

Roland Ernst Stiftung für Gesundheitswesen  
Geschäftsführung  
Naumannstr.8  
01309 Dresden

## Abschlussbericht Projekt 5/21

Thema: Einfluss von Darmreife und Endotoxinen auf das Expressions- und Aktivierungsprofil des TLR4-NFKB Signalweges im Mausmodell – Untersuchungen zur Verbesserung der Lebenserwartung bei der nekrotisierenden Enterokolitis (NEC)

Kurzbezeichnung Expressions- und Aktivierungsprofil des TLR4-NFKB Signalweges in Abhängigkeit der Reife intestinaler Epithelzellen

Laufzeit 01.12.2021 – 31.05.2023

### Antragsbearbeiter/Projektleiter

Name, Vorname Riedel, Jan (Dr. rer. nat.)  
Dienstbezeichnung/Funktion Laborleiter der Kinderchirurgie  
Hochschule Universität Leipzig  
Telefon 0341/97-26515  
E-Mail [Jan.Riedel@medizin.uni-leipzig.de](mailto:Jan.Riedel@medizin.uni-leipzig.de)

Name, Vorname Mayer, Steffi (PD Dr. med.)  
Dienstbezeichnung/Funktion Fachärztin für Kinderchirurgie  
Hochschule Universität Leipzig  
Telefon 0341/97-26872  
E-Mail [Steffi.Mayer@medizin.uni-leipzig.de](mailto:Steffi.Mayer@medizin.uni-leipzig.de)

Direkt der Klinik/des Instituts  
Name, Vorname Lacher, Martin (Prof. Dr. med.)  
Dienstbezeichnung/Funktion Direktor der Klinik und Poliklinik für Kinderchirurgie

Leipzig, 28.03.2024

# 1 Motivation und Zielsetzung des Projekts

Die nekrotisierende Enterokolitis (NEC) ist die häufigste, lebensbedrohliche gastrointestinale Störung der Neonatalperiode. Sie tritt bei etwa 5-10% der extrem Frühgeborenen auf und ist durch eine Dysregulation der mukosalen Immunantwort bestimmt. Trotz verbesserter neonatologischer und chirurgischer Therapiemöglichkeiten ist eine NEC mit einer hohen Mortalität verbunden. So sterben noch immer 15-30% der Frühgeborenen mit NEC. Überlebende Kinder weisen zudem eine signifikante Häufung neurologischer Entwicklungsstörungen, chronische Lungenerkrankungen oder ein Kurzdarmsyndrom aufgrund operativer Resektion nekrotisches Darmgewebes auf [1–3].

Spezifische Behandlungsmöglichkeiten für die NEC gibt es nicht. Präventive Maßnahmen können einer NEC vorbeugen, die Interventionsmöglichkeiten sind jedoch limitiert. Neonatologische Behandlungsstrategien begrenzen sich auf den Einsatz von Breitbandantibiotika und das Pausieren der enteralen Ernährung. Bei fortschreitender Entzündung mit Darmperforation muss das nekrotische Gewebe chirurgisch entfernt und häufig ein temporärer künstlicher Darmausgang angelegt werden. Nicht selten gehen diese Eingriffe mit einem signifikanten Verlust an Darmlänge einher.

Die NEC ist eine multifaktorielle Erkrankung und betrifft zumeist Frühgeborene. Diese zeigen im Vergleich zu termingeborenen Kindern einen deutlichen Unterschied in der bakteriellen Kolonisation, der mikrozirkulären Perfusion, der Reifung des intestinalen Epithels sowie des gastrointestinalen Immunsystems [4]. Die Pathogenese der NEC basiert auf einer übermäßigen Induktion von proinflammatorischen Signalkaskaden, welche die Mukosa des unreifen Darms schädigen, ohne dass endogene Reparaturmechanismen adäquat greifen [5]. Die daraus entstehende Permeabilitätsstörung begünstigt eine Translokation von Bakterien durch das Darmepithel mit konsekutiver intestinaler Ischämie, die schließlich in einer NEC resultiert [6].

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass dem Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) bei der Initiierung der NEC eine entscheidende Rolle zukommt. Toll-like Rezeptoren (TLR) dienen der Erkennung von PAMPs (pathogen-associated molecular pattern) und werden zum angeborenen Abwehrsystem gezählt [7]. PAMPs sind molekulare Signaturen, die ausschließlich von Krankheitserregern gebildet werden. Über TLR können diese Signaturen erkannt und eine entsprechende Immunantwort durch die Expression von Zielgenen induziert werden.

Lipopolysaccharide (LPS) in der äußeren Membran negativer Bakterien fungieren als PAMP und sind spezifische Liganden für den TLR4 Rezeptor. Über Bindung an den Rezeptor kommt es intrazellulär zur Translokation des Transkriptionsfaktor NFκB (p65) und damit zur Induktion einer proinflammatorischen Immunantwort.

Die Applikation von LPS wird auch verwendet, um eine nekrotisierende Enterokolitis im Tiermodell zu induzieren [8, 9]. Hiermit hat sich unsere Arbeitsgruppe in den letzten Jahren bereits intensiv beschäftigt. So wurde im Vergleich zum etablierten „bakteriellen“ NEC Modell (LPS-Applikation, Kälte- und Hypoxiebelastung) eine mögliche „virale“ NEC bei 72 Stunden alten Mäusen mit Hilfe von polyinosinic:polycytidylic acid (pI:C) induziert. Das in seiner Struktur einer viralen doppelsträngigen RNA ähnliche pI:C ist in der Lage, eine virale Exposition zu simulieren. Nach pI:C-Applikation konnten zwar intestinale Läsionen hervorgerufen werden, ein Anstieg von proinflammatorischen Zytokinen wurde jedoch nicht beobachtet [9]. Im Gegensatz dazu induzierte die Applikation von Dextran Sodium Sulfat (DSS) in 3 Tage alten Mäusen sowohl NEC-artige Läsionen als auch eine ausgeprägte humorale und zelluläre Immunreaktion [8].

