

# 1. Zusammenfassung / Summary

## 1.1. Der Verlust von IL-6 schützt die Alveolarepithelzelle Typ II und ermöglicht das Lungenwachstum bei neugeborenen Mäusen nach Hyperoxie

**Hintergrund:** Frühgeborene, die erhöhtem Sauerstoff (O<sub>2</sub>) ausgesetzt sind, entwickeln häufig eine bronchopulmonale Dysplasie (BPD). Es ist bekannt, dass Entzündungsprozesse wesentlich zur Pathogenese der BPD beitragen; Studien am Menschen zeigen, dass Interleukin-6 (IL-6) in der Lunge von Säuglingen, die eine BPD entwickeln, erhöht ist. Da IL-6 Inflammation und Zellhomöostase reguliert, haben wir die Hypothese untersucht, dass die Aktivierung der IL-6-Signalkaskade nach Hyperoxie (HYX) zu den strukturellen und funktionellen Veränderungen in der Lunge neugeborener Mäusen führt; ein IL-6-Mangel hingegen schütze und ermögliche das Lungenwachstum bei neugeborenen Mäusen unter HYX.

**Methoden:** Die funktionelle Rolle des IL-6-Signalwegs in der HYX-induzierten neonatalen Lungenerkrankung als Modell der BPD wurde in C57Bl/6N sowie in IL-6-defizienten Mäusen (*Il6<sup>-/-</sup>*) und deren Wildtyp-Kontrollen (WT) untersucht. Neugeborene Mäuse wurden entweder 85% O<sub>2</sub> (Hyperoxie, HYX) oder 21% O<sub>2</sub> (Normoxie, NOX) vom postnatalen Tag 1 (P1) bis P28 ausgesetzt. Lungenfunktionsanalysen wurden an P28 durchgeführt; am Ende der Experimente wurden die Lungen exzidiert und eingefroren; einige Lungen wurden mit Paraformaldehyd druckfixiert und für quantitative Histomorphometrie in Paraffin eingebettet.

**Ergebnisse:** (1) 85% O<sub>2</sub> induzierte eine Entzündung, die mit einer ausgeprägten Aktivierung des IL-6-STAT3-SOCS3-Signalwegs in den Lungen der neugeborenen Mäuse assoziiert war und zu einer beeinträchtigten Alveolarisierung und einer verminderten dynamischen Lungen-Compliance führte. (2) Quantitative histomorphometrische Analysen der Lungen zeigten eine reduzierte Alveolenzahl und mikrovaskuläre Bildung in den Lungen nach HYX. Im Gegensatz dazu waren neonatale *Il6<sup>-/-</sup>* Mäuse signifikant vor diesen Veränderungen geschützt. (3) Darüber hinaus wies die Beurteilung der elastischen Fasern auf, dass der IL-6-Mangel die Proliferation der Myofibroblasten reduzierte und die gestörte Ablagerung elastischer Fasern in den Alveolen verringerte. (4) Weitere Analysen zeigten, dass *Il6<sup>-/-</sup>* Mäuse vor Apoptose der Alveolarepithelzelle Typ II (ATII) geschützt waren und eine erhöhte Expression von Surfactant-Proteinen aufwiesen. (5) Diese Befunde nach HYX standen im Zusammenhang mit einer reduzierten Klf4 Expression in Makrophagen und einer M1-ähnlichen (pro-inflammatorischen) Aktivierung.

**Schlussfolgerung:** Unsere Studie zeigt, dass eine gezielte Beeinflussung der IL-6-Signalkaskade das Überleben und die Funktion von ATII schützt und das Lungenwachstum in

neugeborenen Mäusen unter HYX ermöglichen könnte. Diese Ergebnisse identifizieren den IL-6 Signalweg als einen neuen möglichen Ansatz für eine Behandlungsstrategie von Frühgeborenen mit dem Risiko für BPD.

## **1.2. Loss of IL-6 preserves surfactant protein expression and enables lung growth in newborn mice exposed to prolonged HYX**

**Rationale:** Premature infants exposed to increased oxygen (O<sub>2</sub>) are often afflicted with bronchopulmonary dysplasia (BPD). It is well recognized that inflammation contributes to the pathogenesis of BPD; human studies show that Interleukin-6 (IL-6) is increased in lungs of infants evolving BPD. Since IL-6 is known to regulate inflammation and cell homeostasis, we hypothesized that HYX-induced lung growth arrest in newborn mice is linked to activation of IL-6 signaling; in contrast, IL-6 deficiency is protective and enables lung growth in newborn mice exposed to HYX.

