

# Glutathione - a key regulator of skin homeostasis and wound repair

**Doctoral Thesis**

**Author(s):**

Telorack, Michèle

**Publication date:**

2014

**Permanent link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010399828>

**Rights / license:**

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

Diss. ETH No. 22044

**GLUTATHIONE - A KEY REGULATOR OF  
SKIN HOMEOSTASIS AND WOUND REPAIR**

A dissertation submitted to  
ETH ZURICH  
for the degree of Doctor of Sciences

presented by  
MICHÈLE TELORACK

Dipl. Biol., Friedrich-Alexander-University Erlangen-Nuremberg

born 04.01.1983  
Erlangen, Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Sabine Werner, examiner  
Prof. Dr. Michael Detmar, co-examiner  
PD. Dr. Liliane Michalik, co-examiner

2014

## **Zusammenfassung**

Die Haut ist das größte Organ des menschlichen Körpers. Sie bildet nicht nur die Barriere zu der Umgebung, sondern ist auch involviert in Thermoregulation und Sinneswahrnehmung. Ihre äußerste Schicht, die Epidermis, besteht hauptsächlich aus Keratinozyten. Diese Zellen unterliegen kontrollierter(m) Proliferation, Differenzierung und Zelltod, um die epidermale Integrität aufrecht zu erhalten und ihre Funktionsfähigkeit zu gewährleisten. Unter homöostatischen Bedingungen, aber besonders während der Wundheilung, muss eine strenge Regulation dieser Prozesse stattfinden. Dies erfordert ein gut ausgewogenes Redox-Gleichgewicht, welches durch ein Netzwerk an detoxifizierenden Enzymen und Molekülen garantiert wird, welche die Entstehung erhöhter Mengen an reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies (ROS/RNS) verhindern und/oder diese beseitigen. Falls dieses Detoxifizierungssystem überfordert oder genetisch beeinträchtigt ist, kann es zu schwerwiegendem oxidativen Stress kommen. Dies ist bei vielen verschiedenen humanen Hautpathologien der Fall, die mit einem veränderten Redox-Status einhergehen. Dazu gehören chronische, nicht heilende Geschwüre, entzündliche Hautkrankheiten und Krebs. Aus diesem Grund ist es wichtig, die Mechanismen zu verstehen, die das Redox-Gleichgewicht in der Haut kontrollieren. Das Tripeptid Glutathion, ein bekanntes Antioxidans, ist eine Hauptkomponente der oxidativen Stressabwehr, aber über seine Funktion in Keratinozyten während der Homöostase und Reparatur der Haut sowie bei Hauterkrankungen ist wenig bekannt. In dieser Arbeit wurde die katalytische Untereinheit (Gclc) der Glutamacysteinligase (Gcl) - dem Schlüsselenzym der Glutathionbiosynthese - in Keratinozyten genetisch ausgeschaltet. Dies ermöglicht die Untersuchung der Konsequenzen einer Langzeit-Glutathiondepletion für die epidermale Homöostase und die Wundheilung.

Epidermale Homöostase und Wundheilung waren in Mäusen, denen Gclc in Keratinozyten fehlt, gestört, was sich in Hyperkeratose der Epidermis und

verzögerter Wund-Reepithelialisierung widerspiegelte. Überraschenderweise war die frühe Wundheilungsphase nicht betroffen. Während späterer Phasen des Reparaturprozesses und unter homöostatischen Bedingungen wurden jedoch schwerwiegende Schäden an DNA und Proteinen in Kombination mit mitochondrialen Abnormalitäten der Keratinozyten detektiert, was zur Apoptose führte. Zusätzlich war der Transkriptionsfaktor Nrf2 - ein Hauptregulator der zellulären Stressantwort - in Gclc-defizienten Keratinozyten *in vitro* und *in vivo* aktiviert. Da bereits gezeigt wurde, dass konstitutive Nrf2 Aktivierung in der Epidermis Hyperkeratose und einen epidermalen Barrieredefekt verursachen kann, ist die Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors in Gclc-defizienten Mäusen eine naheliegende Erklärung für die epidermalen Abnormalitäten, die in diesen Tieren beobachtet wurden. Andererseits verhindert offensichtlich erhöhte Nrf2 Aktivität vermutlich noch ernsthafteren zellulären Schaden, da Nrf2/Gclc doppel-defiziente Mäuse kurz nach der Geburt sterben, was darauf hindeutet, dass beide Moleküle komplementäre zytoprotektive Signalwege aktivieren.

Zusammenfassend geben die Ergebnisse dieser Arbeit Aufschluss über die Rolle von Glutathion in Keratinozyten für die Homöostase der Haut und die Wundheilung und zeigen eine wichtige Funktion von Glutathion in der Aufrechterhaltung der genomischen Integrität in Keratinozyten auf.

## ***Summary***

The skin is the largest organ of the human body. It is not only the barrier to the environment, but it is also involved in thermoregulation and sensation. Its outermost layer, the epidermis, consists mainly of keratinocytes. These cells undergo controlled proliferation, differentiation and cell death to maintain epidermal integrity and to ensure its proper function. Under homeostatic conditions, but especially during wound healing, a tight regulation of these processes has to be guaranteed. This requires a well-balanced redox state, which is achieved by a network of detoxifying enzymes and molecules, which help to prevent the formation of excessive levels of reactive oxygen and nitrogen species (ROS/RNS) and/or are involved in their scavenging. If this detoxification system is overwhelmed or genetically impaired, severe oxidative stress can occur. This can be seen in a large variety of human skin pathologies, which have been reported to show an altered redox state, including chronic, non-healing ulcers, inflammatory skin diseases and cancer. Therefore, it is important to understand the mechanisms, which control the redox balance in the skin. The tripeptide glutathione, a well known antioxidant, is a major component of the oxidative stress defense, but its function in keratinocytes during skin homeostasis, repair and disease has been poorly characterized. In this work, the catalytic subunit (Gclc) of glutathione cysteine ligase (Gcl) - the key enzyme of glutathione biosynthesis - was genetically targeted in keratinocytes, making it possible to study the consequences of long-term glutathione depletion in epidermal homeostasis and to analyze the role of glutathione in keratinocytes during wound healing.

Epidermal homeostasis and wound healing were disturbed in mice lacking Gclc in keratinocytes as reflected by hyperkeratosis in the epidermis and delayed wound reepithelialization. Surprisingly, the early phase of wound healing was not affected. During later phases of the repair process and under homeostatic conditions, severe damage of DNA and proteins combined with mitochondrial abnormalities of keratinocytes were detected, resulting in

apoptosis. Additionally, the transcription factor Nrf2 - a master regulator of the cellular stress response - was activated in Gclc-deficient keratinocytes *in vitro* and *in vivo*. Since constitutive activation of Nrf2 in the epidermis had previously been shown to cause hyperkeratosis and an epidermal barrier defect, the activation of this transcription factor in Gclc-deficient mice provides a likely explanation for the epidermal abnormalities observed in these animals. On the other hand, enhanced Nrf2 activity probably prevented even more severe cellular damage, since Nrf2/Gclc double deficient mice die shortly after birth, suggesting that both molecules activate complementary cytoprotective pathways.

Taken together, the results of this work shed light onto the role of glutathione in keratinocytes for skin homeostasis and wound repair and demonstrated an important function of Gclc for the maintenance of genome integrity in keratinocytes.