

Die Entwicklung eines Gallengangsatresie Modells durch Einsatz des Isoflavonoids Biliatresone

Etablierung, Analyse, Translation

Christian Tomuschat
Klinik und Poliklinik für Kinderchirurgie
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

1. Antragsteller

Christian Tomuschat

Klinik und Poliklinik für Kinderchirurgie

und

Hans Christian Schmidt

Doktorand, Klinik und Poliklinik für Kinderchirurgie

2. Zusammenfassung

Die Pathogenese der Gallengangsatresie (GA) ist unbekannt. Unter der Nutzung von Biliatresone wird ein GA-Phänotyp bei der neonatalen Maus induziert. Anschließend wird durch die Verminderung der antioxidativen Kapazität in den neonatalen extrahepatischen Cholangiozyten die Initiierung und Fortschreiten der Entzündung in den Gallengängen sowie der Fibrose beschrieben. Der Erfolg des Vorhabens wird nicht nur eine neue Sicht auf die Pathogenese der GA ermöglichen, es bietet auch die Möglichkeit, ein Mausmodell auf Grundlage von Biliatresone weiter zu charakterisieren und damit eine systematische Erforschung des Einflusses von Umwelttoxinen auf die GA zu zulassen. Der Einsatz von humanen Cholangiozytenorganoide wird darüber hinaus den Weg für eine sinnvolle Translation frei machen.

3. Stand der Forschung

Die Gallengangsatresie betrifft nur Neugeborene. Sie ist eine entzündlich-fibrosierende und obliterierende Affektion der extra- und intrahepatischen Gallenwege. Ihre Pathogenese ist unbekannt. Sie stellt den häufigsten chirurgischen Interventionsgrund eines Ikterus im Neugeborenenalter dar. Typisch sind eine direkte Hyperbilirubinämie, achole Stühle sowie dunkler Urin [1]. Die Standardtherapie ist die zeitnahe Diagnose und die Durchführung einer Hepatoporto-Enterostomie (Kasai-OP) [2]. Trotz zügiger Diagnose und Operation ist eine Verbesserung des Ikterus in nur 60-70 % der behandelten Patienten zu erreichen. Aufgrund der progressiven Natur der GA sowie lebenslangen Risiko von wiederkehrenden Cholangitiden, zunehmender portaler Hypertension und fortschreitender Leberzirrhose benötigen 75 % der Patienten vor ihrem 20. Lebensjahr eine Lebertransplantation [3]. Die Lebensqualität von Patienten mit GA im Vergleich zur Normalbevölkerung ist deutlich eingeschränkt und wird maßgeblich durch die fortschreitende Leberzirrhose sowie Immunsuppression nach erfolgter Lebertransplantation definiert [4]. Nicht zuletzt stellt die Erkrankung eine erhebliche gesundheitsökonomische Belastung dar. Die Entwicklung neuer Therapien ist limitiert, da die molekularen Ursachen der GA sowie das rapide Fortschreiten der hepatischen Dysfunktion nur schlecht verstanden sind [1]. Zuletzt rückten Umwelttoxine in den Fokus der Ursachensuche, da die bisherigen, Virus-basierenden Modelle sich als unzureichend dargestellt haben [5, 6, 7].

Biliatresone

Nach Ingestion von Biliatresone, einem Isoflavonid aus Pflanzen der *Dysphania*-Spezies, entsteht bei Schafen ein GA-ähnlicher Phänotyp [5][6]. Von einem pathochemischen Gesichtspunkt vermindert Biliatresone den Glutathionspiegel in den Cholangiozyten. Die daraus resultierende Verminderung der antioxidativen Kapazität von Leber und Gallenwege führt zu einer erhöhten Vulnerabilität gegenüber toxischer Insulte. In vitro wurden diesbezüglich bereits gute Ergebnisse erzielt werden [5,7]. Wir konnten bereits zeigen, dass die Cholangiozyten von C57BL/6 Mausneonaten ein „suszeptibles Fenster“ besitzen, wann durch die Gabe von Biliatresone eine Schädigung eintritt (**Abb. 1**).

