

Diminution du taux d'ARNm du collagène VII chez des patients atteints d'une forme sévère d'épidermolyse bulleuse dystrophique récessive

Latifa HILAL¹, Claudine BLANCHET-BARDON² & Michel GOOSSENS³

(Reçu le 21/01/1997 ; Accepté le 25/05/1997)

نقص في نسبة مرسل الكولاجين VII عند أشخاص مصابين بشكل قاس من مرض الإنحلال البشري الفقاعي المتحني

الإنحلال البشري الفقاعي المتحني "EBDR" مرض جلدي وراثي يتميز بهشاشة بالغة للجلد والأغشية المخاطية، مصحوبة بألياف إرتباط شاذة. يتميز الأشخاص المصابين، بنقص حاد بل غياب ألياف الإرتباط المكونة أساسا من الكولاجين VII. لقد تم سابقا إثبات العلاقة الجينية ما بين جين الكولاجين VII والمظهر الخارجي لـ "EBDR". في هذا البحث، درسنا نسبة الحمض النووي الريبوزي المرسل للكولاجين VII عند سبعة أشخاص مصابين بهذا المرض، من بينهم ستة مصابين بشكل قاس منه (شكل هلبو-سيمانس) (EBDR mutilante de Hallopeau -Siemens). وقد لاحظنا انخفاضا في هذه النسبة، عند ثلاثة أشخاص من الفئة الثانية. مما يوحي أن طفرة في جين الكولاجين VII قد تؤدي إلى الانخفاض الذي قد يكون السبب في نقص أو غياب ألياف الإرتباط وبالتالي السبب في هذا المرض الخطير عند هؤلاء الأشخاص.

الكلمات المفتاحية : مرض الإنحلال البشري الفقاعي الوراثي - الكولاجين VII - حمض نوي ريبوزي مرسل - ألياف الإرتباط

Diminution du taux d'ARNm du collagène VII chez des patients atteints d'une forme sévère d'épidermolyse bulleuse dystrophique récessive

Les épidermolyses bulleuses dystrophiques récessives (EBDR) constituent un groupe de maladies héréditaires caractérisées par une fragilité cutanéomuqueuse extrême associée à une anomalie des fibres d'ancrage essentiellement constituées de collagène VII. Dans les EBDR elles sont réduites voire complètement absentes. Récemment, une liaison génétique entre le phénotype des EBDR et le gène du collagène VII a été établie. Au cours de ce travail, on a étudié le taux des ARNm du collagène VII chez 7 patients atteints d'EBDR dont 6 sont atteints d'une forme sévère (EBDR mutilante de Hallopeau-Siemens). On a, ainsi, montré une forte diminution de ce taux chez 3 de ces derniers. Ces résultats suggèrent que, chez ces 3 patients, une mutation dans le gène du collagène VII peut être à l'origine d'une diminution du taux des ARN du collagène VII et, par conséquent, de la réduction ou l'absence des fibres d'ancrages responsable du phénotype de la maladie.

Mots clés : Épidermolyses bulleuses héréditaires - Collagène VII - ARNm - Fibres d'ancrage

Type VII collagen mRNA diminution in patients with severe recessive dystrophic epidermolysis bullosa

Recessive dystrophic epidermolysis bullosa (RDEB) is a group of epidermal blistering diseases characterized by extreme mucocutaneous fragility associated with altered anchoring fibrils. RDEB phenotype was linked to the type VII collagen gene (COL7A1) which encodes the major component of anchoring fibrils. RDEB patients showed reduced or absent anchoring fibrils. In this paper, we have described a marked diminution in type VII collagen mRNA rate, in three patients with a severe type of RDEB (Hallopeau-Siemens RDEB). In four other RDEB patients this rate was normal. These results suggest that a mutation in the type VII collagen gene may induce, in the three RDEB-HS patients, a diminution in type VII collagen mRNA rate which may be the underlying cause of fibrils anchoring diminution (or absence) and consequently of the disease.

