

# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Klinik und Poliklinik für Kinderchirurgie

Prof. Dr. Konrad Reinshagen

## **NEC is a NETs dependent process and markers of NETosis are predictive of NEC in mice and humans**

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Deirdre Kathleen Vincent  
aus Detmold

Hamburg 2020

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 21.04.2021**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. Michael Boettcher**

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Samuel Huber**

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b><u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u></b>	<b>4</b>
<b>2.</b>	<b><u>PUBLIKATION</u></b>	<b>5</b>
<b>3.</b>	<b><u>EINLEITUNG</u></b>	<b>14</b>
<b>4.</b>	<b><u>MATERIAL UND METHODEN</u></b>	<b>15</b>
<b>4.1</b>	<b>STUDIENDESIGN</b>	<b>15</b>
<b>4.2</b>	<b>TIERVERSUCHE</b>	<b>15</b>
4.2.1	NEC - INDUKTION	15
4.2.2	NEC UND NETs ZEITVERLAUF	16
4.2.3	PAD - INHIBITION	16
<b>4.3</b>	<b>BLUT ANALYSE</b>	<b>16</b>
<b>4.4</b>	<b>MORPHOLOGISCHE DARMANALYSE UND GEWEBEPREPARATION</b>	<b>16</b>
4.4.1	EXTRAZELLULÄRE DNA	17
4.4.2	HISTOLOGISCHE ANALYSE	17
4.4.3	TUNEL - ASSAY	17
4.4.4	ELISA (C5A)	18
<b>4.5</b>	<b>MENSCHLICHE PROBENSAMMLUNG</b>	<b>18</b>
<b>4.6</b>	<b>STATISTIK</b>	<b>18</b>
<b>5.</b>	<b><u>ERGEBNISSE</u></b>	<b>18</b>
	<b>HUMANE PROBEN</b>	<b>19</b>
<b>6.</b>	<b><u>DISKUSSION</u></b>	<b>20</b>
<b>7.</b>	<b><u>ZUSAMMENFASSUNG</u></b>	<b>24</b>
<b>8.</b>	<b><u>ERKLÄRUNG DES EIGENANTEILS</u></b>	<b>25</b>
<b>9.</b>	<b><u>LITERATURVERZEICHNIS</u></b>	<b>26</b>
<b>10.</b>	<b><u>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</u></b>	<b>30</b>
<b>11.</b>	<b><u>DANKSAGUNG</u></b>	<b>35</b>
<b>12.</b>	<b><u>LEBENS LAUF</u></b>	<b>36</b>
<b>13.</b>	<b><u>EIDESSTÄTTLICHE VERSICHERUNG</u></b>	<b>36</b>

## 1. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
C5a	Complement 5a (Komplement 5a)
cfDNA	Cell free DNA (zellfreie DNA)
FG	Frügeborenes
GCSF	Granulocyte-colony stimulating factor (Granulozytenkolonie-stimulierender Faktor)
H3cit	Citrulliniertes Histon H3
H&E	Hämatoxylin und Eosin
I/R Läsion	Ischämie/Reperfusionläsion
LPS	Lipopolysaccharid
MPO	Myeloperoxidase
NE	Neutrophile Elastase
NEC	Necrotizing enterocolitis (nekrotisierende Enterokolitis)
NET	Neutrophil extracellular trap (neutrophile extrazelluläre Falle)
NG	Neugeborenes
PAD	Protein-Arginin-Deiminase
PAD4	Protein-Arginin-Deiminase 4
PBS	Phosphate-buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
p.p.	Postpartum
TLR4	Toll-like receptor 4 (Toll-like Rezeptor 4)

# SCIENTIFIC REPORTS

## OPEN NEC is likely a NETs dependent process and markers of NETosis are predictive of NEC in mice and humans

Received: 21 May 2018

Accepted: 9 August 2018

Published online: 22 August 2018

Deirdre Vincent<sup>1</sup>, Michaela Klinke<sup>1</sup>, Georg Eschenburg<sup>1</sup>, Magdalena Trochimiuk<sup>1</sup>, Birgit Appl<sup>1</sup>, Bastian Tiemann<sup>2</sup>, Robert Bergholz<sup>1</sup>, Konrad Reinshagen<sup>1</sup> & Michael Boettcher<sup>1</sup>

Necrotizing enterocolitis (NEC) is one of the most devastating diseases affecting premature and mature infants. It is hypothesized that NEC is the result of neutrophils' active role in hyperinflammation after bacterial gut colonization, through their nuclear DNA release and formation of neutrophil extracellular traps (NETs) to combat pathogens. The aim of this study was to evaluate the importance of NETs in NEC pathogenesis, as well as to identify and validate markers of NETosis to predict NEC. NEC was induced in mice by gavage feeding of Neocate and lipopolysaccharide, followed by ten minutes of hypoxia (5% O<sub>2</sub>) q12h for five days, starting on day four postpartum (p.p.). The interrelation of NEC and neutrophils, including NETs, was assessed macroscopically (i.e. NEC score, SYTOX Orange), microscopically (i.e. Chiu score, citrullinated histone H3, neutrophil elastase), and in blood samples (i.e. cell-free DNA (cfDNA), DNase). In order to determine the exact role of NETs in NEC pathogenesis, a protein arginine deiminase (PAD) inhibition model was established (preventing NETs formation in mice) by injecting BB-Cl-amidine once daily, starting on day one p.p. Additionally, human intestinal samples of diagnostically verified NEC were analyzed. In total, 76 mice were analyzed in the experiment. Serum cfDNA correlated positively with NEC manifestation, as measured by macroscopic NEC score ( $r = 0.53$ ,  $p = 0.001$ ), and microscopic evaluation with Chiu score ( $r = 0.56$ ,  $p < 0.001$ ). Markers of neutrophil activation and NETosis were significantly increased in animals with NEC and in human samples as compared to controls. Further, prevention of NETosis by protein arginine deiminase (PAD) inhibition in mice significantly reduced mortality, tissue damage, and inflammation in mice induced with NEC. Our results suggest that the hyperinflammation observed in NEC is a NETs-dependent process, as NEC severity was significantly reduced in mice incapable of forming NETs (PAD inhibition) and markers for NEC and NETs correlated positively during the time course of NEC induction. Further, serum surrogate markers of NETosis (such as cfDNA and DNase) appear to predict NEC in neonatal mice. As findings of the mouse NEC model correlate positively with human NEC samples immunohistochemically, the hyperinflammation reaction observed in mice could potentially be applied to human NEC pathogenesis.

Necrotizing enterocolitis (NEC) is considered one of the most devastating diseases affecting premature and term-born infants, as its manifestation often leads to necrosis of the small intestine, which results in mortality rates of up to 30% in very low birth weight (VLBW) infants<sup>1</sup>. Moreover, it affects approximately 12% of infants with a birth weight of less than 1500 g<sup>2</sup>.

Despite its high prevalence and years of research on the topic, the pathogenesis remains unclear. However, current findings not only suggest that NEC is a multifactorial disease process, but also, that it is almost always preceded by bacterial exposure of the immature intestine after birth<sup>3</sup>.

Upon exposure, the premature infant develops a local hyperinflammation response, which ultimately damages the neonatal intestine and results in NEC development<sup>4</sup>. Thereafter, the intestine of term infants' has been shown

<sup>1</sup>Department of Pediatric Surgery, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistrasse 52, 20246, Hamburg, Germany. <sup>2</sup>Department of Experimental Animal Research, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistrasse 52, 20246, Hamburg, Germany. Deirdre Vincent and Michaela Klinke contributed equally. Correspondence and requests for materials should be addressed to M.B. (email: [m.boettcher@uke.de](mailto:m.boettcher@uke.de))

to adapt to the hyperinflammation via a downregulation of their immune system; whereas, in preterm infants, no downregulation occurs<sup>3</sup>.

One of the main mechanisms supporting this theory, on a cellular level, is the activity of the intestinal epithelial cell toll-like receptor 4 (TLR4), which exhibits a higher expression in the preterm intestine than in the intestine of term-born infants. This upregulation of TLR4 leads to increased mucosal injury, as: (1) apoptosis of enterocytes becomes accelerated and (2) the rate of healing is reduced through impaired intestinal restoration and proliferation<sup>3</sup>. Additionally, numerous studies, including clinical trials, have strengthened the case for TLR4's role in the pathogenesis of NEC. One such example is the protective effect of breastfeeding on NEC development, in that it inhibits the signaling cascade that leads to TLR4 activation<sup>3,5</sup>. This increased signaling cascade activity, caused by a higher TLR4 expression, results in the production of chemokines and inflammatory cytokines that are necessary for the recruitment of neutrophils to the location of inflammation<sup>6,7</sup>. Based on previous research findings, we hypothesized that recruitment of neutrophils must also play a crucial role in NEC development. Neutrophils, as activated by the neonatal innate immune system, defend against infectious agents as first line responders and eliminate pathogens by phagocytosis and/or degranulation<sup>8</sup>. However, excessive neutrophil activity is widely known to cause tissue damage, especially during acute inflammatory responses<sup>9</sup>. This type of damage is more notable in human neonatal intestinal epithelial cells in comparison to adult intestinal epithelial cells, as demonstrated by an inflated production of cytokines in response to pathogens, inflammatory mediators, and commensal bacteria in neonates. The consequence is an excessive neutrophil migration to the area of inflammation<sup>4</sup>. Upon activation, neutrophils combat pathogens using three main mechanisms: (1) phagocytosis, (2) degranulation, and (3) formation of neutrophil extracellular traps (NETs)<sup>10</sup>.

The relatively novel mechanism of NET formation describes the process by which neutrophils release web-like DNA structures studded with histones and antimicrobial proteins. To date, two mechanisms of NET formation are known. The first and main pathway constitutes apoptosis of the neutrophil in question and is also known as NETosis. The second mechanism involves NET formation without apoptosis, thus enabling neutrophils to continue functioning<sup>11</sup>. NETosis via cell death occurs two to four hours after stimulation, whereas NET formation occurs more rapidly, approximately five to 60 minutes after stimulation<sup>11,12</sup>. When formed, NETs have several functions. Two of significance to this study are: (1) they fight infection through immobilizing microbes, such as bacteria, fungi, viruses, and protozoa in their DNA mesh; and (2) they eliminate microorganisms via lethal concentrations of antimicrobial agents contained within the NETs<sup>13–15</sup>.

As the role of NETs in NEC development has yet to be investigated, the aim of this study was to determine whether NETs play a crucial role in NEC pathogenesis. Therefore, both (1) a NEC mouse model and (2) human NEC intestinal samples were evaluated. Additionally, in order to determine the extent of NETs' contribution to NEC development, a mouse model using protein arginine deiminase (PAD) inhibition was employed to prevent NETs from being formed.

## Methods

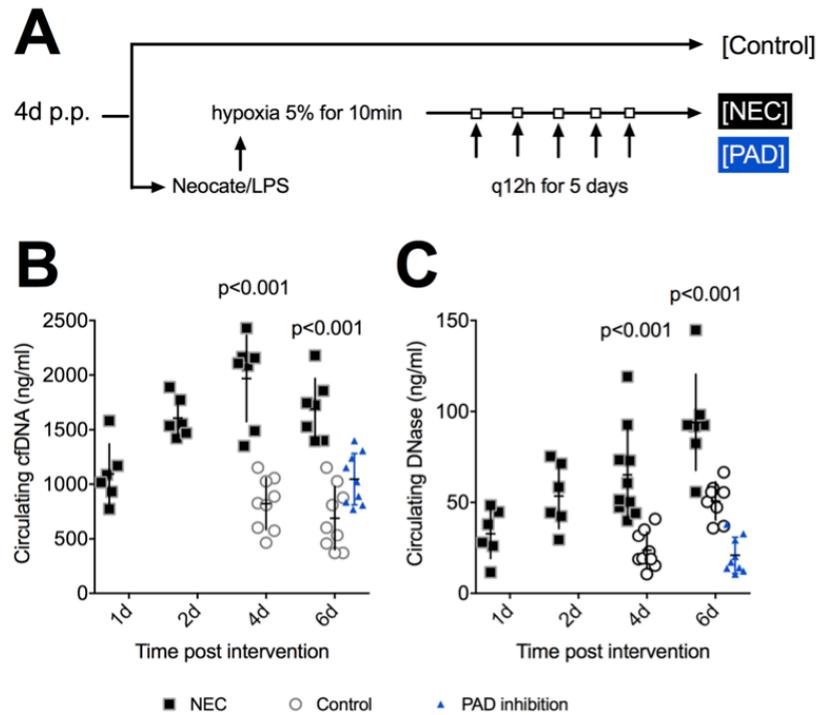
**Study design.** The study was approved by the Hamburg State Administration for animal research (63/16). A total of 76 mice were included in the experimental model and were held within the animal facility, according to environmental parameters established and dictated by the German guide for the care and use of laboratory animals (Tierschutzgesetz).

Additionally, histological intestinal samples of nine human neonates that underwent surgery due to NEC at the Department of Pediatric Surgery of the University Medical Center Hamburg-Eppendorf from 2016 to 2017 were included in the study. Only cases with confirmed classical NEC, without prior patent ductus arteriosus closure, or complex health conditions, were included. Examinations were in accordance with the guidelines of the medical research ethics committee of Hamburg (Ethik-Kommission der Ärztekammer Hamburg, PV 4991) and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments. Written informed consent was obtained from the parents or legal guardians of the nine neonates.

**Animal Procedures.** *NEC Induction Paradigm.* NEC was induced using a well-established protocol<sup>16</sup>: Pregnant C57BL/6J mice were singly housed within the animal care facility with food and water ad lib. Mother animals delivered naturally and pups were kept with their mother throughout the entire experimental procedure. On day four postpartum (p.p.), the NEC induction paradigm commenced. Subjects were gavage fed a solution of 0.1 ml Neocate (Nutricia) and lipopolysaccharide (LPS) from *E. coli* LPS-EB (InvivoGen), using a 1:50 concentration of LPS to Neocate twice daily followed by 10 minutes of hypoxia at 5% oxygen. The total induction paradigm was maintained for six days and the animals were euthanized on day 10 p.p., at the latest.

**NEC and NETs Timeframe.** The induction protocol is shown in Fig. 1A. To assess the development of NEC and NETs, animals were euthanized via decapitation after sedation with isoflurane gas (Forene 100%, AbbVie) at the following endpoints: 1d, 2d, 4d, and 6d after induction commencement. During the entire length of the experiment, mother animals received tramadol (Tramal 1 mg/ml, Grünenthal) in their drinking water for pain management of the pups. Tramadol ingested by mother mice is transferred to offspring pups through drinking of breastmilk at 12–14% of its original concentration, which has been shown to ensure appropriate pain management for test subjects<sup>17</sup>. To control for other factors that may influence the pups, a control group was also included.

