

DISS. ETH NO. 30067

UNRAVELING THE INTERPLAY BETWEEN FGF AND NRF2 IN INFLAMMATORY SKIN DISEASES

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

MICHAEL ULRICH KOCH
M.Sc. in Regenerative Biology and Medicine,
TU Dresden

born on 22.09.1994

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Sabine Werner, examiner
Prof. Dr. Nancy Hynes, co-examiner
Prof. Dr. Michael Detmar, co-examiner

2024

II. SUMMARY

The skin is the largest and outermost organ in mammals and serves a large variety of functions, including temperature regulation, sense of mechanical stimuli, and most importantly formation of a protective barrier. It can be subdivided into the epidermis, in which keratinocytes are the primary cell type, the underlying dermis, and the lowest layer - the hypodermis. The skin can be affected by various diseases, which often cause a severe burden for the patients and strongly impact the quality of life.

The most common chronic inflammatory skin disease is atopic dermatitis (AD), which affects at least 230 million people worldwide. It is a relapsing disease characterized by recurrent eczematous lesions, erythroderma, intense itch and discomfort. The pathophysiology of AD is complex, multifactorial and highly heterogeneous, and involves genetic predisposition as well as environmental factors. Epidermal barrier dysfunction and immunological alterations promoting a heightened type 2 response have been recognized as crucial drivers of the disease. Due to its complex nature, AD pathogenesis is still incompletely understood. Until today, the disease cannot be cured, and the available treatments only ameliorate the symptoms. Genetic studies indicate a pivotal role of defects in keratinocytes in the pathogenesis of AD. However, the global changes of the proteome of the entire epidermis remained unknown.

Our laboratory previously used a pressure-cycling technology and data-independent acquisition approach to generate the first quantitative proteomics dataset of epidermis from healthy volunteers and from lesional and non-lesional skin of AD patients. Validation was performed using targeted proteomics with parallel reaction monitoring mass spectrometry. In my thesis project, I analyzed these proteomics data, and I verified some of the hit proteins by immunofluorescence staining. This analysis identified impaired activation of the NRF2-antioxidant pathway and a reduced abundance of mitochondrial proteins involved in key metabolic pathways in the affected epidermis. Knock-down of NRF2 in primary human keratinocytes by small interfering RNAs revealed that NRF2 controls the expression of a small subset of mitochondrial genes, and reduction of NRF2 activity reduced the concentrations of intracellular ATP.

To study the role of NRF2 in the context of skin inflammation and to determine if the down-regulation of NRF2 activity in the epidermis of AD patients is functionally relevant, I made use of a mouse model that exhibits various features resembling AD in humans. These mice, designated K5-R1/R2 mice, lack fibroblast growth factor receptors 1 and 2 (Fgfr1 and Fgfr2) in keratinocytes. I found an age-dependent down-regulation of Nrf2 activity in the epidermis of these mice, which correlated with disease progression. This was associated with increased DNA damage and senescence. Additional loss of Nrf2 in keratinocytes of these mice, which was achieved by breeding with conditional *Nrf2* knockout mice, mildly aggravated the phenotype. Surprisingly, long-term genetic activation of Nrf2 in keratinocytes of K5-R1/R2 mice caused

SUMMARY

severe hyperkeratosis, keratinocyte hyperproliferation, epidermal thickening, as well as increased keratinocyte apoptosis, DNA damage and senescence, which were at least in part a consequence of excessive upregulation of certain cornified envelope proteins. However, time-limited pharmacological activation of Nrf2 in the skin of adult K5-R1/R2 mice promoted skin barrier function and protected from DNA damage. This protective activity of Nrf2-activating compounds was even more pronounced in *Spink5* knockout mice, a mouse model for Netherton syndrome. Previous studies from our laboratory showed that this treatment significantly alleviates the cutaneous phenotype of *Spink5* knockout mice and promotes attachment of the *stratum corneum* and concomitant epidermal barrier function. I contributed to this work by showing that Nrf2 activation induces overexpression of secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI), a known inhibitor of kallikrein 7 and elastase 2, in human keratinocytes *in vitro*. In the *Spink5*-deficient epidermis, upregulation of *Sipi* is likely to promote stabilization of corneodesmosomes, thereby preventing premature desquamation.