Key words : Heritable epidermolysis bullosa - Type VII collagen- mRNA - Anchoring fibrils

¹ Faculté des Sciences, Département de Biologie, Unité de Génétique, Université Ibn Tofail, BP 133, Kénitra, Maroc

² Institut de Recherche sur la peau, Hôpital Saint-Louis, 75 010 Paris, France

³ INSERM U91, Hôpital Henri Mondor, 94 010 Créteil, France

□ Auteure correspondante

INTRODUCTION

Les épidermolyse bulleuses (EB) héréditaires constituent un groupe de maladies cutanées de gravité variable. Ces maladies cliniquement et génétiquement hétérogènes sont caractérisées par la formation de décollements cutané-muqueux survenant à la suite d'un traumatisme mineur. Leur incidence est de 1/50 000 et elles sont transmises selon le mode autosomique dominant ou récessif (Cooper & Bauer, 1984). Les EB peuvent être classées en trois catégories selon le niveau de la séparation tissulaire responsable de la formation de bulles (Fine *et al.*, 1991) : les épidermolyse bulleuses simples (EBS) où le clivage a lieu dans les kératinocytes de la couche basale de l'épiderme, les épidermolyse bulleuses jonctionnelles (EBJ) où le clivage se produit entre le derme et l'épiderme au niveau de la *Lamina lucida* et les épidermolyse bulleuses dystrophiques (EBD) pour lesquelles la séparation tissulaire s'effectue sous la *Lamina densa* dans le derme papillaire.

Les EBD peuvent être transmises selon le mode dominant (EBDD) ou récessif (EBDR). Les formes récessives sont représentées par plusieurs sous-groupes selon la sévérité et la distribution des lésions : l'EBDR généralisée mutilante de Hallopeau-Siemens (EBDR-HS) qui représente la forme la plus sévère, l'EBDR généralisée mineure et les EBDR localisée et inversée.

Dans les EBD, le clivage tissulaire est associé à une anomalie des fibres d'ancrage (Fine *et al.*, 1991). Des études d'immunofluorescence et de microscopie électronique de biopsies cutanées de patients ont permis de montrer que, dans l'EBDR mineure, les fibres d'ancrage sont diminuées alors que, dans l'EBDR-HS, elles sont absentes. Les fibres d'ancrage étant constituées essentiellement de collagène VII, ces résultats ont permis de suggérer que, dans les EBDR, cette protéine serait absente ou très sévèrement altérée (Bruckner-Tuderman, 1991 ; McGrath *et al.*, 1993).

Le gène du collagène VII (COL7A1) a été cloné et localisé sur le bras court du chromosome 3 dans la région 3p21.1 (Parente *et al.*, 1991 ; Christiano *et al.*, 1992). Il a une taille de 32 kb ; il est constitué de 118 exons de petite taille (27 à 350 pb) interrompus par des introns de 71 à 1293 pb (Christiano *et al.*, 1992 ; 1994).

Le gène COL7A1 est transcrit en un ARNm de 9,2 kb et code pour une protéine de 340 kd (Christiano

et al., 1992). L'ARNm du collagène VII est fortement exprimé dans les kératinocytes et faiblement exprimé dans les fibroblastes dermiques (Ryynänen *et al.*, 1992). L'identification d'un RFLP (polymorphisme de longueur de fragment de restriction) Pvu II a permis d'établir une liaison génétique entre le gène COL7A1 et le phénotype de différentes formes d'EBDR en particulier celle de l'EBDR-HS (Ryynänen *et al.*, 1991 ; Hovnanian *et al.*, 1992).

L'implication du gène COL7A1 dans les EBDR a été confirmée par la caractérisation récente de différents défauts moléculaires telles que des mutations faux-sens (Christiano *et al.*, 1993 ; Hilal *et al.*, 1993a ; Hilal, 1994), une insertion-délétion et une insertion d'un doublet CG créant un codon stop (Hilal *et al.*, sous presse ; Hilal *et al.*, 1993b) ainsi que plusieurs mutations non-sens chez des patients atteints d'EBDR (Christiano *et al.*, 1994 ; Hilal, 1994 ; Hovnanian *et al.*, 1994).