Eine NEC-ähnliche Inflammation kann auch mechanisch durch ein intestinales Ischämie-Reperfusion-Modell induziert werden, bei der die A. mesenterica sup. der Versuchstiere für 30 Minuten abgeklemmt und anschließend reperfundiert wird [10]. Die daraus resultierende Entzündungsreaktion

bei neonatalen, vier Tage alten Mäusen war im Vergleich zu adulten, vier Wochen alten Mäusen stark erhöht [11]. Diese Ergebnisse unserer Gruppe unterstreichen unsere Expertise im Bereich der NEC Forschung und die Bedeutung der reifeabhängigen intestinalen Inflammation.

Bei frühgeborenen Kindern kommt es, ähnlich wie nach LPS-Stimulation im Tierversuch, zu einer übermäßigen Aktivierung des TLR4 Rezeptors ausgelöst durch die mikrobielle Besiedlung des Darms [12]. Diese übermäßige Aktivierung ist auf eine erhöhte Expression von TLR4 im Darm von Frühgeborenen zurückzuführen. Grund hierfür ist eine entwicklungsabhängige Expression von TLR4, welche bei termingeborenen Kindern deutlich vermindert ist [13]. Somit geht die Unreife des Darms mit einer erhöhten TLR4 Expression, die sich als Intoleranz gegenüber Endotoxinen wie LPS manifestiert, einher. Dies ist ein wesentlicher pathognomonischer Faktor der NEC.

Zusätzlich konnte in murinen primären intestinalen Epithelzellen gezeigt werden, dass postnatal durch LPS Exposition eine Endotoxin-Toleranz erworben wird [14]. Diese Ergebnisse sind sowohl im Rattenmodell [15] als auch in humanen experimentellen Ansätzen reproduzierbar [16, 17]. Der Zusammenhang zwischen Endotoxin-Toleranz und altersabhängiger Darmreife wurde jedoch bisher nicht ausreichend aufgeklärt. Auch fehlt eine systematische entwicklungsabhängige Analyse der Signalkomponenten, welche nach LPS Stimulation aktiviert werden.

## 2 Zielsetzung des Projekts

Ziel des Projektes ist es, die Endotoxin (LPS)-induzierte proinflammatorische Immunantwort in Abhängigkeit von der Reife des Darmes weiter systematisch tierexperimentell zu untersuchen, um daraus neue Therapiestrategien für die NEC abzuleiten und damit ihre Morbidität und Mortalität zu senken.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Validierung unterschiedlicher Entwicklungsstadien intestinaler Epithelzellen

Um den Reifegrad der murinen Darmzellen dem humanen System anzugleichen, wurden unterschiedliche Altersstufen der Mäuse gewählt, welche den Reifegrad von humanem Darm von der Pränatalperiode bis in das Erwachsenenalter entsprechen (Abbildung 1) [18]. Diese Korrelation beruht auf der Expression unterschiedlicher Markergene (Strukturgene, Gene für die Homeostase, Epithelial spezifische Gene) und der relativen Anzahl an bestimmten Zellpopulationen (Goblet, Paneth und Enteroendokrine Zellen).



Abbildung 1: Schematische Darstellung der humanen Entwicklungsphasen mit korrespondierenden Altersstufen von Mäusen hinsichtlich des Reifegrads des Darm. Dem Reifegrad des Darms von unreif zu reif lassen sich bestimmte humane Entwicklungsphasen einem entsprechendem Mausalter zuweisen. Dabei korrespondiert hinsichtlich quantitativer Zelltypanalyse und mRNA Markerexpression fetaler Darm mit Darm von Mäusen des Alters 1 Woche (<P10). Darmgewebe

von frühgeborenen Kindern weist den zuvor beschriebenen Kriterien eine Korrespondenz zu 2 Wochen (P14) auf. Die Darmreife von termingeborenen Kindern kann dem Alter von 4 Wochen (P28) in Mäusen zugeordnet werden und Mäuse des Alters von 8 Wochen (P56) entsprechen adultem humanem reifen Darm [18].

Um die gewählten unterschiedlichen Entwicklungsstadien zu verifizieren, haben wir die basale Expression von epithel-spezifischen Genen innerhalb der unterschiedlichen Altersstufen bestimmt (Abbildung 2). Sowohl für *Reg3-γ* als auch für *Lysozym (Lys)* konnten wir zeigen, dass zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien diese unterschiedlich exprimiert sind. Beide Gene zeigten eine kontinuierliche Hochregulation bis zur 4. Woche der murinen Entwicklung. Insbesondere *Reg3-γ* war nach 4 Wochen stark erhöht während diese erst in der 8. Woche für *Lys* detektierbar war. Aufgrund der Unterschiede in der Dynamik der Expression dieser Markergene gehen wir davon aus, dass diese unterschiedlichen Entwicklungsstadien der intestinalen Epithelzellen widerspiegeln.

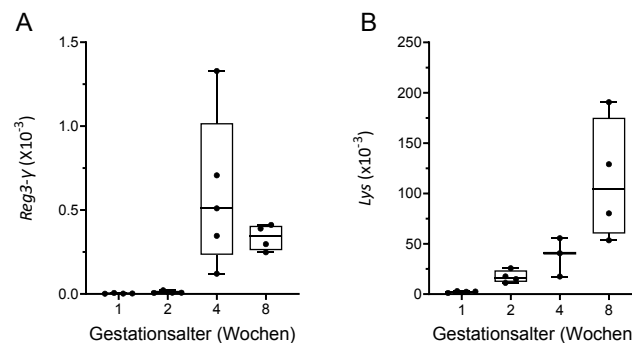


Abbildung 2: Quantifizierung von epithel-spezifischen Genen in primären IECs in verschiedenen Entwicklungsstadien des Darms. Primäre IECs wurden in verschiedenen Entwicklungsstadien isoliert und die Genexpression von *Reg3-γ* (A) und *Lys* (B) wurde mittels RT-PCR bestimmt.  $\beta$ -Actin wurde als Housekeeper verwendet zur Relativierung der Genexpression (n= 3-5).

