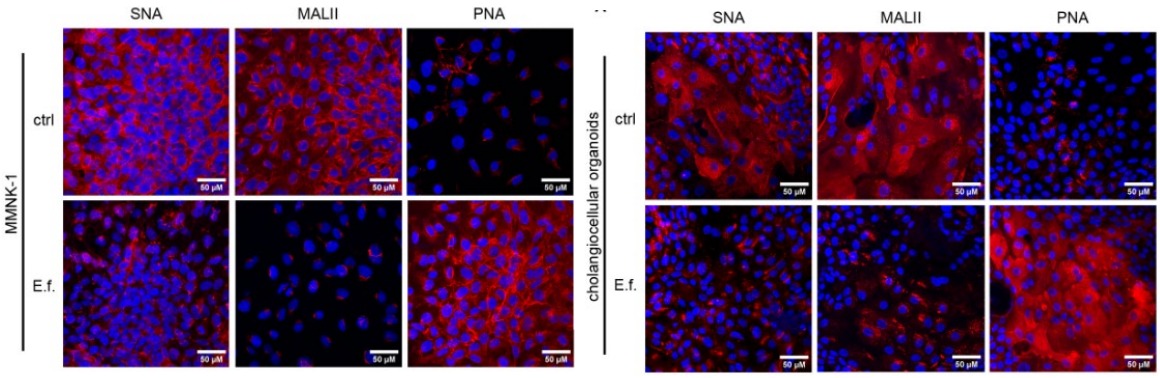


**Bild 5: Immunfluoreszenzbilder von MMNK1 Cholangiozyten und Cholangiozyten Organoiden:** Färbung der Zellkerne mit DAPI (blau) und biotinyliertem *SNA* (Färbung der α2,6-Sialylierung), *MAL-II* (Färbung der α2,3-Sialylierung) und PNA (Färbung der β1,3-Galactose). Vor Behandlung mit E.f. Sialidase Sialylierung ersichtlich, nach Behandlung mit Sialidase Verlust der Sialinsäure

Wie oben beschrieben wurde der Effekt der Desialylierung der Organoide im physiologischen Gallemillieu nachgeahmt und mittels MTT Proliferationsassay und eines Apoptose Assay ausgewertet. Hier zeigte sich eine signifikant reduzierte Viabilität nach Behandlung mit Gallensäuren, wenn die Organoide vorab desialyliert wurden. Die gleiche Tendenz ließ sich im Apoptose Staining zeigen, dies war jedoch nicht signifikant (Bild 6). Der MTT Assay wurde in Kooperation mit der AG Heidrich durchgeführt, der ergänzende Apoptose Assay erfolgte im Rahmen des Clinical Leaves.

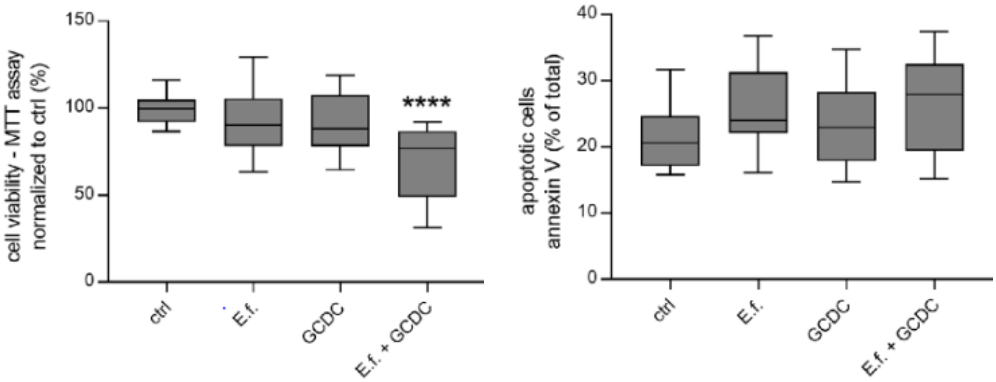


**Bild 6: MTT- und AnnexinV Apoptose Assay nach Behandlung der E.f. Sialidase, Gallensäure (GCDC) oder GCDC Behandlung nach Desialylierung:** **** p>0.0001 one way ANOVA; Desialylierung sorgt für eine signifikante Erhöhung der Empfindlichkeit für Gallensäure induzierten Schaden. N=3