Besides NRF2, analysis of published transcriptome data revealed downregulation of *FGFR2* expression in the epidermis of lesional skin of AD patients. This is of likely importance for the disease phenotype, because mice lacking *Fgfr1* and *Fgfr2* in keratinocytes develop AD-like symptoms. To study the relevance of FGFR signaling for skin inflammation in humans, we established a genetic *in vitro* model. Through CRISPR/Cas9-mediated *FGFR2* knockout in the human HaCaT keratinocyte cell line, we abrogated the activity of FGF7 and FGF10 to induce cell signaling, migration and proliferation of keratinocytes, without triggering compensatory upregulation of other FGF receptors. Rather, loss of *FGFR2* suppressed the expression of *FGFR3*. Most importantly, the knockout of *FGFR2* promoted the expression of interferon-stimulated genes under homeostatic conditions and in response to inflammatory mediators. This activity is likely to further aggravate the inflammatory phenotype in an *in vivo* setting.

Taken together, the results obtained in this thesis provide insight into the molecular mechanisms underlying the pathogenesis of AD and identify NRF2 and FGFR2 as potential targets for future therapeutic applications. In particular, we propose restricted activation of NRF2 as a possible therapy for this common inflammatory skin disease.

III. Zusammenfassung

Die Haut ist das größte Organ von Säugetieren und erfüllt eine Vielzahl von Funktionen, darunter die Regulation der Körpertemperatur, die Wahrnehmung mechanischer Reize und vor allem die Bildung einer schützenden Barriere. Sie wird in drei Schichten unterteilt - die Epidermis, in der Keratinozyten der bei weitem häufigste Zelltyp sind, die darunterliegende Dermis, und die unterste Schicht - die Hypodermis. Die Haut kann von einer Vielzahl von Krankheiten betroffen sein, die häufig eine schwere Belastung für die Patienten darstellen und deren Lebensqualität stark beeinträchtigen.

Die häufigste chronisch entzündliche Hauterkrankung ist die atopische Dermatitis (AD), die mindestens 230 Millionen Menschen weltweit betrifft. Es handelt sich um eine rezidivierende Krankheit, die durch wiederkehrende ekzematöse Läsionen, Erythrodermie, und starken Juckreiz gekennzeichnet ist. Die Pathophysiologie der AD ist komplex, multifaktoriell und hoch heterogen und umfasst genetische Prädisposition sowie Umweltfaktoren. Eine Dysfunktion der epidermalen Barriere und immunologische Veränderungen, die eine verstärkte Typ-2 Antwort fördern, wurden als entscheidende Treiber der Krankheit identifiziert. Aufgrund ihrer komplexen Natur ist die Pathogenese der AD noch immer unvollständig verstanden. Bis heute kann die Erkrankung nicht geheilt werden, und die verfügbaren Therapien lindern nur die Symptome. Genetische Studien deuten auf eine entscheidende Rolle von Defekten in den Keratinozyten bei der Pathogenese der AD hin. Die globalen Veränderungen des Proteoms der gesamten Epidermis waren jedoch bisher unbekannt.

Unser Labor konnte unter Verwendung einer Druckzyklustechnologie und eines Daten-unabhängigen Erfassungsansatzes den ersten quantitativen Proteom-Datensatz der Epidermis von gesunden Probanden sowie von läsionaler und nicht läsionaler Haut von AD-Patienten generieren. Die Validierung erfolgte durch zielgerichtete Proteomik mit paralleler Reaktionsüberwachung mittels Massenspektrometrie. In meiner Dissertation habe ich diese Proteom-Daten analysiert und einige der identifizierten Proteine durch Immunfluoreszenzfärbung validiert. Dadurch konnten wir eine beeinträchtigte Aktivierung des NRF2-Antioxidationswegs sowie eine mitochondriale Dysfunktion in der betroffenen Epidermis identifizieren. Der Knock-down von NRF2 in primären humanen Keratinozyten mittels «small interfering RNAs» hat gezeigt, dass NRF2 die Expression einer Untergruppe von mitochondrialen Genen kontrolliert. Zudem führte die Verminderung der NRF2-Aktivität zu einer Reduktion der intrazellulären Konzentration von ATP.

