

DISS ETH NO. 24527

***The Nrf3 transcription factor and its novel roles
in keratinocytes***

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES OF ETH ZURICH

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

BEAT SIEGENTHALER

Master of Science, ETH Zurich

born on *11.09.1986*

citizen of Trub, BE

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Sabine Werner, examiner

Prof. Dr. Michael Detmar, co-examiner

PD. Dr. Liliane Michalik, co-examiner

2017

Summary

The skin forms the outermost surface of our body and fulfills several essential functions. As a barrier organ, the skin is frequently exposed to various environmental stressors. Excessive exposure to UV radiation and chemical pollutants, for instance, are harmful for the mammal's biggest organ, as these can lead to increased production of reactive oxygen species (ROS). Consequently, and in addition to its continuous self-renewing capacity, the skin has developed a comprehensive network of antioxidant defense systems to prevent excessive cellular damage and as a possible consequence malignant transformation.

The stress-activated transcription factor nuclear factor erythroid 2 related factor 2 (Nrf2) senses increasing levels of ROS and/or electrophilic compounds, resulting in its stabilization and nuclear accumulation, followed by activation of cytoprotective target genes. The related Nrf3, the newest member of the Cap'n'Collar protein family, is highly expressed in basal keratinocytes of normal human epidermis, but overall dispensable for skin development and homeostasis. Its biological function(s), remain(s) to be uncovered. Our laboratory previously showed a novel role of Nrf3 in the UV response of human and murine keratinocytes, which was followed-up in this thesis project. *In vivo* and *in vitro* studies using Nrf3-deficient mice/keratinocytes, as well as keratinocytes with NRF3 knock-down revealed a pro-apoptotic function of Nrf3. Furthermore, we show that the effect of Nrf3 on UV-induced apoptosis is cell autonomous and independent of DNA double strand breaks, ROS and Nrf2. Since protection of Nrf3-deficient keratinocytes from apoptosis was also observed under hyperosmotic and oxidative stress conditions, it is not restricted to UV-induced apoptosis. However, Nrf3-deficiency did no longer protect from apoptosis, when it was induced by disruption of cell-matrix interactions. This is likely a consequence of the stronger cell-cell and cell-matrix adhesion in Nrf3-deficient keratinocytes and in line with this the higher cell surface integrin levels and enhanced activation of focal adhesion kinase.

Therefore, our observations indicate that the basal expression of Nrf3 facilitates apoptosis upon insults (amongst others UV radiation) and thereby prevents accumulation of mutated basal cells in the epidermis, which could give rise to skin tumors. This is of particular interest, since UV radiation is one of the fundamental tumor-promoting carcinogens, and skin cancer still affects 2-3 million people worldwide every year. Also in the context of carcinogenesis, very little information is available on Nrf3. In addition to public data, we found low NRF3 protein levels in basal cell carcinomas (BCCs), but even less in squamous cell carcinomas (SCCs), both compared to expression in basal cells of normal human epidermis. However, we found overexpression of NRF3 mRNA in a subset of SCCs, implying a regulation of NRF3 on the posttranscriptional or posttranslational level, and/or expression of a mutated form of the gene.

To unravel a possible role of Nrf3 deficiency in skin cancer formation, we performed two different skin carcinogenesis studies. First, we induced tumors on K14-HPV8 mice via irradiation with a high dose of UVA and UVB. However, there was no effect of Nrf3 on skin tumor formation or growth of existing tumors in this model. It is possible, that the expression of the

oncogenic HPV8 transgene masked any potential effects of Nrf3. Furthermore, we had to sacrifice the mice at an early time point, most likely before malignant conversion of any of the tumors could have happened. However, using the chemically-induced skin tumorigenesis model, we not only found significantly larger papillomas, but also a much higher malignant conversion rate of existing tumors. Given the generally low conversion rate in C57BL/6 background, the finding of 20% SCCs in Nrf3-deficient mice compared to only 2.5% in wild-type mice was striking. This strong effect might result from the enhanced proliferation in papillomas lacking Nrf3 or from the pro-apoptotic effect of Nrf3, which may prevent accumulation of cells with oncogenic mutation(s). The more pronounced invasiveness might be explained by the enhanced migration rate of Nrf3-deficient keratinocytes as observed in our *in vitro* studies, which in turn might be linked to the observed involvement of Nrf3 in cell adhesion, integrin expression and downstream signaling.