### 3.2 LPS-induzierte Genexpression von murinen intestinalen Epithelzellen zu unterschiedlichen Stadien der intestinalen Entwicklung

Nach Verifizierung der unterschiedlichen Entwicklungsstadien anhand von Markergenexpression haben wir untersucht, ob sich diese unterschiedlichen Stadien hinsichtlich ihrer pro-inflammatorischen Antwort unterscheiden. Um dies zu analysieren, haben wir primäre IECs für drei Stunden mit  $1\mu\text{g/ml}$  LPS stimuliert und im Anschluss die Genexpression von *TNF- $\alpha$* , *IL-1 $\beta$* , *KC* und *IL-6* mittels RT-PCR bestimmt (Abbildung 3). In Darmepithelzellen konnten wir eine signifikante LPS-induzierte *TNF- $\alpha$*  Genexpression im Zeitraum bis zu 4 Wochen detektieren (Abbildung 3A). Spätere Zeitpunkte (8 Wochen) waren nicht mehr in dem Maße responsiv. Auch für *IL-1 $\beta$*  und *KC* konnten wir eine ausgeprägte Reaktion auf LPS in frühen Entwicklungsstadien nachweisen (Abbildung 3B, C) während auch zu späteren Zeitpunkten keine signifikante LPS abhängige Genexpression zu detektieren war. Für *IL-6* konnte in den früheren Stadien zwar eine Induktion der Expression gemessen werden, diese war jedoch nicht signifikant ( $p=0,052$ ) (Abbildung 3D).

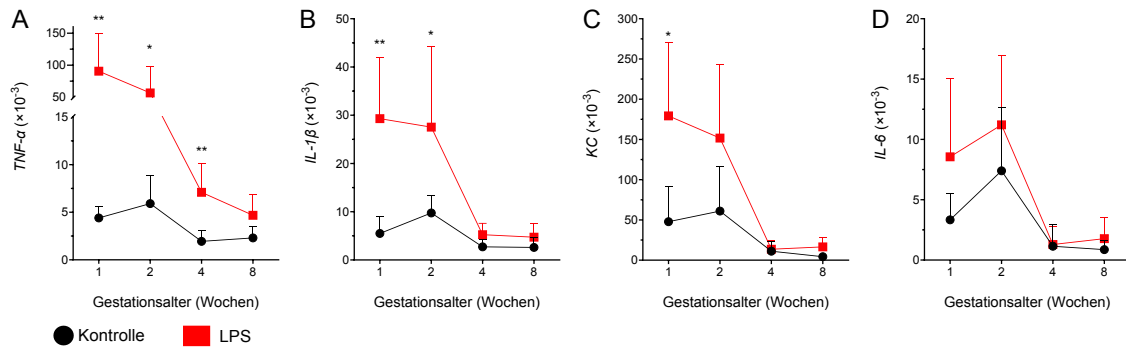


Abbildung 3: LPS-induzierte Genexpression von pro-inflammatorischen Genen in Abhängigkeit des Entwicklungsgrades muriner intestinaler Epithelzellen. Primäre IECs von Mäusen in verschiedenen Stadien der gastrointestinalen Entwicklung wurden isoliert und für drei Stunden mit 1 $\mu$ g/ml LPS stimuliert. RNA wurde isoliert und die Genexpression von *TNF- $\alpha$*  (A), *IL-1 $\beta$*  (B), *KC* (C) und *IL-6* (D) mittels RT-PCR analysiert.  *$\beta$ -Actin* wurde als Housekeeper zur Normalisierung der Genexpression verwendet. Alle Diagramme zeigen Mittelwerte  $\pm$ SD. Für die statistische Berechnung wurde ein zweiseitiger ungepaarter T-Test durchgeführt um Kontrollgruppe mit LPS Stimulation zu einem jeweiligen Entwicklungsstadium zu analysieren. (n=5-7; \*p<0,05; \*\*p<0,01)

Wir haben in den frühen Entwicklungsstadien eine hohe basale Expression der untersuchten pro-inflammatorischen Marker festgestellt. Dennoch waren diese Zellen – im Unterschied zu späteren Stadien mit einer geringeren basalen Expression – deutlich responsiver als Stadien mit fortgeschrittener Entwicklung. Um zu überprüfen, ob es Unterschiede in der Stärke der Geninduktion zwischen den unterschiedlichen Zeitpunkten gibt, haben wir den Fold Change bestimmt (Abbildung 4). Sowohl für *TNF- $\alpha$*  als auch für *IL-1 $\beta$*  zeigt sich hier eine kontinuierliche Reduktion der LPS abhängigen Responsivität der murinen intestinalen Epithelzellen mit fortschreitender Entwicklung (Abbildung 4A, B). So war die Geninduktion in Stadien von einer Woche signifikant erhöht im Vergleich zu Stadien von 4 und 8 Wochen. Ein ähnlicher Trend zeigte sich auch die das Gen *KC*, jedoch waren diese Werte statistisch nicht aussagekräftig (Abbildung 4C).

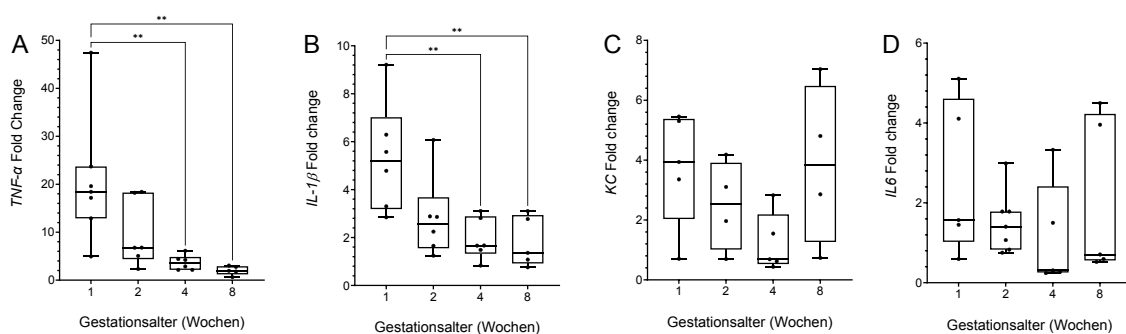


Abbildung 4: LPS-abhängige Induktionslevel von pro-inflammatorischen Genen zu unterschiedlichen Stadien der intestinalen Entwicklung. Die primären IECs wurden wie in Abbildung 3 beschrieben stimuliert und die Genexpression mittels RT-PCR bestimmt. Im Anschluss wurde die Stärke der LPS induzierten Genexpression in Bezug auf die unstimulierten Kontrollen normalisiert um somit der Fold Change für *TNF- $\alpha$*  (A), *IL-1 $\beta$*  (B), *KC* (C) und *IL-6* (D) ermittelt. Zur statistischen Analyse wurde ein One-way ANOVA durchgeführt um die Werte innerhalb der Stadien miteinander zu vergleichen (n=5-7; \*\*p<0,01).

