

Molecular mechanisms regulating organ development in neonatal hyperoxia-induced injury

ZUSAMMENFASSUNG

Frühgeburtlichkeit ist aufgrund der unvollständigen Organentwicklung ein wesentlicher Risikofaktor für Krankheiten im späteren Leben. Insbesondere die Lungenunreife ist von großer klinischer Relevanz. Die mechanische Beatmung und Gabe von erhöhten Sauerstoffkonzentrationen sind zwar lebensrettende Maßnahmen bei Frühgeborenen, haben aber eine akute Schädigung von Organen wie Lunge und Nieren zur Folge. Wir haben den Effekt erhöhter Sauerstoffkonzentrationen in zwei Modellen der Hyperoxie-induzierten Organschädigung untersucht:

I) **HINTERGRUND:** Es gibt zunehmende Evidenz, dass Frühgeburtlichkeit und oxidativer Stress Risikofaktoren für chronische Nierenerkrankungen im späteren Leben sind. Da die Nierenentwicklung bei Frühgeborenen nicht abgeschlossen ist, sind die Nieren unreif und anfällig für eine Hyperoxie-induzierte Schädigung durch erhöhte Sauerstoffkonzentrationen. Verschiedene Publikationen weisen auf eine Störung der Nierenfunktion nach Hyperoxie hin, welche mit Fibrose und Entzündung assoziiert wurde. Daher haben wir strukturelle und funktionelle Veränderungen sowie molekulare Mechanismen infolge prolongierter Sauerstoffexposition neugeborener Mäuse analysiert und untersucht, ob diese Effekte Interleukin-6(IL-6)-abhängig sind.

METHODEN: Neugeborene Wildtyp(WT)- sowie IL-6^{-/-}-Mäuse wurden bis zum postnatalen Tag (P) 28 unter Hyperoxie (85% O₂) gehalten und dann bis P70 in die Normoxie (21% O₂) überführt. Die Kontroll-Gruppe wurde über den gesamten Zeitraum unter Raumluft gehalten.

ERGEBNISSE: Bei WT-Mäusen konnten wir eine *frühe „akute Schädigungsphase“* definieren, die mit einem verringerten Wachstum der Nierenrinde und einer verminderten tubulären Proliferation an P28 einherging. Auf molekularer Ebene konnten wir eine Aktivierung der IL-6/Stat3- und TGF-β/Smad2-Signalwege nachweisen, was an einen Anstieg von Entzündungsmarkern und einer Dysregulation der mitochondrialen Biogenese gekoppelt war. An P70 konnten wir eine *späte „regenerative Phase“* determinieren, die im Vergleich zur Kontroll-Gruppe in

WT-Mäusen durch tubuläre Proliferation und eine Beeinträchtigung der glomerulären und tubulären Funktion gekennzeichnet war. Interessanterweise, waren IL-6^{-/-}-Mäuse vor Hyperoxie-induzierten strukturellen und teilweise funktionellen sowie molekularen Veränderungen aufgrund der fehlenden Aktivierung der Stat3/Smad2-Signalkaskade und mitochondrialen Störung geschützt.

FAZIT: Diese Studie zeigt, dass Hyperoxie eine Schädigung der Niere induziert und diese über eine neue IL-6-Smad2-Achse vermittelt wird. Ein Verlust von IL-6 hat einen protektiven Effekt während der Nephrogenese bei neonataler Sauerstoffexposition und könnte damit als potenzieller Ansatz für künftige therapeutische Studien zur Behandlung von chronischen Nierenerkrankungen von Frühgeborenen dienen.

- II) HINTERGRUND: Bronchopulmonale Dysplasie ist eine chronische Lungenerkrankung Frühgeborener, die sich durch eine verminderte Alveolarisation und Regeneration nach neonataler Hyperoxie auszeichnet. Krüppel-like Faktor 4 (Klf4) ist ein Transkriptionsfaktor, der das Überleben und die Differenzierung von Zellen reguliert und bereits mit vermindertem Lungenwachstums assoziiert wurde. Da Alveolarepithelzellen Typ II (ATII) Vorläuferzellen der Alveolen sind und eine wichtige Rolle bei der Lungenregeneration spielen, haben wir die Auswirkung von Hyperoxie auf die Klf4 Expression und die ATII-Zellhomöostase in Lungen neugeborener Mäusen analysiert. Außerdem haben wir den Effekt von Hyperoxie, sowie die funktionelle Rolle von Klf4 in der ATII-Zellhomöostase *in vivo* und auf molekularer Ebene *in vitro* untersucht.

METHODEN: Neugeborene WT Mäuse wurden 28 Tage lang 85% O₂ oder Raumluft ausgesetzt. Mäuse mit ATII Zell-spezifischer Ablation von Klf4 wurden während der späten Lungenentwicklung an P21 untersucht. *In vitro* wurde in murinen ATII Zellen (MLE-12) eine Überexpression (Klf4^{OE}) und Deletion von Klf4 (Klf4^{del}) mittels Doxycyclin-induzierbaren *Sleeping Beauty*-Transposonsystem bzw. CRISPR/Cas9-Technik induziert. Anschließend wurden die Zellen unter Hyperoxie oder Normoxie inkubiert.