**PAD-Inhibition.** Protein Arginine Deiminase 4 (PAD4) is a histone-modifying enzyme and its inhibition, by either genetic knockout or Cl-amidine treatment, has been shown to prevent NET formation<sup>18</sup>. In this study, PAD inhibition was achieved by daily subcutaneous injections of 10 mg/kg bodyweight Cl-amidine (BB-Cl-amidine, Cayman Chemical, preparation according to manufacturer's protocol), starting on day one p.p. for the entirety



**Figure 1.** Experimental design and biomarkers of necrotizing enterocolitis (NEC). (A) Mice within the NEC group were subjected to Neocate/lipopolysaccharide gavage feeding followed by hypoxia at 5% for 10 min twice daily for five days. The induction was started on day four postpartum (p.p.). All animals were euthanized on day 10 p.p. at the latest. (B) Cell-free (cfDNA) is a surrogate marker of NETosis. It significantly increased with time and compared to controls. Protein arginine deiminase (PAD) inhibition (blue) resulted in significantly lower levels of cfDNA in comparison to untreated animals. (C) DNase showed a near linear significant increase with time. Animals with NEC had significantly higher levels than controls and PAD inhibited mice (blue). Data shown as Mean  $\pm$  SD. Statistics: Mann-Whitney test and ANOVA.

of the procedure<sup>19</sup>. Keeping in accordance with the NEC induction paradigm, PAD inhibited mice underwent NEC induction on day four p.p., as described in the previous section, while controlling for pain through mother-pup-transfer of tramadol via breast milk until euthanasia. All animals were euthanized on day 10 p.p. Figure 1A demonstrates the time frame outlining the PAD inhibition paradigm.

**Sample Collection and Storage.** Blood: Upon euthanasia, blood samples were collected through decapitation in test tubes containing ethylenediaminetetraacetic acid and processed immediately. The samples were then centrifuged at 2000 relative centrifugal force for 10 minutes at room temperature, followed by plasma collection and separation from the buffy coat. All samples were preserved at a temperature of  $-80^{\circ}\text{C}$  until further analysis.

**Intestinal Tissue:** After blood collection, animals were dissected using a midline incision. Bowel preparation and removal was conducted with aid of a light microscope to better evaluate the intestine for macroscopic markers of NEC. At this time, the morphologic analysis was performed and captured using a 4 K/12-megapixel camera. The relevant segments of the small intestine were then evenly distributed into test tubes containing: (1) phosphate buffered saline (PBS) and (2) Bouin solution. Tissue stored in PBS was used directly to visualize NETs.

**Blood Analysis.** Blood plasma was used to assess levels of cell free DNA (cfDNA) and DNase in individual subjects, where cfDNA is considered a surrogate marker for NET formation and DNase represents the degradation of cfDNA. Plasma was collected and analyzed for cfDNA, as well as DNase, based on previously described and validated methods<sup>20</sup>.

**Morphologic Analysis of the Intestine.** Scoring of macroscopic NEC manifestation occurred during dissection and was performed by two observers blinded to the subject's test group. As none of the animals showed necrosis or perforation, animals were simply divided into (0) No NEC or (1) NEC, according to whether they did or did not demonstrate pneumatosis intestinalis or infarction, respectively.

**Tissue Preparation and Evaluation.** Extracellular DNA: Intestinal samples were placed in PBS and analyzed for NETs under a fluorescence microscope using SYTOX Orange (50  $\mu$ M, Life Technologies)<sup>21</sup>. Pictures were taken using an Olympus SC 50 camera and digitized with cellSens Standard (Olympus). Scoring was conducted by an observer blinded to the study as followed:

- None (0) – no signs of NETs
- Mild (1) – small amount of NETs
- Moderate (2) – medium amount of NETs
- Severe (3) – large amount of NETs

**Histological Analysis:** Upon tissue fixation in Bouin solution, intestinal samples were dehydrated overnight and embedded in paraffin. Prepared intestinal tissue was then cut into 3  $\mu$ m thick sections and applied to slides for further analysis. All samples were analyzed by a pathologist blinded to the study and captured using an Olympus SC 50 camera. Digitization was completed via the cellSens Standard program (Olympus).

**Hematoxylin and Eosin (H&E):** H&E staining occurred via machine and using a standardized staining procedure, while semi-quantitative assessment of the intestinal damage was conducted under light microscopy, utilizing the previously validated Chiu score<sup>22</sup>.

**Immunohistochemical Staining (NE, MPO, H3cit, TLR4):** Histological samples were further immunohistochemically stained for neutrophil elastase (NE), myeloperoxidase (MPO), citrullinated histone H3 (H3cit), and TLR4: Neutrophil activation and recruitment was evaluated with NE (ABCAM, ab68672) and MPO (DIANOVA, DLN-012930) staining procedures; while NETs production was assessed with H3cit (ABCAM, ab5103), a surrogate marker for NETs; and inflammation via TLR4 (ABCAM, ab22048) staining. Subsequently, the stained samples were incubated according to manufacturer's instructions. In accordance with each antibody examined, an appropriate isotype control antibody was used as a negative control. Digitized MPO, NE, H3cit, and TLR4 immunohistochemically stained slides were then evaluated in a semi-quantitative fashion:

- None (0) – no signs of tissue staining
- Mild (1) – small amount of tissue staining
- Moderate (2) – medium amount of tissue staining
- Severe (3) – large amount of tissue staining

**TUNEL Assay:** A TUNEL assay was performed to detect DNA fragmentation in cell nuclei (a marker for apoptosis in intestinal tissue) using an *In Situ* Cell Death Detection Kit (Roche, Mannheim, Germany). The amount of apoptosis was assessed in a semi-quantitative fashion by an observer blinded to the study groups:

- None (0) – no signs of tissue staining
- Mild (1) – small amount of tissue staining
- Moderate (2) – medium amount of tissue staining
- Severe (3) – large amount of tissue staining

**ELISA (C5a):** In order to assess recruitment of inflammatory cells, such as neutrophils, a complement component 5a (C5a) ELISA using plasma was employed. The chemoattractant C5a is hypothesized to be a main factor involved in the inflammation cascade causing NEC and, as such, was measured in this study using a standard C5a KIT (Abcam, Cambridge, UK), according to manufacturer's instructions<sup>23</sup>. The results are expressed as pg/ml.

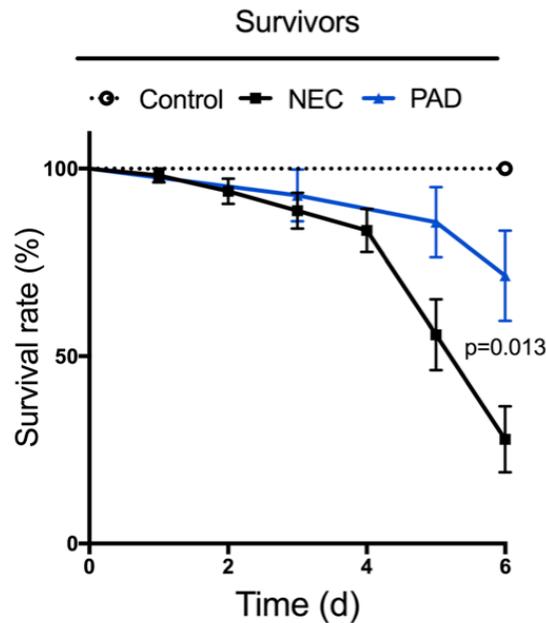
**Human Sample Collection:** Blood and intestinal samples were collected at the time of surgery upon removal of necrotic tissue. In order to be included in the study, NEC diagnosis had to be confirmed surgically by the attending surgeon. The intestinal samples were stained according to the previous description of mice sample preparation (HE, NE, MPO, H3Cit, TLR4) and analyzed by a pathologist blinded to the study.

**Statistics:** All data was analyzed using SPSS Statistics 24 (IBM, NY, USA) and GraphPad Prism 7 (GraphPad, CA, USA). A pre-power study calculation was performed using G\*Power 3.1. The power was deduced from a previous study examining NEC in mice<sup>24</sup>. Differences between groups were calculated using the ANOVA test (with planned contrasts) and results are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD). For ordinal data, differences were calculated with the Mann-Whitney test, while association between factors was statistically evaluated using Spearman's Rho. The level of significance for all tests was set at  $<0.05$ .

## Results

Survival rates are shown in Fig. 2, with a total of 51 out of 76 animals surviving the entirety of the procedure. Specifically, all animals in the control group survived until day six (10/10), while only 50% of animals in the NEC group reached this endpoint (7/14). Animals that underwent PAD inhibition demonstrated an increased survival rate, with 10 out of 14 animals reaching this endpoint. Moreover, the mortality rate at the predetermined endpoint of day 10 p.p. was significantly reduced after PAD inhibition ( $p = 0.0129$ ) and resembled control mice mortality rates. Regarding NEC manifestation, the majority of animals within the NEC induction group showed clinical signs of NEC, such as abdominal distension. In line with these clinical signs, NEC manifestation increased with time: 1d (0/6), 2d (1/8), 4d (4/10), 6d (5/7), based on macroscopic inspection. In comparison to the NEC group, animals that underwent PAD inhibition, had a significantly lower and especially less severe NEC manifestation score at the final endpoint (4/10 versus 5/7,  $p = 0.003$ ).

Surrogate markers of NET production, namely cfDNA and DNase, are shown in Fig. 1B,C, where cfDNA increased notably with time ( $p = 0.007$ ) and levels were significantly higher within the NEC groups than in



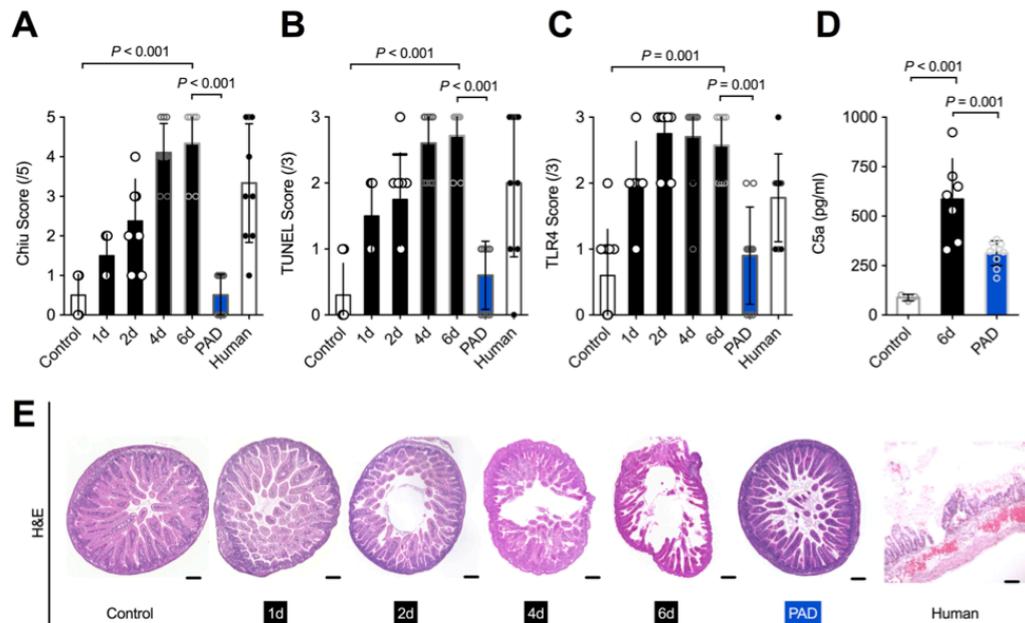
**Figure 2.** Survival rates of animals after NEC induction. Less than 30% of animals in the intervention group survived until their predetermined date of euthanasia. Animals with PAD inhibition (blue) were subjected to the same NEC induction protocol but had a significantly reduced mortality rate compared to animals in the NEC group ( $p = 0.013$ ). Statistics: Wilcoxon test.

controls (Fig. 1B). Additionally, ROC analysis (comparing mice after NEC induction to controls at day four and six of NEC induction start) showed 100% sensitivity and specificity for cfDNA levels above 1250 ng/ml ( $p = 0.001$ ). DNase concentration also significantly increased with time, most likely as a consequence of NET production and tissue damage ( $p = 0.002$ ), and animals with NEC exhibited significantly higher DNase levels than control animals (Fig. 1C). In contrast, animals with PAD inhibition had significantly lower cfDNA and DNase levels compared to NEC mice (Fig. 1B,C). Compared to age-matched controls however, cfDNA levels in PAD inhibited mice were significantly higher ( $p = 0.02$ ), while their DNase concentrations were markedly lower ( $p < 0.001$ ). This trend can be explained by the hypoxia treatment that PAD inhibited mice received, as hypoxic states have been shown to increase cfDNA levels. Thus we can assume that NETosis prevention in PAD inhibited mice was successful and that the measured increase in cfDNA levels in mice with PAD inhibition is most likely a consequence of tissue damage caused by the hypoxia treatment and not induced by NETosis<sup>25</sup>. Ultimately, a moderate positive correlation was observed between cfDNA and DNase levels ( $R = 0.57$ ,  $p < 0.001$ ), reflecting an upregulation of DNase in mice with high cfDNA levels.

Microscopic evaluation of NEC manifestation demonstrated a significant increase in tissue damage within the NEC group in comparison to controls ( $p < 0.001$ ). More specifically, animals undergoing NEC induction had significantly higher Chiu scores than controls, as shown in Fig. 3A,E. Furthermore, apoptosis rates increased drastically with time amongst NEC group animals ( $p < 0.001$ ) and TUNEL scores were notably higher in the NEC group than in controls, as seen in Fig. 3B. In comparison to the NEC group, animals with PAD inhibition appeared to be protected from tissue damage and displayed significantly less apoptosis (Fig. 3A,B).

General inflammation and complement activation, as measured by TLR4 expression and C5a activation, respectively, were more pronounced with increased length of the NEC induction paradigm. In fact, TLR4 expression was very high in all animals undergoing NEC induction (Fig. 3C) and showed a steady increase with time ( $p > 0.05$ ). In contrast, mice with PAD inhibition showed significantly less TLR4 expression (Fig. 3C). Moreover, animals within the NEC group exhibited a severe complement activation, which was reduced by PAD inhibition (Fig. 3D).

