DISS. ETH NO. 21630

ROLES AND MECHANISMS OF ACTION OF THE NRF2 TRANSCRIPTION FACTOR IN LIVER HOMEOSTASIS AND REGENERATION

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

ANNE ULRIKE KÖHLER

M. Sc. Life Science, University of Konstanz, Germany

born on 16.04.1982

citizen of Germany

accepted on recommendation of

Prof. Dr. Sabine Werner

Prof. Dr. Markus Stoffel

Prof. Dr. Albrecht Wendel

2013

Zusammenfassung

Die Leber ist durch ihre zentrale Rolle im Stoffwechel und bei der Entsorgung giftiger Substanzen permanent reaktiven Sauerstoffspezies (RSS) ausgesetzt. Die übermässige Produktion oder die verringerte Fähigkeit zur Entsorgung von RSS führen zu oxidativem Stress in den betroffenen Zellen. Dieser spielt wiederum eine zentrale Rolle bei der Entstehung von chronischen Lebererkrankungen, die ein häufig in der Klinik anzutreffendes Problem darstellen. Das Verständnis der Mechanismen, die oxidativen Stress auslösen oder die Redoxhomöostase einer Zelle kontrollieren, ist daher eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung von Strategien zur Prävention beziehungsweise Behandlung chronischer Lebererkrankungen. Da die Transkriptionsfaktoren Nrf2 und NF-κB zentrale Regulatoren der antioxidativen Abwehr sind, ist es ein wichtiges Ziel unserer Forschung, deren Rolle in der Leberhomöostase- und regeneration genauer zu verstehen.

In früheren Arbeiten unserer Gruppe wurde gezeigt, dass die Leberregeneration nach partieller Hepatektomie in Nrf2 Knockout-Mäusen nur eingeschränkt funktionierte. Die unter anderem beobachtete verzögerte Proliferation der Hepatozyten in Nrf2 Knockout-Mäusen konnte auf eine verringerte Insulin/IGF1-Antwort der Leberzellen als direkte Folge von oxidativem Stress zurückgeführt werden. Im ersten Teil meiner Dissertation war ich an einem Projekt beteiligt, in welchem die durch CCl_4 verursachten Leberschäden und fibrotischen Veränderungen in Nrf2 Knockout-Mäusen charakterisiert wurden. Dabei stellten wir fest, dass CCl_4 im Verhältnis zu Wildtyptieren in den Knockout-Mäusen einen stärkeren Leberschaden anrichtete und auch die Entstehung von Fibrose begünstigt war.

Da wir in Wildtyptieren nie eine Aktivierung von Nrf2 über ein basales Niveau hinaus beobachteten, vermuteten wir, dass eine weitere Aktivierung von Nrf2 die Regeneration der Leber sowohl im Operations- als auch im toxischen Modell eventuell positiv beeinflussen könnte. Entgegen dieser Annahme konnte ich jedoch im zweiten Teil meiner Doktorarbeit zeigen, dass die Expression einer konstitutiv aktiven Nrf2 Mutante in Hepatozyten transgener Mäuse die Regeneration nach CCl_4 nicht verbesserte. Überraschenderweise verlief die Regeneration der Leber nach partieller Hepatektomie sogar schlechter als in Wildtyptieren. Diese Ergebnisse zeigen, dass bei der Verwendung von Nrf2-Aktivatoren in der Klinik in Situationen Vorsicht angebracht ist, in denen die Fähigkeit der Leber zur Regeneration wichtig ist, wie z.B. zum Beispiel nach Leberoperationen.

Bei der Untersuchung der molekularen Ursachen des Regenerationsphänotyps in caNrf2-exprimierenden Mäusen fanden wir heraus, dass Nrf2 in der regenerierenden Leber dieser

Tiere die Gene aktiviert, die für den Zellzyklusinhibitor p15 beziehungsweise das pro-apoptotische Protein Bcl2l11 (Bim) kodieren. Die verstärkte Expression dieser Proteine, die mit der reduzierten Proliferation beziehungsweise der erhöhten Apoptose der Leberzellen zeitlich korrelierte, stellt eine naheliegende Erklärung für den Regenerationsdefekt in den caNrf2-transgenen Mäusen dar.

