

1. Summary

Laminins represent the major component of basement membranes (BM). They are heterotrimeric glycoproteins, composed of an α , β and γ chain. In skin, the main laminin isoforms in the dermo-epidermal junction (DEJ) are laminin-332, laminin-511 and laminin-211, the latter being restricted to hair follicles (HFs). The laminin γ 1 chain is the most ubiquitously expressed γ chain, whose complete deletion in mice leads to embryonic lethality at day E5.5. To analyze the physiological and pathological function of γ 1 chain in skin, we generated mice with keratinocyte-specific ($LAMC1^{EKO}$) and fibroblast-specific ($LAMC1^{FKO}$) deletion of this chain using the Cre/loxP system.

$LAMC1^{FKO}$ mice did not reveal a striking skin phenotype, but the fibroblast-derived laminin γ 1 chain seems to have a systemic role in mice, since its deletion led to kyphosis, increased mortality, weight reduction and reduced panniculus adiposus. The mechanisms underlying to these defects need further investigation.

$LAMC1^{EKO}$ mice revealed aberrant HF differentiation and coat pigmentation. HF morphogenesis was delayed up to 8 days in newborn mice when compared to controls. However, embryonic HF development was not affected in knockout mice, since formation of placodes and early hair germs were comparable to controls. Factors of the BMP-pSmad1/5-HoxC13-FoxN1-Msx2 signaling pathway, implicated in the regulation of hair shaft keratins, were downregulated in $LAMC1^{EKO}$ skin. The pigmentation phenotype of trunk skin of $LAMC1^{EKO}$ mice was not attributable to decreased melanocyte numbers, but protein expression levels of Trp-1, Trp-2 and tyrosinase were reduced in knockout back skin, indicating impaired melanocyte differentiation. Since melanocytes differentiate after migration into HFs, it was hypothesized that the migratory capacity of the cells may be impaired, resulting in an abnormal distribution in $LAMC1^{EKO}$ skin. In fact, number of melanocytes (cKit⁺/Trp-2⁺) in HFs was reduced, but the cells were more abundant in the epidermis, suggesting a migratory defect. The migration defect could be explained by the altered DEJ in $LAMC1^{EKO}$ mice, with loss of keratinocyte-derived laminin-511 and ectopic deposition of fibroblast-derived laminin-211 in the whole DEJ. Of those two laminins, laminin-511, however, is the preferred substrate for migration and adhesion of primary melanocytes *in vitro* than laminin-211. Contact of melanocytes with laminin-511 induced the expression of the chemokine receptor CXCR4 on melanocytes *in vitro*, needed for SDF1 (Stromal cell-derived factor 1)-mediated migration to HFs. In agreement with these data, CXCR4 expression in melanocytes was induced on control keratinocyte-derived matrix, but not on $LAMC1^{EKO}$ keratinocyte-produced matrix lacking laminin-511.

In summary, this study indicates that both keratinocytes and fibroblasts contribute to laminins of the DEJ. Furthermore, it demonstrates that epidermal laminin-511 is a key regulator for later hair development and shaft differentiation, as well as melanocyte differentiation by regulating melanocyte migration from epidermis to HFs.

1. Zusammenfassung

Laminine stellen einen Hauptbestandteil von Basalmembranen (BM) dar. Sie sind heterotrimeren Glykoproteine, bestehend aus einer α , β und γ -Kette. In der dermoepidermalen Junktionszone (DEJ) der Haut kommen die Isoformen Laminin-332, Laminin-511 und Laminin-211 vor, wobei Letzteres auf Haarfollikel (HF) beschränkt ist. Die Laminin γ 1-Kette stellt die am häufigsten vorkommende γ -Kette dar, dessen vollständige Deletion bei Mäusen zu einer embryonalen Letalität an Tag E5.5 führt. Um die physiologische und pathologische Funktion der γ 1-Kette in der Haut zu untersuchen, wurden Mäuse mit Keratinozyten-spezifischer ($LAMC1^{EKO}$) und einer Fibroblasten-spezifischer ($LAMC1^{FKO}$) Deletion dieser Kette mit Hilfe des *Cre/loxP*-Systems generiert.

$LAMC1^{FKO}$ -Mäuse zeigten keinen auffälligen Hautphänotyp, jedoch scheint die Fibroblasten-spezifische Laminin γ 1-Kette eine systemische Funktion in Mäusen zu haben, da dessen Deletion zur Kyphose, erhöhter Mortalität, Gewichtsreduktion und reduzierter subkutaner Fettgewebsschicht führt. Die Mechanismen, die zu diesen Defekten führen, müssen weiter untersucht werden.

$LAMC1^{EKO}$ Mäuse zeigten gestörte HF-Differenzierung und Fell-Pigmentierung. Die HF-Morphogenese war bei Neugeborenen im Vergleich zu Kontrollen um bis zu 8 Tagen verzögert. Die embryonale HF-Entwicklung war bei Knockout-Mäusen jedoch nicht beeinflusst, da die Bildung von Plakoden und frühen Haarkeimen mit denen der Kontrollen vergleichbar war. Faktoren des BMP-pSmad1/5-HoxC13-FoxN1-Msx2-Signalweges, die an der Regulation von Haarschaft-Keratinen beteiligt sind, waren in der Haut von $LAMC1^{EKO}$ -Mäusen herunterreguliert. Der Fell-Pigmentierungsphänotyp von $LAMC1^{EKO}$ -Mäusen war nicht auf eine erniedrigte Gesamtzahl von Melanozyten zurückzuführen, doch die Expression der Proteine Trp-1, Trp-2 sowie tyrosinase waren in der Rückenhaut vermindert, was auf eine gestörte Melanozyten-Differenzierung hinwies. Da Melanozyten nach der Migration in die HF differenzieren, wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Migrationsfähigkeit der Zellen beeinträchtigt sein könnte, was zu deren abnormalen Verteilung in der $LAMC1^{EKO}$ -Haut führt. Tatsächlich war die Melanozyten-Anzahl (cKit⁺/Trp-2⁺) in HFn reduziert, jedoch in der Epidermis erhöht, was auf einen Migrationsdefekt hindeutet. Erklärt werden konnte der Migrationsdefekt durch die veränderte DEJ in $LAMC1^{EKO}$ -Mäusen, mit einem Verlust von Keratinozyten-spezifischem Laminin-511 und ektopischer Ablagerung von Fibroblasten-spezifischem Laminin-211 in der gesamten DEJ. Von diesen beiden Lamininen ist Laminin-511 *in vitro* jedoch das bevorzugte Substrat für die Migration und Adhäsion von primären Melanozyten im Vergleich zu Laminin-211. Der Kontakt von Zellen mit Laminin-511 induzierte die Expression des Chemokinrezeptors CXCR4 auf Melanozyten *in vitro*, welches für die SDF1 (Stromal cell-derived factor 1)-vermittelte Migration zu HFn benötigt wird. Übereinstimmend mit diesen Daten wurde die Expression von CXCR4 in Melanozyten auf Matrix induziert, welches von Kontroll-Keratinozyten produziert wurde, jedoch nicht von $LAMC1^{EKO}$ -Keratinozyten, dem Laminin-511 fehlt.

Zusammenfassend zeigt die Studie, dass sowohl Keratinozyten als auch Fibroblasten zu Lamininen der DEJ beitragen. Außerdem wird deutlich, dass epidermales Laminin-511 ein

Schlüsselregulator für die späte Haar-Entwicklung und -Schaftdifferenzierung darstellt und auch die Melanozyten-Differenzierung durch die Melanozyten-Migration reguliert.