Um die Rolle von NRF2 im Zusammenhang mit Hautentzündungen zu untersuchen und um herauszufinden, ob die reduzierte NRF2-Aktivität in der Epidermis von AD-Patienten funktionell relevant ist, habe ich ein Mausmodell verwendet, das zentrale Merkmale des humanen AD Phänotyps aufweist. Diese Mäuse, als K5-R1/R2-Mäuse bezeichnet, weisen eine selektive Deletion der Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptoren 1 und 2 (Fgfr1 und Fgfr2) in Keratinozyten auf. Ich habe eine

Zusammenfassung

altersabhängige Herunterregulierung der Nrf2-Aktivität in der Epidermis dieser Mäuse festgestellt, die mit dem Krankheitsverlauf korreliert. Dies geht mit vermehrtem DNA-Schaden und Seneszenz einher. Ein zusätzlicher Verlust von Nrf2 in den Keratinozyten dieser Mäuse, der durch die Kreuzung mit Keratinozyten-spezifischen Nrf2-Knockout-Mäusen erreicht wurde, führte zu einer leichten Verstärkung des Phänotyps. Überraschenderweise führte eine langfristige genetische Aktivierung von Nrf2 in den Keratinozyten von K5-R1/R2-Mäusen zu schwerer Hyperkeratose, Keratinozyten-Hyperproliferation, epidermaler Verdickung sowie vermehrter Keratinozyten-Apoptose, DNA-Schaden und Seneszenz, was zumindest teilweise auf eine übermäßige Hochregulierung bestimmter Proteine der Hornschicht zurückzuführen war. Eine zeitlich begrenzte pharmakologische Aktivierung von Nrf2 in der Haut von adulten K5-R1/R2-Mäusen förderte jedoch die Hautbarrierefunktion und schützte vor DNA-Schäden. Diese protektive Funktion von Nrf2-aktivierenden Substanzen war noch ausgeprägter bei *Spink5*-Knockout-Mäusen, einem Mausmodell für das Netherton Syndrom. Frühere Studien unseres Labors haben gezeigt, dass topische Behandlung mit NRF2 Aktivatoren den Haut-Phänotyp dieser Mäuse signifikant lindert und die Stabilisierung der Hornschicht sowie die damit verbundene epidermale Barrierefunktion fördert. Ich konnte hierbei zeigen, dass die Aktivierung von NRF2 die Überexpression des sekretorischen Leukozyten-Proteaseinhibitors (SLPI), welcher Kallikrein 7 und Elastase 2 inhibiert, in humanen Keratinozyten *in vitro* induziert. In der *Spink5*-defizienten Epidermis fördert die Hochregulierung von SLPI vermutlich die Stabilisierung von Corneodesmosomen und verhindert somit eine vorzeitige Ablösung der Hornschicht.

Neben NRF2 hat die Analyse von veröffentlichten Transkriptom-Daten eine Herunterregulierung der FGFR2-Expression in der Epidermis von läSIONALER Haut von AD Patienten gezeigt. Dies ist vermutlich relevant für den Krankheitsphänotyp, da Mäuse mit einem Knockout von *Fgfr1* und *Fgfr2* in Keratinozyten AD-ähnliche Symptome entwickeln. Um die Relevanz des FGFR-Signalweges für Hautentzündungen beim Menschen zu untersuchen, haben wir ein genetisches *in vitro* Modell etabliert. Durch einen CRISPR/Cas9-vermittelten FGFR2-Knockout in der humanen HaCaT Keratinozyten-Zelllinie blockierten wir den Effekt von FGF7 und FGF10 auf die zelluläre Signaltransduktion, sowie auf die Migration und Proliferation von Keratinozyten, ohne eine kompensatorische Hochregulierung anderer FGF-Rezeptoren auszulösen. Vielmehr unterdrückte der Verlust von FGFR2 die Expression von *FGFR3*. Insbesondere wurde durch den Knockout von *FGFR2* die Expression Interferon-regulierter Gene unter homöostatischen Bedingungen und als Reaktion auf entzündliche Mediatoren gefördert. Diese Aktivität dürfte den entzündlichen Phänotyp in einem *in vivo*-Setting weiter verstärken.

Zusammenfassend liefern die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse Einblicke in die molekularen Mechanismen, die der Pathogenese von AD zugrunde liegen, und identifizieren NRF2 und FGFR2 als potenzielle Zielmoleküle für zukünftige therapeutische Ansätze. Insbesondere schlagen wir eine limitierte Aktivierung von NRF2 als mögliche Therapie für diese weitverbreitete entzündliche Hauterkrankung vor.