**Methods:** The functional role of IL-6 signaling in aberrant lung development was studied in C57Bl/6N as well as IL-6-deficient mice (*Il6*<sup>-/-</sup>) and its wildtype controls (WT). Newborn mice were exposed to either 85% O<sub>2</sub> (hyperoxia, HYX) or 21% O<sub>2</sub> (normoxia, NOX) from postnatal day 1 (P1) to P28. Lung function tests were performed at P28; at the end of the experiments lungs were excised and snap-frozen or pressure-fixed in paraformaldehyde and paraffin-embedded for quantitative morphometric analyses.

**Results:** 1) Exposure to 85% O<sub>2</sub> induced cytokine driven inflammation, along with marked activation of IL-6-STAT3-SOCS3 signaling in lungs of newborn mice, resulting in impaired alveolarization and decreased lung dynamic compliance. 2) Quantitative histomorphometric analyses of the lungs revealed reduced alveolar count and microvascular formation in lungs after HYX. In contrast, *Il6*<sup>-/-</sup> pups were significantly protected from these alterations. 3) Moreover, assessment of elastic fibers showed that IL-6 deficiency reduced myofibroblast proliferation and attenuated elastic fiber deposition in the alveoli. 4) Further analyses revealed that *Il6*<sup>-/-</sup> mice were protected from ATII apoptosis and showed increased expression of surfactant proteins. (5) These findings after HYX were related to a reduced abundance of Klf4 in macrophages and M1-like (pro-inflammatory) polarization.

**Conclusion:** Our study demonstrates that targeting IL-6 signaling could protect ATII and enable lung growth in newborn mice exposed to prolonged HYX, offering thereby a new potential target to treat preterm infants evolving BPD.

### **1.3. Neues Krüppel-like Factor 4 (Klf4) - Forkhead Box Protein O1 (FoxO1) Interaktom: Ein Regulator von Fibroblasten bei Sauerstoff-induzierter neonataler Lungenschädigung**

**Hintergrund:** Prolongierte Sauerstoffgabe bei Frühgeborenen ist ein Risikofaktor für die Entstehung einer bronchopulmonalen Dysplasie (BPD). Die Lungen von Säuglingen mit BPD zeigen eine gestörte Ausbildung von Alveolen und Mikrogefäßen zusammen mit einem Umbau der Lungenmatrix. Der Transkriptionsfaktor Krüppel-like factor 4 (Klf4) ist an wichtigen zellbiologischen Prozessen beteiligt. Neuere Studien zeigen, dass Klf4 die Aktivität des Forkhead-Box-Proteins O1 (FoxO1) und die Homöostase der alveolären Myofibroblasten reguliert, was für den Prozess der Alveolarisierung und der Fibrose entscheidend ist. Daher stellten wir die Hypothese auf, dass die Klf4-FoxO1-Achse mechanistisch wichtig für die Lungenfibroblastenfunktion und für die Sauerstoff-induzierte neonatale Lungenschädigung ist.

**Methoden:** (1) Neugeborene C57Bl/6N-Mäuse wurden bis zum postnatalen Tag 28 (P28) 85% O<sub>2</sub> (Hyperoxie, HYX) oder 21% O<sub>2</sub> (Normoxie, NOX) ausgesetzt. (2) Murine primäre Lungenfibroblasten (MPLF) wurden mit Doxycyclin-induzierbarem *sleeping-beauty Transposon System* oder siRNA transfiziert, um Klf4 zu überexprimieren (Klf4<sup>OE</sup>) oder in der Expression zu hemmen [Klf4<sup>del</sup>]. Anschließend wurden die Zellen für bis zu 48 Stunden HYX oder NOX exponiert. Zellüberleben (MTT), Proliferation (BrdU), Apoptose (Caspase3), Migration (Boyden-Kammer-Assay) und Genexpression (qRT-PCR) wurden untersucht. (3) Die mRNA-Expression von FoxO1 und seinen Zielgenen (*Fas*, *Ccnb1*) wurden in MPLF mit Klf4<sup>del</sup> oder Klf4<sup>OE</sup> gemessen.