Au cours de ce travail, on a étudié l'expression des ARNm du collagène VII chez 7 patients atteints d'EBDR dont 6 d'EBDR-HS et un d'EBDR inversée. Ceci nous a permis de montrer que 4 patients EBDR présentent un taux normal d'ARNm COL7A1 alors que 3 patients EBDR-HS montrent une forte diminution du taux d'ARNm, ce qui suggère qu'une anomalie au niveau du taux du collagène VII peut être à l'origine de la réduction ou la diminution des fibres d'ancrages et, par conséquent, du phénotype de l'EBDR-HS chez ces patients.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Patients

Le diagnostic a été réalisé par le Dr Blanchet-Bardon à l'Hôpital Saint-Louis à Paris selon les critères cliniques et de la microscopie électronique définis par Fine *et al.* (1991). Chez tous les patients les lésions sont apparues à la naissance. Les patients 1, 2, 3, 4, 6 et 7 présentent les signes cliniques d'une EBDR-HS et le patient 5 d'une EBDR inversée (Hovnanian *et al.*, 1992). Les caractéristiques de chacun des patients sont données dans le tableau 1.

2. Culture de kératinocytes

Les kératinocytes ont été mis en culture dans le laboratoire de Yann Barrandon (Département de Biologie, École Normale Supérieure, Paris) à partir de biopsies cutanées prélevées sur chaque patient, en peau saine (Rheinwald & Green, 1975).

Tableau 1. Caractéristiques des patients atteints d'épidermolyse bulleuse dystrophique récessive (EBDR) de Hallopeau-Siemens (HS) ou inversée

Patients EBDR	âge (ans)	Origine	Consanguinité	N*	
1	HS	13	Algérienne	1er degré	3/5
2	HS	14	Espagnole	non	2/2
3	HS	15	Algérienne	non	1/3
4	HS	21	Espagnole	non	1/4
5	inversée	22	Française	non	1/2
6	HS	21	Française	non	1/1
7	HS	2	Marocaine	1er degré	1/4

* N = nombre d'enfants atteints dans la famille sur nombre total des enfants

3. Extraction d'ARN totaux

Les cellules sont décollées à la trypsine puis lavées au PBS. Après centrifugation pendant 10 minutes à 16 000 x g à l'aide d'une microcentrifugeuse Eppendorf, le culot cellulaire est mis en présence de 1 volume (V) de tampon de lyse (thiocyanate de guanidium 4 M, citrate de sodium 25 mM, sarcosyl 0,5% (P/V), β -mercaptoéthanol 0,1 M), de 1/10 V d'acétate de sodium 2 M (pH 4,2), 1 V de phénol saturé en eau, 1/5 V de chloroforme isoamyl-alcool saturé en eau (pour 10^6 à 10^7 cellules, V = 800 μ l).

Le mélange est incubé 15 minutes dans la glace puis centrifugé à 4°C, à 16 000 x g, pendant 20 minutes. La phase aqueuse est extraite, additionnée de 1 V d'isopropanol puis laissée une heure à -20°C. Après 30 minutes de centrifugation à 16 000 x g, le culot est repris dans 1/10 V de tampon de lyse. Les ARN totaux sont alors précipités en présence de 1 V d'isopropanol pendant 1 heure à -20°C et centrifugés 30 minutes à 16 000 x g. Le culot d'ARN est dissout dans 50 à 200 μ l d'eau. La quantité d'ARN totaux obtenue est évaluée en mesurant l'absorbance à 260 nm (une unité d'absorbance à 260 nm = 40 μ g d'ARN/ml selon Chomczynski & Sacchi (1987).

4. Northern blot*

Les ARN totaux (30 μ g environ) sont séparés sur gel d'agarose 1%, transférés sur membrane "Hybond C-extra" (Amersham) puis hybridés, d'une part, avec une sonde ADNc spécifique du gène COL7A1 et, d'autre part, avec la sonde ubiquitaire GAPDH (Ryynänen *et al.*, 1992). Les sondes sont marquées à l' [α - 32 P] ATP par la technique de multi-amorçage au hasard. La membrane est mise en contact d'un film X-Omat S qui est révélé 10 jours après.