Taken together, these results show that Nrf3 in basal keratinocytes has a pro-apoptotic function in response to cell damaging agents, and thereby prevents accumulation of damaged/mutated cells in the epidermis. Therefore, Nrf3 acts as a tumor suppressor in the skin and becomes an interesting target for the treatment of not yet malignant and possibly of malignant skin tumors.

Zusammenfassung

Die Haut ist das grösste menschliche Organ. Als Grenzorgan erfüllt sie viele essenzielle Funktionen, darunter der Schutz gegen schädliche Umweltfaktoren wie zum Beispiel giftige Substanzen oder übermässige UV-Strahlung. Letztere können zu erhöhter Bildung von reaktiven Sauerstoff-Spezien (ROS) führen, welche ihrerseits unter anderem das Erbgut schädigen. Um dem entgegenzuwirken, hat unser Körper umfassende Verteidigungsmechanismen entwickelt. So wird der entstandene oxidative Stress mit Antioxidantien bekämpft und allfällige DNA-Schäden werden so schnell wie möglich repariert. Gleichzeitig werden, um das Risiko einer Tumorentstehung zu minimieren, Zellen mit zu stark geschädigtem Erbgut durch programmierten Zelltod (Apoptose) entfernt.

Der Zellstress-aktivierte Transkriptionsfaktor Nrf2 kann erhöhte ROS-Werte erkennen und daraufhin die Expression entgiftender Enzyme und antioxidativer Proteine induzieren. Der zwar eng verwandte, aber minim erforschte Transkriptionsfaktor Nrf3, wird in den basalen Keratinozyten der humanen Epidermis stark exprimiert. Offensichtlich ist Nrf3 jedoch entscheidend für die Entwicklung und Homöostase der Haut, und seine biologischen Funktionen müssen noch entdeckt werden. Unser Labor hat im Vorfeld eine neue Rolle von Nrf3 bei der UV-Antwort von humanen und murinen Keratinozyten gefunden, was im Rahmen dieser Doktorarbeit weiterverfolgt wurde. So haben *in vivo* als auch *in vitro* Studien an Mäusen/Keratinozyten, denen Nrf3 fehlt (Nrf3-ko), gezeigt, dass Nrf3 eine pro-apoptotische Funktion bei der UV-Antwort hat. Des Weiteren konnten wir zeigen, dass dieser pro-apoptotische Effekt zellautonom und unabhängig von DNA Schäden, ROS und Nrf2 ist.

Überraschenderweise konnten wir auch unter hyperosmotischen und oxidativen Stress-Situationen diesen pro-apoptotischen Effekt beobachten, was darauf schliessen lässt, dass dieser Effekt nicht UV-spezifisch ist. Sobald wir jedoch Apoptose durch eine Zerstörung der Zell-Matrix Interaktionen auslösten, konnte das Fehlen von Nrf3 nicht mehr vor dem Zelltod schützen. Höchstwahrscheinlich ist dies eine Konsequenz der stärkeren Zell-Zell und Zell-Matrix Adhäsion der Nrf3-defizienten Keratinozyten, was mit den von uns gezeigten erhöhten Integrin-Spiegeln und verstärkter Aktivierung der „Focal adhesion kinase“ (FAK) übereinstimmen würde.

