



Doctoral Thesis

Functional Characterization of the Ubiquitin Ligase Nedd4-1 in Skin Homeostasis and Repair

Author(s):

Yan, Shen

Publication Date:

2020

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-b-000464537> →

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. 27252

Functional characterization of the ubiquitin ligase Nedd4-1 in skin homeostasis and repair

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

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

Shen Yan

Master of Natural Science, Xiamen University

born on 25.12.1989

citizen of the People's Republic of China (PRC)

accepted on the recommendation of

Prof. Dr Sabine Werner, examiner

Prof. Dr. Cornelia Halin Winter, co-examiner

Prof. Dr. Liliane Michalik, co-examiner

2020

(Year of acceptance of the doctoral thesis by the Department Conference)

Summary

The skin is the largest organ of the body and forms a protective barrier against invading pathogens, allergens, and toxins, as well as harmful UV irradiation, and it protects from excessive water loss from the inside. Any insult to this barrier is therefore a major challenge and requires rapid and efficient repair.

Wound healing is a complex and dynamic biological process, and various cellular pathways are activated after injury to restore tissue integrity. Different cell types, including keratinocytes, fibroblasts, endothelial cells and immune cells, migrate, proliferate and differentiate to reach this goal. These cells produce various growth factors and cytokines, which are important for intercellular communication. An imbalance in the regulation and expression pattern of these signaling molecules causes impaired repair and even results in the formation of non-healing ulcers. Interestingly, it has recently been shown that growth factor signaling is regulated by various types of post-translational protein modifications. One of them is protein ubiquitination, and the previous work of our laboratory identified the ubiquitin ligase Nedd4-1 as a positive regulator of epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling with a key function in liver regeneration. However, the function of the E3 ubiquitin ligase Nedd4-1 in the skin has not been well studied. Therefore, this thesis project aimed to study the function of Nedd4-1 in skin development, homeostasis, injury and repair.

Expression studies revealed that Nedd4-1 is strongly expressed in the epidermis and even more in the dermis of mouse skin as well as in cultured keratinocytes and fibroblasts. This is functionally relevant, since knockout of Nedd4-1 in keratinocytes or fibroblasts and other mesenchymal cells in mice had various severe consequences. Mice with Nedd4-1 deficiency in keratinocytes exhibit reduced epidermal thickness and attenuated terminal differentiation of keratinocytes as well as abnormalities in hair follicle cycling. In particular, healing of full-thickness excisional wounds was strongly impaired in the mutant mice, mainly as a result of impaired re-epithelialization, but also of reduced wound contraction. The re-epithelialization defect resulted from reduced proliferation and migration of keratinocytes as shown *in vivo* and in knock-down studies with cultured keratinocytes. Loss of Nedd4-1 in keratinocytes also aggravated UVB-induced keratinocyte apoptosis. Functional *in vitro* studies suggest that the beneficial activities of Nedd4-1 in wound repair and UV response are at least in part mediated by impaired EGFR-induced Erk1/2 signaling. These results identify a crucial function of Nedd4-1 in epidermal homeostasis, UV response and wound healing.

Knockout of Nedd4-1 in mesenchymal cells caused early postnatal lethality, and E18.5 embryos exhibited strong growth retardation and malformation of various organs. In particular, bone and lung development were impaired in the mutant mice. The skin of these mice exhibited dermal atrophy, and concomitantly severe impairments of keratinocyte differentiation, resulting in a hyperthickened epidermis. These abnormalities are at least in part a consequence of the reduced proliferation and migration of Nedd4-1-deficient fibroblasts, as revealed by knock-down studies in cultured fibroblasts. The reduction in the number of fibroblasts and/or abnormal function of these cells is likely to affect the epidermis by alterations in paracrine-acting factors or extracellular matrix proteins. Impaired EGFR – Erk1/2 signaling is a possible cause for the proliferation and migration deficiency of Nedd4-1 deficient fibroblasts, although additional, as yet unknown mechanisms may well be involved.

Taken together, the results of this thesis revealed novel roles of Nedd4-1 in fibroblasts and keratinocytes, which are relevant for skin development, wound healing and UVB response, and they emphasize the relevance of protein ubiquitination in these processes.

Zusammenfassung

Die Haut ist das grösste Organ des menschlichen Körpers und bildet eine schützende Barriere gegen Krankheitserreger, Allergene, und Giftstoffe. Sie schützt zudem vor schädlicher UV-Strahlung und vor zu starkem Wasserverlust. Jede Verletzung dieser Barriere muss daher rasch und effizient repariert werden.

