

Authors Name: Aishwarya Dipak Bhosale

Document title: Abstract for PhD thesis publication in English and German

Thesis Title:

Interactions between actin and Spectrin cytoskeletal networks in epidermal barrier formation

Abstract (In English):

The mammalian skin epidermis serves as a physical and innate immune barrier that protects the organism from external hazards like pathogen infiltration, physical or chemical insults as well as water loss. The epidermis is a multilayered epithelium that is constantly turned over by the shedding of its most terminally differentiated cells and balanced by the proliferation of the basal stem cell layer to replace differentiating cells that move upwards. This upward movement is coupled to a spatiotemporally defined differentiation process associated with major changes in cell shape and function, i.e. formation of the intercellular tight junction barrier and the uppermost terminally differentiated corneocyte barrier. Improper barrier restoration and defects in differentiation can lead to inflammatory skin diseases and cancer which are also marked by altered cell shape. Previously, we have shown that the contractile actomyosin cytoskeleton, a major determinant of cell shape and motility, undergoes changes in subcellular organization and intensity as well as tensile properties within the tissue that mark different stages of differentiation. We hypothesized that the regulation of F-actin organization and dynamics is responsible for changes in cell shape, position, and keratinocyte differentiation. Specifically, we asked which molecules determine different states of epidermal actomyosin and whether these states are linked to the differential cell shape and function of different epidermal layers. To this end, a new spatial epidermal proteomics procedure was established, which revealed a ubiquitous expression of most components of the Spectrin cytoskeletal network, which is associated with actin in other cell types. In addition, two regulators of actomyosin contractility, Shroom4 and Cnn1 are enriched during early and terminal differentiation, respectively. Knockdown studies in primary keratinocytes or epidermal deletion of non-erythrocytic α -Spectrin showed that α -Spectrin closely works together with the actomyosin network to maintain the integrity of the cell cortex. In

keratinocytes, α II-Spectrin was connected via intercellular adherens junctions, influencing actomyosin organization and contractility, which collectively regulate the cell shape of suprabasal cells in vivo. An interference with α II-Spectrin disturbed tight junction function in vitro. Furthermore, the structural and mechanical analysis of actomyosin cortices revealed an interdependency of F-actin filament organization and levels of contractility in the response to mechanical damage. Furthermore, interfering with actomyosin contractility through blebbistatin, in α II-Spectrin knockdown keratinocytes rescued the increased opening size in laser ablation experiments. These data suggest a model in which Spectrin and actomyosin networks are closely integrated structurally and functionally to assure the integrity of the contractile cell cortex that is essential for epidermal cell shape. Additionally, Cnn1 influenced actomyosin contractility without impacting TJ function, while shroom4 affected TJ function but showed no effect on contractility, highlighting their distinct roles in the actomyosin regulation. Altogether, our data show that non-erythrocytic α II-Spectrin plays a critical role as an essential constituent of the actomyosin cytoskeleton governing cell shape and TJ barrier function.

Zusammenfassung (auf Deutsch):

Die Epidermis der Haut dient als physische Barriere, die den Organismus vor äußeren Gefahren wie dem Eindringen von Krankheitserregern, physikalischen oder chemischen Einflüssen sowie Wasserverlust schützt. Sie ist ein mehrschichtiges Epithel, das sich durch die Ablösung der obersten Zellschichten bei gleichzeitiger Proliferation der basalen Stammzellschicht und anschließender Migration in die oberen Hautschichten konstant erneuert. Die Migration in die oberen Zellschichten ist dabei an einen räumlich und zeitlich definierten Differenzierungsprozess gekoppelt, der mit bedeutenden Veränderungen der Zellmorphologie und -funktion einhergeht, wie der Bildung der interzellulären Tight-Junction-Barriere und der obersten Korneozytenbarriere. Beeinträchtigungen der Barrierefunktion und Zelldifferenzierung in der Haut führen unter anderem zu entzündlichen Hauterkrankungen und Hautkrebs, welche beide durch Veränderungen in der Zellform gekennzeichnet sind. In vorangegangenen Experimenten konnten wir zeigen, dass das kontraktile Aktomyosin-Zytoskelett, welches eine wichtige Rolle bei der Gestaltung der Zellmorphologie und der Organisation der Zellmotilität hat, im Zuge der Differenzierung Veränderungen in der subzellulären Organisation und Abundanz sowie in der Kontraktilität innerhalb des Gewebes durchläuft. basierend auf diesen Beobachtungen stellten wir die Hypothese auf, dass die Regulierung der F-Aktin-Organisation und -Dynamik für Veränderungen der Zellform und -position sowie der Keratinozyten Differenzierung verantwortlich ist. Insbesondere wollten wir wissen, welche Faktoren Veränderungen im epidermalen Aktomyosin verursachen und in welchem Zusammenhang diese mit den schichtspezifischen Zellformen und Funktionen stehen. Zu diesem Zweck haben wir ein neues Proteomik-Verfahren entwickelt welches es uns ermöglicht Proteomik-Daten für einzelnen Hautschichten zu generieren. Die Daten zeigten eine ubiquitäre Verteilung der meisten Komponenten des Spectrin-Zytoskelett-Netzwerks über die verschiedenen Hautschichten hinweg. Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass zwei Regulatoren der Aktomyosin-Kontraktilität, Shroom4 und Cnn1, während der frühen (Shroom4) respektive terminalen (Cnn1) Differenzierung anreichern. Knockdown-Studien in primären Keratinozyten sowie Epidermis spezifische Deletionen von nicht-erythrozytärem α -Spectrin zeigten, dass das α -Spectrin-Netzwerk eng mit dem Aktomyosin-Netzwerk zusammenarbeitet, um die Integrität des Zellkortexes zu erhalten. In Keratinozyten ist α -Spectrin über interzelluläre Adherens Junctions

verbunden und beeinflusste die Aktomyosin-Organisation und -Kontraktilität, die gemeinsam die Zellmorphologie der suprabasalen Zellen *in vivo* regulieren. Des Weiteren zeigten *in vitro* Experimente, dass ein Knockdown von α II-Spectrin die Funktion der tight junctions beeinträchtigt. Die strukturelle und mechanische Analyse der Aktomyosin-Kortexe ergab, dass die Organisation der F-Aktin-Filamente und die Kontraktilität bei der Reaktion auf mechanische Schäden voneinander abhängig sind. Darüber hinaus führte die Reduktion der Aktomyosin-Kontraktilität durch Blebbistatin in α II-Spectrin-Knockdown-Keratinocyten zu einer Reduktion der Einschnitts Größe in Laserablationsexperiment. Diese Daten deuten auf ein Modell hin, in dem das Spectrin- und Aktomyosin-Netzwerk strukturell und funktionell eng miteinander verbunden sind, um die Integrität des kontraktilen Zellkortexes zu gewährleisten, die für die epidermale Zellmorphologie wesentlich ist. Darüber hinaus beeinflusste Cnn1 die Aktomyosin-Kontraktilität, ohne sich auf die TJ-Funktion auszuwirken, während Shroom4 die TJ-Funktion beeinflusste, aber keine Auswirkungen auf die Kontraktilität zeigte, was die unterschiedlichen Funktionen dieser Proteine bei der Aktomyosin-Regulierung verdeutlicht. Insgesamt zeigen unsere Daten, dass nicht-erythrozytäres α II-Spectrin als wesentlicher Bestandteil des Aktomyosin-Zytoskeletts eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Zellmorphologie und TJ-Barrierefunktion spielt.