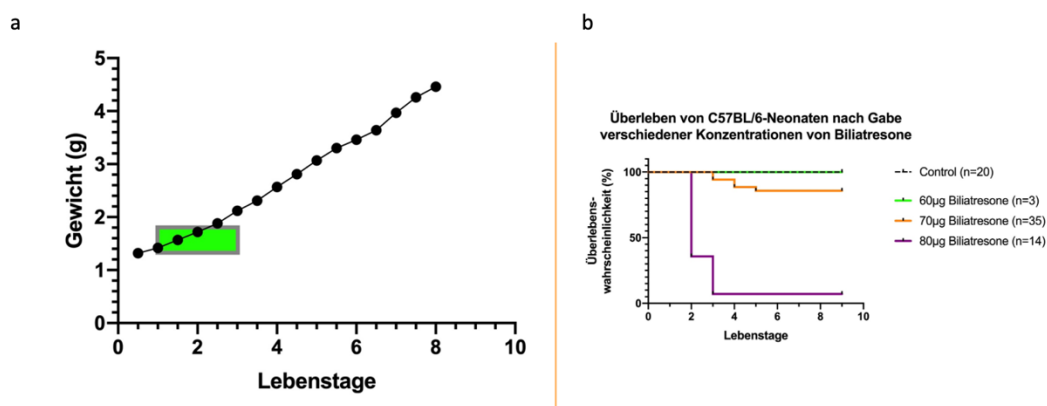


Abbildung 1: a) Suszeptibilitätsfenster von C57BL/6-Neonaten für die Biliatresone-Injektion mit Induktion einer extrahepatischen Cholangiopathie. Ideales Zeitfenster zwischen 24 und 72 Stunden. Ideales Gewichtsfenster C57BL/6: 1,40-1,80g. Wenn Gewichts- und Zeitfenster erreicht sind, dann ist die Suszeptibilität der Neonaten gegenüber dem Biliatresone am wahrscheinlichsten. b) Spezifische Konzentrationen und Mortalität.

In klinischen Studien wurde belegt, dass die antioxidative Kapazität der Leber negativ mit der GA-Inzidenz sowie Inflammation der Leber und Zirrhose korrelierte [8]. Weiterhin führt Biliatresone zur Microtubuli-Destabilisierung und damit zu einer erhöhten Permeabilität. In Cholangiozytenexplantkulturen, initiierte Biliatresone eine Lumenobstruktion sowie eine subepitheliale Fibrose [7,9,10]. Ebenfalls wurden verminderte mRNA Level des Transkriptionsfaktor SOX17 nach Gabe von Biliatresone gemessen. Dies ist von Relevanz da SOX17 maßgeblich bei der embryonalen Entwicklung der extrahepatischen Gallenwege implementiert ist und eine Haploinsuffizienz von SOX17 bereits schwere Missbildungen der ableitenden Gallenwege hervorruft [11,12]. Biliatresone stellt somit einen robusten externen umweltspezifischen link zu einer intrazellulären Signalkaskade da, die einen direkten Einfluss auf die Entwicklung und Homöostase der Cholangiozyten hat. Somit ist Biliatresone das ideale Toxin, um eine extrahepatische GA-Phänotyp bei Mäusen auszulösen.

4. Vorarbeiten

Der ethischen Zustimmung N045/21 entsprechend wurde Biliatresone in 24-72 Stunden alte murine C57BL/6-Neonaten intraperitoneal einmalig injiziert. Infolgedessen entwickelte sich ein GA-ähnlicher Phänotyp mit Ikterus, gelben Urin und acholen Stuhl (Abb. 2). Pathomorphologisch entwickelte zunächst eine Dilatation mit anschließender Obstruktion der extrahepatischen Gallenwege. Biliatresone ist hoch effektiv das Ausmaß der antioxidativen Kapazität in neonatalen extrahepatischen Cholangiozyten zu verändern und gleichzeitig eine Cholangiopathie zu etablieren [7,9]. Damit prädestiniert sich Biliatresone, als spezifischer Vertreter der Isoflavonoide, als Umwelttoxin, welches spezifisch auf das extrahepatische Gallengangssystem (EHGA) wirkt. Der von unserer Forschungsgruppe vorgelegte Ansatz ist absolut neu und ist im Hinblick der Pathogenese der GA einzigartig. Das Konzept erlaubt auch eine systematische Untersuchung der Fibrose und kann möglicherweise neue Hinweise auf die progressive Dynamik der Erkrankung liefern. Bisherige Tiermodelle zur GA sind nicht verlässlich und spiegeln allenfalls nur einen kleinen Teil der komplexen Dynamik wider, unser Modell folgt einem neuen Ansatz, der dem Phänotyp beim Menschen sehr gut abbildet.

