

# Reactive oxygen species-regulated genes and their roles in cutaneous wound repair

**Doctoral Thesis**

**Author(s):**

Hanselmann, Christine

**Publication date:**

2002

**Permanent link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004323748>

**Rights / license:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

Diss. ETH No 14518

# Reactive oxygen species-regulated genes and their roles in cutaneous wound repair

A dissertation to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGIE  
for the degree of  
Doctor of Natural Science

presented by  
CHRISTINE HANSELMANN

Diploma in Biochemistry, Eberhard-Karls-Universität Tübingen  
born 28<sup>th</sup> March 1970  
from Germany

accepted on recommendation of  
Prof. Dr. Sabine Werner, examiner  
Prof. Dr. Hans M. Eppenberger, co-examiner

2002

---

## Zusammenfassung

Die Verletzung der Haut setzt eine komplexe Abfolge biologischer Prozesse in Gang, die letztendlich zur Heilung der Wunde führen. Während der frühen Entzündungsphase wandern Granulozyten und Makrophagen in die Wunde ein. Zur Abwehr mikrobieller Erreger produzieren sie grosse Mengen an reaktiven Sauerstoffspezies. Obwohl dieser Abwehrmechanismus für die Wundheilung wichtig ist, können grosse Mengen an reaktiven Sauerstoffspezies die Zellproliferation und -migration beeinflussen und sogar das Gewebe zerstören. Daher benötigt die Zelle Mechanismen, um reaktive Sauerstoffspezies zu detoxifizieren. Zur Untersuchung der zellulären Antwort auf oxidativen Stress wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst nach Genen gesucht, deren Expression in Keratinozyten durch reaktive Sauerstoffspezies reguliert wird. Zudem wurde deren Expression und Funktion bei der Wundheilung untersucht.

Häm-Oxygenase ist das Enzym, welches den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt im Abbau von Hämoglobin katalysiert. Dieses Enzym ist wichtig im Eisenstoffwechsel, aber es wurde auch gezeigt, dass es bei der Zellabwehr gegen oxidativen Stress eine Rolle spielt. Dieser Effekt könnte auch bei der Wundheilung und bei entzündlichen Erkrankungen wichtig sein. Deshalb untersuchten wir die Expression von zwei Häm-Oxygenase Isoenzymen, HO-1 und HO-2, bei der Heilung von Exzisionswunden. Wir konnten zeigen, dass die Expression von HO-1 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene drei Tage nach Verwundung stark erhöht ist. Nach Abheilung der Wunde ging die Expressionsrate von HO-1 auf das Ausgangsniveau zurück. Im Gegensatz dazu war die Expression von HO-2 bei der Wundheilung nur geringfügig verändert. HO-1 wird von den Entzündungszellen des Granulationsgewebes und von den Keratinozyten des hyperproliferativen Epithels gebildet. Dies konnten wir mittels *in situ*-Hybridisierung und immunhistochemischen Färbungen nachweisen. In der Haut von Patienten, die an Psoriasis leiden, konnte ebenfalls eine starke Expression von HO-1 nachgewiesen werden. Auch die Expression von HO-2 war in der Haut dieser Patienten erhöht. Genau wie in Wunden, wird in der Haut von Psoriasispatienten HO-1 vor allem von Entzündungszellen und von Keratinozyten gebildet. In *in vitro* Studien mit kultivierten Keratinozyten konnte gezeigt werden, dass nicht Wachstumsfaktoren und

---

proinflammatorische Zytokine diese Expression auslösen, sondern reaktive Sauerstoffspezies. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass HO-1 eine Rolle bei der Wundheilung und bei entzündlichen Erkrankungen spielt. Dort könnte es am Häm-Abbau und an der Abwehr reaktiver Sauerstoffspezies beteiligt sein.

Um zusätzlich neue Stress-regulierte Gene zu identifizieren, wurden HaCaT Zellen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt, und die cDNA dieser Zellen wurde zur Hybridisierung eines cDNA Arrays eingesetzt. Dabei konnte ich zwei Gene identifizieren, Nm23-H1 und MAO A, deren Expression durch reaktive Sauerstoffspezies reguliert wird. Dies konnte auch durch weitere *in vitro* Versuche bestätigt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde nach Molekülen gesucht, die bei der Wundheilung für die Detoxifizierung reaktiver Sauerstoffspezies verantwortlich sein könnten. Hierfür wurden KFG-regulierte Gene in Keratinozyten identifiziert und charakterisiert.

*Keratinocyte growth factor* (KGF) ist ein starkes Mitogen für Epithelzellen und es spielt eine Rolle beim Überleben dieser Zellen unter Stressbedingungen. Eines der KGF-Zielgene kodiert für den Transkriptionsfaktor *NF-E2-related factor 2* (Nrf2). Nrf2 spielt eine wichtige Rolle bei der Zellantwort auf oxidativen Stress, da dieser Transkriptionsfaktor die Expression zahlreicher Gene reguliert, die zytoprotektive Proteine kodieren. Deshalb untersuchten wir die Wundheilung in Nrf2 Knockoutmäusen. Interessanterweise war die Expression von einigen proinflammatorischen Zytokinen, Wachstumsfaktoren und extrazellulären Matrixmolekülen während der ersten Phase der Wundheilung herunterreguliert, dagegen war die Entzündungsphase in diesen Mäusen verlängert. Trotz dieser molekularen Unterschiede konnten wir histologisch keine Veränderung des Wundheilungsprozesses beobachten. Dies könnte durch die verstärkte Expression des zu Nrf2 homologen Transkriptionsfaktors Nrf3 in diesen Tieren bedingt sein. Auch Nrf3 ist ein Zielgen von KGF. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass sowohl Nrf2 als auch Nrf3 Genexpression und Entzündung während der Wundheilung regulieren.

