

Abstract

Apicobasal polarity of the mammalian epidermis is mediated by a highly conserved set of polarity proteins which act in complexes. In collaboration with two other ternary complexes (the Crumbs and Scribble complexes), the apical Par complex regulates the asymmetric distribution of cellular components throughout epithelia. Par3 is a core feature of that complex. From a mouse model with a keratinocyte-specific deletion of Par3 (*Par3^{eKO}* mice) it is known that it safeguards tissue homeostasis through correct tight junction assembly and balanced cell fate decisions by ensuring correct chromosome partitioning during mitosis. In addition, tissue homeostasis relies on intercellular communication- both between the same types of cell and different ones. Recently, it emerged that polarity proteins are also involved in that process. For Par3, a non-cell autonomous role for melanocyte behavior was discovered. Next to melanocytes, dendritic epidermal T cells (DETC) and Langerhans cells (LC) inhabit the epidermal niche. They share a dendritic morphology, but have different origin and functions. DETC support keratinocyte (KC) homeostasis and respond to stress-induced KC antigens by secretion of soluble factor (cytokines, chemokines and growth factors) as well as cell lysis. On the other hand, LC present antigens to naive T cells promoting peripheral tolerance against self-, commensal- and benign environmental antigens or protective immune responses upon an activating stimulus.

In this thesis, the role of epidermal Par3 for tissue-resident immune cells was investigated. In the *Par3^{eKO}* mouse model, postnatal loss of DETC (and to a lesser extent LC) was observed. The reduction of DETC could not be explained by proliferation defects or increased emigration rates. Instead, an increased sensitivity to cell death was found, which correlated with increased surface expression of death receptor CD95. Changes in DETC morphology upon loss of epidermal Par3 suggested an elevated state of activation. Using a stable DETC line (7-17), TCR stimulation in monocultures resulted in reduced cell viability (concurrent with CD95 upregulation). Hence, the possibility of activation-induced cell death in DETC in absence of epidermal Par3 was examined. In fact, in *in vitro* co-cultures inhibition of TCR signal transduction was sufficient to rescue DETC survival in presence of Par3 knock-out KC. Moreover, in a DETC-dependent manner, ~7% of *Par3^{-/-}* KC were found to express MHCII. In normal epidermis, MHCII expression is mainly confined to LC and cultured KC do not express surface MHCII at all. Induction of KC-intrinsic MHCII presentation required TCR signaling and was completely abrogated in presence of a neutralizing anti-IFN γ antibody, suggesting that paracrine IFN γ signaling downstream of DETC activation is essential for this. To test whether loss of epidermal Par3 reduces the threshold to skin inflammation, a model of irritant contact dermatitis was applied. Indeed, mice lacking KC-expressed Par3 responded with a pronounced percutaneous inflammatory responses (indicated by ear swelling and phenotypical

scoring) to topical 1-Fluoro-2,4-dinitrobenzene exposure. In challenged skin, the number of apoptotic epidermal cells was markedly increased in *Par3eKO* mice. Potentially, this is attributed to an enhanced cytolytic capacity of DETC in absence of epidermal Par3.

In conclusion, disruption of Par3-mediated polarity signaling might constitute a physiological alarm signal of tissue destruction for tissue-resident T cells. Thus, in the absence of damage, epidermal Par3 seems to prevent DETC from becoming activated and controls their effector functions (such as IFN γ release). The results suggest a novel role for epithelial polarity proteins as instructors of cutaneous immunity, and in addition, open up a new pathway for polarity proteins to support tissue homeostasis in health and inflammatory skin diseases. In particular, epidermal Par3 emerges as part of the „epiimmunome“.