Die Wundheilung der Haut ist ein komplexer und dynamischer Prozess, während dessen viele zelluläre und molekulare Signalwege aktiviert werden, um die Integrität des Gewebes wiederherzustellen. Verschiedene Zelltypen, insbesondere Keratinozyten, Fibroblasten, Endothelzellen und Immunzellen, wandern in die Wunde ein, teilen sich und differenzieren, um dieses Ziel zu erreichen. Diese Zellen produzieren verschiedene Wachstumsfaktoren und Zytokine, die wichtig sind für die interzelluläre Kommunikation. Ein Ungleichgewicht im Expressionsmuster dieser Signalmoleküle verursacht Wundheilungsstörungen und kann zur Bildung von nicht heilenden Geschwüren führen.

Interessanterweise konnte kürzlich gezeigt werden, dass die Wachstumsfaktor-Wirkung durch verschiedene posttranslationale Proteinmodifikationen reguliert werden kann. Eine davon ist Protein-Ubiquitylierung, und vorausgehende Arbeiten identifizierten die Ubiquitin-Ligase Nedd4-1 als einen positiven Regulator der Signaltransduktion durch den Rezeptor für den Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF). Unsere Arbeitsgruppe hat gezeigt, dass dieser Regulations-Mechanismus für die Leberregeneration von entscheidender Bedeutung ist. Über die Funktion von Nedd4-1 in der Haut und bei der Wundheilung ist jedoch bisher sehr wenig bzw. gar nichts bekannt. Daher war es das Ziel dieser Doktorarbeit, die Funktion von Nedd4-1 bei der Entwicklung, Homöostase, Verletzung und Reparatur der Haut zu untersuchen.

Expressions-Untersuchungen zeigten, dass Nedd4-1 in der Epidermis und noch stärker in der Dermis der Mauhaut exprimiert wird, sowie in kultivierten Keratinozyten und Fibroblasten. Dies ist funktionell relevant, da der Knockout von Nedd4-1 in Keratinozyten oder Fibroblasten und anderen mesenchymalen Zellen von Mäusen schwerwiegende Konsequenzen hatte. Mäuse, denen Nedd4-1 in Keratinozyten fehlt, zeigten eine reduzierte epidermale Dicke und eine defekte terminale Differenzierung der epidermalen Keratinozyten, sowie Abnormitäten im Haarzyklus. Insbesondere war die Heilung von Exzisions-Hautwunden verzögert, was auf Defekten in der Re-epithelialisierung sowie der Wundkontraktion beruht. Der Re-epithelialisierungs-Defekt basiert auf der verlangsamten Migration und Teilung von Keratinozyten, was sowohl im Wundgewebe der Knockoutmäuse also auch in kultivierten Keratinozyten mit Nedd4-1 Knock-down gezeigt werden konnte. Der Verlust von Nedd4-1 in Keratinozyten führte auch zu einer verstärkten UVB-induzierten Apoptose dieser Zellen *in vivo*. Resultate, die in funktionellen *in vitro* Experimenten erzielt wurden, sprechen dafür, dass die Wundheilungsstörung und die verstärkte UV-induzierte Apoptose in Nedd4-1 Knockoutmäusen möglicherweise zumindest teilweise auf eine weniger effiziente Aktivierung des Erk1/2 Signalweges durch den EGF Rezeptor zurückzuführen ist.

Der Knockout von *Nedd4-1* in mesenchymalen Zellen führte dazu, dass die Mäuse während der späten embryonalen Entwicklung oder direkt nach der Geburt starben. Achtzehn Tage alte Embryonen zeigten deutliche Entwicklungsstörungen in verschiedenen Organen. Auffallend waren die Knochenabnormitäten sowie Defekte in der Lunge, und auch die Haut zeigte eine stark reduzierte Zellularität in der Dermis und eine verdickte Epidermis. Die dermalen Defekte sind

vermutlich auf die verlangsamte Migration und Teilung von Nedd4-1-defizienten Fibroblasten zurückzuführen, wie in Nedd4-1 Knock-down Experimenten mit kultivierten Hautfibroblasten gezeigt werden konnte. Die Reduktion der Zahl der Fibroblasten oder funktionelle Defekte dieser Zellen könnten dann zu einer reduzierten Produktion von parakrin wirkenden Faktoren oder extrazellulären Matrixproteinen führen, welche wiederum die Epidermis beeinflussen. Die ineffiziente Erk1/2 Aktivierung durch den EGF Rezeptor ist auch hier ein möglicher Grund für die Abnormitäten in den Fibroblasten, obwohl vermutlich noch weitere, bisher unbekannt Mechanismen involviert sind.

Zusammenfassend konnten in dieser Doktorarbeit wichtige Funktionen von Nedd4-1 in Fibroblasten und Keratinozyten identifiziert werden, die von grosser Relevanz sind für die Hautentwicklung, die Wundheilung und die UV Antwort der Haut. Dies zeigt die grosse Bedeutung von Protein-Ubiquitylierung bei diesen Prozessen.