

Abstract

Centrosomes, a pair of centrioles surrounded by a pericentriolar matrix of proteins, organize mitotic spindles and provide the essential centriolar templates for cilia and flagella. Previous reports showed that the loss of centrioles in the developing mouse embryo and brain prolonged mitosis and activated a novel p53-dependent apoptosis pathway, also called the mitotic surveillance checkpoint, that is not due to the loss of cilia, DNA damage or aneuploidy. Here, we genetically defined the functions of centrioles and cilia in skin epithelial progenitors which have a well-studied developmental and differentiation program. We conditionally removed *Sas-4* or *Ift88*, which are essential for centriole and cilia formation, respectively, in the developing mouse skin epithelium starting at embryonic day 9.5 (E9.5). Our data showed that the *Sas-4* mutant skin epithelium lacked centrosomes and cilia, was thinner and had much less hair than controls. Like in the mouse embryo and brain, the loss of centrioles led to an upregulation of p53 accompanied by cell death between E12.5 and E15.5. However, in newborns, p53 was still high in the epidermal basal progenitors of the mutants but apoptosis was barely detectable, whereas the cell cycle profile of the mutants was similar to that of the controls. The phenotypes observed upon centriole removal were not due to the secondary loss of cilia because an *Ift88*/cilia epidermal knockout did not show overt phenotypes. We conclude that in contrast to cilia, centrioles and centrosomes in the skin epithelium are important to ensure normal development, but the acentriolar progenitors show robust regulation to maintain a functional skin barrier. Remarkably, the removal of *p53* in the *Sas-4* mutant epidermis was sufficient to significantly rescue the epidermal and hair defects, but not the loss of cilia. A similar phenotypic rescue was also observed after conditionally knocking out *Usp28* or *53bp1*, which were also implicated in the mitotic surveillance checkpoint *in vitro*.

The development of a stratified skin epidermis starts with a simple single-layered epithelium whose progenitor cells in the basal layer maintain the balance between proliferation and differentiation. The current dogma states that keratinocyte progenitors that divide parallel to the basement membrane undergo a symmetric cell division, generating two new progenitor cells, while those dividing perpendicular to the basement membrane undergo an asymmetric division, generating one daughter progenitor cell and one differentiating cell. Interestingly, our data showed that in the developing skin epidermis of *Sas-4*; *p53* double mutants there was a shift towards more perpendicular divisions, although stratification and differentiation of the epidermis was not affected. Our data in the developing skin epidermis, and previous data in the brain neocortex, suggest that the mitotic spindle orientation maybe uncoupled from cell fate in these developing mammalian tissues. In addition, inhibition of cellular proliferation in cultured developing skin explants indicated that cell division itself might not be essential for the initiation

of suprabasal cell fates. Using live cell imaging in the skin explants, we observed progenitor cells that divide perpendicularly and then re-join the cells in contact with the basement membrane. We also observed several cells that undergo delamination from the basal to the suprabasal layers without dividing in the process. Collectively, the data in this study support a new model of skin epidermal development in which the early basal layer appears pseudo-stratified, both early basal cells and their immediate suprabasal progenitors can undergo cell division, and basal cells also delaminate to populate the new suprabasal layers.