Zusammenfassung

Apikobasale Polarität in der Epidermis von Säugetieren wird durch eine Reihe von stark konservierten Polaritätsproteinen vermittelt, die in Komplexen agieren. In Wechselwirkung mit zwei weiteren ternären Komplexen (dem Crumbs und dem Scribble Komplex) reguliert der apikale Par Komplex die ungleichmäßige Verteilung von zellulären Bestandteilen in Epithelen. Par3 ist zentraler Bestandteil des Komplexes. Von einem Mausmodell mit Keratinozyten-spezifischem Verlust von Par3 (*Par3^{eKO}* Mäuse) ist bekannt, dass Par3 die epidermale Homöostase sicherstellt, indem es zur korrekten Zusammensetzung von *Tight junctions*, sowie zu einer ausgeglichenen Differenzierungsrate von Keratinozyten (KC) beiträgt. Die epidermale Homöostase stützt sich außerdem auf die Kommunikation zwischen Zellen des gleichen, sowie unterschiedlichen Zelltyps. Es hat sich kürzlich herausgestellt, dass Polaritätsproteine eine wichtige Rolle in diesem Prozess spielen. Für Par3 wurde eine nicht-zellautonome Rolle für Melanozyten Homöostase beschrieben. Neben Melanozyten befinden sich auch die gewebeansässigen dendritischen epidermalen T Zellen (DETC) und Langerhans Zellen (LC) in der Epidermis. Diese Zelltypen teilen ihr dendritisches Aussehen, unterscheiden sich aber in ihrer Herkunft und Funktion. DETC spielen eine wichtige Rolle für die Keratinozyten-Homöostase und reagieren auf Stress-Antigene mit der Ausschüttung von entzündlichen Faktoren und Zytolyse. LC hingegen präsentieren Antigene für naive T Zellen und fördern die periphere Toleranz gegen gutartige Stoffe oder lösen nach Kontakt mit einem Aktivierungsstimulus eine protektive Immunantwort aus.

In dieser Doktorarbeit wurde die Rolle von epidermalem Par3 für gewebeansässige Immunzellen untersucht. In *Par3^{eKO}* Mäusen wurde ein postnataler Verlust an DETC festgestellt (und zu einem geringeren Ausmaß an LC). Die Reduktion der DETC konnte nicht durch einen Proliferationsdefekt oder eine gesteigerte Auswanderung der Zellen aus dem Gewebe begründet werden. Stattdessen wurde eine erhöhte Sensibilität der DETC für programmierten Zelltod beobachtet, welcher mit einer Erhöhung der Oberflächenexpression des „Todesrezeptors“ CD95 einherging. Veränderungen in der Morphologie der DETC deuteten auf eine gesteigerte immunologische Aktivierung der Zellen hin. Bei T-Zell-Rezeptor Stimulation einer stabilen DETC Linie (7-17) konnte eine Verringerung der Zellviabilität in Monokulturen festgestellt werden, die mit einer verstärkten Oberflächenexpression von CD95 auftrat. Auf Grundlage dieser Beobachtungen wurde getestet, ob in *Par3^{eKO}* Mäusen ein Aktivierungs-induzierter Zelltod der DETC vorliegt. Tatsächlich konnte das Überleben von DETC in Kokulturen mit Par3-defizienten KC durch die Zugabe eines Inhibitors der TCR-Signaltransduktion deutlich verbessert werden. Zudem wurde in Abhängigkeit von DETC die Expression von MHCII auf einem Teil (~7%) der *Par3^{-/-}* KC entdeckt. In normaler Epidermis ist die Expression von MHCII größtenteils auf LC beschränkt und kultivierte KC exprimieren kein

MHCII auf ihrer Oberfläche. Diese Induktion von MHCII-Präsentation in den KC war auf TCR Signaltransduktion und IFN γ Verfügbarkeit angewiesen, was darauf hindeutet, dass IFN γ Sekretion durch Aktivierung der DETC hierfür verantwortlich ist. Zuletzt wurde untersucht, inwiefern der Verlust von epidermalem Par3 die Pathophysiologie von irritativer Kontaktdermatitis beeinflusst. Mäuse ohne epidermales Par3 zeigten eine stärkere entzündliche Hautreaktion, gekennzeichnet durch eine größere Schwellung und phänotypische Ausprägung der Entzündungsreaktion nach Kontakt mit 1-Fluoro-2,4-dinitrobenzene. In gereizter Haut wurde außerdem eine erhöhte Anzahl an apoptotischen Zellen im Gewebe festgestellt, die (vermutlich) mit einer erhöhten zytotoxischen Aktivität der DETC in Abwesenheit von epidermalen Par3 einhergeht.

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass eine Störung des epidermalen Par3-Signalweges möglicherweise ein physiologisches Warnsignal bei Gewebeerstörung für umliegende gewebständige T Zellen darstellt. Daraus lässt sich ableiten, dass epidermales Par3 die Aktivierung von DETC in Abwesenheit eines Reizes bremst, und somit auch die Freisetzung von IFN γ . Die Ergebnisse deuten auf eine neue Rolle von Polaritätsproteinen als Instrukteur von kutanen Immunzellen hin. Zudem eröffnen diese Beobachtungen einen neuen möglichen Signalweg für Polaritätsproteine, um Gewebemöostase in Gesundheit und während inflammatorischer Hautkrankheiten zu regulieren. Insbesondere konnte Par3 als Bestandteil des „Epiimmunoms“ ermittelt werden.