<u>Generierung weiterer bakterieller Sialidasen:</u>

In Kooperation mit unserer Klinik für Mikrobiologie der MHH erfolgte die Sammlung von Patientengalle zur Generierung weiterer biliärer Bakterien. Das Genom von mehreren biliären Streptococcus Stämmen wurde sequenziert und hinsichtlich des Vorliegens einer Sialidase analysiert. Nach eingehender Sequenzanalyse wurden zwei Sialidasen aus unterschiedlichen Streptokokkus Stämmen hergestellt. Hierfür wurde die DNA-Sequenz rekombinant in *E.coli* exprimiert und affinitätschromatographisch bis zur Homogenität aufgereinigt. Die Sialidase Aktivität wurde mittels fluorimetrischem Assay mit 4-MU-Sia als Substrat nachgewiesen. Gemessen wird hier die 4-MU Fluoreszenzintensität innerhalb von 60 Minuten durch Abspaltung der Sialinsäure (Bild 7).

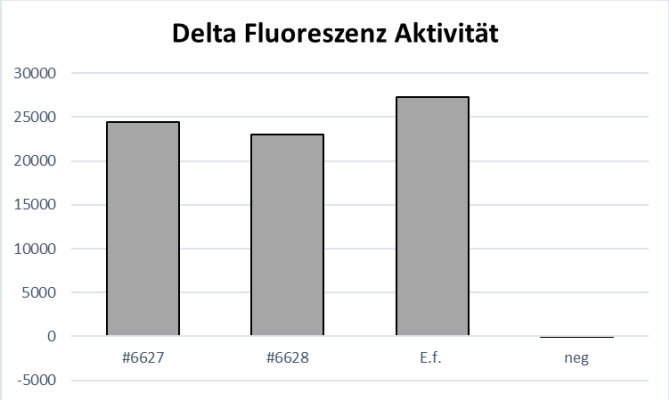


**Bild 7: Sialiadase Aktivitätsmessung aufgereinigter Streptokokkus Sialidasen (#6627 und #6628):** delta Fluoreszenz-Aktivität wird gezeigt. Als negative Kontrollen wurde der Versuchsansatz ohne Enzym verwendet. Es zeigt sich eine Sialidase Aktivität der aufgereinigten Sialidasen. Messung in Triplikaten

NEU: Aktivitätsmessung in Galleproben:

Die Messung von Sialidase Aktivität in Galleproben mittels fluorimetrischem Assay wurde im Rahmen des Projektes anhand von Testproben von Patienten mit unterschiedlichen Erkrankungen etabliert. Es erfolgte die Messung von insgesamt 30 Proben von Patienten mit PSC (Bild 8). Als Kontrolle wurden hitze-inaktivierte Proben verwendet, da es nicht möglich ist, gesunde Kontrollproben zu erhalten, da eine Intervention zur Gallesammlung zu risikoreich ist. Insgesamt zeigte sich eine sehr inhomogene Sialidase Aktivität innerhalb der Kohorte, was prinzipiell zu den großen Unterschieden im klinischen Verlauf der Erkrankung passt. Für eine detaillierte Auswertung ist die Messung von weiteren PSC-Patienten und vor allem von Kontrollprobanden ohne Gallenwegserkrankungen anzustreben. Dies ist zur weiteren Analyse essentiell, war jedoch im Rahmen der aktuellen Arbeit nicht möglich aufgrund von geringen Probenmengen der Galleproben.

