

## **Abstract - aPKC $\lambda$ function in epidermal spindle orientation, cell fate regulation and skin carcinogenesis**

**Susanne Vorhagen**

Regulation of cell fate is crucial to control cell and tissue specification and to balance self-renewal with differentiation in tissue homeostasis. This process is thought to require the alignment of the mitotic spindle with cell fate determinants to promote either symmetric (daughters with same fate) or asymmetric (differential fate) divisions. Previously, we identified the atypical protein kinase C (aPKC $\lambda$ ), the catalytic component of the aPKC $\lambda$ /Par3/Par6 polarity complex, as a major regulator of cell fate in the mammalian self-renewing epidermis. Loss of aPKC $\lambda$  (aPKC $\lambda^{\text{epi-/-}}$ ) results in gradual stem cell exhaustion and cell fate changes accompanied by an increase in asymmetric spindle orientation, suggesting that aPKC $\lambda$  controls epidermal cell fate through regulation of oriented cell division. The overall aim of this thesis was to unravel whether spindle orientation is crucial to regulate cell fate and to ask whether and how aPKC $\lambda$  links cell fate to spindle orientation and finally, how these cell fate changes impact on skin carcinogenesis. To this end, we generated a novel transgenic mouse model with an epidermis-specific expression of membrane-targeted aPKC $\lambda$  (aPKC $\lambda^{\text{CAAX}}$ ). In *Drosophila* neuroblasts, a similar construct was reported to promote symmetric divisions, expand the stem cell population resulting in cancerous overgrowth. Unexpectedly, aPKC $\lambda^{\text{CAAX}}$  expression in the mammalian epidermis promoted asymmetric spindle orientation, comparable to aPKC $\lambda^{\text{epi-/-}}$  mice, but nevertheless resulted in expansion of hair follicle stem cells and impaired hair follicle regeneration, phenotypes that were opposite to those seen upon loss of aPKC $\lambda$ . Our findings thus demonstrate that mitotic spindle orientation alone cannot explain epidermal cell fate. To determine the underlying molecular mechanism of cell fate determination a proteomic screen for aPKC $\lambda$  binding partners was performed that identified the polarity protein lethal giant larvae (Lgl), implicated in *Drosophila* cell fate decisions in *Drosophila*, as an aPKC $\lambda$  binding partner. Interestingly, aPKC $\lambda$  promoted stem cell fate *in vitro* in an Lgl-dependent manner, suggesting that aPKC $\lambda$  acts through Lgl to mediate cell fate decisions in keratinocytes. To ask whether altered aPKC $\lambda$  function would affect tumor induction and growth we performed two stage skin carcinogenesis experiments. In contrast to *Drosophila*, where aPKC $\lambda^{\text{CAAX}}$  induced tissue overgrowth and tumor formation, this study shows that both loss and membrane-targeting of aPKC $\lambda$  reduced Ras-driven skin carcinogenesis and that aPKC $\lambda$  cooperates with Par3 to drive tumor formation possibly through cytokine-mediated stimulation of growth and survival pathways. Taken together, this study demonstrates that spindle orientation and cell fate are not necessarily coupled, identifies a key role for aPKC $\lambda$  in balancing epidermal stem cell self-renewal and differentiation, in part mediated through Lgl, to

control skin homeostasis and shows that uncontrolled aPKC function can result in epithelial skin cancer.

## Zusammenfassung

Die Regulierung von Zellschicksalsentscheidungen ist essentiell um das Gleichgewicht von Proliferation und Differenzierung, und somit die Gewebekomöostase, aufrecht zu erhalten. Es wird vermutet, dass dies durch eine gezielte Orientierung der mitotischen Spindel und Zellschicksalsdeterminanten vermittelt wird, um entweder symmetrische (Tochterzellen mit gleichem Schicksal) oder asymmetrische (ungleichem Schicksal) Zellteilungen zu ermöglichen. In vorherigen Studien identifizierten wir die atypische Protein Kinase C (aPKC $\lambda$ ), und somit die katalytische Komponente des aPKC $\lambda$ /Par3/Par6 Polaritätskomplexes, als wichtigen Regulator von Zellschicksalsentscheidungen in der Säugetierepidermis. So führte der Verlust von aPKC $\lambda$  (aPKC $\lambda^{\text{epi-/-}}$ ) zu einer graduellen Stammzellerschöpfung und ging mit vermehrter asymmetrischer Spindelorientierung einher. Dies deutete darauf hin, dass aPKC $\lambda$  einen molekularen Link zwischen Spindelorientierung und Zellschicksalsentscheidungen darstellt. Ziel dieser Doktorarbeit war es zu untersuchen, ob Spindelorientierung wirklich ausschlaggebend für die Zellschicksalsentscheidungen in der Epidermis ist, ob diese durch aPKC $\lambda$  vermittelt werden und wie Zellschicksalsveränderungen die Entstehung von Hauttumoren beeinflusst. Dafür wurde eine transgene Mauslinie generiert, welche Membran-assoziiertes aPKC $\lambda$  (aPKC $\lambda^{\text{CAAX}}$ ) exprimiert. In neuronalen *Drosophila* Vorläuferzellen, führte die Expression eines ähnlichen Konstrukts zu vermehrter symmetrischer Zellteilung, Erneuerung von Vorläuferzellen und Tumorentstehung. Unerwartet führte aPKC $\lambda^{\text{CAAX}}$  Expression in der Säugetierepidermis, vergleichbar zu aPKC $\lambda^{\text{epi-/-}}$  Mäusen, zu vermehrten asymmetrischen Spindelorientierungen, was jedoch mit einer Stammzellexpansion im Haarfollikel und beeinträchtigter Haarfollikelregenerierung einherging und somit einen konträren Phänotypen darstellte. Folglich ist Spindelorientierung nicht ausschlaggebend für Zellschicksalsentscheidungen in der Epidermis. Um den molekularen Mechanismus zu entschlüsseln, wurde eine proteomische Analyse von aPKC $\lambda$  Interaktoren in Keratinozyten durchgeführt, durch die Lgl (Lethal giant larvae), welches Zellschicksalsentscheidung in *Drosophila* vermittelt, als aPKC $\lambda$  Interaktionspartner identifiziert wurde. Interessanterweise war die stammzellerneuernde Funktion von aPKC $\lambda$  *in vitro* Lgl abhängig, was darauf hindeutet, dass aPKC $\lambda$  Zellschicksalsentscheidungen durch die Regulierung von Lgl vermittelt. Außerdem konnten wir im Rahmen dieser Studie belegen, dass aPKC $\lambda$  gemeinsam mit Par3 die Ras-induzierte Entstehung von Hauttumoren fördert, welche wohlmöglich durch den Einfluss auf Zytokin-vermittelten Signalwege reguliert wird. Zusammenfassend, weisen die präsentierten Daten darauf hin, dass Spindelorientierung und Zellschicksalsentscheidungen

nicht direkt gekoppelt sind, dass aPKC $\lambda$  mit Hilfe von Lgl das Gleichgewicht zwischen Stammzellerneuerung und Differenzierung reguliert und dass beeinträchtigte aPKC $\lambda$  Funktionalität zur Entstehung von Hautkrebs beitragen kann.