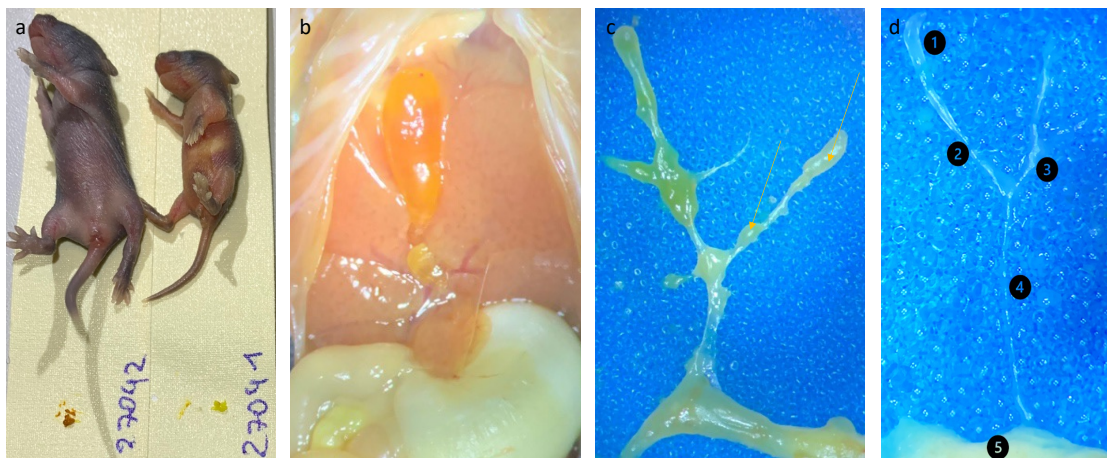


Abbildung 2: a) 7-Tage alte C57BL/6 Mäuse. Das rechte Tier wurde mit Biliatresone behandelt, typische Zeichen eines Ikterus sowie acholer Stuhl. Links Kontrolltier, behandelt mit NaCl 0.9 % sowie gleichen Anteilen der DMSO-Konzentration wie in der Biliatresone-Lösung. b) Extrahepatisches Gallengangssystem (EHGA) mit Dilatation und Hydrops der Gallenblase. c) EHGA mit dilatierten und obstruktiven Elementen. d) Exemplarisch EHGA einer murinen Maus mit 1) Gallenblase 2) Ductus cysticus 3) Ductus hepaticus 4) Ductus choledochus 5) Duodenum.

5. Projektziele mit Forschungshypothesen

In der Grundlagenforschung in Bereich der GA gilt zunächst zu beweisen, wo die Erkrankung beginnt. Bisher konnte nicht belegt werden, ob die Erkrankung intrahepatisch oder extrahepatisch ihren Ursprung hat. Wenn man die unterschiedliche Embryologie von intrahepatischen und extrahepatischen Gallengangssystem betrachtet (Entwicklung in Abhängigkeit von SOX17), so ist ein Ursprung extrahepatisch in Erwägung zu ziehen und bildet die Hypothese unseres Ansatzes [12]. Weiterhin gehen wir von einem second-hit Modell aus.

Erhöhte Suszeptibilität der extrahepatischen neonatalen Cholangiozyten (Abb. 1) mit anschließendem „second hit“ hin zur Etablierung einer manifesten GA. Die optimale Translation erfolgt anschließend mit Etablierung von humanen Cholangiozytenorganoide.

6. Arbeitsprogramm mit Zielen

Ziel 1 ist als durch gezielte Manipulation des EHGA bei neonatalen Mäusen einen GA-Phänotyp zu etablieren. Dies ist, wie in unseren Vorarbeiten beschrieben, bereits verlässlich gelungen.

Ziel 2 soll die Dynamik der Erkrankung mit Inflammation und Fibrose sowie konsekutiver Zirrhose der Leber charakterisiert werden. Dies soll durch verschiedene Standardlabortechniken deskriptiv erfolgen (**Abb. 3**)

Störung der Leberfunktion	Serummarker: Genkorrelation:	ALT, GLDH Cyp7a1,Nr0b2,Fn1
Funktionsverlust	Serummarker: Genkorrelation:	Bilirubin (8-22mmol/L), Albumin Timp1,Cd14,Ccl273
Inflammation 1	Immunhistochemie: Genkorrelation:	BrdU+/SM22α Kupffer-Zellen Mki67,Birc5,Notch1
Inflammation 2	Immunhistochemie: Genkorrelation:	S100A4+ Zellen Pdgrβ,Birc5,Tgrβ
Cholangiozytenreaktion	Immunhistochemie: Genkorrelation:	BrdU+ Cholangiozyten Ccr2mCyp2c37,Slc10a1
Aktivierung von hepatischen Sternzellen	Immunhistochemie: Genkorrelation:	αSMA + Zellen Tgrβ2,Cxcl4,Timp1
Nekrose	Immunhistochemie: Genkorrelation:	Infarkt Fläche (H&E Färbung) Gsta2,Gstm1,Timp1
Fibrose	Immunhistochemie: Genkorrelation:	Sirius red Fläche, CTGF+ Zellen Timp2,Tnfrsf1β,Il10rb, Tgrβ,Pdgrβ,Tgrbr2

Abbildung 3: Arbeitsprogramm Ziel 2

Ziel 3 Humane Cholangiozytenorganoide (Expertise im Bereich der Organoide liegen bereits ausreichend vor) werden entwickelt und mit Biliatresone behandelt. Ziel ist die Identifikation von drei Genen, die als kritisch nach Biliatresone induziertem Cholangiozyten Insult angesehen werden: RhoU/Wrch1, Hey2, and SOX17. Alle drei Gene bilden linear eine Signalkaskade und führen in Abhängigkeit von Glutathion zu einer ausgeprägten Cholangiopathie [7].