As predicted, NEC induction resulted in severe neutrophil activation and NETs production. In fact, extracellular DNA significantly increased with time amongst NEC group animals ( $p = 0.002$ ), and animals with NEC revealed considerably higher levels of extracellular DNA in comparison to controls (Fig. 4A,E). PAD inhibited animals had significantly lower levels than controls (Fig. 4A). Further, neutrophil activation, as assessed by MPO and NE, significantly increased with time (MPO  $p = 0.034$ ; NE  $p = 0.018$ ) and levels were markedly higher than in controls (Fig. 4B,C). Again, animals with PAD inhibition displayed a non-significant reduction in neutrophil activation (Fig. 4B,C). Additionally, NETs production, as measured by H3cit, significantly increased with time ( $p < 0.001$ ) while control animals displayed considerably lower levels, as seen in Fig. 4D. Likewise, PAD inhibition



**Figure 3.** PAD inhibition reduces tissue damage and apoptosis. (A,E) Using the Chiu score for assessment, there was a significant increase in intestinal tissue damage with time that was prevented in mice undergoing PAD inhibition (blue). These findings are illustrated by staining the samples with hematoxylin & eosin. (B) Apoptosis was assessed using a TUNEL assay. Apoptosis was vastly increased after NEC induction, while animals with PAD inhibition (blue) showed significantly lower TUNEL scores than animals of the NEC group. (C,F) Toll like receptor 4 (TRL4) expression increased with time in animals with NEC in comparison to control animals. PAD inhibition (blue) prevented this effect. (E) Complement activation was assessed via a complement component 5a (C5a) assay, which showed a linear significant elevation in concentration after NEC induction. This increase in C5a was prevented by PAD inhibition (blue). Total number of subjects: controls n = 10, 1d NEC n = 6, 2d NEC n = 8, 4d NEC n = 10, 6d NEC n = 7, PAD inhibition n = 10, humans n = 9. Statistics: Mann-Whitney test and ANOVA.

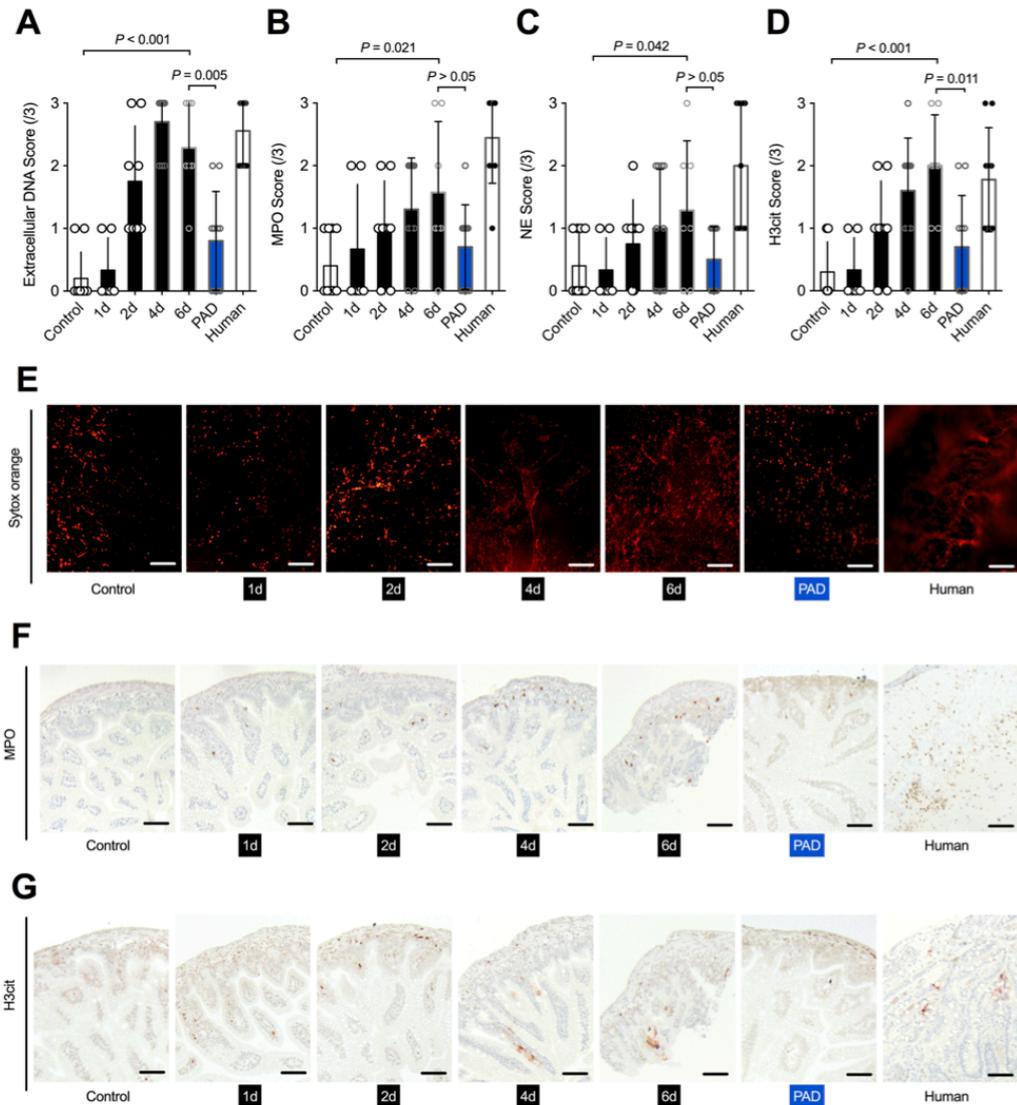
appeared to have been successful, as these animals had significantly lower H3cit scores than their NEC counterparts (Fig. 4D).

**Human Subjects.** All subjects were prematurely born (27.56 ± 2.24 SSW), underweight (1038.89 ± 317.99g), and underwent surgery between day nine to 10 p.p. (9.57 ± 8.46d). As shown in Fig. 3, human NEC intestinal samples experienced similar levels of tissue damage (Chiu score), apoptosis (TUNEL) and inflammation (TLR4), as compared to mice with NEC. Moreover, neutrophil activation, measured by MPO and NE, as well as neutrophils undergoing NETosis, were comparable between human and mice NEC samples, as seen in Fig. 4.

### Discussion

The exact pathophysiology of NEC remains unclear, but immaturity of the intestinal barrier coupled with an exaggerated inflammatory response, initiated by the immature intestinal epithelium in response to injury, is the leading hypothesis<sup>14,26,27</sup>. At sites of inflammation, neutrophils eliminate pathogens via: (1) phagocytosis and (2) through the production of web-like DNA structures that are coated with histones and proteolytic enzymes, which are known as NETs<sup>28</sup>. These NETs may be the key to understanding NEC pathogenesis. In fact, the current study demonstrated that NEC manifestation was mostly prevented in PAD inhibited mice, which were incapable of producing NETs, when subjected to the same NEC induction protocol as NEC mice. Even more, all aspects commonly associated with NEC manifestation, such as tissue damage, apoptosis, and inflammation were significantly reduced in animals with PAD inhibition. Therefore, as PAD4 is a necessary enzyme required for the process of NETosis, and thus, animals with PAD inhibition were unable to produce NETs<sup>29</sup>, it is very likely that NETs contribute crucially to NEC pathogenesis.

The results of the current study support the hyperinflammation hypothesis that explains NEC development. Statistical analysis of our research findings revealed that after NEC induction, animals showed a robust neutrophil activation and an increase in NETs-producing neutrophils, which is in line with previous studies<sup>30,31</sup>. Moreover, animals with NEC showed a strong activation of (1) the complement system and (2) an increased expression of



**Figure 4.** NEC induces neutrophil activation and possibly NET formation. (A,E) Quantification of extracellular DNA, including neutrophil extracellular traps (NETs), was visualized by SYTOX Orange staining. NEC animals demonstrated a relevant increase in NETs, which was significantly reduced in the absence of PAD (blue). Human subjects with NEC had similar NET scores. (B,C,F) Neutrophil elastase (NE) and myeloperoxidase (MPO), both markers of neutrophil activation, increased with time in NEC animals in comparison to controls, and were reduced in animals with PAD inhibition (blue). (D,G) Quantification of the NET marker citrullinated histone H3 (H3cit) showed an elevation in animals, as well as humans with NEC. The surrogate marker was significantly reduced in the PAD inhibition group (blue), with H3cit levels in animals with PAD inhibition being close to controls ( $p = 0.075$ ). Total number of subjects: controls  $n = 10$ , 1d NEC  $n = 6$ , 2d NEC  $n = 8$ , 4d NEC  $n = 10$ , 6d NEC  $n = 7$ , PAD inhibition  $n = 10$ , humans  $n = 9$ . Statistics: Mann-Whitney test and ANOVA.

TLR4, both a result of activated neutrophils. On one hand, neutrophils not only induce NETosis, but also activate the complement signaling cascade, which in turn results in C5a production<sup>32</sup>. Additionally, NETs induce and/or enhance complement system activation via i.e. activation of Factor XII, which subsequently leads to neutrophil recruitment and NETosis<sup>33</sup>. On the other hand, increased expression of TLR4 in NEC has been reported previously in both mice and humans<sup>3,34</sup>. This can be explained by TLR4s' role in facilitating the recognition of invading pathogens by responding to bacterial DNA and LPS<sup>35</sup>. Even more, activation of TLR4 has been shown to result in

a release of pro-inflammatory cytokines (i.e. interleukin 6, tumor necrosis factor alpha) via MyD88-dependent pathways and to initiate platelet aggregation<sup>36</sup>. Thus, considering these two cascades, initiated by activated neutrophils, one can state that NETs, as produced by neutrophils during NEC, induce complement activation and further inflammation through increased TLR4 expression with subsequent activation of additional neutrophils. Hence, the inflammatory cascade observed in NEC, results in a vicious cycle in which neutrophils induce hyperinflammation via production of NETs and these NETs further activate neutrophils. Thus, we postulate that NETs are essential for NEC progression. Further, as our human NEC samples showed similar levels of neutrophil activation and NET production, it is conceivable that the results of the animal model are transferable to human NEC patients.

Adding to the role of NETs in NEC, our findings suggest that NET markers, like DNase and cfDNA, may serve as means to diagnose NEC. Recent studies support our findings as these also showed the presence of cfDNA and neutrophilic proteins in the intestine of neonates with NEC<sup>30</sup>. However, the pool of cfDNA is likely made up of DNA of various origins, including: (1) the formation of NETs by neutrophils, and (2) passive release of mitochondrial and nuclear DNA of injured and dying cells<sup>26,37–40</sup>. Thus, not all extracellular DNA identified by staining procedures in this study is composed of NETs only. However, cfDNA concentrations were significantly increased in animals undergoing NEC induction in comparison to controls in this study. This is in line with current research demonstrating that human neonates suffering from NEC experience high levels of cfDNA (above 1000 ng/ml)<sup>41</sup>. Even though the study did not result in pronounced cfDNA levels, all NEC mice displayed cfDNA concentrations above 1250 ng/ml, which distinguished all NEC animal subjects from control mice. Nevertheless, before cfDNA can be adopted as a diagnostic marker for NEC, further studies examining other diseases of the intestine are needed.

Regarding results of the PAD inhibition mouse model, we believe that differences between PAD inhibited mice and normal physiological mice could have been even more pronounced, if PAD4 inhibition would have been effectuated using a genetic knockout model. Therefore, using an inhibition model and not a knockout model could be considered a potential limitation of this study. However, with this in mind, the H3Cit expression in the PAD inhibition group of the current study was almost equivalent to baseline levels, as seen in the control group. Thus, we are convinced that the PAD4 function was almost entirely blocked within this group. Strengthening our PAD inhibition model, are previous studies that showed excellent results of Cl-amidine in order to achieve PAD4 inhibition<sup>18</sup>. In fact, C57BL/6 mice might not be the optimal animal subject for NEC research, as neutrophil levels in humans are more than two times higher than in mice<sup>37,38</sup>. It is thus possible that NETs might even play a more substantial role in NEC pathogenesis than observed in this current mouse NEC model.

In conclusion, our study supports the theory that NETs play an essential part in NEC pathogenesis. Overall, NEC mortality and, in particular morbidity were vastly reduced after inhibition of NETosis through PAD inhibition, with levels mimicking those of healthy controls not subjected to the NEC induction protocol. As such, NETs appear to be vital to the hyperinflammation cascade accompanying NEC development and we believe that inhibition of NETosis might limit the consequences of NEC. Furthermore, cfDNA appears to be an excellent marker for diagnosis of NEC. However, further studies are needed to validate our findings.

## References

- Lin, P. W. & Stoll, B. J. Necrotizing enterocolitis. *Lancet* **368**, 1271–1283, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69525-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69525-1) (2006).
- Caplan, M. S. Neonatal necrotizing enterocolitis. *Introduction. Semin Perinatol* **32**, 69, <https://doi.org/10.1053/j.semperi.2008.02.001> (2008).
- Leaphart, C. L. *et al.* A Critical Role for TLR4 in the Pathogenesis of Necrotizing Enterocolitis by Modulating Intestinal Injury and Repair. *The Journal of Immunology* **179**, 4808–4820, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.7.4808> (2007).
- Nanthakumar, N. N., Fusunyan, R. D., Sanderson, I. & Walker, W. A. Inflammation in the developing human intestine: A possible pathophysiologic contribution to necrotizing enterocolitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 6043–6048, <https://doi.org/10.1073/pnas.97.11.6043> (2000).
- Good, M. *et al.* Breast milk protects against the development of necrotizing enterocolitis through inhibition of Toll Like Receptor 4 in the intestinal epithelium via activation of the epidermal growth factor receptor. *Mucosal Immunology* **8**, 1166–1179 (2015).
- McElhinney, D. B. *et al.* Necrotizing Enterocolitis in Neonates With Congenital Heart Disease: Risk Factors and Outcomes. *Pediatrics* **106**, 1080–1087 (2000).
- Hayashi, F. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood* **102**, 2660–2669, <https://doi.org/10.1182/blood-2003-04-1078> (2003).
- Selders, G. S., Fetz, A. E., Radic, M. Z. & Bowlin, G. L. An overview of the role of neutrophils in innate immunity, inflammation and host-biomaterial integration. *Regenerative Biomaterials* **4**, 55–68, <https://doi.org/10.1093/rb/rbw041> (2017).
- Weiss, S. J. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* **320**, 365–376, <https://doi.org/10.1056/NEJM198902093200606> (1989).
- Papayannopoulos, V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nature Reviews Immunology*, <https://doi.org/10.1038/nri.2017.105> (2017).
- Manda, A., Pruchniak, M. P., Arazna, M. & Demkow, U. A. Neutrophil extracellular traps in physiology and pathology. *Cent Eur J Immunol* **39**, 116–121, <https://doi.org/10.5114/ceji.2014.42136> (2014).
- Martinod, K. *et al.* Neutrophil elastase-deficient mice form neutrophil extracellular traps in an experimental model of deep vein thrombosis. *J Thromb Haemost* **14**, 551–558, <https://doi.org/10.1111/jth.13239> (2016).
- Brinkmann, V. *et al.* Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* **303**, 1532–1535, <https://doi.org/10.1126/science.1092385> (2004).
- Fuchs, T. A. *et al.* Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**, 15880–15885, <https://doi.org/10.1073/pnas.1005743107> (2010).
- Camicia, G., Pozner, R. & de Larranaga, G. Neutrophil extracellular traps in sepsis. *Shock* **42**, 286–294, <https://doi.org/10.1097/SHK.000000000000221> (2014).
- Welak, S. R. *et al.* Intestinal NADPH oxidase 2 activity increases in a neonatal rat model of necrotizing enterocolitis. *PLoS one* **9**, e115317, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115317> (2014).
- Ilett, K. F. *et al.* Use of a sparse sampling study design to assess transfer of tramadol and its O-desmethyl metabolite into transitional breast milk. *Br J Clin Pharmacol* **65**, 661–666, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2008.03117.x> (2008).
- Li, P. *et al.* PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J Exp Med* **207**, 1853–1862, <https://doi.org/10.1084/jem.20100239> (2010).