Zusammenfassend kann man anhand dieser Daten ableiten, dass besonders Stadien der frühen postnatalen Entwicklung der murinen intestinalen Epithelzellen eine ausgeprägte Responsivität

bezüglich LPS aufweisen und dass diese mit fortschreitender gastrointestinalen Entwicklung zurückgeht. Besonders murine Stadien der IEC von 1 und 2 Wochen zeigen eine hohe Anfälligkeit gegenüber LPS. Hierbei handelt es sich in Bezug auf die humanen Stadien um fetale Entwicklungsstadien und Stadien, die frühgeburtlichen Kindern entsprechen.

### 3.3 Analyse der Expression und Aktivierung von Komponenten des LPS abhängigen Signalweges

Ausgehend von der Beobachtung, der hohen LPS Anfälligkeit in den frühen Entwicklungsstadien haben wir im Folgenden die LPS induzierte Signalkaskade mit den dazugehörigen Rezeptoren weiter untersucht. Hierfür haben wir im ersten Schritt die basale Expression des TLR-4 und seines Co-Rezeptors MD-2 mittels RT-PCR bestimmt (Abbildung 5A, B). Es zeigte sich hier, dass das Maximum innerhalb der untersuchten Zeitreihe bei beiden Genen bei 2 Wochen zu finden war. Im Vergleich dazu zeigten spätere Entwicklungsstadien eine deutlich reduzierte basale Genexpression.

Im nächsten Schritt haben wir untersucht, ob es Unterschiede im Aktivierungsmuster des LPS-TLR-4 Signalweges gibt. Hierfür haben wir intestinale Epithelzellen, isoliert aus 2 und 4 Wochen alten Mäusen, einer LPS Kinetik unterzogen und im Anschluss den Phosphorylierungsgrad von p65 mittels Western Blot bestimmt (Abbildung 5C). Hier zeigte sich, dass IECs aus 2 Wochen alten Mäusen bereits nach 30 Minuten einen erhöhten Aktivierungszustand aufwiesen. Im Gegensatz dazu war das Signal in 4 Wochen alten Mäusen kaum detektierbar (auch nicht bei länger Exposition der Proben auf der gleichen Membran).

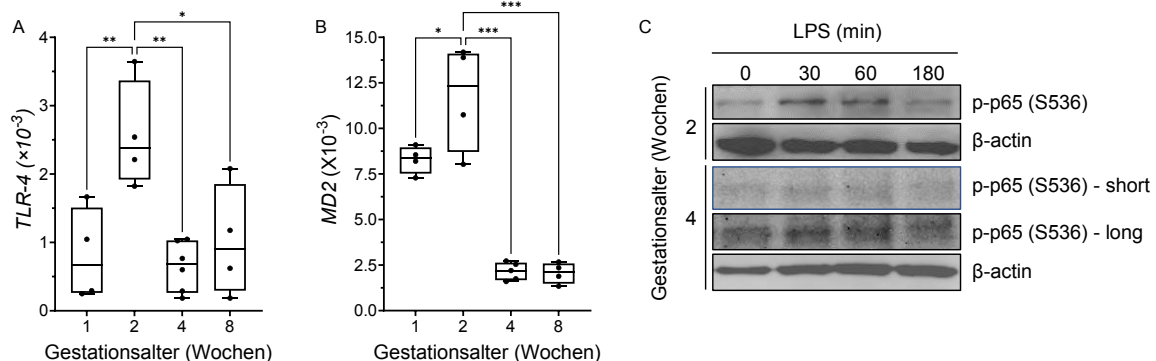


Abbildung 5: Erhöhte Expression und Aktivierung von LPS Signalwegkomponenten in intestinalen frühen Entwicklungsstadien. Expressionsanalyse der basalen *TLR-4* (A) und *MD-2* (B) Expression zu unterschiedlichen Zeiten in der gastrointestinalen Entwicklung. *β-Actin* wurde als Housekeeper für die Normalisierung der Genexpression genutzt. Zur statistischen Analyse wurden die Proben mittels One-Way ANOVA in den unterschiedlichen Stadien miteinander verglichen (n=4-6; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001). C) Primäre IECs von Mäusen im Alter von 2 und 4 Wochen wurden isoliert und mit 1µg/ml stimuliert. Zu unterschiedlichen Zeiten wurde der Aktivierungsgrad von p65 mittels Western Blot analysiert. Unstimulierte Zellen wurden als Kontrollen verwendet (0 Minuten).

Diese Daten weisen darauf hin, dass die Expressionslevel der für die LPS abhängige pro-inflammatorischen Genexpression notwendigen Rezeptoren (TLR-4, MD-2) deutlich erhöht ist in IECs in frühen Entwicklungsstadien. Weiterhin konnten wir zeigen, dass in IECs aus frühen Entwicklungsstufen eine erhöhte Aktivierung von p65 nach LPS Exposition vorliegt. In Bezug auf die Korrelation dieser murinen Stadien mit dem humanen Reifegrad korrelieren diese Expressions- und Aktivierungsmuster mit dem Status der Frühgeburtlichkeit.