ERGEBNISSE: (1) Klf4 wird während der Organogenese der Lunge in einem spatio-temporalen Muster und insbesondere während der Alveolarisation, einem kritischen Zeitfenster der Lungenentwicklung, exprimiert. Durch Co-Lokalisation mit Aquaporin 5 (AQ5) und Surfactant Protein C (SP-C) als Marker für ATI bzw. ATII Zellen konnte gezeigt werden, dass Klf4 während der postnatalen Lungenentwicklung

in alveolären Epithelzellen lokalisiert ist. Ein vermindertes Lungenwachstums nach Hyperoxie war mit einer verminderten Klf4 mRNA und Proteinexpression assoziiert, was wiederum mit einem Verlust von AQP5 sowie SP-C Protein einherging. (2) In MLE-12 Zellen war die Gen- und Proteinexpression von Klf4 nach Inkubation unter hyperoxischen Bedingungen reduziert und die Zellviabilität vermindert. Außerdem führte sowohl Überexpression als auch Ablation von Klf4 zu einem verringerten Zellüberleben. Während der Epithelzellmarker E-Cadherin in Klf4^{del} vermindert war, war die Proteinexpression von E-Cadherin in Klf4^{OE} Zellen erhöht. Mechanistisch konnten wir zeigen, dass Klf4^{OE} die Stat3 Signalkaskade blockiert und den Smad2-Signalweg aktiviert; umgekehrt induzierte Klf4^{del} die Aktivierung von Stat3 und inhibierte die Smad2-Aktivität. Darüber hinaus führte die Inhibition von Smad2 in Klf4^{OE} zu einer Aktivierung von Stat3 und die Stimulierung mit TGF- β in Klf4^{del} Zellen zu einer erhöhten Aktivität von Stat3. Abschließend konnten wir zeigen, dass eine ATII Zell-spezifische Deletion von Klf4 *in vivo* in einer verminderten Anzahl von ATII Zellen resultiert und dass Klf4 somit eine bedeutende Rolle in der ATII-Zellhomöostase während der späten Lungenentwicklung spielt.

FAZIT: Wir haben eine neue Klf4-Stat3-Smad2-Achse in der ATII-Zellhomöostase identifiziert, die in ATII-Zellen und in der Lunge neugeborener Mäuse aufgrund von Sauerstoffgabe dysreguliert ist. Klf4 scheint eine wichtige Rolle in der Regeneration der Lunge nach Sauerstoff-induzierter Schädigung zu spielen.

SUMMARY

Prematurity is linked to incomplete organ development and the pathogenesis of diseases. Mechanical ventilation with supplemental oxygen is a life-saving treatment of premature infants but associated with multiple harmful effects in different organ systems, among others lung and kidneys. We investigated the effect of increased oxygen concentrations in two models of hyperoxia-induced organ injury:

I) **RATIONALE:** Previous studies have linked prematurity to chronic kidney disease (CKD) in later life. Since nephrogenesis is not completed in preterm neonates, kidneys are immature and the susceptibility to hyperoxia-induced injury after mechanical ventilation with supplemental oxygen concentrations might be increased. Since various studies indicate kidney impairment after hyperoxia and suggest a pivotal role of fibrosis and inflammation, we analyzed structural as well as functional impacts, defined molecular mechanisms of neonatal hyperoxia exposure on renal injury and investigated whether these effects are Interleukin-6(IL-6)-dependent.

METHODS: Newborn wildtype (WT) and IL-6^{-/-} mice were exposed to 85% O₂ for 28 days and then maintained in room air until postnatal day P (P) 70. Control mice were kept in room air throughout life.

RESULTS: In WT mice, we defined an *early “acute injury phase”*, which was associated with reduced renal cortical growth and a decreased tubular proliferation at P28. On a molecular level, we observed an activation of IL-6/Stat3 and TGF-β/Smad2 signaling pathways that was linked to an increase of inflammatory markers and dysregulation of mitochondrial biogenesis. At P70, we determined a *late “regenerative phase”*, which was characterized by tubular proliferation and impaired glomerular and tubular function compared to the controls in WT mice. Interestingly, IL-6^{-/-} mice were protected from hyperoxia-induced structural, partially functional and molecular changes due to abrogation of Stat3/Smad2 signaling activation and mitochondrial disruption.

CONCLUSION: This study provides evidence that hyperoxia exposure is linked to renal injury and mediated *via* a novel IL-6-Smad2 axis. IL-6 deficiency has a beneficial effect on nephrogenesis after neonatal hyperoxia and could serve as a potential target for future therapeutic studies to treat and ameliorate CKD.