19. Fadini, G. P. *et al.* NETosis Delays Diabetic Wound Healing in Mice and Humans. *Diabetes* **65**, 1061–1071, <https://doi.org/10.2337/db15-0863> (2016).
20. Fuchs, T. A., Kremer Hovinga, J. A., Schatzberg, D., Wagner, D. D. & Lammle, B. Circulating DNA and myeloperoxidase indicate disease activity in patients with thrombotic microangiopathies. *Blood* **120**, 1157–1164, <https://doi.org/10.1182/blood-2012-02-412197> (2012).
21. Tanaka, K. *et al.* *In vivo* characterization of neutrophil extracellular traps in various organs of a murine sepsis model. *PLoS One* **9**, e111888, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111888> (2014).
22. Chiu, C. J., McArdle, A. H., Brown, R., Scott, H. J. & Gurd, F. N. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal. *Arch Surg* **101**, 478–483 (1970).
23. Tayman, C. *et al.* C5a, a complement activation product, is a useful marker in predicting the severity of necrotizing enterocolitis. *Tohoku J Exp Med* **224**, 143–150 (2011).
24. Zani, A. *et al.* A spectrum of intestinal injury models in neonatal mice. *Pediatr Surg Int* **32**, 65–70, <https://doi.org/10.1007/s00383-015-3813-x> (2016).
25. Okkonen, M. *et al.* Plasma cell-free DNA in patients needing mechanical ventilation. *Crit Care* **15**, R196, <https://doi.org/10.1186/cc10357> (2011).
26. Brill, A. *et al.* Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice. *J Thromb Haemost* **10**, 136–144, <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2011.04544.x> (2012).
27. Saffarzaadeh, M. *et al.* Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. *PLoS One* **7**, e32366, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032366> (2012).
28. Nauseef, W. M. & Borregaard, N. Neutrophils at work. *Nat Immunol* **15**, 602–611, <https://doi.org/10.1038/ni2921> (2014).
29. Papayannopoulos, V., Metzler, K. D., Hakkim, A. & Zychlinsky, A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* **191**, 677–691, <https://doi.org/10.1083/jcb.201006052> (2010).
30. MacQueen, B. C. *et al.* Elevated fecal calprotectin levels during necrotizing enterocolitis are associated with activated neutrophils extruding neutrophil extracellular traps. *J Perinatol* **36**, 862–869, <https://doi.org/10.1038/jp.2016.105> (2016).
31. De Plaen, I. G. Inflammatory signaling in necrotizing enterocolitis. *Clin Perinatol* **40**, 109–124, <https://doi.org/10.1016/j.clp.2012.12.008> (2013).
32. Wang, H., Wang, C., Zhao, M. H. & Chen, M. Neutrophil extracellular traps can activate alternative complement pathways. *Clin Exp Immunol* **181**, 518–527, <https://doi.org/10.1111/cei.12654> (2015).
33. Yuen, J. *et al.* NETosing Neutrophils Activate Complement Both on Their Own NETs and Bacteria via Alternative and Non-alternative Pathways. *Front Immunol* **7**, 137, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00137> (2016).
34. Jilling, T. *et al.* The roles of bacteria and TLR4 in rat and murine models of necrotizing enterocolitis. *J Immunol* **177**, 3273–3282 (2006).
35. Clark, S. R. *et al.* Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med* **13**, 463–469, <https://doi.org/10.1038/nm1565> (2007).
36. Xu, J., Zhang, X., Monestier, M., Esmon, N. L. & Esmon, C. T. Extracellular histones are mediators of death through TLR2 and TLR4 in mouse fatal liver injury. *J Immunol* **187**, 2626–2631, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003930> (2011).
37. Zitvogel, L., Kepp, O. & Kroemer, G. Decoding cell death signals in inflammation and immunity. *Cell* **140**, 798–804, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.015> (2010).
38. Bhagirath, V. C., Dwivedi, D. J. & Liaw, P. C. Comparison of the Proinflammatory and Procoagulant Properties of Nuclear, Mitochondrial, and Bacterial DNA. *Shock* **44**, 265–271, <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000397> (2015).
39. Jimenez-Alcazar, M., Kim, N. & Fuchs, T. A. Circulating Extracellular DNA: Cause or Consequence of Thrombosis? *Semin Thromb Hemost* **43**, 553–561, <https://doi.org/10.1055/s-0036-1597284> (2017).
40. Jimenez-Alcazar, M. *et al.* Host DNases prevent vascular occlusion by neutrophil extracellular traps. *Science* **358**, 1202–1206, <https://doi.org/10.1126/science.aam8897> (2017).
41. Nguyen, D. N. *et al.* Elevated levels of circulating cell-free DNA and neutrophil proteins are associated with neonatal sepsis and necrotizing enterocolitis in immature mice, pigs and infants. *Innate Immun* **23**, 524–536, <https://doi.org/10.1177/1753425917719995> (2017).

## Acknowledgements

The authors thank Kristin Hartmann (Core Facility Mouse Pathology, UKE Medical School) for assistance with histological processing.

## Author Contributions

Deirdre Vincent: Ms. Vincent acquired the data, drafted the initial manuscript, and approved the final manuscript as submitted. Michaela Klinke: Dr. Klinke acquired the data, drafted the initial manuscript, and approved the final manuscript as submitted. Georg Eschenburg: Dr. Eschenburg acquired the data, and approved the final manuscript as submitted. Magdalena Trochimiuk: Ms. Trochimiuk acquired the data, and approved the final manuscript as submitted. Birgit Appl: Ms. Appl acquired the data, and approved the final manuscript as submitted. Bastian Tiemann: Dr. Tiemann conceptualized and designed the study, and approved the final manuscript as submitted. Robert Bergholz: Dr. Bergholz conceptualized and designed the study, and approved the final manuscript as submitted. Konrad Reinshagen: Prof. Reinshagen conceptualized and designed the study, and approved the final manuscript as submitted. Michael Boettcher: Dr. Boettcher conceptualized and designed the study, acquired the data, acted as course instructor, performed statistics, drafted the initial manuscript, and approved the final manuscript as submitted. All authors approved the final manuscript as submitted and agree to be accountable for all aspects of the work.

## Additional Information

**Competing Interests:** The authors declare no competing interests.

**Publisher's note:** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## **Die NEC ist ein NETs-abhängiger Prozess und NETose-Marker sind prädiktiv für NEC in Mäusen und Menschen**

### **3. Einleitung**

Die nekrotisierende Enterokolitis (necrotizing enterocolitis - NEC) gilt als eine der schwerwiegendsten pädiatrischen Krankheitsbilder, welche vor allem Frühgeborene (FG), aber auch zu einem geringeren Anteil Neugeborene (NG), betrifft. Tatsächlich entwickeln etwa 12% aller Säuglinge mit einem Geburtsgewicht von weniger als 1500 Gramm eine NEC (Caplan 2008), unter der es trotz adäquater Therapie zu einer signifikanten Sterblichkeitsrate von bis zu 30% kommen kann (Lin und Stoll 2006). Trotz steigender Prävalenz und ausgiebiger Forschung, ist die Datenlage zur Pathogenese der NEC gering. Aktuelle Studien deuten darauf hin, dass die NEC ein multifaktorieller Krankheitsprozess ist, und durch die Exposition des unreifen Darms gegenüber Bakterien nach der Geburt ausgelöst wird (Leaphart et al. 2007). Nach dieser Exposition reagiert das Immunsystem des FG mit einer lokalen Hyperinflammationsreaktion, welche den neonatalen Darm beschädigt und zur NEC-Entwicklung führt (Nanthakumar et al. 2000). Diese Theorie wird durch die Tatsache gestärkt, dass die Immunsystemaktivität von termingerechten NG nach bakterieller Exposition herunterreguliert wird, während bei FG diese Regulation nicht stattfindet (Leaphart et al. 2007).

Einer der wichtigsten Mechanismen zur Bestärkung dieser Theorie bezieht sich auf die Aktivität des sogenannten intestinalen Toll-like Rezeptors 4 (TLR4), welcher bei FG im Vergleich zu NG eine erhöhte Expression aufweist. Eine TLR4 Hochregulation führt zu einer erhöhten Schleimhautschädigung, da (1) die Apoptose von Enterozyten beschleunigt wird und (2) die Heilungsrate, durch eine beeinträchtigte intestinale Reparatur und Proliferation, reduziert wird (Leaphart et al. 2007). Daher bedingt eine erhöhte TLR4 Expression eine Aktivierung von Signalkaskaden, welche letztendlich zur Produktion von Chemokinen und inflammatorischen Zytokinen führt, die für die Rekrutierung von neutrophilen Zellen zum Entzündungsort notwendig sind (McElhinney et al. 2000, Hayashi et al. 2003). Aktuelle Studien, untermauern die Rolle des TLR4 in der NEC-Pathogenese, wie z.B. der Nachweis des protektiven Effektes des Stillens, welche die TLR4 Signalkaskade hemmt und somit zu einer erniedrigten TLR4-Aktivierung führt (Leaphart et al. 2007, Good et al. 2015).

Entsprechend dieser Daten ist davon auszugehen, dass die TLR4 Aktivierung zu einer Rekrutierung von neutrophilen Zellen führt und diese somit entscheidend zur NEC-Entstehung beitragen. Die aktivierten Neutrophilen bekämpfen Pathogene mit Hilfe von drei Hauptmechanismen: (1) Phagozytose, (2) Degranulation und (3) Bildung von neutrophilen extrazellulären Fallen (neutrophil extracellular traps - NETs) (Papayannopoulos 2018). NETs sind mit Histonen und antimikrobiellen Proteinen bespickte netzartige DNA Strukturen und

werden von Neutrophilen durch 2 Mechanismen gebildet und ausgeschüttet: (1) Apoptose (NETose), auch bekannt als „beneficial suicide“, oder (2) nicht-lytische und nicht-apoptotische vesikuläre Freisetzung (Manda et al. 2014). Nach ihrer Freisetzung bekämpfen NETs Infektionen in dem sie in ihren DNA-Netzen Mikroben, wie Bakterien, Pilze, Viren und Protozoen immobilisieren, und mittels proteolytischer Enzyme, welche in den NETs enthalten sind, eliminieren (Brinkmann et al. 2004, Fuchs et al. 2010, Camicia et al. 2014).

Da die Rolle der NETs in der NEC-Pathogenese noch unbekannt ist, war es das Ziel dieser Studie zu erforschen, ob NETs eine entscheidende Rolle in dieser spielen. Hierfür wurden ein NEC-Mausmodell entwickelt und zusätzlich humane NEC-Darmproben untersucht. Um das Ausmaß der NETs-Beteiligung an der NEC-Entwicklung zu beurteilen, wurde zusätzlich ein Mausmodell entwickelt, welches die Protein-Arginin-Deiminase (PAD) inhibiert, um somit eine NETs-Bildung zu verhindern.

#### **4. Material und Methoden**

##### 4.1 Studiendesign

Die Studie wurde von der Hamburgischen Landesverwaltung für Tierforschung genehmigt (63/16) und mit insgesamt 72 Versuchsmäusen durchgeführt. Zusätzlich wurden histologische Untersuchungen an Darmpräparaten von neun NG durchgeführt, welche von 2017 bis 2018 an der Klinik für Kinderchirurgie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf a.G. einer NEC operiert wurden. Die Untersuchungen erfolgten nach den Richtlinien der Ethikkommission der Medizinischen Forschung Hamburg (Ethik-Kommission der Ärztekammer Hamburg, PV4991) und in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki (1964) und Ihren späteren Änderungen und Ergänzungen.

##### 4.2 Tierversuche

###### 4.2.1 NEC - Induktion

Schwangere C57BL/6J-Mäuse wurden einzeln in der Tierpflegeeinrichtung mit Nahrung und Wasser ad lib. gehalten. Die Muttertiere gebaren auf natürlichem Weg und Jungtiere wurden während der gesamten Versuchsdurchführung bei dem Muttertier gehalten. Am vierten Tag postpartum (p.p.) wurde mit der NEC-Induktion begonnen: Versuchstiere wurden mit einer Mischung aus 0,1 ml Neocate (Nutricia) und Lipopolysaccharidlösung (LPS) (1:50-Konzentration von LPS zu Neocate) mittels einer Sonde zweimal täglich geschlündelt, gefolgt von einer zehnminütigen Hypoxieperiode bei 5% Sauerstoff. Dieses Protokoll wurde sechs Tage durchgeführt und die Tiere spätestens am zehnten Tag p.p. euthanasiert.

#### 4.2.2 NEC und NETs Zeitverlauf

Das Induktionsprotokoll ist in Abbildung (Abb.) 1A dargestellt. Um die Entwicklung von NEC und NETs zu beurteilen, wurden Tiere an prädefinierten Endpunkten (1d, 2d, 4d und 6d nach Beginn der Induktion) getötet. Während des gesamten Experiments wurde das Trinkwasser der Muttertiere mit Tramadol versetzt, welches mit 12-14% der ursprünglichen Konzentration durch Trinken der Muttermilch auf die Jungtiere übertragen wird und eine angemessene Schmerztherapie gewährleistet (Ilett et al. 2008). Zur Kontrolle anderer Faktoren, welche die Jungtiere beeinflussen könnten, wurde eine zusätzliche Versuchstiergruppe gebildet (Kontrollgruppe), in der die Mäuse am vierten oder sechsten Tag post NEC-Induktionsprotokoll euthanasiert wurden.