Peroxiredoxine (Prxs) sind eine neuentdeckte Familie von Proteinen mit anti-oxidativer Wirkung. Sie spielen eine Rolle bei der Zellproliferation und -differenzierung, sowie beim Überleben in Stresssituationen. Unsere Gruppe konnte zeigen, dass Prx VI nach Hautverletzung in Keratinozyten verstärkt exprimiert wird. Wir generierten stabile CHO

---

Zelllinien, die Prx VI überexprimieren, und konnten zeigen, dass diese Zelllinien unter bestimmten Bedingungen resistenter gegen oxidativen Stress sind. Prx VI wurde auch in der Epidermis von transgenen Mäusen überexprimiert. Es ergab sich kein Hautphänotyp, aber nach Verwundung der Mäuse konnten wir ein grösseres hyperproliferatives Epithel und einen beschleunigten Wundschluss beobachten. Es könnte also gut möglich sein, dass die Keratinozyten am Wundrand resistenter gegen oxidativen Stress sind und somit eine bessere Wundheilung möglich ist.

---

## Abstract

Injury to the skin initiates a series of events including inflammation, new tissue formation, and matrix remodeling. During the early inflammatory phase, polymorphonuclear leukocytes and macrophages infiltrate the wounded tissue. Once activated, they produce large amounts of reactive oxygen species (ROS) as a part of their defence mechanism. Although this process is beneficial, increased levels of ROS can inhibit cell migration and proliferation and can even cause severe tissue damage. Therefore, cells must develop strategies to detoxify these molecules. To gain insight into the mechanisms involved in ROS detoxification in wounded skin, we searched for genes that are regulated by ROS in keratinocytes and for genes that can protect these cells from the toxic effects of ROS.

One of these genes that we found to be regulated by ROS in keratinocytes encodes heme oxygenase-1 (HO-1), the rate-limiting enzyme in the degradation of heme. In addition to its obvious role in iron metabolism, a series of findings indicate an important role of HO in the cellular protection against oxidative stress. This effect might be of particular importance during wound healing and also in inflammatory disease. Therefore, we determined the expression of the two HO isozymes, HO-1 and HO-2, during the healing process of full-thickness excisional wounds in mice. We showed a remarkable induction of HO-1 mRNA and protein expression within three days after skin injury. After completion of wound healing, HO-1 expression declined to basal levels. By contrast, expression of HO-2 was not significantly modulated by skin injury. *In situ* hybridization and immunohistochemistry revealed high HO-1 expression in inflammatory cells of the granulation tissue and in keratinocytes of the hyperproliferative epithelium. A strong over-expression of HO-1 was also observed in the skin of patients suffering from the inflammatory skin disease psoriasis. In addition, HO-2 mRNA levels were increased in the skin of psoriatic patients. Similar to wounded skin, inflammatory cells and keratinocytes of the hyperthickened epidermis were the major producers of HO-1 in psoriatic skin. *In vitro* studies with cultured keratinocytes revealed a potential role of ROS, but not of growth factors and pro-inflammatory cytokines, as inducers of HO-1 expression in inflamed skin. Our findings suggest a novel role of HO in wound healing

---

and inflammatory skin disease where it might be involved in heme degradation and in the protection of cells from the toxic effects of ROS.

In addition, we hybridized a cDNA array with cDNAs from control and ROS-treated HaCaT keratinocytes to identify additional stress-regulated genes. The genes encoding Nm23-H1 and monoamine oxidase A, were shown to be regulated by ROS *in vitro*.

In the second part of my thesis I searched for genes that could be responsible for the detoxification of ROS. For this purpose, we identified and characterized KGF-regulated genes in HaCaT keratinocytes. Keratinocyte growth factor (KGF) is a potent mitogen for epithelial cells, and it promotes survival of these cells under stress conditions. We identified the gene encoding the transcription factor NF-E2-related factor 2 (Nrf2) as a novel target of KGF action. Nrf2 is a key player in the cellular stress response, since it regulates the expression of various genes that encode cytoprotective proteins. To determine a possible role of Nrf2 in wound healing, we studied the wound repair process in Nrf2 knockout mice. Interestingly, the expression of various key players involved in wound healing was significantly reduced in early wounds of the Nrf2 knockout animals, and the late phase of repair was characterized by prolonged inflammation. However, these differences in gene expression were not reflected by obvious histological abnormalities. The normal healing rate appears to be at least partially due to an up-regulation of the related transcription factor Nrf3, which was also identified as a target of KGF. Taken together, our results reveal novel roles of the KGF-regulated transcription factors Nrf2 and possibly Nrf3 in the control of gene expression and inflammation during cutaneous wound repair.

Peroxiredoxins (Prxs) are a recently described family of anti-oxidant proteins that have been implicated, via their anti-oxidant activity, in a number of cellular functions, including regulation of cell proliferation and differentiation and survival under stress conditions. Our group demonstrated a strong up-regulation of Prx VI expression in keratinocytes in response to KGF *in vitro* and to wounding *in vivo*. To determine a possible cytoprotective function of this protein, we stably transfected CHO cells with a Prx VI expression construct, and we demonstrated *in vitro* that these cell lines are more resistant against oxidative stress. Finally, we overexpressed Prx VI in the epidermis of transgenic mice. Although the skin was not obviously affected by overexpression of this enzyme, we observed a faster reepithelialisation rate and enhanced wound closure. It

---

seems possible that Prx VI protects keratinocytes at the wound edge from oxidative stress, thereby allowing faster reepithelialisation.