

Abstract

Acute kidney injury (AKI) caused by ischemia-reperfusion injury (IRI) is a major clinical condition characterized by a rapid loss of renal function and high mortality. Reactive oxygen species (ROS)-induced damage represents a central driver of the pathogenic cascades underlying IRI. Despite extensive efforts to elucidate the molecular mechanisms involved, effective therapeutic or preventive strategies remain unavailable. This study investigates the therapeutic potential of the mitochondrial protease CLPP in renal IRI through a combination of cell culture systems, a CLPP-deficient mouse model, and studies involving experimental AKI induction in CLPP knockout (KO) mice.

In vitro analyses revealed that loss of CLPP alters the regulation of genome maintenance and oxidative stress defense under hypoxic conditions. Notably, CLPP deficiency appeared to confer partial protection against ferroptotic cell death in renal cell models. Mechanistically, the pronounced accumulation of free complex I (CI) N-module subunits under hypoxia highlighted how additional mitochondrial stress can further exacerbate CI instability leading to accumulation of free N-module in the absence of CLPP.

At the tissue level, CLPP ablation in the kidney lead to characteristic substrate accumulation, robust activation of the integrated stress response (ISR), and selective disturbances in mitochondrial protein complex stability consistent with other CLPP-deficient tissues. As opposed to more pronounced effects seen in heart and brown adipose tissue, mitochondrial dysfunction remained comparatively mild in CLPP-deficient kidney. Notably, CLPP loss appeared to confer a compensatory reduction in pathological ROS production, particularly under conditions of oxidative stress, thereby revealing a potential therapeutic angle for targeting CLPP in ROS-driven diseases. We identified a sex- and genotype-specific protective effect of CLPP deletion in renal IRI. CLPP deficiency conferred renal protection specifically in female animals through reduced upstream ROS burden and enhanced NRF2-dependent antioxidant buffering, representing a preconditioning effect rather than an adaptive response. Impaired innate immune activation and fibrinolysis was also observed amongst females. Given that complement activation and fibrin deposition are major drivers of tubular injury and maladaptive repair following IRI, we rationalized that disruption of these pathways in CLPP-deficient females contributed directly to improved histological and functional outcomes. Indeed, reprogrammed mitochondrial-to-nuclear stress signaling preferentially engaged NRF2-dependent cytoprotective networks in females, resulting in diminished ROS-induced injury and reduced immune activation. Our data indicate that IRI resistance is attributed to NRF2-mediated upregulation of glutathione S-transferase alpha 4

(GSTA4), potentially leading to reduced lipid peroxidation and ferroptosis in a tissue-specific manner.

Collectively, our findings demonstrate that CLPP deficiency elicits a sex-biased, stress-adaptive protective response that limits mitochondrial ROS-driven injury. This work identifies CLPP as a promising therapeutic target in AKI and related oxidative pathologies and provides a mechanistic framework linking altered ferroptosis susceptibility and enhanced NRF2–GSTA4–dependent detoxification pathways together with impaired immune responses to improved IRI outcomes in female CLPP KO mice.

Zusammenfassung

Akutes Nierenversagen (AKI) in Folge einer Ischämie-Reperfusionsschädigung (IRI) ist eine schwerwiegende klinische Erkrankung. Sie ist durch einen raschen Verlust der Nierenfunktion und eine hohe Mortalität gekennzeichnet. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind der Haupttreiber der pathogenen Schäden, die der IRI zugrunde liegen. Trotz umfangreicher Bemühungen, die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen aufzuklären, gibt es nach wie vor keine wirksamen therapeutischen oder präventiven Strategien. Diese Studie untersucht das therapeutische Potenzial der mitochondrialen Protease CLPP bei renaler IRI durch eine Kombination aus Zellkultursystemen, einem CLPP-defizienten Mausmodell und Studien zur experimentellen AKI-Induktion in diesem.