#### 4.2.3 PAD - Inhibition

Protein-Arginin-Deiminase 4 (PAD4) ist ein Histon-modifizierendes Enzym, dessen Hemmung durch Cl-Amidin-Behandlung die Bildung von NETs verhindert (Li et al. 2010). In dieser Studie wurde eine PAD-Hemmung durch tägliche subkutane Injektionen von 10 mg/kg Körpergewicht Cl-Amidin ab Tag eins p.p. für den gesamten Zeitraum des oben beschriebenen Verfahrens aufrechterhalten (Fadini et al. 2016). Abb. 1A zeigt den Zeitverlauf der PAD-Inhibition.

#### 4.3 Blut Analyse

Die Blutproben wurden in Serum sowie Plasma getrennt, gekühlt transportiert und umgehend in eine -80°C Kühlung überführt. Zellfreie DNA (cell free DNA – cfDNA) und DNasen wurden aus Blutplasmaproben gewonnen und wie zuvor beschrieben analysiert (Fuchs et al. 2012). CfDNA ist ein unspezifischer Marker der NETs-Bildung, während DNase den Abbau von extrazellulärer DNA, inklusive der NETs, widerspiegelt.

#### 4.4 Morphologische Darmanalyse und Gewebepreparation

Um Darmgewebe makroskopisch sowie mikroskopisch zu analysieren, wurde das Abdomen unter Verwendung eines Mittellinienschnitts eröffnet und der betroffene Darm unter dem Mikroskop entfernt. Die makroskopische Beurteilung der NEC-Manifestation wurde während der Dissektion von zwei verblindeten Beobachtern durchgeführt, und einer von zwei Gruppen zugeteilt: Keine NEC (0) und NEC (1). Tiere mit makroskopischer NEC wurden anhand sichtbarer pneumatosis intestinalis und/oder Nekrose definiert.

Die relevanten Segmente des Dünndarms wurden daraufhin in (1) phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate-buffered saline - PBS) und (2) Bouin eingelegt. Eine weitere Probe wurde in flüssigen Stickstoff schockgefroren.

#### 4.4.1 Extrazelluläre DNA

Der extrazelluläre DNA Nachweis wurde mittels intestinaler Proben in situ veranschaulicht, indem in PBS gegebenen Gewebeproben unter einem Fluoreszenzmikroskop mit SYTOX Orange eingefärbt und analysiert wurden (Tanaka et al. 2014). Ein verblindeter Untersucher führte die Beurteilung und Kategorisierung durch:

- (0) - keine extrazelluläre DNA; (1) – wenig extrazelluläre DNA; (2) – mittel-viel extrazelluläre DNA; (3) – viel extrazelluläre DNA.

#### 4.4.2 Histologische Analyse

Nach der Gewebefixierung in Bouin wurden Proben dehydriert, in Paraffin eingebettet und in 3 µm dicke Schnitte auf Objektträger zur weiteren Analyse aufgebracht. Alle Proben wurden von einem verblindeten Pathologen analysiert.

##### 4.4.2.1 Hämatoxylin und Eosin (H&E)

Die H&E-Färbung erfolgte mit einem standardisierten, maschinellen Färbeverfahren, und wurde mit dem Lichtmikroskopie anhand des Chiu Scores semi-quantitativ beurteilt (Chiu et al. 1970).

##### 4.4.2.2 Immunohistochemische Färbungen (NE, MPO, H3cit, TLR4)

Histologische Proben wurden immunohistochemisch für neutrophile Elastase (NE), Myeloperoxidase (MPO), citrulliniertes Histon H3 (H3cit) und TLR4 gefärbt. Aktivierung und Rekrutierung von Neutrophilen wurde mit NE und MPO visualisiert, und NETs-Produktion mit Hilfe des Surrogatmarkers für NETs, H3cit, bewertet. Die intestinale Entzündungsreaktion wurde mittels TLR4 Färbung aufgezeigt. Zusätzlich wurde für jeden verwendeten Antikörper eine Isokontrolle (Negativkontrolle) für jedes angefärbte Präparat angefertigt. Digitalisierte MPO-, NE-, H3cit- und TLR4-gefärbte Präparate wurden anschließend semiquantitativ ausgewertet:

- (0) - keine Gewebefärbung; (1) - geringe Gewebefärbung; (2) – mittel-starke Gewebefärbung; (3) - starke Gewebefärbung.

#### 4.4.3 TUNEL - Assay

Um DNA-Fragmentierungen in Zellkernen (ein Apoptosemarker im Darmgewebe) nachzuweisen, wurde ein TUNEL-Assay verwendet und die Ergebnisse semiquantitativ kategorisiert:

- (0) - keine Apoptose; (1) - geringe Apoptose; (2) – mittel-starke Apoptose; (3) - starke Apoptose.

#### 4.4.4 ELISA (C5a)

Zur Rekrutierung von Entzündungszellen, wie z.B. Neutrophilen, wurde das Chemokin Komplement 5a (complement 5a - C5a) nachgewiesen (Tayman et al. 2011). Für diesen Nachweis wurde ein ELISA mit Plasma verwendet (Ergebnisse in pg/ml).

#### 4.5 Menschliche Probensammlung

Darmproben wurden zum Zeitpunkt der Operation, nach Entfernung des nekrotischen Gewebes, entnommen. Um in die Studie aufgenommen zu werden, musste die NEC-Diagnose vom behandelnden Chirurgen operativ bestätigt werden. Im Anschluss wurden Darmproben gemäß der oben genannten Beschreibung für HE, NE, MPO, H3cit und TLR4 gefärbt und von einem verblindeten Pathologen ausgewertet (siehe 4.4.2.2).

#### 4.6 Statistik

Alle Daten wurden mittels SPSS Statistics 24 und GraphPad Prism 6 analysiert. Zudem wurde eine Prä-Power Studie mit G \* Power 3.1 durchgeführt. Die Power wurde von einer früheren Studie, in der NEC bei Mäusen untersucht wurde, bezogen (Zani et al. 2016). Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit einem ANOVA analysiert. Für ordinale Daten wurden Unterschiede zwischen den Gruppen mit dem Mann-Whitney-Test berechnet, während für Assoziationen zwischen Faktoren der Spearman's Rho Test genutzt wurde. Das Signifikanzniveau wurde auf  $<0,05$  festgelegt.

### 5. Ergebnisse

Insgesamt überlebten 51 von 76 Tieren (Abb. 2). In der Kontrollgruppe überlebten alle Tiere (10/10), während in der NEC-Gruppe weniger als 60% den geplanten Euthanasietag erreichten (31/52). In der PAD-Inhibitionsgruppe überlebten zehn von 14 Tieren, so dass somit die Mortalität nach PAD-Hemmung signifikant reduziert wurde ( $p = 0,008$ ).

Hinsichtlich NEC-Manifestation, zeigte die Mehrheit der NEC-Tiere klinische Anzeichen von NEC, wie z.B. distendierte Abdomen. Ferner nahm die makroskopische NEC-Manifestation mit längerer NEC-Induktionszeit zu: 1d (0/6), 2d (1/8), 4d (4/10), 6d (5/7). Im Vergleich zur NEC-Gruppe, zeigten PAD-inhibierte Tiere eine signifikant reduzierte, und vor allem weniger schwere, NEC-Manifestation am Euthanasietag (4/10 gegenüber 5/7,  $p = 0,003$ ).

Die Surrogatmarker für NET-Bildung und -Abbau, cfDNA und DNase, sind in der Abb. 1B-C aufgezeigt. Es zeigte sich, dass die cfDNA Konzentration mit längerer NEC-Induktionszeit signifikant anstieg und die Konzentration innerhalb der NEC-Gruppen signifikant erhöht war im Vergleich zu den Kontrolltieren (Abb. 1B). Ebenso zeigte die gemessene DNase

Konzentration im Gewebe der NEC-Tiere einen stetigen Zuwachs je länger die NEC-Induktion andauerte, am wahrscheinlichsten als Folge der NET-Produktion und Gewebeschädigung ( $p = 0,002$ ). Weiterhin zeigten NEC-Tiere signifikant höhere DNase-Spiegel als Kontrolltiere (Abb. 1C) und PAD-inhibierte Mäuse hatten signifikant niedrigere cfDNA- und DNase-Spiegel als Tiere aus der NEC-Gruppe (beide  $p < 0,001$ ), welches insgesamt auf eine niedrigere NET-Produktion der PAD-inhibierten Tiere hindeutet.

Die histologische Auswertung der Gewebeproben zeigte einen signifikanten Anstieg der Gewebeschädigung innerhalb der NEC-Gruppe im Vergleich zu den Kontrollen ( $p < 0,001$ ). Insbesondere hatten NEC-induzierte Tiere signifikant höhere Chiu Scores als Kontrolltiere, wie aus Abb. 3A und 3E zu entnehmen ist. Darüber hinaus nahmen die Apoptose-Raten mit Verlängerung der NEC-Induktionsdauer bei Tieren der NEC-Gruppe drastisch zu ( $p < 0,001$ ). Zusätzlich waren die TUNEL-Werte in der NEC-Gruppe deutlich höher als bei Kontrolltieren, wie in der Abb. 3B dargestellt ist. Im Vergleich zur NEC-Gruppe schienen Tiere mit PAD-Hemmung vor Gewebeschädigung geschützt zu sein und zeigten signifikant weniger Apoptose (Abb. 3A, 3B).

Allgemeine Entzündung und Komplementaktivierung, gemessen an TLR4-Expression bzw. C5a-Aktivierung, waren mit zunehmender Länge des NEC-Induktionsprogramms ausgeprägter. Die PAD-Inhibierung verhinderte diesen Effekt (Abb. 3C, 3D).

Wie Eingangs hypothesiert, führte die NEC-Induktion zu einer starken Neutrophilenaktivierung und NET-Produktion. Insbesondere nahm auch histologisch gesehen die extrazelluläre DNA Konzentration mit längerer NEC-Induktion in den NEC-Gruppen signifikant zu ( $p = 0,002$ ), und Tiere mit NEC zeigten, im Vergleich zu den Kontrollen, beträchtlich höhere Mengen an extrazellulärer DNA (Abb. 4A und 4E). PAD-inhibierte Tiere zeigten diese Entwicklung nicht (Abb. 4A). Weiterhin nahm die Neutrophilenaktivierung, welche mit Hilfe von MPO und NE Färbung beurteilt wurde, mit andauernder Zeit der NEC-Induktion signifikant zu (MPO  $p = 0,034$ ; NE  $p = 0,018$ ) und waren deutlich erhöht im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 3B und 3C). Abermals zeigten Tiere mit PAD-Hemmung eine nicht-signifikante Reduktion der Neutrophilenaktivierung (Abb. 3B und 3C). Darüber hinaus nahm die NET-Produktion (H3cit) mit längerer NEC-Induktionszeit signifikant zu ( $p < 0,001$ ), während Kontrolltiere deutlich niedrigere Werte aufwiesen, wie in Abb. 3D zu sehen ist. Ebenso schien die PAD-Inhibition erfolgreich gewesen zu sein, da diese Tiere signifikant niedrigere H3cit-Werte hatten als die NEC-Tiere (Abb. 3D).

### **Humane Proben**

Alle menschlichen Darmproben wurden von frühgeborenen ( $27,56 \pm 2,24$  SSW), hypotrophen ( $1038,89 \pm 317,99$  g) und an Tag neun oder zehn p.p. operierten ( $9,57 \pm 8,46$ d) Säuglingen gewonnen. Wie in Abb. 3 gezeigt, wiesen humane NEC-Darmproben eine ähnliche

Gewebeschädigung (Chiu Score), Apoptose (TUNEL) und Entzündung (TLR4) auf wie Mäuse mit NEC. Darüber hinaus waren Neutrophilenaktivierung, gemessen anhand von MPO und NE, sowie NETose-Raten zwischen menschlichen und tierischen NEC-Proben vergleichbar, wie in Abb. 4 zu sehen ist.

## **6. Diskussion**

Auch wenn die genaue Pathophysiologie der NEC nicht geklärt ist, bestärkt diese Studie die Hypothese, dass eine unreife Darmbarriere in Kombination mit einer überschießenden Inflammationsreaktion, die durch das unreife Darmepithel als Reaktion auf eine Verletzung ausgelöst wird, ursächlich für die NEC-Entwicklung ist (Fuchs et al. 2010, Brill et al. 2012, Saffarzadeh et al. 2012). Wie bereits beschrieben, eliminieren neutrophile Granulozyten Pathogene durch: (1) Phagozytose und (2) Produktion von NETs (Nauseef und Borregaard 2014), so dass diese der Schlüssel zum Verständnis der NEC-Pathogenese sein könnten. Tatsächlich zeigt diese Studie, dass die NEC-Manifestation bei PAD-inhibierten Mäusen, welche keine NETs bilden können, meistens verhindert wurde, wenn diese Tiere dieselbe NEC-Induktion erhielten. Darüber hinaus waren die Manifestationsformen der NEC, nämlich (1) Gewebeschädigung, (2) Apoptose und (3) Entzündung bei PAD-inhibierten Tieren signifikant reduziert. Da PAD4 ein für die NETose notwendiges Enzym ist, und somit Tiere mit PAD-Hemmung nicht in der Lage sind NETs zu produzieren (Papayannopoulos et al. 2010), ist es sehr wahrscheinlich, dass NETs eine entscheidende Funktion in der NEC-Pathogenese haben.