Unsere Beobachtungen implizieren also, dass die basale Expression von Nrf3 das Auslösen der Apoptose nach UV-Bestrahlung vereinfacht und dadurch vermutlich eine Ansammlung von mutierten basalen Zellen in der Epidermis verhindert, was zugleich das Risiko für einen Hauttumor verringert. Dies ist besonders interessant, da UV-Strahlung eines der wichtigsten Karzinogene ist und auch heute noch 2-3 Millionen Menschen weltweit an nicht-melanozytärem Hautkrebs leiden. Auch ist im Kontext der Krebsentstehung immer noch sehr wenig über Nrf3 und seine Funktionen bekannt. Korrelierend mit öffentlich zugänglichen Daten fanden wir verglichen zu menschlichen Basalzellen der Epidermis niedrigere NRF3 Protein-Spiegel in Basalzellkarzinomen und noch niedrigere in Plattenepithelkarzinomen der Haut. Die mRNA-Spiegel von NRF3 hingegen waren zumindest in einem Teil der Plattenepithelkarzinome sogar erhöht. Dies deutet auf eine post-transkriptionale oder post-

translationale NRF3-Regulierung und/oder eine Expression einer mutierten Form hin.

Um eine potenzielle Funktion von Nrf3 bei der Pathogenese von Hautkrebs zu untersuchen, führten wir zwei verschiedene Tumor-Studien durch. Zuerst wurden Mäuse, denen Nrf3 fehlt, mit HPV8-transgenen Tieren verpaart. Letztere Mäuse exprimieren die frühe Genregion des Humanen Papillomavirus 8 (HPV8) spezifisch in Keratinozyten. Dies hat eine humane Relevanz, da die Infektion mit HPV8 beim Menschen mit epidermale Hautkrebs assoziiert wird. Jedoch konnten unsere Ergebnisse in diesem Modell keinen Effekt von Nrf3 auf die Hautkrebs-Bildung oder das Wachstum bereits entstandener Tumore zeigen. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die stark tumorfördernden HPV8 Gene potenzielle Effekte von Nrf3 überdecken. Aus Tierschutz-Gründen mussten die Mäuse auch zu einem relativ frühen Zeitpunkt euthanisiert werden und somit konnte höchstwahrscheinlich eine mögliche maligne Konversion noch gar nicht stattfinden. Bei chemisch induzierter Hautkarzinogenese fanden wir jedoch nicht nur signifikant grössere Papillome, sondern auch eine erhöhte maligne Konversion der Tumore. Beim Fehlen von Nrf3 entwickelten sich 20% aller Tumore, jedoch nur 2.5% der Tumore in Wildtyp-Mäusen, zu Plattenepithelkarzinomen. Dies ist erstaunlich hoch, da insbesondere in dem verwendeten genetischem Hintergrund C57BL/6 sehr selten maligne Tumore entstehen. Dieser starke Effekt findet seinen Ursprung möglicherweise in der erhöhten Zellteilung in Papillomen der Nrf3-ko Mäuse oder im anti-apoptotischen Effekt der Nrf3-Defizienz, welcher wiederum zur Ansammlung von tumorfördernden Mutationen führen kann. Unsere Ergebnisse aus *in vitro* Studien zeigten zudem eine erhöhte Migrations-Rate der Nrf3-defizienten Keratinozyten, was eine Erklärung für die erhöhte Invasivität der Tumorzellen darstellen könnte. Die verstärkte Migration ist wiederum möglicherweise gekoppelt mit der Beteiligung von Nrf3 an Zell-Adhäsion, Integrin-Expression und nachgeschalteten Signalwegen.

Zusammenfassend konnten die in dieser Doktorarbeit erzielten Erkenntnisse zeigen, dass Nrf3 in basalen Keratinozyten als Antwort auf toxische Einflüsse eine pro-apoptotische Funktion ausübt und dadurch vermutlich eine Akkumulation von geschädigten/mutierten Zellen in der Epidermis verhindert. Nrf3 agiert dementsprechend als ein Tumor-Suppressor in der Haut und könnte somit ein klinisch interessantes Target darstellen für die Behandlung von Tumorstufen und möglicherweise sogar von bereits malignen Hauttumoren.