

Diss. ETH No 14346

Activin and TGF- β regulated genes in
keratinocytes and their role in
cutaneous wound repair

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY
for the degree of
Doctor of Natural Science

presented by
Silke Werner

Diploma in Chemistry, Ludwig-Maximilians Universität, München
born April 2nd, 1973
from Germany

accepted on recommendation of
Prof. Dr. Sabine Werner, examiner
Prof. Dr. Hans M. Eppenberger, co-examiner
2001

1 Zusammenfassung

Die Wachstums- und Differenzierungsfaktoren Activin und TGF- β , zwei Mitglieder der TGF- β Superfamilie, spielen in der Wundheilung der Haut eine wichtige Rolle. Beide Faktoren sind in der Lage, den Wundheilungsprozess zu beschleunigen. Während bereits zahlreiche Funktionen von TGF- β während des Reparaturprozesses bekannt sind, wie z.B. die Steuerung der Synthese extrazellulärer Matrixproteine oder die Regulation der Zellmigration, ist bisher nur wenig über die Funktion von Activin bekannt.

Sowohl Activin als auch TGF- β beeinflussen den Reepithelialisierungs-Prozess. *In vitro* Experimente haben gezeigt, dass beide Faktoren unterschiedliche Effekte auf Keratinozyten ausüben. Während Activin hauptsächlich die Differenzierung dieser Zellen fördert, ist es die Hauptaufgabe von TGF- β , ihr Zellwachstum zu stoppen. Um die molekulare Wirkungsweise dieser beiden Faktoren in Keratinozyten genauer zu untersuchen, war es daher Ziel dieser Arbeit, Gene zu identifizieren, die in den Epithelzellen durch Activin oder TGF- β reguliert werden.

Hierfür wurden drei verschiedene Ansätze gewählt. Es wurden die *Differential Display Reverse Transcription* (DDRT) PCR-Technik verwendet und es wurde ein käuflich erwerblicher Atlas-Filter hybridisiert. Weiterhin wurden verschiedene Differenzierungsmarker auf Expressionsänderungen nach Wachstumsfaktorbehandlung untersucht. Um eine mögliche Regulation der identifizierten Zielgene durch Activin und TGF- β *in vivo* zu bestimmen, wurde deren Expression anschliessend während des Wundheilungsprozesses analysiert.

Mit Hilfe der DDRT-PCR-Technik konnte das *Keratin 15* Gen als TGF- β reguliertes Gen identifiziert werden. Keratin 15 ist ein Bestandteil des Cytoskeletts der Basalzellen vielschichtiger Epithelien. Die Expression von *Keratin 15* mRNA wurde in Keratinozyten durch TGF- β und TNF- α , wie auch in geringem Masse durch KGF und EGF reprimiert. Im Gegensatz dazu wurde die Expression von *Keratin 14*, dem bedeutendsten Typ I Keratin der Basalzellen, durch TGF- β induziert. Übereinstimmend mit den *in vitro* Daten wurde die *Keratin 15* Expression während des

Wundheilungsprozesses reprimiert, dagegen aber die *Keratin 14* Expression induziert. Mittels Immunfluoreszenz konnte gezeigt werden, dass Keratin 15 in allen, an die Wunde angrenzenden Basalzellen der Epidermis exprimiert wird, nicht aber in dem hyperproliferativen Epithel über dem Granulationsgewebe. Diese Ergebnisse zeigen, dass Keratin 15, möglicherweise als Folge der erhöhten Wachstumsfaktorexpression in der verwundeten Haut, nicht in den aktivierten Keratinozyten des verdickten Wundepithels exprimiert wird.