In-vitro-Analysen zeigten, dass der Verlust von CLPP die Regulation der Genomaufrechterhaltung und der Abwehr von oxidativem Stress unter hypoxischen Bedingungen verändert. Bemerkenswert ist, dass CLPP-Deletion einen teilweisen Schutz vor ferroptotischem Zelltod in Nierenzellmodellen bietet. Mechanistisch gesehen unterstreicht die ausgeprägte Anreicherung freier Komplex-I-N-Modul-Untereinheiten unter Hypoxie, wie mitochondrialer Stress die Instabilität des Komplexes I verschlimmert. Der verstärkte Versuch der Zellen, beschädigte Komponenten des Komplexes I zu ersetzen, führt zur Anreicherung von freiem N-Modul, wenn CLPP nicht vorhanden ist.

Auf Gewebeebene führt die CLPP-Ablation in der Niere zu einer charakteristischen Substratakkumulation, einer robusten Aktivierung der integrierten Stressreaktion (ISR) und selektiven Störungen der Stabilität der mitochondrialen Atmungskette, die mit anderen CLPP-defizienten Geweben übereinstimmen. Die mitochondriale Dysfunktion bleibt jedoch in der Niere vergleichsweise mild im Vergleich zu den ausgeprägteren Effekten, die im Herzen und im braunen Fettgewebe zu beobachten sind. Der Verlust von CLPP führt zu einer kompensatorischen Verringerung der pathologischen ROS-Produktion, insbesondere unter erhöhtem oxidativem Stress, was einen potenziellen therapeutischen Ansatz für die gezielte Behandlung von ROS-bedingten Erkrankungen durch CLPP bietet.

Tatsächlich identifizieren unsere Ergebnisse eine geschlechts- und genotypspezifische Schutzwirkung der CLPP-Deletion bei renaler IRI. Der CLPP-Verlust bewirkte eine Nierenschutzwirkung speziell bei weiblichen Tieren durch eine verringerte ROS-Belastung und eine verstärkte NRF2-abhängige antioxidative Pufferung, was eher einen Präkonditionierungseffekt als eine adaptive Reaktion darstellt. Zusätzlich trugen eine beeinträchtigte Aktivierung des angeborenen Immunsystems und eine verminderte Fibrinolyse zum Phänotyp bei. Angesichts der Tatsache, dass die Komplementaktivierung und die

Fibrinablagerung die Hauptursachen für tubuläre Schäden und maladaptive Reparatur nach IRI sind, trugen die abgeschwächte Immunaktivierung und die oxidative Modifikation dieser Signalwege bei CLPP-defizienten Weibchen wahrscheinlich direkt zu ihren verbesserten histologischen und funktionellen Ergebnissen bei. Die scheinbar umprogrammierte Stresssignalübertragung von den Mitochondrien zum Zellkern aktivierte bei Weibchen bevorzugt NRF2-abhängige zytoprotektive Netzwerke, was zu einer Verringerung der ROS-induzierten Schädigung und einer verminderten Immunaktivierung führte. Mechanistisch gesehen deuten unsere Daten darauf hin, dass die Resistenz gegen IRI auf die NRF2-vermittelte Hochregulation von Glutathion-S-Transferase Alpha 4 (GSTA4) zurückzuführen ist, die möglicherweise zu einer verringerten Lipidperoxidation und Ferroptose führt. Diese Schutzwirkung schien teilweise gewebespezifisch zu sein.

Insgesamt zeigen unsere Ergebnisse, dass ein CLPP-Mangel eine geschlechtsspezifische schützende Stressadaptionsreaktion auslöst, die die durch mitochondriale ROS verursachten Schäden begrenzt. Diese Arbeit identifiziert CLPP als vielversprechendes therapeutisches Ziel bei AKI und verwandten oxidativen Pathologien und liefert einen mechanistischen Rahmen, der die veränderte Ferroptose-Anfälligkeit und die verstärkten NRF2-GSTA4-abhängigen Entgiftungswege zusammen mit beeinträchtigten Immunantworten mit verbesserten IRI-Ergebnissen bei weiblichen CLPP-KO-Mäusen in Verbindung bringt.