* Séparation, transfert d'ARN et hybridation avec une sonde

RÉSULTATS

Au cours de ce travail, on a étudié, grâce à la technique de "Northern blot", le taux des ARNm du collagène VII chez 7 patients atteints d'EBDR dont 6 patients d'EBDR-HS (1, 2, 3, 4, 6, 7) et un patient d'EBDR inversée (5). Pour cela, des biopsies cutanées de ces 7 patients ont été prélevées, les kératinocytes ont été mis en culture et les ARN totaux ont été extraits. Comme l'expression du gène COL7A1 dépend de l'âge, des ARN totaux issus de kératinocytes de sujets normaux de la même tranche d'âge que les patients ont été utilisés comme contrôles (C1 : 24 ans et C2 : 4 ans). Les ARN de tous les individus ont été séparés selon la technique du Northern blot. L'expression du gène codant pour la GAPDH étant ubiquitaire, l'hybridation avec cette sonde nous a permis de normaliser la quantité d'ARN déposée pour chaque échantillon.

L'analyse du "Northern blot" montre que, chez tous les patients, l'ARNm du collagène VII est décelable et de taille normale (environ 9 kb) (Figure 1).

L'intensité des bandes a été estimée à l'aide d'un densitomètre (Vilber Lourmat, Bioprofil). Chez les patients 2, 4, 5 et 6, le taux d'ARNm collagène VII est normal par rapport au contrôle de la même tranche d'âge (C1), alors que chez les patients 1, 3 et 7 une forte diminution du taux d'ARNm COL7A1 est observée.

DISCUSSION

Plusieurs travaux avaient fait du gène COL7A1 le gène candidat des EBD. On a précédemment établi une liaison génétique entre le phénotype de l'EBDR-HS et le gène COL7A1 (Hovnanian *et al.*, 1992).

Afin de rechercher le défaut moléculaire dans ce gène chez des patients atteints d'EBDR, on a utilisé plusieurs approches.

D'abord, la technique du Southern blot nous a permis d'éliminer l'hypothèse d'une anomalie majeure (réarrangements, délétions ou insertions de taille supérieure à 1 kb). Les techniques de DGGE (gel d'électrophorèse en gradient de dénaturation) et de séquençage nous ont permis de caractériser plusieurs mutations de différentes natures chez des patients atteints d'EBDR-HS et d'EBDR inversée (Hilal *et al.*, 1997; Hilal *et al.*, 1993a; Hilal *et al.*, 1993b; Hovnanian *et al.*, 1994).

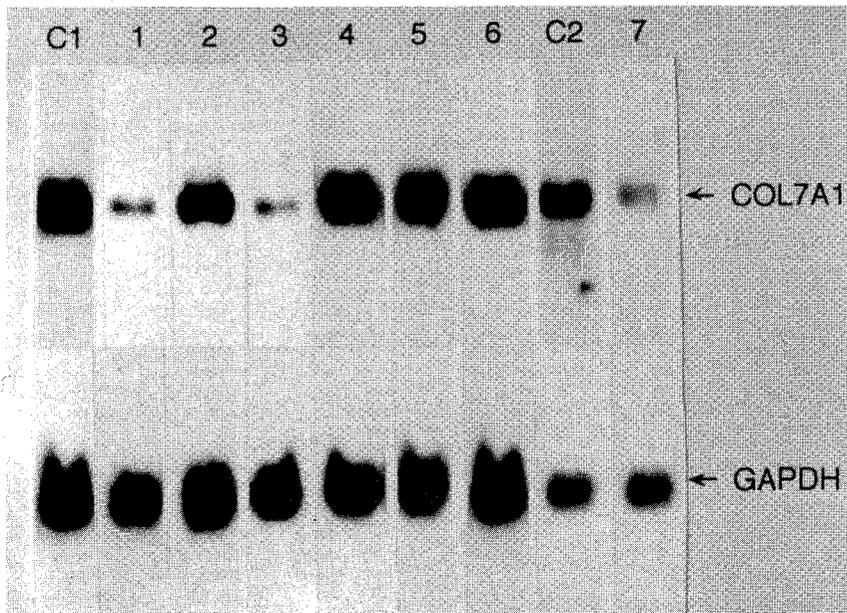


Figure 1. Étude du taux d'ARNm COL7A1 par "Northern blot"

