



Doctoral Thesis

## **Roles of the cytoprotective transcription factors Nrf2 and Nrf3 in liver and skin biology**

**Author(s):**

Beyer, Tobias A.

**Publication Date:**

2006

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005347880> →

**Rights / License:**

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

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH No. 16915

# **Roles of the cytoprotective transcription factors Nrf2 and Nrf3 in liver and skin biology**

A dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY  
ZURICH

for the degree of  
Doctor of Natural Science

presented by  
TOBIAS A. BEYER  
Dipl. Natw. ETH Zurich, Switzerland  
born August 3<sup>rd</sup>, 1976  
from Amden, Switzerland

accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. Sabine Werner, examiner  
Prof. Dr. Ulrike Kutay, co-examiner

2006

## Zusammenfassung

Reaktive Sauerstoffspezies (RSS) werden durch Umwelteinflüsse, als Antwort auf Verletzungen oder durch normale metabolische Aktivität gebildet. Übermäßige Produktion oder reduzierte Abwehr von RSS führen zu oxidativem Stress in den betroffenen Zellen. Die Familie der Nrf Transkriptionsfaktoren spielt eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der RSS Homöostase durch die Regulation der Expression von Proteinen mit antioxidativer Wirkung und anderen RSS-detoxifizierenden Enzymen. In meiner Doktorarbeit untersuchte ich die Funktion von Nrf2 während der Leberregeneration und die Regulation dieses Faktors in Keratinozyten *in vitro* und *in vivo*. Zusätzlich charakterisierte ich den Transkriptionsfaktor Nrf3 auf biochemischer und funktioneller Ebene.

Da oxidativer Stress die Antwort der Leber nach Verletzung beeinflussen kann, untersuchten wir die Leberregeneration in Nrf2 Knockout-Mäusen. Hepatozyten dieser Tiere zeigten erhöhten oxidativen Stress, verursacht durch eine reduzierte Expression von RSS detoxifizierenden Enzymen. Zusätzlich war die Aktivierung anti-apoptotischer und pro-mitogener Signaltransduktionswege nach partieller Hepatektomie verändert. Diese Unterschiede führten zu einer verlangsamten Regeneration aufgrund verspätet eintretender Proliferation und durch verstärkte Apoptose der Hepatozyten. Unsere Resultate sprechen dafür, dass pharmakologische Aktivierung von Nrf2 zur Verbesserung der Leberregeneration bei Patienten mit akuter oder chronischer Leberschädigung führen könnte.

In unserem Labor konnte vor kurzem eine wichtige Rolle von Nrf Transkriptionsfaktoren bei der Prävention chemisch-induzierter Karzinogenese in der Haut gezeigt werden. Im zweiten Teil meiner Doktorarbeit untersuchte ich daher die Mechanismen, die die Aktivität von Nrf2 in Keratinozyten regulieren. Überraschenderweise induzierten

weder UV Bestrahlung noch Verwundung die Aktivierung von Nrf2, obwohl beide Prozesse mit hoher RSS Produktion assoziiert sind. Einzig die topische Behandlung der Haut mit elektrophilen Chemikalien löste eine Induktion aus. Diese Befunde bestätigten sich mit kultivierten Keratinozyten. Behandlung der Zellen mit elektrophilen Chemikalien induzierte Akkumulation des Nrf2 Proteins im Zellkern verbunden mit der Expression von Nrf2 Zielgenen. UV Bestrahlung oder Behandlung mit RSS hingegen zeigten keinen Effekt. Die Resultate können in Zukunft für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze im Bereich der Chemoprevention verwendet werden.

Im letzten Abschnitt meiner Doktorarbeit untersuchte ich die Regulationsmechanismen von Nrf3, einem weiteren, wenig bekannten Mitglied der Nrf Familie. In unserer Studie zeigten wir, dass sich dieses Protein hauptsächlich im Zytoplasma befindet, während sich eine am Aminoterminus verkürzte Version des Proteins im Kern aufhält. Wir identifizierten Calpain IV in einem Hefe *Two-hybrid screen* als möglichen Interaktionspartner von Nrf3. Biochemische Versuche legen den Schluss nahe, dass proteolytische Spaltung von Nrf3 durch die Cysteinprotease Calpain die subzelluläre Lokalisation von Nrf3 reguliert.

Die Resultate meiner Doktorarbeit ermöglichen einen tieferen Einblick in die Regulationsmechanismen von Nrf2 und Nrf3 und zeigen erstmals eine Funktion von Nrf2 bei der Gewebsregeneration.

## Summary

Cells are often exposed to reactive oxygen species (ROS), which are generated by environmental factors, in response to injury, or by normal metabolic activity. Enhanced production or reduced defense against ROS result in oxidative stress. Nrf transcription factors play important roles in the regulation of detoxifying enzymes and antioxidant proteins, thereby controlling the ROS homeostasis. In my thesis I investigated the role of Nrf2 in liver regeneration, and I studied its regulation in keratinocytes *in vitro* and *in vivo*. In addition, Nrf3 was biochemically and functionally characterized.

Since oxidative stress influences the response of the liver to injury, we studied liver regeneration in Nrf2 knockout mice. Hepatocytes of these animals were characterized by enhanced oxidative stress due to reduced expression of ROS-detoxifying enzymes. After partial hepatectomy, abnormal activation of major anti-apoptotic and pro-mitogenic signaling pathways was observed. These abnormalities resulted in delayed liver regeneration as a result of delayed onset of hepatocyte proliferation and enhanced apoptosis. These results identify Nrf2 as an important player in liver repair and suggest that pharmacological activation of Nrf2 might be a promising strategy to enhance the repair process in patients after acute or chronic liver damage.

Recent studies from our laboratory revealed that Nrf transcription factors in keratinocytes are crucial for the prevention of chemically-induced skin cancer. Therefore, it was of particular interest to characterize the regulation of Nrf2 in keratinocytes, and this question was addressed in the second part of my thesis. *In vivo*, topical treatment of the skin with electrophilic chemicals activated Nrf2 in keratinocytes. By contrast, skin injury or UV irradiation, two events associated with high incidence of ROS formation, had no effect. This was confirmed with cultured keratinocytes where electrophiles, but not reactive oxygen species or UV irradiation stimulated nuclear translocation of Nrf2

and subsequent Nrf2-mediated gene expression. These findings provide the basis for the development of novel therapeutics for chemoprevention of skin tumors.

An additional goal of this thesis was to investigate the mechanism of action of Nrf3, a poorly characterized member of the Nrf family of transcription factors. We found that Nrf3 is normally retained in the cytoplasm, whereas an aminoterminally-truncated version translocated to the nucleus. In a yeast two-hybrid assay I identified calpain IV as a putative Nrf3 interaction partner. Biochemical studies suggest that proteolytic cleavage of Nrf3 by the cysteine protease calpain is responsible for nuclear translocation of Nrf3.

Taken together, the results of this thesis provide insight into the regulation of the Nrf2 and Nrf3 transcription factors and reveal a novel function of Nrf2 in tissue repair.