

## Abstract

Tissue homeostasis and regeneration require concerted cell polarization and tissue architecture. Polarity protein complexes drive cell polarity and fate in invertebrates. The evolutionarily conserved proteins of the ternary Par3 polarity complex, Par3-aPKC-Par6, mediate asymmetry in various systems. Recently, we identified a dual function of Par3 in cancer development. Par3 exerts pro-oncogenic functions by promoting papillomagenesis whereas it suppresses the formation of keratoacanthoma and melanoma. However, whether Par3 contributes to the overall epidermal homeostasis was not known yet. Thus, the aim of this study was to investigate potential functions of Par3 in the homeostasis of a stratified epithelium, its tissue integrity, and in the regeneration of the epidermis. Strikingly, epidermal loss of Par3 disturbed the inside-out skin barrier in newborn mice. This barrier defect coincided with altered expression and localization of principle tight junction components, with increased epidermal thickness and differentiation. Moreover, epidermal deletion of Par3 caused an initial expansion and later decline of hair follicle bulge stem cells, accompanied by an enrichment of committed progenitors and formation of hypertrophic sebaceous glands. These data are indicative of aberrant cell fate decisions and premature aging upon deletion of Par3. Earlier reports revealed that the loss of aPKC $\lambda$  results in gradual stem cell exhaustion and altered cell fate with an increase in perpendicular spindle orientation. Contrary to aPKC $\lambda$  epidermal deletion, however, Par3 inactivation in epidermis shifted mitotic spindles toward planar orientation. While these findings uncover a role of Par3 in directing oriented division processes, they also indicate that the aberrant differentiation upon Par3 loss is unlikely to be attributed to increased perpendicular spindle orientation. Importantly, this further suggests that spindle orientation epidermal is not necessarily coupled to cell fate. Next to a role of Par3 in epidermal homeostasis, this study also assessed a potential function of this polarity protein in wound-induced skin repair *in vivo*. Intriguingly, mice lacking epidermal Par3 showed delayed wound healing with aberrant wound edge morphology accompanied by altered deposition of LN332 and ectopic distribution of  $\beta$ 4 integrin. *In vitro* analyses of primary keratinocytes further suggested impaired cell spreading as well as reduced front-directed polarization of the Golgi apparatus upon Par3 loss. Complementing the delayed wound healing in the mouse model, a strong decrease of PAR3 protein expression was detected in the epidermis of human chronic venous ulcers, indicating that impaired Par3 expression associates with human skin pathologies. Collectively, this study thus uncovered a novel role of the conserved cell polarity protein Par3 for maintaining epidermal homeostasis through regulation of epidermal barrier, epidermal differentiation as well as hair follicle stem cell maintenance, and highlights its key role in wound repair.

## Zusammenfassung

Die Homöostase und Regenerationsfähigkeit von Geweben wird durch das Zusammenspiel von Zellpolarisierung und Gewebearchitektur ermöglicht. In Invertebraten steuern Polaritätskomplexe Architektur und Schicksal von Zellen. Die evolutionär konservierten Proteine des ternären Par3-Polaritätskomplexes, Par3-aPKC-Par6, vermitteln Asymmetrie in verschiedenen Systemen. Kürzlich haben wir eine duale Funktion von Par3 in der Karzinogenese identifiziert. Par3 übt pro-onkogene Funktionen während der Papillombildung aus, wohingegen es die Bildung von Keratoankathomen und Melanomen unterdrückt. Allerdings war bisher nicht bekannt, ob Par3 zur epidermalen Homöostase beiträgt. Das Ziel dieser Arbeit war es, potentiellen Funktionen von Par3 in Zusammenhang mit der Homöostase eines stratifizierten Epithels, seiner Gewebeintegrität und Regenerationsfähigkeit zu untersuchen. Der Verlust von Par3 führte zu einem Defekt der Innen-Außen-Barriere bei neugeborenen Mäusen. Dieser Barrieredefekt ging mit einer veränderten Expression und Lokalisation von wichtigen Tight Junction-Komponenten, erhöhter epidermaler Verdickung und einem veränderten Differenzierungsverhalten einher. Außerdem führte der Verlust von Par3 zu einem initialen Anstieg und späteren Abfall der Haarfollikel-Stammzellenpopulation. Zusätzlich kam es zu einer Anreicherung von determinierten Vorläuferzellen und zur Bildung von hypertrophen Talgdrüsen. Diese Daten suggerieren, dass Verlust von Par3 zu aberranten Zellschicksalsentscheidungen und frühzeitiger Alterung führt. Vorangegangene Studien zeigten, dass der Verlust von aPKC $\lambda$  zu einem graduellen Stammzellverlust und veränderter Zelldifferenzierung führt, bei der eine erhöhte perpendikuläre Ausrichtung des Spindelapparates festgestellt wurde. Im Gegenzug zum Verlust von aPKC $\lambda$  führte die Inaktivierung von Par3 jedoch zu einem verstärkt planar ausgerichteten Spindelapparat. Diese Ergebnisse suggerieren eine Funktion von Par3 während der orientierten Zellteilung und deuten darauf hin, dass die beobachtete abnormale Differenzierung nach Verlust von Par3 nicht mit einer erhöhten perpendikulären Ausrichtung des Spindelapparates zusammenhängt. Entsprechend legen diese Ergebnisse auch nahe, dass die Ausrichtung des Spindelapparates nicht mit der Steuerung des Schicksals der Zelle verknüpft sein muss. Neben der Funktion von Par3 während der epidermalen Homöostase beschäftigte sich diese Arbeit auch mit einer potentiellen Funktion dieses Polaritätproteins während der Wundheilung *in vivo*. Mäuse mit inaktiviertem Par3 in der Epidermis zeigten eine zeitlich verzögerte Wundschließung und einer abnormale Wundrandmorphologie, welche von einer veränderten Deposition von LN332 und einer ektopischen Verteilung von  $\beta$ 4 integrin begleitet wurde. Darüber hinaus zeigten weiterführende *in vitro*-Analysen von primären Keratinozyten, dass Verlust von Par3 zu einer Beeinträchtigung der Zelladhäsion und -Ausbreitung sowie zu einer reduzierten Polarisierung des Golgi-Apparates in Richtung der Migration führt. Ergänzend zur verzögerten Wundheilung

im Mausmodell wurde ein starker Anstieg des epidermalen Expressionslevels von PAR3 in humanen venös-bedingten Hautgeschwüren festgestellt. Das zeigt einen Zusammenhang von Par3-Expression mit epidermalen Pathologien beim Menschen. Zusammenfassend zeigt diese Arbeit eine neue Funktion des konservierten Polaritätsproteins Par3 in der Aufrechterhaltung der epidermalen Homöostase durch Regulation der epidermalen Barriere, epidermalen Differenzierung sowie Aufrechterhaltung der Haarfollikel-Stammzellen, und demonstriert eine Schlüsselfunktion von Par3 in der Wundschließung.