### 3.4 Identifikation von $\beta$ -Catenin als potenzielles Targetgen

Im Rahmen der Untersuchung der LPS Anfälligkeit haben wir in einem transgenen Modell, in dem CD97 unter der Kontrolle des Villinpromoters zellspezifisch in intestinalen Epithelzellen exprimiert wird [19], beobachtet, dass diese Zellen eine Toleranz gegenüber LPS haben. Diese spiegelt sich in einer deutlich verminderten pro-inflammatorischen Genexpression wieder (Abbildung 6A). Dieses transgene Modell zeichnet sich fernab der Überexpression von CD97 auch durch eine deutliche Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin aus [19] (Abbildung 6B). Analysen des Aktivierungszustandes von p65 nach LPS Stimulation ergaben, dass IECs, in denen  $\beta$ -Catenin stabilisiert ist, eine deutlich geringere p65 Phosphorylierung aufweisen im Vergleich zu Wildtyp IECs (Abbildung 6C). Die zuvor beobachtete LPS Toleranz kann durch Zugabe einer  $\beta$ -Catenin spezifischen Inhibitors (iCRT3) überwunden werden, so dass diese Zellen erneut anfällig gegenüber LPS werden, was sich in einer erhöhten  $TNF-\alpha$  Genexpression in Anwesenheit von iCRT3 widerspiegelt (Abbildung 6D).

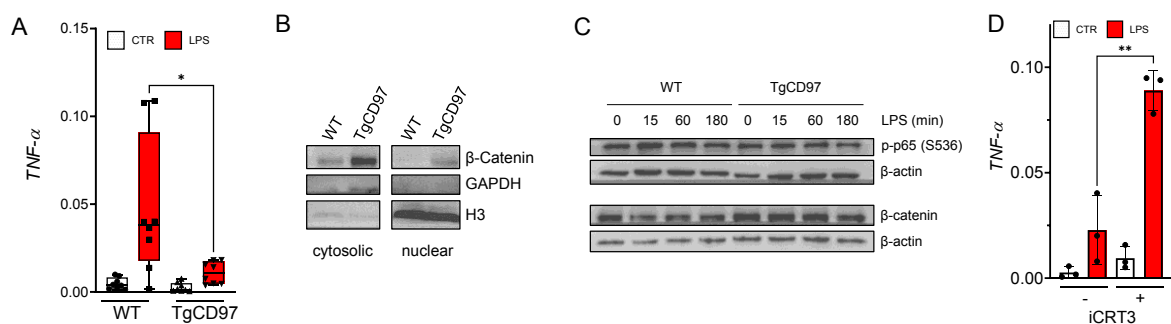


Abbildung 6: Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin attenuiert Aktivierung von p65 und pro-inflammatorische Gene. A) Primäre IECs aus Wildtyp (WT) und CD97 transgenen (TgCD97) Mäusen im Alter von 2 Wochen wurden isoliert und mit  $1\mu\text{g/ml}$  LPS stimuliert. Im Anschluss wurde die Genexpression von  $TNF-\alpha$  mittels RT-PCR analysiert.  $\beta$ -Actin wurde als Housekeeper für die Normalisierung verwendet. Die statistische Analyse zwischen der WT/LPS und TgCD97/LPS Gruppe wurde mittels ungepaartem T-Test durchgeführt (n=8, \*p<0,05). B) Analyse der subzellulären Verteilung von  $\beta$ -Catenin im Cytosol und Nucleus zwischen Wildtyp (WT) und transgenen CD97 (TgCD97) Mäusen in primären IECs. GAPDH dient als cytosolischer und H3 als nukleärer Marker. C) Analyse des Aktivierungszustandes von p65 zwischen Wildtyp (WT) und transgenen CD97 (TgCD97) IECs aus 2 Wochen alten Mäusen nach Stimulation mit  $1\mu\text{g/ml}$  LPS. D) Primäre IECs aus transgenen CD97 Tieren wurden isoliert und mit  $10\mu\text{M}$  iCRT3 für zwei Stunden vorinkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit  $1\mu\text{g/ml}$  LPS für drei Stunden inkubiert und die Genexpression von  $TNF-\alpha$  mittels RT-PCR bestimmt.  $\beta$ -Actin wurde als Housekeeper zur Normalisierung verwendet. Für die statistische Analyse der LPS/-iCRT3 und LPS/+iCRT3 Gruppe wurde der ungepaarte T-Test herangezogen (n=3; \*\*p>0,01).

Interessanterweise ist Catenin im Rahmen der NEC deutlich herunterreguliert, was auf eine erhöhte Aktivität des AKT-GSK3-Signalweges zurückzuführen ist und LPS abhängig ist [20]. Auf Basis dieser Daten haben wir im weiteren Verlauf des Projekts untersucht, ob eine Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin (außerhalb des transgenen Kontextes) die LPS induzierte pro-inflammatorische Genexpression reduzieren kann und welche molekularen Mechanismen dem zu Grunde liegen.

### 3.3 Stabilisierung von $\beta$ -Catenin attenuiert die pro-inflammatorische Genexpression

Wir konnten zuvor in den primären intestinalen Epithelzellen beobachten, dass LPS zu einer Reduktion von  $\beta$ -Catenin in Wildtyp Zellen führte, während in den TgCD97 dies nicht der Fall war. Um dies zu überprüfen haben wir im Vorfeld IEC-6 Zellen mit LPS behandelt und im Anschluss das Phosphorylierungslevel von  $\beta$ -Catenin (S33/37 T41) und p65 analysiert (Abbildung 7A). Hier zeigte sich, dass nach einer Stunde eine Erhöhung der Catenin Phosphorylierung zu detektieren war und

gleichzeitig eine Reduktion von Catenin im Gesamtprotein. Bei der Phosphorylierungsstelle von Catenin handelt es sich um eine posttranslationale Modifikation, die das Protein über die GSK3- $\beta$  Kinase zum proteasomalen Abbaus markiert [21]. Weiterhin bewirkte das Treatment mit LPS eine Erhöhung des p65 Phosphorylierungsgrades was in diesem Fall mit einer Aktivierung einhergeht. Um Catenin nun in LPS Konditionen zu stabilisieren haben wir für die folgenden Experimente den GSK3 spezifischen Inhibitor CHIR99021 verwendet. Hier zeigte sich auf transkriptioneller Ebene, dass dies in Kombination zu einer Reduktion der proinflammatorischen Antwort führt (Abbildung B, C). Gleichzeitig konnten wir beobachten, dass die zum proteasomalen Abbaus nötige Phosphorylierung von Catenin in der Kombination LPS/CHIR99021 reduziert war im Vergleich zur Einzelstimulation mit LPS (Abbildung 7D). Analog konnten wir zeigen, dass CHIR99021 auch den Aktivierungsgrad gemessen an der Phosphorylierung von p65 herabsetzt. Diese Daten weisen darauf hin, dass CHIR99021 die LPS abhängige Reduktion von Catenin abschwächt und dies Einfluss auf den Aktivierungsgrad von p65 hat.