Zusammenfassung

Zentrosomen, bestehend aus einem Paar Zentriolen umgeben von einer perizentriolaren Proteinmatrix, organisieren die Mitosespindel und bilden die essentielle Grundlage für die Ausbildung von Zilien und Flagellen. Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass der Verlust von Zentriolen im sich entwickelnden Mausembryo und -gehirn zu einer Verlängerung der Mitose und Aktivierung eines neuen p53-abhängigen Apoptose-Signalwegs führt. Die Aktivierung von diesem Signalweg, auch mitotischer Kontrollpunkt genannt, konnte nicht auf den Verlust von Zilien, DNA-Schäden oder Aneuploidie zurückgeführt werden. Ziel dieser Arbeit war es, die Funktionen von Zentriolen und Zilien in Vorläuferzellen des Hautepithels, welche ein ausführlich erforschtes Entwicklungs- und Differenzierungsprogramm besitzen, genetisch zu bestimmen. Dafür haben wir zwei Gene, *Sas-4* und *Ift88*, welche jeweils für die Zentriolen- und Zilienbildung essentiell sind, ab Tag 9.5 der murinen Embryonalentwicklung (E9.5) im sich entwickelnden Hautepithel konditional ausgeknockt. Unsere Ergebnisse zeigten, dass das *Sas-4* mutierte Hautepithel, welches weder Zentriolen noch Zilien besaß, dünner war und viel weniger Haare aufwies als die Kontrollen. Genau wie im Mausembryo und -gehirn, führte hier der Verlust von Zentriolen zu einer Hochregulierung von p53 und Zelltod zwischen den Stadien E12.5 und E15.5. In den basalen Vorläuferzellen der mutierten Epidermis von Neugeborenen wurde p53 ebenfalls hochreguliert, jedoch fand keine Apoptose statt, während das Zellzyklusprofil in den Mutanten ähnlich dem der Kontrollen war. Diese Beobachtungen waren nicht auf den sekundären Verlust von *Ift88*/Zilien zurückzuführen, da der Knockout von Zilien in der Epidermis keinen offenkundigen Phänotyp aufwies. Daraus lässt sich schließen, dass Zentriolen und Zentrosomen im Gegensatz zu Zilien, eine wichtige Funktion im Hautepithel besitzen, um eine normale Entwicklung zu gewährleisten, jedoch zeigen auch die azentriolaren Vorläufer eine robuste Regulation zur Erhaltung einer funktionalen Hautbarriere.

Bemerkenswerterweise war die Entfernung von *p53* in der *Sas-4* mutierten Epidermis ausreichend, um die zuvor beobachteten Defekte in der Epidermis und in Bezug auf die Haarentwicklung, aber nicht den Verlust von Zilien, aufzuheben. Eine ähnliche Rettung des Phänotyps wurde nach dem Ausschalten von *Usp28* und *53bp1* in der Epidermis, welche *in vitro* ebenfalls mit dem mitotischen Kontrollpunkt in Zusammenhang gebracht wurden, beobachtet.

Die Entwicklung der stratifizierten Epidermis geht von einem einlagigen Epithel aus, dessen Vorläuferzellen in der Basalschicht das Gleichgewicht zwischen Proliferation und Differenzierung aufrechterhalten. Das derzeitige Dogma besagt, dass Keratinozyten-Vorläufer, die sich parallel zur Basalmembran teilen, eine symmetrische Teilung durchlaufen, um zwei neue Vorläuferzellen zu generieren, während die sich rechtwinklig zur Basalmembran teilenden Zellen eine asymmetrische Teilung durchlaufen, woraus eine Vorläuferzelle und eine sich differenzierende

Zelle entstehen. Interessanterweise zeigten unsere Ergebnisse, dass in der sich entwickelnden Hautepidermis von *Sas-4; p53* Doppelmutanten rechtwinklige Teilungen, im Vergleich zu parallelen Teilungen, vermehrt stattfanden, obwohl die Stratifizierung und Differenzierung der Epidermis nicht beeinträchtigt war. Unsere Daten der sich entwickelnden Hautepidermis und frühere Untersuchungen im Neocortex des Gehirns weisen darauf hin, dass die Orientierung der Mitosespindel in diesen sich entwickelnden Säugetiergeweben unabhängig vom Zellschicksal sein kann. Außerdem zeigte eine Inhibierung der Zellproliferation in kultivierten Hautexplantaten, dass die Zellteilung selbst womöglich für die Initiierung der suprabasalen Zellschicksale nicht essentiell ist. Durch Live-Bildgebung konnten wir Vorläuferzellen beobachten, die sich rechtwinklig teilen und anschließend wieder in die Zellen mit Kontakt zur Basalmembran eingliedern. Weiterhin konnten wir beobachten, dass einige Zellen von der basalen hin zu den suprabasalen Schichten delaminieren, ohne sich während dieses Prozesses zu teilen. Insgesamt unterstützen die Daten dieser Arbeit ein neues Modell der epidermalen Hautentwicklung, in welchem die frühen basalen Schichten pseudostratifiziert sind, sich sowohl frühe basale Zellen als auch ihre intermediären suprabasalen Vorläufer teilen können und basale Zellen auch delaminieren können, um Teil der neuen, suprabasalen Schichten zu werden.