Les ARN totaux ont été extraits à partir de kératinocytes en culture issus de patients atteints d'EBDR-HS (1, 2, 3, 4, 6, 7) et inversée (5), ainsi que de sujets contrôles (C1 : adulte de 24 ans, C2 : enfant de 4 ans). Les ARN ont été ensuite séparés sur gel d'agarose 1%, transférés sur membrane "Hybond C-extra", puis hybridés avec une sonde spécifique du collagène VII (COL7A1), d'une part, et avec la sonde ubiquitaire GAPDH, d'autre part. Les sondes ont été marquées à l' $[\alpha^{32}\text{P}]$ ATP.

Au cours de cette étude, on a également étudié l'expression des ARNm du collagène VII chez des patients EBDR-HS et EBDR inversée, lesquels ont montré un taux normal d'ARNm du collagène VII. Ceci suggère que ces patients sont porteurs de mutations qui n'ont pas d'effet sur le taux de ces ARN.

Cependant, chez trois autres patients parmi ceux atteints d'EBDR-HS (1, 3 et 7), une forte diminution du taux d'ARNm COL7A1 est observée. Ces résultats suggèrent fortement que, chez ces trois patients, une mutation dans le gène COL7A1 peut être à l'origine de la diminution du taux d'ARNm COL7A1 et, par conséquent, du taux de la protéine correspondante. Ceci serait donc responsable de la réduction ou de l'absence des fibres d'ancrage à l'origine du phénotype de la maladie.

Cette diminution d'ARN peut être une conséquence directe d'une anomalie du taux d'expression du gène COL7A1 due à une mutation au niveau des régions régulatrices en 5' ou en 3' du gène, ou

indirecte telle que l'effet d'une mutation stop. En effet, il a déjà été montré, dans certains gènes comme les gènes de la triphosphate isomérase (Daar & Maquat, 1988), de la β -globine (Baserga & Benz, 1988) et de l'ornithine aminotransférase (Mashima *et al.*, 1992), qu'une mutation non-sens ou une mutation décalant le cadre de lecture et introduisant un codon stop conduisait à une diminution du taux d'ARNm. On a également montré, chez un patient EBDR-HS porteur d'une insertion-délétion à l'état homozygote créant un codon stop, une forte diminution (de 90%) du taux d'ARNm COL7A1 (Hilal *et al.*, 1993b).

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer ce phénomène. La diminution du taux d'ARNm pourrait être due à une diminution de leur demi-vie. Lors de la traduction, lorsque les ribosomes rencontrent un codon stop prématuré, ceux-ci se dissocient et le reste de l'ARNm serait exposé à la dégradation par les nucléases ce qui affecterait donc la demi-vie des ARN (Daar & Maquat 1988).

Cette hypothèse prédit un effet positionnel de la mutation non-sens, c'est à dire que plus elle est en 5' plus le taux d'ARN est faible comme cela a été déjà décrit chez les procaryotes (Adhya & Gottesman, 1978).

Un autre mécanisme a aussi été envisagé. La diminution du taux d'ARNm peut être due à un blocage du transport des ARNm du noyau vers le cytoplasme. Il existerait une régulation, par rétro-contrôle, du transport des ARN. Le codon stop au niveau des ARNm servirait de signal pour inhiber le transit des ARN vers le cytoplasme. Il est possible que le noyau lui-même soit sensible à la présence du codon stop au niveau des ARN nucléaires et inhibe son passage vers le cytoplasme.