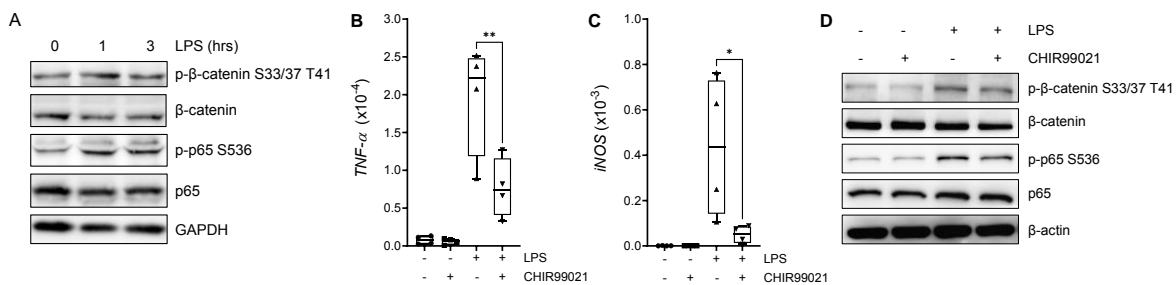


Abbildung 7: CHIR99021 attenuiert LPS induzierte Expression pro-inflammatorischer Gene und  $\beta$ -Catenin Degradation. A) IEC-6 Zellen wurden für 1 und 3 Stunden mit 0,1 $\mu$ g/ml LPS stimuliert und der Phosphorylierungsgrad von  $\beta$ -Catenin (S33/37 T41) und p65 (S536) mittels Western Blot analysiert. IEC-6 Zellen wurden über Nacht mit 10 $\mu$ M CHIR99021 vorbehandelt und im Anschluss für 3 Stunden mit 0,1 $\mu$ g/ml LPS behandelt. Die Genexpression von *TNF- $\alpha$*  (B) und *iNOS* (C) mittels RT-PCR bestimmt. Statistische Analyse wurde mittels One-Way ANOVA durchgeführt (n=4; \*p<0,05; \*\*p<0,01). D) IEC-6 Zellen wurden über Nacht mit 10 $\mu$ M CHIR99021 vorbehandelt und im Anschluss für 30 Minuten mit 0,1 $\mu$ g/ml LPS stimuliert und der Phosphorylierungsgrad von  $\beta$ -Catenin (S33/37 T41) und p65 (S536) mittels Western Blot analysiert.

Da es sich bei IEC-6 Zellen um eine kommerzielle Zelllinie handelt, stellte sich die Frage, ob CHIR99021 auch in primären IECs die LPS induzierte Genexpression reduzieren kann. Weiterhin sollten die erzielten Daten durch die Verwendung eines zweiten GSK3 Inhibitors bestätigt werden. Hierfür wurde SB415286 verwendet. Wir konnten für beide Inhibitoren zeigen, dass diese in der Lage sind, pro-inflammatorische Genexpression vermittelt durch LPS zu reduzieren (Abbildung 8). Dabei muss man hier beachten, dass die Konzentrationen bei der es zu einer signifikanten Reduktion kam für CHIR99021 nur bei 50 $\mu$ M zu detektieren waren. Im Falle von SB415286 konnte dies schon bei einer Konzentration von 25 $\mu$ M erreicht werden. Wir haben in keinem Fall in dem gewählten Zeitraum eine Beeinträchtigung der Zellen feststellen können, was man bei so hohen Konzentrationen vermuten kann.



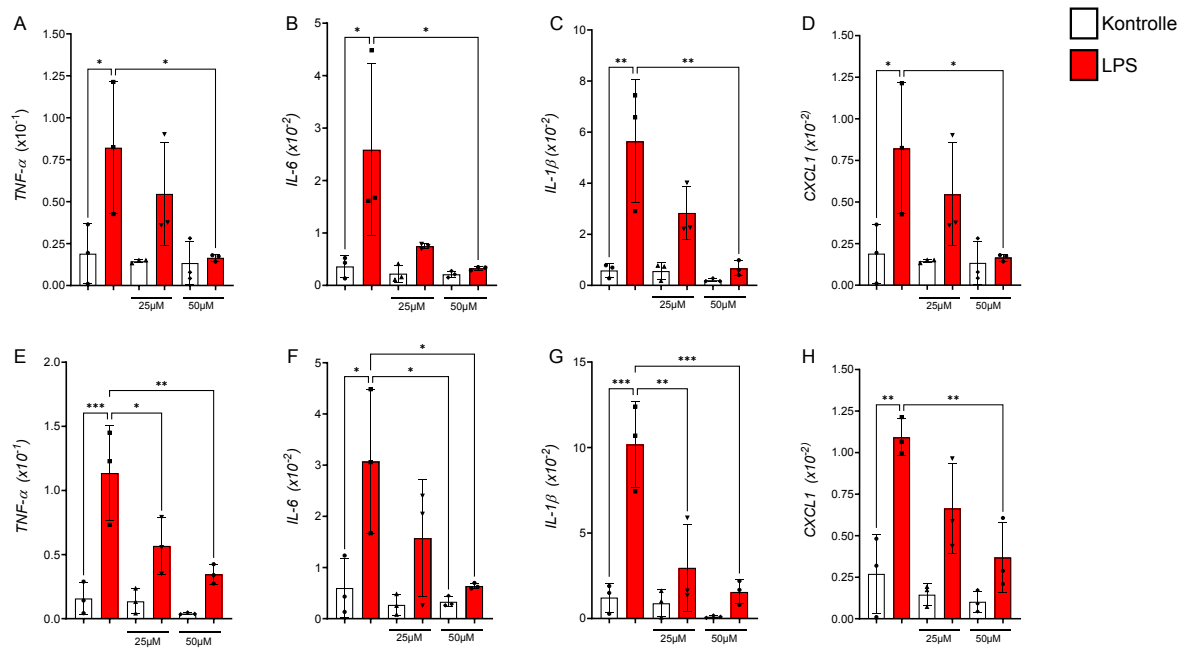


Abbildung 8: GSK3 Inhibition durch CHIR99021 oder SB415286 reduziert die LPS induzierte pro-inflammatorische Genexpression in primären intestinalen Epithelzellen. Primäre IECs aus 2 Wochen alten Mäusen wurden isoliert und im Anschluss mit 1 μg/ml LPS für drei Stunden in Anwesenheit von CHIR99021 (A-D) oder SB415286 (E-H) inkubiert. Im Anschluss wurde die Genexpression unterschiedlicher inflammatorischer Marker mittels RT-PCR bestimmt. *β-Actin* wurde als Housekeeper zur Normalisierung verwendet. Die statistische Analyse wurde mittels One-way ANOVA innerhalb der verschiedenen Gruppen durchgeführt (n=3; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001).