Die Analyse verschiedener Differenzierungsmarker nach Wachstumsfaktorbehandlung ergab, dass Mad1, der Antagonist des Transkriptionsfaktors c-Myc, durch Activin und TGF- β in Keratinozyten induziert wird. Mittels eines *solid phase DNA binding assays* konnte gezeigt werden, dass nach Wachstumsfaktor-Behandlung die Menge an DNA-gebundenem Mad1 ansteigt. In Übereinstimmung mit den *in vitro* Daten wird die *Mad1* Expression während des Wundheilungsprozesses deutlich induziert. *In situ* Hybridisierung ergab, dass *mad1* in polymorphkernigen Leukozyten und in den suprabasalen Keratinozyten des hyperproliferativen Epithels exprimiert wird. Grössere Mengen an *mad1* mRNA konnten weiterhin in dem hyperproliferativen Epithel von Psoriasis-Patienten detektiert werden. Da Mad1 das Zellwachstum und/oder die Differenzierung verschiedener Zelltypen reguliert, sprechen diese Ergebnisse dafür, dass die Zellwachstums-inhibierenden und/oder Differenzierungs-induzierenden Funktionen von Activin und TGF- β zumindest partiell durch Mad1 vermittelt werden.

Mittels des käuflich erwerblichen Atlas-Filters konnten vier potentielle Activin-regulierte Gene identifiziert werden. Die meisten dieser Gene spielen in der Zellwachstums- und/oder Differenzierungsregulation von Keratinozyten eine Rolle. Eines dieser Gene kodiert für Id-1, ein Protein der Id-Familie. Id-Proteine fungieren als negative Regulatoren der *basic helix-loop-helix* (bHLH) Transkriptionsfaktoren. Sie fördern das Zellwachstum und inhibieren die Differenzierung der Keratinozyten. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression der *Id-1* mRNA sowohl durch TGF- β als auch durch Activin reprimiert wird.

Mittels der DDRT-Technik wurde *Leu-13* als falsch positives TGF- β reguliertes Gen identifiziert. Hierbei handelt es sich um ein durch Interferon induzierbares Oberflächenprotein, das das Zellwachstum und die Zelladhäsion verschiedener Zellarten reguliert. Untersuchungen ergaben, dass *Leu-13*, das bisher nicht als in Keratinozyten exprimiertes Gen beschrieben wurde, in diesen Zellen durch wachstumshemmende Cytokine wie TNF- α induziert wird. Um eine mögliche Regulation von *Leu-13* durch Cytokine *in vivo* zu bestimmen, wurde die *Leu-13* Expression während des Wundheilungsprozesses analysiert. Sie stieg nach Verwundung signifikant an. Mittels *in situ* Hybridisierung wurde deutlich, dass *Leu-13* mRNA in den Entzündungszellen des Granulationsgewebes zu finden ist. Untersuchungen der *Leu-13* Expression in der entzündlichen Darmerkrankung Morbus Crohn ergaben, dass *Leu-13* sehr stark in den, in das kranke Gewebe einwandernden, Entzündungszellen exprimiert wird. Diese Ergebnisse weisen daraufhin, dass die *Leu-13* Expression ein Merkmal inflammatorischer Prozesse ist und möglicherweise als Entzündungsmarker verwendet werden kann.

Zusammenfassend kann man sagen, dass Activin, im Gegensatz zu TGF- β , in Keratinozyten nur eine geringe Zahl an Genen reguliert. Fast alle der identifizierten Gene kodieren für Proteine, die die Proliferation und Differenzierung von Keratinozyten beeinflussen. Dies weist darauf hin, dass die Regulation der Differenzierung und/oder Proliferation die Hauptaufgabe von Activin in diesem Zelltyp ist. TGF- β dagegen kontrolliert die Expression zahlreicher Proteine, die verschiedenste Funktionen übernehmen und scheint daher eine deutlich umfassendere Aufgabe in Keratinozyten zu übernehmen.

2 Summary

Activin and TGF- β , two members of the TGF- β superfamily, are important modulators of tissue repair. Both can accelerate the wound healing process. Whereas various functions of TGF- β during the repair process are known, including for example promotion of extracellular matrix synthesis and regulation of cell migration, little is as yet known about the function of activin.

Both growth factors are important for the reepithelialization process of wounds. However, *in vitro* experiments have revealed differences in the action of activin and TGF- β on keratinocytes. Activin mainly induces the differentiation of keratinocytes, whereas TGF- β stops the proliferation of these cells. To get more information about the molecular mechanisms of activin and TGF- β action in keratinocytes, I attempted to identify genes, which are regulated by these two growth factors. For this purpose, three methods were used: the differential display RT-PCR technology and the hybridization of a cDNA array. Furthermore, the expression of known differentiation markers was analyzed after growth factor treatment. To determine a potential role of activin and TGF- β in the regulation of these genes *in vivo*, we analyzed their expression during the wound healing process where high levels of both growth factors are present.