Die Auswertung der Daten ergab, dass Tiere mit NEC-Manifestation eine starke Neutrophilenaktivierung und Zunahme der NET-produzierenden Neutrophilen präsentierten, welches auch in anderen Studien belegt wird (MacQueen et al. 2016, De Plaen 2013). Darüber hinaus zeigten Tiere mit NEC eine starke Aktivierung (1) des Komplementsystems und (2) eine erhöhte Expression von TLR4, beides Resultate von aktivierten neutrophilen Granulozyten. Einerseits induzieren neutrophile Granulozyten nicht nur eine NETose, sondern aktivieren andererseits auch das Komplementsystem, welches wiederum zu einer Produktion von C5a führt (Wang et al. 2015). Zusätzlich induzieren und/oder verstärken NETs die Funktion des Komplementsystems durch Aktivierung von Faktor XII, welcher wiederum zur Rekrutierung von Neutrophilen führt und eine NETose induziert (Yuen et al. 2016). Weiterhin wurde eine erhöhte TLR4 Expression in NEC-Tierversuchen als auch bei NEC-NG dokumentiert (Jilling et al. 2006). Diese Beobachtung kann durch die Funktion des TLR4 in der Erkennung und Eliminierung von Pathogenen via bakterieller DNA und LPS erklärt werden (Clark et al. 2007). Darüber hinaus führt die TLR4 Aktivierung zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (z.B. Interleukin 6, Tumornekrosefaktor alpha) via MyD88-

abhängiger Signalwege, welche abermals eine Thrombozytenaggregation initiieren (Xu et al. 2011). Unter Berücksichtigung dieser beiden Signalkaskaden, welche durch aktivierte neutrophile Granulozyten induziert werden, scheint es naheliegend, dass NETs in NEC-Patienten eine Komplementaktivierung sowie Entzündungsreaktion hervorrufen, die primär durch eine erhöhte TLR4-Expression mit anschließender Aktivierung zusätzlicher Neutrophilen verursacht wird. Daher führt die Entzündungskaskade, die bei Tieren mit NEC, ebenso wie bei diagnostisch verifizierten NEC-Patienten beobachtet wird, zu einem Teufelskreis: Neutrophile Zellen induzieren eine Hyperinflammation durch die Expression von NETs, welche wiederum weitere neutrophile Granulozyten aktivieren. Dementsprechend konnten die Hypothesen, dass NETs für die Entwicklung der NEC essentiell sind und die Ergebnisse unseres NEC-Tiermodells auf menschliche NEC-Patienten übertragbar sind, da die humanen NEC-Proben hinsichtlich Neutrophilenaktivierung und NETs-Produktion sich ähnlich der Mausproben verhalten, bestätigt werden.

Zusätzlich legen unsere Ergebnisse nahe, dass die NETose-Marker, DNase und cfDNA, in der NEC-Diagnostik hilfreich sein könnten, v.a. unter dem Gesichtspunkt, dass andere aktuelle Studien unsere Ergebnisse belegen, und cfDNA, sowie neutrophile Proteine, im Darm von NG mit NEC bestätigen (MacQueen et al. 2016). Jedoch ist zu bedenken, dass die in unserer Studie gemessenen cfDNA Konzentrationen, DNA verschiedener Herkunft beinhaltet, einschließlich: (1) NETs, welche von Neutrophilen produziert werden, und (2) passive Freisetzung von mitochondrialer und nukleärer DNA durch geschädigte und apoptotische Zellen (Brill et al. 2012, Zitvogel et al. 2010, Bhagirath et al. 2015, Jimenez-Alcazar et al. 2017a, Jimenez-Alcazar et al. 2017b). Daher besteht die gemessene extrazelluläre DNA Konzentration in dieser, sowie auch anderen Studien, nicht ausschließlich aus NETs. Obwohl unsere Studie nicht sehr stark gesteigerte cfDNA Konzentrationen in NEC-Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren widerspiegelt, zeigten dennoch alle NEC-Mäuse cfDNA-Konzentrationen von über 125 ng/ml, welches jedoch weniger ist als bei NG mit NEC (über 1000 ng/ml) (Nguyen et al. 2017). Die unterschiedlichen cfDNA Werte zwischen einerseits Mäusen dieser Studie und andererseits NG mit NEC ist jedoch anhand unterschiedlicher Konzentrationen von Neutrophilen der einzelnen Spezies erklärbar. Weiße Blutkörperchen des Menschen bestehen aus ca. 50-70% neutrophilen Zellen, während bei Mäusen dieser Anteil weniger als 25% beträgt (Mestas und Hughes 2004). Daher sollten weitere Studien erfolgen, welche andere Infektionskrankheiten des Darms hinsichtlich cfDNA untersuchen, bevor cfDNA als diagnostischer Marker für NEC verwendet werden kann.

Zusammenfassend unterstützt unsere Studie die Theorie, dass NETs eine essentielle Funktion in der NEC-Pathogenese haben. Die NEC-Mortalität, und insbesondere Morbidität, war nach NETose-Prävention durch PAD-Inhibition stark reduziert, wobei die Ergebnisse der PAD-inhibierten Tiere, denen von gesunden Kontrollen ähnelten. Daher scheinen NETs für

die Hyperinflammationskaskade, welche essentiell für die NEC-Entwicklung ist, von entscheidender Bedeutung zu sein, so dass folglich eine NETs-Hemmung das Ausmaß der NEC begrenzen könnte. Darüber hinaus scheint cfDNA ein vielversprechender Marker in der NEC-Diagnostik zu sein.

### **Ausblick**

Auch wenn die Ergebnisse dieser Studie vielversprechend sind und die Unterschiede zwischen den Gruppen signifikant, waren diese jedoch nicht immer sehr stark ausgeprägt. Dieses kann an verschiedenen Faktoren liegen, welche diese Studie limitieren, und in zukünftigen NEC-Versuchen kontrolliert werden sollten.

Eine Erklärung der Unterschiede könnte die Wahl der Versuchstiere (C57BL/ 6J-Mäuse), welche für die T-Zell-Forschung entwickelt worden sind, sein (Mills et al. 2000). Bei NG ist die primäre Immunantwort, wie bereits beschrieben, durch neutrophile Granulozyten vermittelt (Selders et al. 2017). Tatsächlich ist die Konzentration von Neutrophilen im Menschen fast doppelt so hoch als bei Mäusen (Mestas und Hughes 2004), so dass es durchaus möglich ist, dass NETs in der humanen NEC-Pathogenese eine wesentlich größere Rolle spielen als in der aktuellen Studie gezeigt wurde. Um dieses Problem zu beheben und das NEC-Mausmodell der menschlichen NEC-Pathophysiologie näher zu bringen, wäre eine NEC-Studie, bei welcher eine Neutrophilenproliferation in der Maus induziert würde, wie z.B. durch Gabe von Granulozytenkolonie-stimulierenden Faktor (GCSF - granulocyte-colony stimulating factor), indiziert, da GCSF Injektionen zu einer Steigerung der Granulozytenproduktion im Knochenmark führen (Petit et al. 2002).

Zweitens gilt es zu beachten, dass viele NG, sowie FG, welche an der NEC erkranken, häufig auch an kongenitalen Herzerkrankungen leiden. Auch wenn beide Erkrankungen unabhängig voneinander auftreten können, ist auffällig, dass Kinder mit einem angeborenen Herzfehler ein erhöhtes Risiko für eine NEC-Entwicklung haben (Pickard et al. 2009). Für dieses Phänomen gibt es verschiedene Erklärungsansätze: (1) Zu einem kann die Zirkulation bei Kindern mit angeborenen Herzfehlern, v.a. bei linksventrikuläre Ausflusstraktläsionen und Einzelkammerphysiologien so verändert sein, dass nach Behebung des Problems die Kinder eine intestinale Ischämie/Reperfusionläsion (I/R-Läsion) erleiden, die wiederum ein Risikofaktor für die Entstehung einer NEC ist (Giannone et al. 2008). (2) Weiterhin gilt es zu beachten, dass Patienten mit angeborenen Herzfehlern a.G. der Entwicklung von neuen Operationstechniken zunehmend am Herzen operiert werden. Dieses behebt zwar das ursprüngliche Problem am Herzen, doch führen die Stressoren während der Operation und des kardiopulmonalen Bypasses zu einer Erhöhung der zirkulierenden Endotoxine, sowie proinflammatorischen Zytokine, welche, wie bereits beschrieben, Mediatoren in der NEC-Pathophysiologie sind (Ulate et al. 2017). Das Zusammenspiel dieser beiden

pathophysiologischen Mechanismen kann u.a. synergistisch zur Entstehung der NEC führen: Nach erfolgreicher Therapie der kongenitalen Herzerkrankung und somit Behebung der vorherigen pathologischen Hämodynamik, kommt es zu einer Verbesserung des Blutflusses zum zuvor hypoperfundierten Darmbereichs. Die Änderung der Perfusionsverhältnisse kann daraufhin zur Schädigung des Darmgewebes führen (I/R Läsion) (Caudrillier et al. 2012) und in einer Hyperinflammationsreaktion enden, welche a.G. von (1) Neutrophilenaktivierung (u.a. durch freigesetzte Stressoren während der Operation (Ulate et al. 2017) bzw. als firstline responders nach I/R-Läsion (Yagihashi et al. 1998), (2) Darmunreife und (3) pathologischer intestinaler Flora initiiert wird (Eaton et al. 2016). Dementsprechend ist es durchaus möglich, dass bei Kindern mit angeborenen Herzfehlern, welche im Verlauf eine NEC entwickeln, die Ursache der NEC primär durch die oben genannte Pathophysiologie und der daraus resultierenden I/R-Läsion eine ausschlaggebende Rolle spielt. Da das etablierte NEC-Mausmodell, welches zur NEC-Induktion in dieser Studie verwendet wurde, eine Mischung aus bakterieller NEC mittels LPS sowie I/R Läsion durch Hypoxie verwendet, wäre es daher von Interesse, ein neues NEC-Modell zu entwickeln, in der beide NEC-Risikofaktoren getrennt würden, um daraufhin zu evaluieren, wie neutrophile Granulozyten und NETs sich in beiden Modellen verhalten. Basierend auf den Ergebnissen wäre es daraufhin ggfs. möglich eine gezieltere Therapie mittels z.B. DNase zu verwirklichen.

## 7. Zusammenfassung

Introduction NEC is one of the most devastating diseases affecting premature and mature infants. It is hypothesized that NEC is the result of neutrophils' active role in hyperinflammation after bacterial gut colonization, as they release nuclear DNA and form NETs to combat pathogens. The aim of this study was to evaluate NETs' role in NEC pathogenesis, and to identify markers of NETosis to predict NEC.

Methods NEC was induced in mice by gavage feeding Neocate/LPS, followed by a hypoxia phase q12h for 5 days, starting on day 4 p.p.. The interrelation of NEC and neutrophils, including NETs, was assessed macroscopically, microscopically, and in blood samples. To determine the exact role of NETs in NEC pathogenesis, a PAD-inhibition model was established. Human intestinal samples of diagnostically verified NEC were also analyzed.

Results Our results suggest that the hyperinflammation observed in NEC is a NETs-dependent process, as NEC severity was significantly reduced in mice incapable of forming NETs, and markers for NEC and NETs correlated positively. Further, serum NETosis biomarkers appear to predict NEC in mice. As findings of the mouse NEC model correlate positively with human NEC samples, the hyperinflammation reaction observed in mice could potentially be applied to human NEC pathogenesis.

Einleitung Die NEC ist eine der verheerendsten Erkrankungen von FG, sowie NG. Es wird vermutet, dass die NEC eine Folge von überaktiven Neutrophilen ist, welche eine Hyperinflammation durch Freisetzung nukleärer DNA und Bildung von NETs zur Bekämpfung von Pathogenen nach bakterieller Kolonisation des Darmes verursachen. Ziel dieser Studie war es, die Rolle von NETs in der NEC-Pathogenese zu analysieren, sowie NETose-Marker zu identifizieren, um ein NEC besser zu diagnostizieren.

Methoden Die NEC wurde in Versuchsmäusen durch Schlündeln mit Neocate/LPS, gefolgt von einer Hypoxiephase q12h für 5 Tage (beginnend an Tag 4 p.p.) induziert. Die Korrelation zwischen NEC und Neutrophilen, einschließlich NETs, wurde makroskopisch, mikroskopisch und in Blutproben beurteilt. Um die genaue Rolle von NETs in der NEC-Pathogenese zu bestimmen, wurde ein PAD-Inhibitionsmodell etabliert. Zusätzlich wurden menschliche Darmproben von diagnostisch verifizierten NEC Patienten analysiert.

Ergebnisse Die Ergebnisse zeigen, dass die in der NEC zu beobachtende Hyperinflammation ein NETs-abhängiger Prozess ist, da die NEC-Ausprägung in PAD-inhibierten Mäusen signifikant reduziert war und Marker für NEC sowie NETs positiv korrelierten. Ferner scheinen NETose-Serummarker prädiktiv für NEC in Mäusen zu sein. Da die Ergebnisse des NEC-Mausmodells mit den menschlichen Probenanalysen korrelieren, ist die Hyperinflammationsreaktionstheorie der murinen NEC potentiell auf die Pathogenese der menschlichen NEC anwendbar.

## **8. Erklärung des Eigenanteils**

Die Arbeit wurde im Institut für Kinderchirurgie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter der Betreuung von Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Michael Boettcher durchgeführt. Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Priv.-Doz. Dr. med. Michael Boettcher. Im folgenden Abschnitt möchte ich in zeitlicher Abfolge meinen Anteil an der Arbeit darstellen. Zuerst wurde ein NEC-Mausmodell etabliert, welches auf anderen auswertigen Studien basierte und von Priv.-Doz. Dr. med. Michael Boettcher, Dr. med. Michaela Klinke, und mir durchgeführt wurde. Nach Etablierung wurden auch die weiteren NEC-Induktionen sowie PAD-Inhibierungen zwischen uns aufgeteilt. Die makroskopische Aufarbeitung der Proben sowie NETs Färbung erfolgte primär in Zusammenarbeit durch Dr. med. Michaela Klinke und mir.

Daraufhin wurden sämtliche Versuche, nach Einarbeitung von Frau B. Apple und M. Trochimiuk, wie (1) die Präparation der Gewebeproben für die immunohistologischen Färbungen, sowie die Färbung der Proben an sich, (2) cfDNA, (3) DNase, (4) C5a Nachweis, und (5) Einpflegen der Daten von mir eigenständig durchgeführt.

Die Auswertung, das Verfassen, und die Revisionen der Publikation erfolgte durch mich mit der Unterstützung von Priv.-Doz. Dr. med. Michael Boettcher.