In den nächsten Analysen haben wir untersucht, wie sich p65 und Catenin in ihrer jeweiligen subzellulären Lokalisation verhalten. Ausgangspunkt hierfür war, dass wir eine Reduktion im Phosphorylierungsgrades von p65 beobachten haben in Anwesenheit von CHIR99021. Die Immunfluoreszenzanalysen bestätigten, dass in CHIR99021 zu einer verminderten nukleäre Lokalisation von p65 nach LPS Stimulation führt (Abbildung 9A, B). Im Anschluss haben wir uns unter den gleichen Bedingungen die subzelluläre Lokalisation von Catenin angeschaut. Hier konnten wir zeigen, dass CHIR99021 zu einer Stabilisierung von Catenin führt (Abbildung 9C, D) und dass die LPS induzierte Reduktion von Catenin durch dessen Stabilisierung aufgehoben wird. Diese Ergebnisse konnte wir mit Western Blot Analysen von nukleären Fraktionen bestätigen (Abbildung 9E).

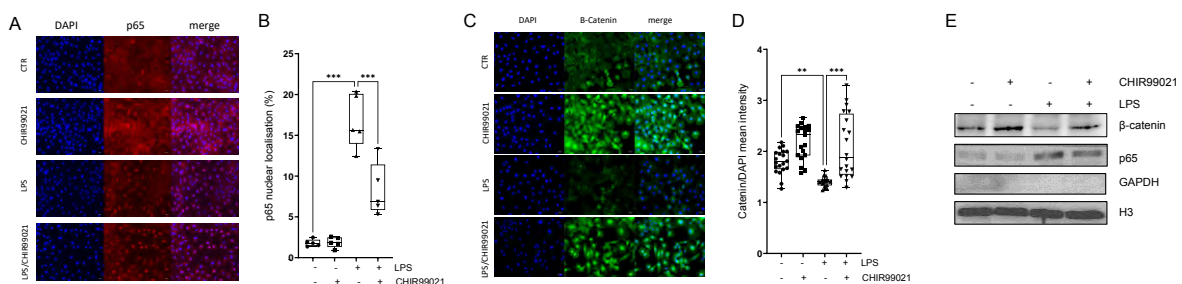


Abbildung 9: Quantitative Analyse der subzellulären Lokalisation von p65 und β-Catenin. IEC-6 Zellen wurden auf Glasplättchen ausgesät und über Nacht mit 10 μM CHIR99021 stimuliert. Im Anschluss wurden die Zellen mit 0,1 μg/ml LPS für 30 Minuten stimuliert und danach fixiert. Immunfluoreszenzfärbungen wurden für p65 (A, B) und Catenin (C, D) durchgeführt. Die statistische Analyse wurde mittels One-way ANOVA durchgeführt (p65: n=5; \*\*\*p<0,001; Catenin n= 17-20; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001). Ebenfalls wurden nukleäre Fraktionen der Proteinproben mittels Western Blot auf p65 und Catenin durchgeführt (E). GAPDH dient hier als cytosolischer Marker und H3 als nukleärer Marker.

## 4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Rahmen dieses Projekts haben wir uns mit der LPS Anfälligkeit von primären IECs in frühen Stadien der gastrointestinalen Entwicklung beschäftigt. Hier konnten wir zeigen, dass diese besonders anfällig hinsichtlich einer hohen inflammatorischen Genexpressionsinduktion in Anwesenheit von LPS sind. Analysen der Komponenten des beteiligten Signalweges zeigten, dass diese deutlich erhöht sind in den anfälligen Stadien im Vergleich zu Stadien, in denen die LPS induzierte Genexpression deutlich geringer ausfällt. Weiterhin konnten wir auch zeigen, dass das Aktivierungsprofil von p65 in frühen Entwicklungsstadien deutlich ausgeprägter ist, was mit der gemessenen hohen Genexpression einhergeht. Ausgehend von der Korrelation der murinen und humanen Daten auf Basis der Markergenexpression und der Frequenz von Zellpopulationen zeigen diese Daten, dass der Phänotyp der murinen und humanen Stadien ebenfalls korreliert. Dies ist besonders ausgeprägt in den Stadien der humanen Frühgeburtlichkeit und den murinen Stadien von 2 Wochen alten Mäusen. Um Faktoren zu identifizieren, die eine hohe pro-inflammatorische Antwort reduzieren können, haben wir aus Beobachtungen aus einem transgenen Mausmodell auf  $\beta$ -Catenin zurückgeschlossen. Wir haben uns im weiteren darauf fokussiert, da Catenin im Rahmen der NEC ebenfalls eine Dysregulation aufweist und somit einen therapeutischen Ansatzpunkt darstellen könnte. Weitere Untersuchungen zeigten, dass eine Stabilisierung von Catenin die LPS Anfälligkeit herabsetzt. So konnten wir demonstrieren, dass primäre IECs, die zuvor keine Toleranz gegenüber LPS aufwiesen durch Catenin Stabilisierung eine deutlich verminderte Induktion von pro-inflammatorischen Genen aufwiesen. Mechanistisch führt die Stabilisierung von Catenin zu einer nukleären Akkumulation bei einer gleichzeitigen Reduktion von nukleärem p65.