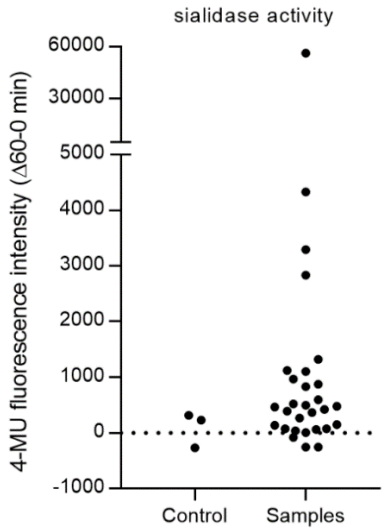


**Bild 8: Sialiadase Aktivitätsmessung in der Galle:** delta Fluoreszenz-Aktivität wird gezeigt. Als negative Kontrollen wurden Hitze-inaktivierte Proben verwendet. Es zeigt sich eine inhomogene Sialidase Aktivität innerhalb der Kohorte

## b) Meilensteine und Liefergegenstände

### Meilensteine

| Nr. | Titel | Arbeitspaket | Einrichtung | Datum lt. Vorhabenbeschreibung | Korrigiertes Datum | Status | Kommentar |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Lektin-Färbung der humanen Leberbiopsien | 1 | Medizinische Hochschule Hannover | 28.02.2022 | 28.02.2022 | Im Zeitplan | |
| 2 | Analyse der Glykokalyx in den Gallengängen der Leberbiopsien in Bezug auf die Grunderkrankung | 1 | Medizinische Hochschule Hannover | 31.05.2022 | | zurückgestellt | aufgrund neuer Ergebnisse nicht mehr im primären Fokus |
| 3 | Analyse der Glykokalyx in den Gallengängen der Leberbiopsien in Bezug auf das Mikrobiom | 1 | Medizinische Hochschule Hannover | 31.12.2022 | 31.12.2022 | Im Zeitplan | |
| 4 | Analyse der Cholangiozyten N-Glykane und Glykolipide mit xCGE-LIF vor und nach Kultivierung mit verschiedenen biliären Bakterienspezies | 2 | Medizinische Hochschule Hannover | 30.09.2022 | | Nicht erreichbar | Aufgrund fehlender Möglichkeiten zur Ko-Kultivierung sowie fehlender Referenzglykane nicht weiter umgesetzt |
| 5 | Analyse der Cholangiozyten-Glykane der xCGE-LIF Analyse (Teil 4) | 2 | Medizinische Hochschule Hannover | 31.03.2023 | | Nicht erreichbar | Aufgrund fehlender Referenzglykane nicht weiter umgesetzt |
| 6 | Analyse der Organoid N-Glykane und Glykolipide mit | 2 | Medizinische Hochschule | 31.07.2023 | | Nicht erreichbar | Aufgrund nicht ausreichender |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | xCGE-LIF vor und nach Kultivierung mit verschiedenen biliären Bakterienspezies | | Hannover | | | | Zellzahlen und fehlender Referenzglykane nicht weiter umgesetzt |
| 7 | Analyse der Organoid-Glykane der xCGE-LIF Analyse (Teil 6) | 2 | Medizinische Hochschule Hannover | 31.10.2023 | | Nicht erreichbar | Aufgrund nicht ausreichender Zellzahlen und fehlender Referenzglykane nicht weiter umgesetzt |

## Liefergegenstände

| Nr. | Titel | Arbeitspaket | Einrichtung | Datum lt. Vorhabenbeschreibung | Korrigiertes Datum | Status | Kommentar |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Publikation zur in vivo Analyse | 1 | Medizinische Hochschule Hannover | 31.08.2022 | 02/2024 | Verzögert | Manuskript eingereicht |
| 2 | Publikation zur in vitro Analyse | 2 | Medizinische Hochschule Hannover | 31.10.2023 | 02/2024 | Verzögert | Manuskript eingereicht |

## c) Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

### Personalmittel

***Medizinische Hochschule Hannover***
**Einsatz: 117.132,66**
**Sachverhalt: die ursprünglich beantragten Personalmittel lagen bei etwa 130.000€. Aufgrund einer Reduktion des Clinical Leaves von 18 auf 15 Monate wurden entsprechende Restgelder an das DZIF zurückgezahlt.**
Es wurde entsprechend meine eigene Stelle von November 2021 – Mai 2022 zu 100% finanziert. Von Mai 2022 bis April 2023 erfolgte eine 50% Finanzierung, da ich zu 50% in der Klinik tätig war. Von Mai 2023 bis Oktober 2023 erfolgte erneut eine 50% Freistellung und dementsprechend 50% Finanzierung.