## 9. Literaturverzeichnis

- Bhagirath VC, Dwivedi DJ, Liaw PC (2015) Comparison of the proinflammatory and procoagulant properties of nuclear, mitochondrial, and bacterial DNA. *Shock*. 44(3):265-271.
- Brill A, Fuchs TA, Savchenko AS, Thomas GM, Martinod K, De Meyer SF, Bhandari AA, Wagner DD (2012) Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice. *J Thromb Haemost*. 10(1):136-144.
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 303(5663):1532-1535.
- Camicia G, Pozner R, deLarrañaga G (2014) Neutrophil extracellular traps in sepsis. *Shock*. 42(4):286-294.
- Caplan MS (2008) Neonatal necrotizing enterocolitis. Introduction. *Semin Perinatol*. 32(2):69.
- Caudrillier A, Kessenbrock K, Gilliss BM, Nguyun JX, Marques MB, Monestier M, Toy P, Werb Z, Looney MR (2012) Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion related acute lung injury. *J Clin Invest*. 122(7):2661-2671.
- Chiu CJ, McArdle AH, Brown R, Scott HJ, Gurd FN (1970) Intestinal mucosal lesion in low flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal. *Arch Surg*. 101(4):478-483.
- Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, Patel KD, Chakrabarti S, McAvoy E, Sinclair GD, Keys EM, Allen-Vercoe E, Devinney R, Doig CJ, Green FH, Kubes P (2007) Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med*. 13(4):463-469.
- De Plaen IG (2013) Inflammatory signaling in necrotizing enterocolitis. *Clin Perinatol*. 40(1):109-124.
- Eaton S, Rees CM, Hall NJ (2016) Current research in necrotizing enterocolitis. *Early Hum Dev*. 97:33-39.
- Fadini GP, Menegazzo L, Rigato M, Scattolini V, Poncina N, Bruttocao A, Ciciliot S, Mammano F, Ciobotaru CD, Brocco E, Marescotti MC, Cappellari R, Arrigoni G, Million R, Vigili de Kreutzenberg S, Albiero M, Avogaro A (2016) NETosis delays diabetic wound healing in mice and humans. *Diabetes*. 65(4):1061-1071.
- Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD, Jr., Wroblewski SK, Wakefield TW, Hartwig JH, Wagner DD (2010) Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107(36):15880-15885.
- Fuchs TA, Kremer Hovinga JA, Schatzberg D, Wagner DD, Lämmle B (2012) Circulating DNA and myeloperoxidase indicate disease activity in patients with thrombotic microangiopathies. *Blood*. 120(6):1157-1164.
- Giannone PJ, Luce WA, Nankervis CA, Hoffman TM, Wold LE (2008) Necrotizing enterocolitis in neonates with congenital heart disease. *Life Sci*. 82(7-8):341-347.

- Good M, Sodhi CO, Egan CE, Afrazi A, Jia H, Yamaguchi Y, Lu P, Branca MF, Ma C, Prindle T Jr., Mielo S, Pompa A, Hodzic Z, Ozolek JA, Hackam DJ (2015) Breast milk protects against the development of necrotizing enterocolitis through inhibition of Toll-like receptor 4 in the intestinal epithelium via activation of the epidermal growth factor receptor. *Mucosal Immunol.* 8(5):1166-1179.
- Hayashi F, Means TK, Luster AD (2003) Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood.* 102(7):2660-2669.
- Ilett KF, Paech MJ, Page-Sharp M, Sy SK, Kristensen JH, Goy R, Chua S, Christmas T, Scott KL (2008) Use of a sparse sampling study design to assess transfer of tramadol and its O-desmethyl metabolite into transitional breast milk. *Br J Clin Pharmacol.* 65(5):661-666.
- Jilling T, Simon D, Lu J, Meng FJ, Li D, Schy R, Thomson RB, Soliman A, Arditi M, Caplan MS (2006) The roles of bacteria and TLR4 in rat and murine models of necrotizing enterocolitis. *J Immunol.* 177(5):3273-3282.
- Jiménez-Alcázar M, Kim N, Fuchs TA (2017a) Circulating Extracellular DNA: Cause or Consequence of Thrombosis? *Semin Thromb Hemost.* 43(6):553-561.
- Jiménez-Alcázar M, Rangaswamy C, Panda R, Bitterling J, Simsek YJ, Long AT, Bilyy R, Krenn V, Renné C, Renné T, Kluge S, Panzer U, Mizuta R, Mannherz HG, Kitamura D, Herrmann M, Napirei M, Fuchs TA (2017b) Host DNases prevent vascular occlusion by neutrophil extracellular traps. *Science.* 358(6367):1202-1206.
- Leaphart CL, Cavallo J, Gribar SC, Cetin S, Li J, Branca MF, Dubowski TD, Sodhi CP, Hackam DJ (2007) A critical role for TLR4 in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis by modulating intestinal injury and repair. *J Immunol.* 179(7):4808-4820.
- Li P, Li M, Lindberg MR, Kennett MJ, Xiong N, Wang Y (2010) PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J Exp Med.* 207(9):1853-1862.
- Lin PW, Stoll BJ (2006) Necrotising enterocolitis. *Lancet.* 368(9543):1271-1283.
- MacQueen BC, Christensen RD, Yost CC, Lambert DK, Baer VL, Sheffield MJ, Gordon PV, Cody MJ, Gerday E, Schlaberg R, Lowe J, Shepherd JG (2016) Elevated fecal calprotectin levels during necrotizing enterocolitis are associated with activated neutrophils extruding neutrophil extracellular traps. *J Perinatol.* 36(10):862-869.
- Manda A, Pruchniak MP, Arażna M, Demkow UA (2014) Neutrophil extracellular traps in physiology and pathology. *Cent Eur J Immunol.* 39(1):116-121.
- McElhinney DB, Hedrick HL, Bush DM, Pereira GR, Stafford PW, Gaynor JW, Spray TL, Wernovsky G (2000) Necrotizing Enterocolitis in Neonates with Congenital Heart Disease: Risk Factors and Outcomes. *Pediatrics.* 106(5):1080-1087.
- Mestas J, Hughes CC (2004) Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol.* 172(5):2731-2738.
- Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM (2000) M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol.* 164(12):6166-6173.

- Nanthakumar NN, Fusunyan RD, Sanderson I, Walker WA (2000) Inflammation in the developing human intestine: A possible pathophysiologic contribution to necrotizing enterocolitis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(11):6043-6048.
- Nauseef WM, Borregaard N (2014) Neutrophils at work. *Nat Immunol.* 15(7):602-611.
- Nguyen DN, Stensballe A, Lai JC, Jiang P, Brunse A, Li Y, Sun J, Mallard C, Skeath T, Embleton ND, Berrington JE, Sangild PT (2017) Elevated levels of circulating cell-free DNA and neutrophil proteins are associated with neonatal sepsis and necrotizing enterocolitis in immature mice, pigs and infants. *Innate Immun.* 23(6):524-536.
- Papayannopoulos V (2018) Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol.* 18(2):134-147.
- Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A (2010) Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J C Biol.* 191(3):677-691.
- Petit I, Szyper-Kravitz M, Nagler A, Lahav M, Peled A, Habler L, Ponomaryov T, Taichman RS, Arenzana-Seisdedos F, Fujii N, Sandbank J, Zipori D, Lapidot T (2002) G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat Immunol.* 3(7):687-794.
- Pickard SS, Feinstein JA, Popat RA, Huang L, Dutta S (2009) Short- and long-term outcomes of necrotizing enterocolitis in infants with congenital heart disease. *Pediatrics.* 123(5):e901–e906.
- Saffarzadeh M, Juenemann C, Queisser MA, Lochnit G, Barreto G, Galuska SP, Lohmeyer J, Preissner KT (2012) Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. *PLoS One.* 7(2):e32366.
- Selders GS, Fetz AE, Radic MZ, Bowlin GL (2017) An overview of the role of neutrophils in innate immunity, inflammation and host-biomaterial integration. *Regen Biomater.* 4(1):55-68.
- Tanaka K, Koike Y, Shimura T, Okigami M, Ide S, Toiyama Y, Okugawa Y, Inoue Y, Araki T, Uchida K, Mohri Y, Mizoguchi A, Kusunoki M (2014) In vivo characterization of neutrophil extracellular traps in various organs of a murine sepsis model. *PLoS One.* 9(11):e111888.
- Tayman C, Tonbul A, Kahveci H, Uysal S, Koseoglu B, Tatli MM, Dilmen U (2011) C5a, a complement activation product, is a useful marker in predicting the severity of necrotizing enterocolitis. *Tohoko J Exp Med.* 224(2):143-150.
- Ulate KP, Yanay O, Jeffries H, Baden H, Di Gennaro JL, Zimmerman J (2017) An elevated low cardiac output syndrome score is associated with morbidity in infants after congenital heart surgery. *Pediatr Crit Care Med.* 18(1):26–33.
- Wang H, Wang C, Zhao MH, Chen M (2015) Neutrophil extracellular traps can activate alternative complement pathways. *Clin Exp Immunol.* 181(3):518-527.
- Xu J, Zhang X, Monestier M, Esmon NL, Esmon CT (2011) Extracellular histones are mediators of death through TLR2 and TLR4 in mouse fatal liver injury. *J Immunol.* 187(5):2626-2631.

- Yagihashi A, Tsuruma T, Tarumi K, Kameshima T, Yajima T, Yanai Y, Watanabe N, Hirata K (1998) Prevention of small intestinal ischemia-reperfusion injury in rat by anti-cytokine-induced neutrophil chemoattractant monoclonal antibody. *J Surgical Res.* 78(2):92-96.
- Yuen J, Pluthero FG, Douda DN, Riedl M, Cherry A, Ulanova M, Kahr WH, Palaniyar N, Licht C (2016) NETosing neutrophils activate complement both on their own NETs and bacteria via alternative and non-alternative pathways. *Front Immunol.* 7:137.
- Zani A, Zani-Ruttenstock E, Peyvandi F, Lee C, Li B, Pierro A (2016) A spectrum of intestinal injury models in neonatal mice. *Pediatr Surg Int.* 32(1):65-70.
- Zitvogel L, Kepp O, Kroemer G (2010) Decoding cell death signals in inflammation and immunity. *Cell.* 140(6):798-804.

## 10. Abbildungsverzeichnis

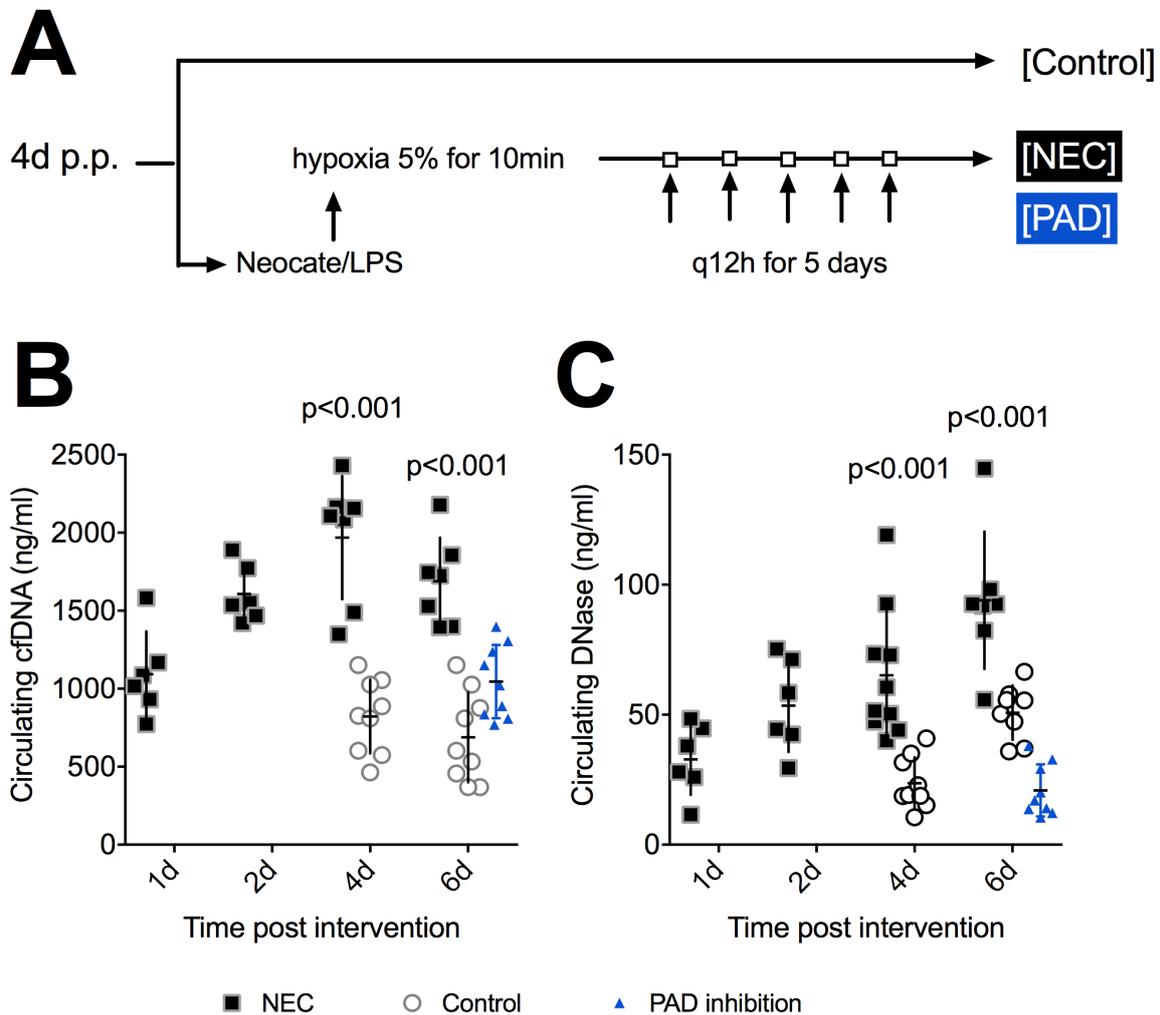


Abb. 1: Studiendesign und Biomarker Ergebnisse für die nekrotisierende Enterokolitis (NEC). (A) Mäuse in der NEC-Gruppe wurden fünf Tage zweimal täglich mit einer Mischung aus Neocate/Lipopolysaccharid geschlündelt und einer zehnmütigen Hypoxieperiode (5% Sauerstoff) ausgesetzt. Mit dieser Induktion wurde am vierten Tag nach der Geburt (p.p.) begonnen. Alle Tiere wurden spätestens an Tag zehn p.p. euthanasiert. (B) Zellfreie DNA (cfDNA) ist ein Marker für NETose, und war in der NEC-Gruppe, je länger die Induktionszeit, im Vergleich zu Kontrollen signifikant erhöht. Eine Protein-Arginin-Deiminase (PAD)-Hemmung (blau) führte in NEC-Tieren, im Vergleich zu unbehandelten Tieren, zu deutlich niedrigeren cfDNA-Werten. (C) Die DNase-Konzentration der NEC-Tiere zeigte einen nahezu linear signifikanten Anstieg. Tiere der NEC-Gruppe hatten signifikant höhere Konzentrationen im Vergleich zu Kontrollen und PAD-inhibierten Mäusen (blau). Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SD dargestellt. Statistik: Mann-Whitney-Test und ANOVA.