Im dritten Teil meiner Doktorarbeit überprüfte ich die Hypothese, dass Nrf2 und NF-κB komplementäre Schutzfunktionen in der Leber übernehmen. Dafür habe ich Mäuse gezüchtet und untersucht, denen sowohl Nrf2 als auch das NF-κB Protein p65/RelA in Hepatozyten fehlt. Im Gegensatz zu den Tieren, denen nur einer der beiden Transkriptionsfaktoren fehlte, entwickelten die Doppelknockout-Mäuse gemäss unserer Hypothese spontan eine Entzündung der Leber sowie daraus folgend eine Leberfibrose. Hiermit konnte erstmals eine funktionelle Wechselwirkung zwischen Nrf2 und NF-κB *in vivo* nachgewiesen werden Darüber hinaus bekam ein Drittel der gealterten weiblichen Mäuse Lebertumore, die inflammatorischen hepatozellulären Adenomen beim Menschen ähnelten. Dabei handelt es sich um einen seltenen, gutartigen Tumor, der hauptsächlich bei Frauen auftritt, die orale Verhütungsmittel mit hohem Östrogengehalt einnehmen. Unsere Doppelknockout-Mäuse stellen daher ein Tiermodell für diesen Tumor dar. Ausserdem weisen unsere Ergebnisse darauf hin, dass Nrf2 und NF-κB auch im Menschen an der Entstehung dieses Tumors beteiligt sein könnten.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die Ergebnisse meiner Doktorarbeit neue Erkenntnisse über die Aufgaben und Funktionsmechanismen von Nrf2 in der normalen und erkrankten Leber lieferten. Sie zeigten zum einen eine unerwartete Nebenwirkung der dauerhaften Aktivierung von Nrf2, und zum anderen legten sie eine bisher unbekannte funktionelle Wechselwirkung von Nrf2 und NF-κB in Hepatozyten offen.

Summary

The liver is constantly exposed to reactive oxygen species (ROS) due to its central role in metabolism and detoxification. If production of ROS is too high or if ROS detoxification is impaired, oxidative stress develops. The latter plays a key role in the pathogenesis of chronic liver disease (CLD) that presents a frequent challenge in the clinics. Thus, a thorough understanding of the mechanisms ensuring redox homeostasis in the liver is particularly important and provides the basis for the development of strategies to prevent or treat CLD. Since the transcription factors Nrf2 and NF-κB play important roles in the regulation of the antioxidant defense system, we sought to investigate their roles in liver homeostasis and regeneration.

Previous studies from our group showed that Nrf2-deficiency impaired liver regeneration after partial hepatectomy in mice. Mechanistically, this involved delayed proliferation due to reduced insulin/IGF1 sensitivity as a result of oxidative stress in hepatocytes of Nrf2-deficient mice. In the first part of my PhD thesis, I contributed to the characterization of CCl_4-induced liver injury and fibrosis in Nrf2 knockout mice. We found that Nrf2 deficiency caused impaired repair after this insult and enhanced the development of liver fibrosis.

Since we never observed Nrf2 activation above basal levels in wild-type mice during liver regeneration, we speculated that Nrf2 activation might be beneficial for liver regeneration in both toxic and surgical injury models because of increased expression of cytoprotective Nrf2 target genes. However, in the second part of my PhD thesis, I demonstrated that expression of a constitutively active Nrf2 (caNrf2) mutant in hepatocytes of transgenic mice did not enhance liver regeneration after injury induced by CCl_4 and also did not protect from the development of fibrosis. On the contrary, liver regeneration upon partial hepatectomy was even impaired. These data suggest that the use of Nrf2 activators should be avoided in patients under conditions where liver regeneration is required, e.g. after liver surgery.

A mechanistic analysis of the regeneration phenotype in caNrf2 expressing mice revealed that Nrf2 activates novel target genes in the regenerating liver, which encode the cyclin-dependent kinase inhibitor p15 and the pro-apoptotic protein Bcl2l11 (Bim). These findings provide a likely explanation for the delayed proliferation and enhanced apoptosis of hepatocytes in caNrf2 transgenic mice.

In the third part of my thesis I tested the hypothesis that Nrf2 and NF-κB exert complementary cytoprotective functions in the liver. For this purpose I generated and characterized mice lacking both Nrf2 and the NF-κB subunit p65/RelA in hepatocytes. In line with our hypothesis, lack of either Nrf2 or p65 had only minimal effects on liver homeostasis. Double-deficient mice, however, developed spontaneous liver inflammation and fibrosis. These results provide the first experimental evidence for a functional interaction of Nrf2 and NF-κB *in vivo*. Moreover, in one-third of aged female double knockout mice we observed development of lesions resembling human inflammatory hepatocellular adenoma, a rare, benign tumor predominantly occuring in women using oral contraceptives with high estrogen content. Thus, our double-deficient mice represent the first animal model for inflammatory HCA. Finally, our data point towards a role for Nrf2 and NF-κB in HCA pathogenesis.

Together, the results obtained during my PhD thesis provide insight into the functions and mechanisms of action of Nrf2 in liver homeostasis and disease. They disclose unexpected deleterious effects of Nrf2 activation and demonstrate a previously unrecognized functional interaction of Nrf2 and NF-κB in hepatocytes.