Il est donc important de caractériser les défauts moléculaires portés par les patients 1, 3 et 7 afin de déterminer la nature de la mutation responsable de la diminution du taux d'ARNm COL7A1. Chez les patients pour lesquels le taux d'ARNm COL7A1 est normal, on peut prédire que des mutations de

nature et de localisation différentes de celles qui affectent le taux d'ARNm seraient à l'origine de la maladie.

Par ailleurs, il a été montré que le facteur "Transforming Growth Hormone β 1 Factor" (TGF- β 1) était capable d'augmenter le taux d'expression des collagènes et, en particulier, du collagène VII dans les fibroblastes et les kératinocytes en culture (König & Bruckner-Tuderman 1991). Il serait donc intéressant d'étudier l'effet du TGF- β 1 sur le taux des ARNm du collagène VII et, en particulier, chez les patients 1, 3 et 7. Cette étude permettrait de déterminer le rôle, *in vivo*, de cette cytokine et d'étudier les éléments de régulation, en 5' ou en 3' du gène, nécessaires à l'action du TGF- β 1.

Enfin, en l'absence de thérapeutique efficace, le TGF- β 1 fournirait une nouvelle approche pour l'augmentation de la synthèse du collagène VII chez les patients dont la maladie est due à une anomalie de l'expression de cette protéine.

RÉFÉRENCES CITÉES

- Adhya S. & Gottesman M. (1978) Nonsense mutations effect on mRNA accumulation in prokaryotic operons. *Annu. Rev. Biochem.* 47 : 967-996
- Baserga S.J. & Benz E.J. (1988) Nonsense mutations in the human β -globin gene affect mRNA metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 : 2056-2060
- Bruckner-Tuderman L. (1991) Collagens of dermo-epidermal junction : role in bullous disorders. *Eur. J. Dermatol.* 1 : 89-100
- Chomczynski P. & Sacchi N. (1987) Single step method of RNA isolation of acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162 : 156-159
- Christiano A.M., Rosenbaum L.M., Chung-Honet L.C., Parente M.G., Woodley D.T., Pan C.T., Zang R.Z., Chu M.L., Burgeson, R.E. & Uitto J. (1992) The large non-collagenous domain (NC-1) of type VII collagen is amino-terminal and chimeric. Homology to cartilage matrix protein, the type III domains of fibronectin and the A domains of von Willbrand factor. *Human Molec. Genet.* 1 : 475-481
- Christiano A.M., Anhalt G., Gibbons S., Bauer E.A. & Uitto J. (1994) Premature termination codons in the type VII collagen gene (COL7A1) underlie severe, mutilating recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Genomics* 21 : 160-168
- Christiano A.M., Chung-Honet L.C., Hovnanian A., Greenspan D.S. & Uitto J. (1992) The gene encoding human type VII collagen (COL7A1) is highly complex: evidence for >115 exons. *Am. J. Hum. Genet.* 4 : A489
- Christiano A.M., Greenspan D.S., Hoffman G.G., Zhang X., Tamai Y., Lin A.N., Diez H.C., Hovnanian A. & Uitto J. (1993) A missense mutation in type VII collagen in two affected siblings with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Nature genet.* 4 : 62-66
- Christiano A.M., Hoffman G.G., Chung-Honet L.C., Lee S., Cheng W., Uitto J. & Greenspan D.S. (1994) Structural organisation of the human type VII collagen gene (COL7A1), composed of more exons than any previously characterized gene. *Genomics* 21 : 160-168
- Cooper T.W. & Bauer E.A. (1984) Epidermolysis bullosa. *Ped. Dermatol.* 1 : 181-188
- Daar I.O. & Maquat L.E. (1988) Premature translation termination mediates triosephosphate isomerase mRNA degradation. *Mol. Cell. Biol.* 8 : 802-813
- Fine J.D., Bauer E.A., Briggaman R.A., Carter D.M., Eady R.A., Esterly N.B., Holbrook K.A., Hurwitz S., Johnson L., Lin A., Pearson R. & Sybert V.P. (1991) Revised clinical and laboratory criteria for subtypes of inherited epidermolysis bullosa. A consensus report by the subcommittee on diagnosis and classification of the national epidermolysis bullosa registry. *J. Am. Acad. Dermatol.* 24 : 119-135
- Hilal L. (1994) Étude de liaison génétique et caractérisation de mutations dans les gènes responsables des épidermolyses bulleuses simples et dystrophiques. Thèse de Doctorat d'État, Faculté des Sciences, Kénitra
- Hilal L., Blanchet-Bardon C. & Goossens M. (1997) Caractérisation d'une insertion CG dans le gène du collagène VII chez un patient atteint d'épidermolyse bulleuse dystrophique récessive de Hallopeau-Siemens. *Actes Inst. Agron. Vét. (Maroc)* 17(1) : 5-13
- Hilal L., Hovnanian A., Duquesnoy P., Blanchet-Bardon C., Christiano A.M., Uitto J., & Goossens M. (1993a) Characterization of mutations within the COL7A1 gene in patients with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J. Invest. Dermatol.* 100 : 499. Abstract.
- Hilal L., Rochat A., Duquesnoy P., Blanchet-Bardon C., Wechsler J., Martin N., Christiano A.M., Barrandon Y., Uitto J., Goossens M. & Hovnanian A. (1993b) A homozygous insertion-deletion in the type VII collagen gene (COL7A1) in Hallopeau-Siemens dystrophic epidermolysis bullosa. *Nature genet.* 5 : 287-293