Using the differential display RT-PCR technology, we identified *keratin 15* as a gene that is downregulated by TGF- β 1. Keratin 15 is a component of the cytoskeleton of basal cells in stratified epithelia. Expression of *keratin 15* was also suppressed by TNF- α and to a lesser extent by EGF and KGF. In contrast, the major basal type I keratin K14 was upregulated by TGF- β and not regulated by the other growth factors. Consistent with the *in vitro* data we found a suppression of *keratin 15* during the wound healing process, whereas *keratin 14* expression was weakly upregulated. Immunostaining revealed the presence of K15 in all basal cells of the epidermis adjacent to the wound, but not in the hyperproliferative epithelium above the granulation tissue. These results demonstrate that *keratin 15* expression is excluded from the activated keratinocytes of the hyperthickened

wound epithelium, possibly as a result of increased growth factor expression in injured skin.

Analyzing various differentiation markers for their growth factor regulation, we identified Mad1, the antagonist of the transcription factor c-Myc, as the product of an activin A and TGF- β 1 upregulated gene. Expression and activity of Mad1 was strongly induced by both factors, although the intensity of the induction was different for activin and TGF- β . To determine a possible role of both factors in the regulation of *mad1* expression *in vivo*, we analyzed *mad1* expression during cutaneous wound repair when high levels of these factors are present. Expression of *mad1* mRNA and protein, but not of other *mad* genes, increased significantly after skin injury, particularly in polymorphonuclear leukocytes and in suprabasal keratinocytes of the hyperproliferative epithelium. Elevated levels of *mad1* mRNA were also detected in the hyperproliferative epithelium of patients suffering from the inflammatory and hyperproliferative skin disease psoriasis. Since Mad1 regulates proliferation and/or differentiation of various cell types, our results indicate, that it mediates, at least in part, the proliferation-inhibiting and/or differentiation-inducing activities of activin and TGF- β .

Hybridization of a cDNA array with cDNAs from quiescent and activin A-regulated keratinocytes revealed four potentially activin regulated genes. Most of them are involved in the regulation of proliferation and/or differentiation of keratinocytes. We particularly analyzed the expression of Id-1, a protein of the Id-protein family. Id proteins are negative regulators of basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factors and, therefore, promote cell growth and inhibit differentiation of various cell types. We could demonstrate a downregulation of *id-1* mRNA expression by activin A and TGF- β 1 in keratinocytes.

Using the differential display RT-PCR technology, we identified *leu-13* as a false positive TGF- β regulated gene. Leu-13 is an interferon-induced cell surface protein which triggers growth inhibition and cell adhesion of various cell types. During our studies it turned out that *leu-13* is expressed by keratinocytes, in particular upon

treatment of these cells with TNF- α and interferon- α . This indicates that Leu-13 plays a role in the inhibition of keratinocyte proliferation. To analyze a potential regulation of *leu-13* by cytokines *in vivo*, we investigated *leu-13* expression during the tissue repair process. *Leu-13* expression was significantly upregulated after skin injury. *In situ* hybridization revealed expression of *leu-13* in inflammatory cells of the granulation tissue. Furthermore, we investigated the expression of *leu-13* in the inflammatory bowel disease Crohn's disease. We could demonstrate an expression of *leu-13* mRNA in the infiltrating inflammatory cells of the gut.

Our studies demonstrate a strong upregulation of *leu-13* expression in inflammatory processes, suggesting that *leu-13* expression can be used as an inflammatory marker.

In summary, the results presented in this thesis demonstrate that activin regulates, very few genes in keratinocytes. Most of these genes are involved in the regulation of proliferation and differentiation of this cell type. This result indicates that the major function of activin in keratinocytes is the regulation of differentiation and/or proliferation. By contrast, TGF- β was shown to regulate a large number of genes which encode proteins involved in various cellular processes, indicating that TGF- β regulates multiple functions in keratinocytes.