

Mark-Christoph Ott: In-vitro- und in-vivo-Studien zur Charakterisierung des extrazellulären Matrixproteins Laminin-5. 2001

Gendefekte in einer der drei Ketten des Laminin-5 verursachen die blasenbildende Hautkrankheit Herlitz'sche Form der Epidermolysis Bullosa (H-JEB). Zur Untersuchung der Funktionen dieser Laminin Isoform habe ich die kurzen Arme und N-terminalen Domänen der nur in Laminin-5 vorkommenden Ketten rekombinant exprimiert und den Phänotyp einer Laminin-5 defizienten Mauslinie untersucht. Die rekombinant exprimierten kurzen Arme und N-terminalen Domänen der $\beta 3$ - und $\alpha 2$ -Kette wiesen identische Eigenschaften auf wie natives Laminin-5. Sie wurden in Interaktionsstudien eingesetzt, um Selbstinteraktionen der $\beta 3$ - und $\alpha 2$ -Kette oder Bindung zwischen diesen Ketten zu identifizieren. Der kurze Arm und die N-terminalen Domäne der $\beta 3$ -Kette interagiert weder mit sich selbst noch miteinander. Die N-terminale Domäne der $\alpha 2$ -Kette bindet an den kurzen Arm derselben Kette ohne selbst zu dimerisieren. Diese Interaktion wird durch die Selbstinteraktion des kurzen Arms und die Bindung von Laminin-5 mit der N-terminalen Domäne und dem kurzen Arm bestätigt. Ich erstellte einen Replacement-Vektor, um das Gen der Laminin $\alpha 2$ -Kette in Maus zu inaktivieren. Bei zwei von 200 transfizierten embryonalen Stammzell-Klonen war der Replacement-Vektor homolog integriert. Aus Zeitgründen verwendete ich für die Charakterisierung des Laminin-5 *in vivo* eine Mauslinie mit Gendefekt in der Laminin $\beta 3$ -Kette. Homozygote Mäuse wiesen junktionale Blasen in der Haut, der Zunge und dem Gaumen auf. Immunohistochemische Färbungen ergaben, daß in Übereinstimmung zum H-JEB-Phänotyp kein Laminin-5 in epidermalen Basalmembranen zu finden war. Keine Unterschiede ergaben sich beim Vergleich der Färbungen von EHS-Laminin, Kollagen Typ XVII, Keratin-1, Keratin-14 und der Integrin $\beta 1$ -Kette in mutanter und Wildtyp Maus. Die Expression des Integrin $\alpha 6\beta 4$ -Ketten ist in einigen der untersuchten Organe bei homozygoten Mäusen diskontinuierlich im Vergleich zu den entsprechenden Organen von Kontrollmäusen. Die Keratinocyten-Differenzierung wird durch die Laminin-5 Defizienz nicht beeinflusst.

Mutations in one of the genes of the laminin-5 chains are associated with Herlitz junctional epidermolysis bullosa (H-JEB), a skin blistering disease. To determine functions of this laminin isoform I expressed the short arms and N-terminal domains of both laminin-5 specific chains and investigated the phenotype of a laminin-5 deficient mouse line. The recombinantly expressed short arms and N-terminal domains of the $\beta 3$ - and $\alpha 2$ -chain showed identical properties as native laminin-5. They were used in interaction studies to identify selfinteraction or binding between the $\beta 3$ - and $\alpha 2$ -chain. The short arm and N-terminal domain of the $\beta 3$ -chain show neither interactions with themselves nor to each other. The N-terminal domain of the $\alpha 2$ -chain binds within the short arm of the same chain but does not dimerise to itself. This binding has been confirmed by the self interaction of the short arm and binding of native laminin-5 to both the N-terminal domain and the short arm. I constructed a replacement vector to inactivate the Laminin $\alpha 2$ gene in mouse. Out of the 200 transfected embryonic stem cell clones 2 had undergone homologous recombination. For lack of time I used a laminin $\beta 3$ deficient mouse line to characterize laminin-5 *in vivo*. Junctional blisters were present in the skin, tongue and palate of homozygous mice. Immunostaining confirmed the absence of laminin-5 from epidermal basement membrane consistent with H-JEB phenotype. No differences were obvious in case of staining EHS-laminin, collagen XVII, keratin-1, Keratin-14 and $\beta 1$ integrin in normal and mutant mice. Integrin $\alpha 6\beta 4$ displays a discontinuous organization in some but not all determined organs when compared with the wildtype. Keratinocyte differentiation is not affected by the absence of laminin-5.