- Hovnanian A., Duquesnoy P., Blanchet-Bardon C., Knowlton R., Amselem S., Lathrop M., Dubertret L., Uitto J. & Goossens M. (1992) Genetic linkage of recessive dystrophic epidermolysis bullosa to the type VII collagen gene. *J. Clin. Invest.* 90 : 1032-1036
- Hovnanian A., Hilal L., Blanchet-Bardon C., de Prost Y., Christiano A.M., Uitto J. & Goossens M. (1994) Recurrent nonsense mutations within the type VII collagen gene in patients with severe dystrophic epidermolysis bullosa. *Am. J. Hum. Genet.* 55 : 289-296
- König A. & Bruckner-Tuderman L. (1991) Epithelial-mesenchymal interactions enhance expression of collagen VII in vitro. *J. Invest. Dermatol.* 85 : 803-808
- Mashima Y., Murakami A., Weleber R.G., Kennaway N.G., Clarke L., Shiono T. & Inana G. (1992) Nonsense-codon mutations of the ornithine aminotransférase gene with decrease levels of mutant mRNA in gyrate atrophie. *Am. J. Hum. Genet.* 51 : 81-91
- McGrath J.A., Ishida-Yamamoto A., O'Grady A., Leigh I.M. & Eady R.J. (1993) Structural variations in anchoring fibrils in Dystrophic Epidermolysis Bullosa: correlation with type VII collagen expression. *J. Invest. Dermatol.* 100 : 366-372
- Parente M.G., Chung L.C., Ryyänänen J., Woodley D.T., Wynn K.C., Bauer E.A., Mattei M.G., Chu M.L. & Uitto J. (1991) Human type VII collagen : ADNc cloning and chromosomal mapping of the gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 : 6931-6935
- Rheinwald J.G. & Green H. (1975) Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes : the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 6 : 331-334
- Ryyänänen J., Sollberg S., Parente M.G., Chung L.C., Christiano A.M. & Uitto J. (1992) Type VII collagen gene expression by cultured human cells in fetal skin: abundant mRNA and protein levels in epidermal keratinocytes. *J. Clin. Invest.* 89 : 163-168
- Ryyänänen M., Knowlton R.G., Parente M.G., Chung L.C., Chu M.L. & Uitto J. (1991) Human type VII collagen : genetic linkage of the gene (COL7A1) on chromosome 3 to dominant dystrophic epidermolysis bullosa. *Am. J. Hum. Genet.* 49 : 797-803