**Ergebnisse:** (1) HYX reduzierte die Klf4 Expression in den Lungen neugeborener Mäusen an P28 und erhöhte die Genexpression von *Tgfβ*, *Serpine1* (TGFβ-Zielgen) und αSMA-Protein (Marker für Myofibroblasten) als Indikatoren für fibrotische Prozesse. Darüber hinaus hemmte TGFβ die Klf4-Expression in Zellkulturstudien mit MPLF; (2) HYX und Klf4<sup>del</sup> blockierten die Migration; Klf4<sup>del</sup> induzierte die Proliferation und erhöhte die mRNA-Expression von Matrixmarkern (*Ccn2*, *Col1a1* und *Col4a1*) sowie *Pdgfra* als Indikator für Myofibroblasten. Im Gegensatz dazu erhöhte Klf4<sup>OE</sup> die Adhäsion und Zellüberleben, aber reduzierte die Proliferation, Apoptose und Migration in MPLF. (3) Klf4<sup>del</sup> und Klf4<sup>OE</sup> erhöhten bzw. reduzierten die Genexpression von FoxO1 und seinen Zielgenen (*Fas*, *Ccnb1*).

**Schlussfolgerung:** Unsere Daten zeigen eine neue Klf4-FoxO1-Achse in Lungenfibroblasten, die das Matrix-Remodeling verhindern und das Wachstum der Lunge bei BPD fördern könnte.

#### 1.4. Novel Krüppel-like factor 4 (Klf4) - Forkhead box protein O1 (FoxO1) interactome: a regulator of fibroblasts in HYX-induced neonatal lung injury

**Rationale:** Preterm infants treated with oxygen supplementation often develop bronchopulmonary dysplasia (BPD). Lungs of infants with BPD show failed alveolar and microvascular formation along with perturbed matrix remodeling. The transcription factor Krüppel-like factor 4 (Klf4) is involved in key cell biological processes. Recent studies show that Klf4 regulates Forkhead box protein O1 (FoxO1) activity and alveolar myofibroblast homeostasis, which is crucial in the process of alveolarization and fibrosis. Therefore, we hypothesized that Klf4-FoxO1 axis is mechanistically important in lung fibroblast function and HYX-induced neonatal lung injury.

**Methods:** (1) Newborn C57Bl/6N mice were exposed to 85% O<sub>2</sub> (hyperoxia, HYX) or 21% O<sub>2</sub> (normoxia, NOX) until postnatal day 28 (P28). (2) Murine primary lung fibroblasts (MPLF) were transfected with doxycycline-inducible sleeping beauty transposon system and siRNA technique for overexpression (OE) and knockdown of Klf4 (del), respectively. Afterwards, the cells were exposed to HYX or NOX for up to 48 hours. Cell viability (MTT), proliferation (BrdU), apoptosis (Caspase3), migration (Boyden chamber assay), and gene expression (qRT-PCR) were assessed. (3) mRNA expression of FoxO1 and its target genes (*Fas*, *Ccnb1*) were measured in MPLF with Klf4<sup>del</sup> or Klf4<sup>OE</sup>

**Results:** (1) HYX reduced abundance of Klf4 in lungs of newborn mice at P28, and increased the gene expression of *Tgfβ*, *Serpine1* (TGFβ target gene) and αSMA protein (marker of myofibroblasts) as indicators of fibrotic processes. Moreover, in cell culture studies, exposure of MPLF to TGFβ reduced Klf4 expression; (2) HYX and Klf4del blocked migration; Klf4del induced proliferation and increased mRNA expression of matrix markers (*Ccn2*, *Col1a1*, and *Col4a1*) as well as *Pdgfra* as an indicator of myofibroblasts. Contrary, Klf4<sup>OE</sup> increased adhesion, viability and reduced proliferation, apoptosis and migration in MPLF. (3) Klf4del and Klf4<sup>OE</sup> increased and reduced the gene expression of FoxO1 and its target genes (*Fas*, *Ccnb1*), respectively.

**Conclusion:** Our data unveil a novel Klf4-FoxO1 axis in lung fibroblasts that could prevent promote matrix remodeling and lung growth arrest in lungs with BPD.