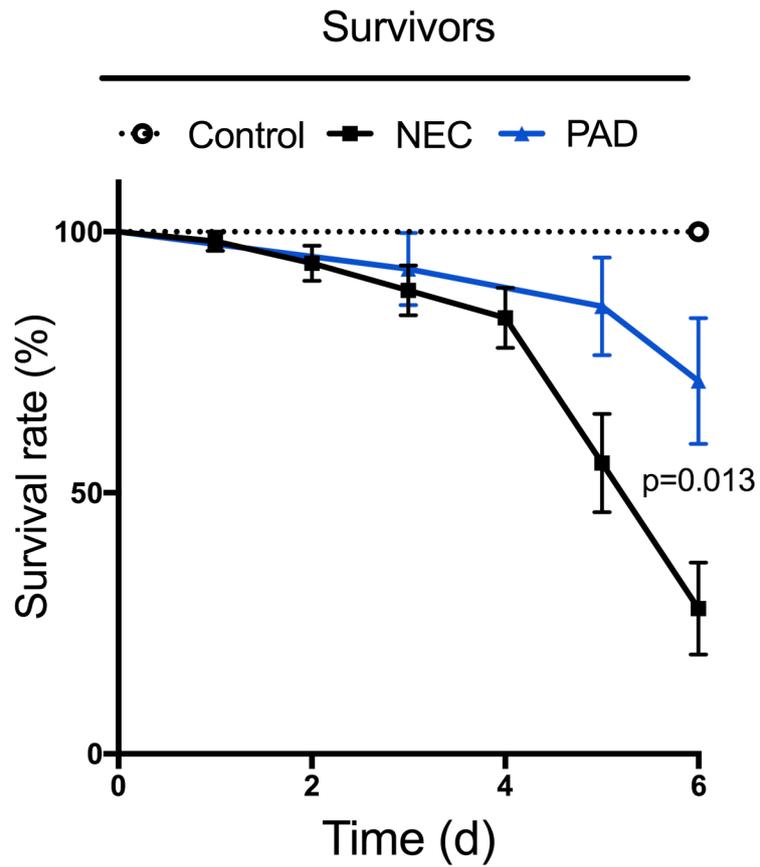


Abb. 2. Überlebensraten der Versuchstiere. Weniger als 30% der Tiere in der Interventionsgruppe überlebten bis zu ihrem Euthanasiezeitpunkt. Tiere mit PAD-Hemmung (blau) wurden demselben NEC-Induktionsprotokoll unterzogen, hatten jedoch im Vergleich zu Tieren in der NEC-Gruppe eine signifikant verringerte Mortalitätsrate ( $p = 0,013$ ). Statistik: Wilcoxon-Test.

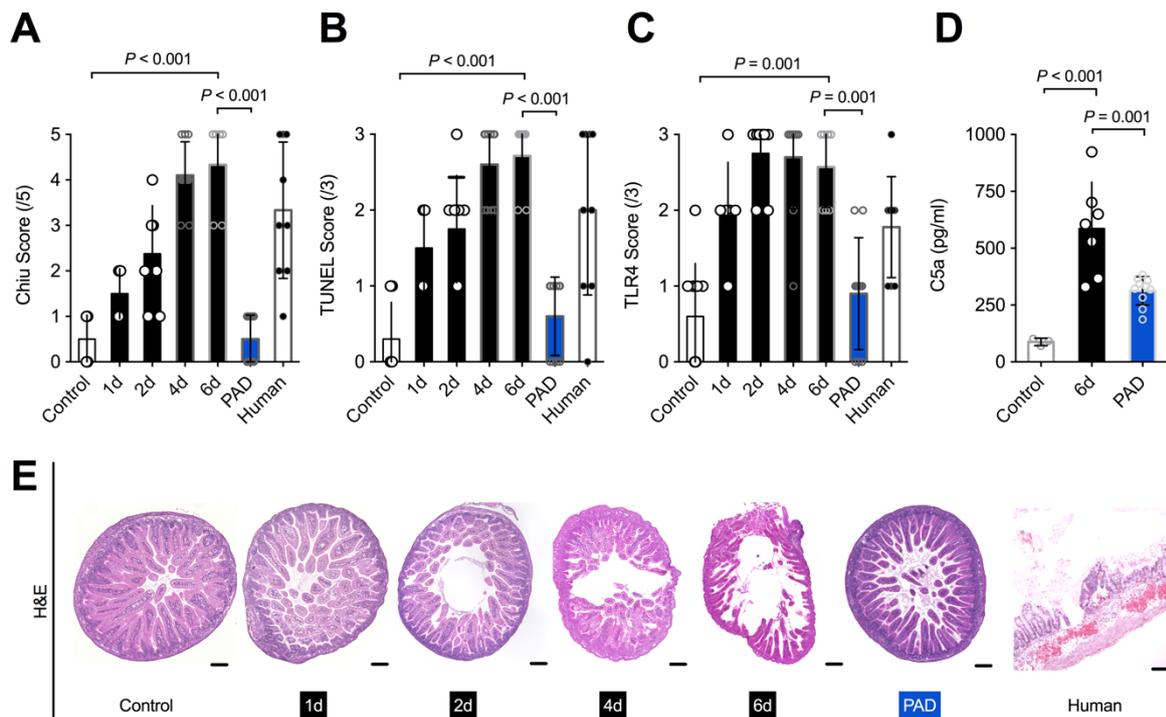


Abb. 3. PAD-Hemmung reduziert Gewebeschäden und Apoptose. (A, E) Mit Hilfe des Chiu Scores wurde die Darmschädigung evaluiert, welche einen signifikanten Anstieg mit längerer NEC-Induktionszeit aufzeigte. PAD-inhibierte Mäuse waren vor dieser Schädigung weitgehend geschützt (blau). (B) Die Apoptoserate wurde mittels eines TUNEL-Assays bewertet. Tiere in der NEC-Gruppe hatten signifikant erhöhte Apoptosewerte, während Tiere mit PAD-Hemmung (blau) signifikant niedrigere TUNEL-Werte aufzeigten. (C, F) Toll-like Rezeptor 4 Expression stieg mit längerer NEC-Induktionszeit, im Vergleich zu Kontrolltieren, an. PAD-Hemmung (blau) verhinderte diesen Effekt. (E) Die Komplementaktivierung wurde über einen Komplementkomponenten-5a-Assay (C5a) bewertet, der nach NEC-Induktion innerhalb der NEC-Gruppe eine linear signifikante Konzentrationserhöhung widerspiegelte. Ein C5a Anstieg wurde durch PAD-Hemmung (blau) verhindert. Gesamtzahl der Probanden: Kontrollen n = 10, 1d NEC n = 6, 2d NEC n = 8, 4d NEC n = 10, 6d NEC n = 7, PAD-Hemmung n = 10, Menschen n = 9. Statistik: Mann-Whitney-Test und ANOVA.

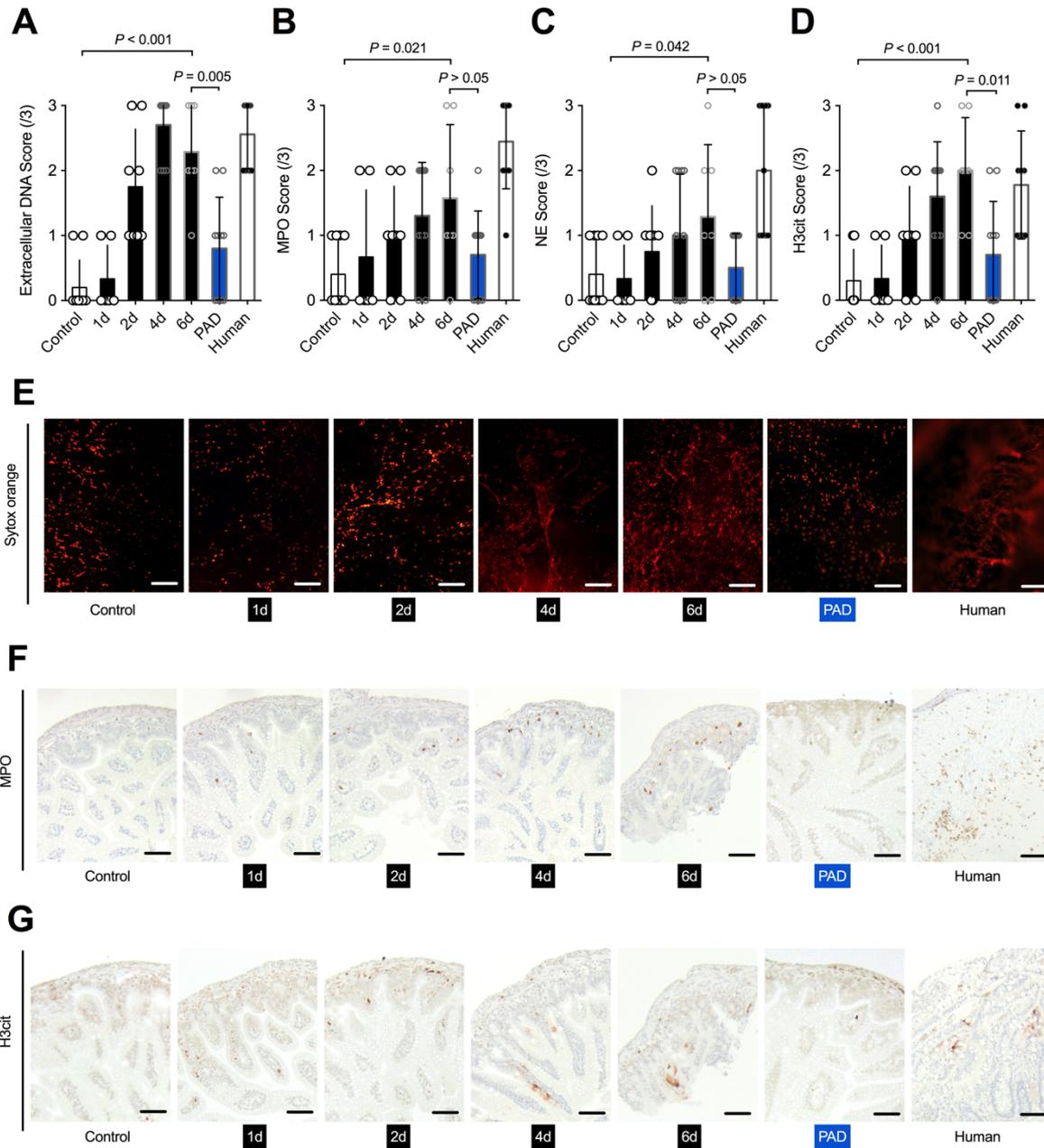


Abb. 4. NEC induziert eine Neutrophilenaktivierung und möglicherweise neutrophile extrazelluläre Fallen (NET) Bildung. (A, E) Die Quantifizierung von extrazellulärer DNA, einschließlich NETs, wurde durch SYTOX Orange-Färbung veranschaulicht. NEC-Tiere zeigten einen relevanten Anstieg des NETs Färbeverhaltens, der in Abwesenheit von PAD (blau) signifikant verringert war. Menschen mit NEC demonstrierten ein, den NEC-Tieren, ähnliches Färbeverhalten. (B, C, F) Neutrophile Elastase (NE) und Myeloperoxidase (MPO), beides Marker der Neutrophilenaktivierung, nahmen bei NEC-Tieren mit zunehmender NEC-Induktionszeit, im Vergleich zu Kontrollen, zu und waren bei Tieren mit PAD-Hemmung (blau) reduziert. (D, G) Der NETs-Marker citrulliniertes Histon H3 (H3cit) zeigte bei Tieren, sowie bei Menschen, mit NEC einen Anstieg. Dieser Marker war in der PAD-Inhibierungsgruppe (blau)

signifikant reduziert, wobei die H3cit-Spiegel bei Tieren mit PAD-Inhibierung den Werten der Kontrolltiere ähnelte ( $p = 0,075$ ). Gesamtzahl der Probanden: Kontrollen  $n = 10$ , 1d NEC  $n = 6$ , 2d NEC  $n = 8$ , 4d NEC  $n = 10$ , 6d NEC  $n = 7$ , PAD-Hemmung  $n = 10$ , Menschen  $n = 9$ . Statistik: Mann-Whitney-Test und ANOVA.

## 11. Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei Priv.-Doz. Dr. med. Michael Boettcher, leitender Oberarzt und Lehrbeauftragter der Klinik und Poliklinik für Kinderchirurgie der Universität Hamburg bedanken, unter dessen Leitung mir die Möglichkeit gegeben wurde diese Arbeit durchzuführen und zu verfassen. Vor allem möchte ich mich bei Ihm für die interessante Themastellung und herausragende Betreuung bedanken – vielen Dank für die fortwährende Hilfsbereitschaft während der Datenerhebung und beim Verfassen der Publikation.

Mein Dank gilt weiterhin folgenden Personen: Magdalena Trochimiuk und Birgit Appl, die mich während der Bearbeitung meiner Dissertation mit allerlei Tipps und Tricks im Labor unterstützt haben. In diesem Sinne danke ich auch Kristin Hartmann, der Mauspathologie Facility des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, bei der histologischen Verarbeitung der Präparate. Besonderen Dank auch an Miquel Jiménez Alcázar für die Hilfe in der cfDNA und DNase Analyse und Auswertung und an Dr. rer. Nat. Georg Eschenburg für die Einarbeitung im Labor.

Für die freundschaftliche Atmosphäre im Labor und im Tierstall möchte ich mich zudem auch bei der gesamten Arbeitsgruppe bedanken. Die ständigen Anregungen und Hilfsbereitschaft haben zum Gelingen meiner Doktorarbeit beigetragen.

Bei Dr. med. Michaela Klinke, meiner Mitstreiterin, möchte ich mich auch vom ganzen Herzen bedanken. Ohne dein Lachen, deine Motivation – auch kurz vor Weihnachten, - viele Nachrichten, und unsere gegenseitige Unterstützung wäre diese Doktorarbeit nicht so genial gewesen.

Zu guter Letzt, noch einen Dank an Mark Butler, meine Eltern, meinen Bruder, und Freunde. Thank you, Mark, for your continuous support in the laboratory, with medical school in general, as well as reading about NEC for the millionth time – I know it can be exhausting. I would have not been able to do it without you! Liebsten Dank auch an meinen Bruder, Philip Krück und meine Freundin Christine von Schalburg, für das Korrekturlesen meines deutschen Manuskriptes. Vielen Dank an meine Eltern, die Vincent-Krücks, the Jones', and the Butler's, die immer an mich glauben, mich durch mehr als zehn Jahre Uni-Karriere unterstützen, und für mich da sind.

...and long may your big jib draw.

## **12. Lebenslauf**

Der Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

## **13. Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: 