## 5 Ausblick

Der exakte molekulare Mechanismus, wie stabilisiertes Catenin die LPS induzierte Genexpression reduziert ist unklar und konnte im Rahmen dieses Projekts nicht geklärt werden. Erst Hinweise aus Experimenten lassen darauf schließen, dass eine direkte Protein-Protein-Interaktion ausgeschlossen werden kann. Weiterhin zeigt sich in der humanen NEC, dass in Bezug auf Catenin keine Dysregulation vorliegt und es hier zu einem vermehrten Abbau kommt. Die Frage, ob nun eine Stabilisierung von Catenin den Schweregrad der NEC herabsetzt bleibt auch weiterhin unbeantwortet. Die hier erhobenen Daten liefern erste Anhaltspunkte, dass dies eine vielversprechende Möglichkeit wäre, zu intervenieren und somit den Grad der Inflammation herabzusetzen. Im Augenblick arbeiten wir an zwei Manuskripten, die sich zum einen mit der LPS Anfälligkeit früher Entwicklungsstadien intestinaler Epithelzellen beschäftigen und zum anderen an den Einfluss von Catenin im Rahmen der LPS vermittelten pro-inflammatorischen Signalkaskade.

## 6 Literatur

1. **Hintz SR, Kendrick DE, Stoll BJ, Vohr BR, Fanaroff AA, Donovan EF, et al.** Neurodevelopmental and growth outcomes of extremely low birth weight infants after necrotizing enterocolitis. *Pediatrics*. 2005; 115: 696–703.
2. **Laughon M, O'Shea MT, Allred EN, Bose C, Kuban K, van Marter LJ, et al.** Chronic lung disease and developmental delay at 2 years of age in children born before 28 weeks' gestation. *Pediatrics*. 2009; 124: 637–48.
3. **Totonelli G, Tambucci R, Boscarelli A, Hermans D, Dall'Oglio L, Diamanti A, et al.** Pediatric Intestinal Rehabilitation and Transplantation Registry: Initial Report from a European Collaborative Registry. *European journal of pediatric surgery : official journal of Austrian Association of Pediatric Surgery ... [et al] = Zeitschrift fur Kinderchirurgie*. 2018; 28: 75–80.
4. **Neu J, Walker WA.** Necrotizing enterocolitis. *The New England journal of medicine*. 2011; 364: 255–64.
5. **Hackam DJ, Sodhi CP.** Toll-Like Receptor-Mediated Intestinal Inflammatory Imbalance in the Pathogenesis of Necrotizing Enterocolitis. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*. 2018; 6: 229-238.e1.
6. **Yazji I, Sodhi CP, Lee EK, Good M, Egan CE, Afrazi A, et al.** Endothelial TLR4 activation impairs intestinal microcirculatory perfusion in necrotizing enterocolitis via eNOS-NO-nitrite signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013; 110: 9451–56.
7. **Akira S, Uematsu S, Takeuchi O.** Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006; 124: 783–801.
8. **Ginzel M, Feng X, Kuebler JF, Klemann C, Yu Y, Wasielewski R von, et al.** Dextran sodium sulfate (DSS) induces necrotizing enterocolitis-like lesions in neonatal mice. *PloS one*. 2017; 12: e0182732.
9. **Ginzel M, Yu Y, Klemann C, Feng X, Wasielewski R von, Park J-K, et al.** The viral dsRNA analogue poly (I:C) induces necrotizing enterocolitis in neonatal mice. *Pediatric research*. 2016; 79: 596–602.
10. **Young CM, Kingma SDK, Neu J.** Ischemia-reperfusion and neonatal intestinal injury. *The Journal of pediatrics*. 2011; 158: e25-8.
11. **Yu Y, Klemann C, Feng X, Ginzel M, Vieten G, Lacher M, et al.** Increased inflammatory reaction to intestinal ischemia-reperfusion in neonatal versus adult mice. *European journal of pediatric surgery : official journal of Austrian Association of Pediatric Surgery ... [et al] = Zeitschrift fur Kinderchirurgie*. 2015; 25: 46–50.
12. **Jilling T, Simon D, Lu J, Meng FJ, Li D, Schy R, et al.** The roles of bacteria and TLR4 in rat and murine models of necrotizing enterocolitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 2006; 177: 3273–82.
13. **Sodhi CP, Neal MD, Siggers R, Sho S, Ma C, Branca MF, et al.** Intestinal epithelial Toll-like receptor 4 regulates goblet cell development and is required for necrotizing enterocolitis in mice. *Gastroenterology*. 2012; 143: 708-718.e5.
14. **Lotz M, Gütle D, Walther S, Ménard S, Bogdan C, Hornef MW.** Postnatal acquisition of endotoxin tolerance in intestinal epithelial cells. *The Journal of experimental medicine*. 2006; 203: 973–84.
15. **Chan KL, Ho JCY, Chan KW, Tam PKH.** A study of gut immunity to enteral endotoxin in rats of different ages: a possible cause for necrotizing enterocolitis. *Journal of pediatric surgery*. 2002; 37: 1435–40.

16. **Nanthakumar NN, Fusunyan RD, Sanderson I, Walker WA.** Inflammation in the developing human intestine: A possible pathophysiologic contribution to necrotizing enterocolitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2000; 97: 6043–48.
17. **Fusunyan RD, Nanthakumar NN, Baldeon ME, Walker WA.** Evidence for an Innate Immune Response in the Immature Human Intestine: Toll-Like Receptors on Fetal Enterocytes. *Pediatric research.* 2001; 49: 589–93.
18. **Stanford AH, Gong H, Noonan M, Lewis AN, Gong Q, Lanik WE, et al.** A direct comparison of mouse and human intestinal development using epithelial gene expression patterns. *Pediatric research.* 2019; 88: 66–76.
19. **Becker S, Wandel E, Wobus M, Schneider R, Amasheh S, Sittig D, et al.** Overexpression of CD97 in intestinal epithelial cells of transgenic mice attenuates colitis by strengthening adherens junctions. *PloS one.* 2010; 5: e8507.
20. **Sodhi CP, Shi X-H, Richardson WM, Grant ZS, Shapiro RA, Prindle T, et al.** Toll-like receptor-4 inhibits enterocyte proliferation via impaired beta-catenin signaling in necrotizing enterocolitis. *Gastroenterology.* 2010; 138: 185–96.
21. **Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg GH, Tan Y, et al.** Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell.* 2002; 108: 837–47.