### Sachmittel (auch Aufträge)

***Medizinische Hochschule Hannover***
**Einsatz: 25.606,86€**
**Sachverhalt**
Zellkultur Mittel (Plastikmaterial, Medium, Zellen)
Substrate und Puffer zur enzymatischen Sialidaseaktivitätsbestimmung
FACS Material
Enzyme und Antikörper zur Glykancharakterisierung
PCR Material, Primer
Mikrobiologie Bedarf (Kulturmedien, Agarplatten)

### Investitionsmittel

***Medizinische Hochschule Hannover***
**Einsatz: 1.685,04€**
**Sachverhalt:**
Pipettenset (Da Arbeit mit bakteriellen Filtraten gesondertes Pipettenset notwendig

### Reisekosten

***Medizinische Hochschule Hannover***
**Einsatz: keine**
**Sachverhalt:**

## d) Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeiten

Der Ressourceneinsatz für die geleistete Arbeit und die erzielten Ergebnisse war angemessen und notwendig. Die Bearbeitung des Projektes und die weitere Analyse der biliären Glykokalyx wäre andernfalls nicht möglich gewesen.

***Medizinische Hochschule Hannover***

## e) Voraussichtlicher Nutzen des Vorhabens, insb. die Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Wir konnten zeigen, dass bestimmte bakterielle Genera in der Lage sind, Sialidasen zu exprimieren und diese in die Galle zu sezernieren. Aus Vorarbeiten wissen wir, dass bestimmte bakterielle Genera und das erhöhte Vorkommen von bakteriellen Sialidasen innerhalb des biliären Mikrobioms mit einem schlechteren Outcome innerhalb der PSC assoziiert sind. Wir konnten zeigen, dass eine Desialylierung von Cholangiozyten diese anfälliger macht für Gallensäure-induzierten Schaden. Hieraus ergibt sich die Hypothese, dass ein hohes Vorliegen von bakteriellen Sialidasen innerhalb des biliären Mikrobioms für Cholangiozyten in Kombination mit den Gallensäuren toxisch ist. Eine genaue Charakterisierung der unterschiedlichen bakteriellen Sialidasen in der Galle hinsichtlich ihrer Aktivität und enzymatischen Spezifität sollte im Rahmen eines weiteren Projektes erfolgen. Nach ausgiebiger Literaturrecherche und Alignments scheint es über 50 relevante bakterielle Sialidasen im Gallenwegssystem zu geben. Eine genauere Einteilung dieser anhand ihrer Struktur und ihres aktiven Zentrums und eine anschließende Klonierung und in vitro Testung ist angestrebt.
Die biochemische Charakterisierung wird in der Zukunft die Suche nach spezifischen Inhitoren erlauben, die *in vitro* getestet und *in silico* optimiert werden können. Langfristig steht hiermit ein therapeutischer Ansatz in der Behandlung von Patienten mit PSC zur Verfügung.
Eine genaue Charakterisierung und eine Testung weiterer Inhibitoren ist in einem Folgeantrag geplant.

Mit der Möglichkeit der Bestimmung von Sialidase Aktivitäten in der Galle von Patienten ergeben sich neue Möglichkeiten für die Diagnostik von Patienten mit chronischen Gallenwegserkrankungen sowie eine genauere Einteilung der Patienten, die von einer beispielsweise antibiotischen Therapie profitieren könnten. Zudem ist eine Erhöhung der Testproben und eine Korrelation mit dem zugrunde liegenden biliären Mikrobiom anzustreben, um die ersten Ergebnisse in einer weiteren Kohorte zu verifizieren.

Eine weitere Förderung zum besseren Verständnis des Zusammenspiels zwischen den Glykokalyx-modifizierenden Enzymen der biliären Bakterien und den Cholangiozyten und ein damit einhergehendes besseres Verständnis von Diagnostik und möglichen Therapieoptionen der Erkrankung ist daher wünschenswert.

***Medizinische Hochschule Hannover***

## f) Während der Durchführung des Vorhabens dem Zuwendungsempfänger bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Keine

***Medizinische Hochschule Hannover***

## g) Erfolgte oder geplante Veröffentlichung der Ergebnisse nach Nr. 5 der Nebenbestimmungen für Zuwendungen (NABF/NKBF 2017)

keine

***Medizinische Hochschule Hannover***