

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
1.1 Blasenbildende Erkrankungen der Haut	1
1.1.1 Einteilung dieser Krankheiten	1
1.1.2 Das Bullöse Pemphigoid (BP)	1
1.1.2.1 Vorkommen bei Menschen	2
1.1.2.2 Ätiologie und Pathogenese	2
1.1.2.3 Klinik	2
1.1.2.4 Diagnose	3
1.1.2.5 Therapie	3
1.1.2.6 Veterinärmedizinische Relevanz des BP bei Haussäugetieren	3
1.2 Kollagen XVII	4
1.2.1 Die Entdeckung von Kollagen XVII	6
1.2.2 Vorkommen und Funktion	6
1.2.3 Struktur	6
1.2.4 Abspaltung der Ektodomäne von der Vollform des Kollagen XVII (Shedding)	7
1.2.5 Beide Formen von Kollagen XVII sind Autoantigene des BP	10
1.2.6 Das Gen von Kollagen XVII	11
1.3 Plasmin und seine Aktivatoren	11
1.3.1 Plasmin und die proteolytische Kaskade	11
1.3.2 Plasminogenaktivatoren (PA)	12
1.3.3 Der Nachweis von Plasminogenaktivatoren in dieser Arbeit	12
1.4 Ziel und Hintergrund dieser Arbeit	14
 Materialien	15
2.1 Geräte	15
2.2 Verbrauchsmaterialien	15
2.3 Chemikalien	16
2.4 Häufig verwendete Lösungen	17
2.5 Marker	19
2.6 Antikörper	20
2.6.1 Primäre Antikörper gegen Kollagen XVII aus Kaninchen	20

2.6.2 Sekundärer Antikörper aus Ziege gegen Kaninchen-AK	20
2.7 Molekularbiologische Kits	20
Methoden	21
3.1 Zellkultur	21
3.1.1 Kultivierung von humanen Hautzellen	21
3.1.2 Isolierung der Keratinozyten aus humanen Hautbiopsien	22
3.1.3 Passagieren der Zellen	23
3.1.4 Einfrieren von Keratinozyten	23
3.1.5 Auftauen von Keratinozyten	23
3.1.6 Ascorbat-Behandlung der Keratinozyten	24
3.2 Proteinanalyse	24
3.2.1 Herstellung von Proteinextrakten aus Keratinozyten	24
3.2.2 Proteingehaltbestimmung	25
3.2.3 Methanolpräzipitation der Proteine	26
3.2.4 Diskontinuierliche SDS-PAGE zur Auf trennung der Proteine	26
3.2.5 Immunoblot der aufgetrennten Proteine	27
3.2.6 Proteinnachweis durch Immunodetektion	28
3.3 RNA-Analyse	30
3.3.1 Isolierung der mRNA aus einer Keratinozyten -Kultur	30
3.3.2 Photometrische Bestimmung der Konzentration der Nukleinsäuren	31
3.3.3 RT-PCR	31
3.3.4 Agarosegel -Elektrophorese zur Auf trennung der cDNA-Fragmente	34
3.4 Statistik	34
Ergebnisse	35
4.1 Immundetektion der Vollform von Kollagen XVII und seiner löslichen Ektodomäne	35
4.1.1 Nachweis der Vollform des Kollagen XVII als Maßstab der Expression	36
4.1.2 Immundetektion der freigesetzten löslichen Kollagen XVII -Ektodomäne	38
4.2. Nachweis der mRNA-Expression	40
4.2.1 RT-PCR-Nachweis der Vollform des Kollagen XVII, seiner Protease TACE und deren Inhibitor TIMP-3	40
4.2.2 Nachweis der mRNA -Expression von den Plasminogenaktivatoren	42

Diskussion	45
5.1 Kollagen XVII -Expression im Alter	45
5.2 Vermehrtes Shedding von Kollagen XVII im Alter	45
5.3 Die Expression der Sheddase TACE und ihres Inhibitors TIMP-3 ist altersunabhängig	47
5.4 Die Expression der Plasminogenaktivatoren ist nur teilweise altersabhängig	48
5.5 Ausblick	50
 Zusammenfassung	51
 Summary	53
 Literatur	55
 Abbildungsverzeichnis	65
 Tabellenverzeichnis	66
 Abkürzungsverzeichnis	67
 Danksagung	70
 Lebenslauf	71

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der beiden Formen des humanen BP180-Proteins	8
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Shedding-Vorgangs.	9
Abbildung 3: Schematische Darstellung der proteolytischen Kaskade bei der Fibrinolyse	12
Abbildung 4: Western Blot -Analyse von Zell-Extrakten und konzentrierten Zellkulturmedien aus humanen primären Keratinozyten	36
Abbildung 5: Vergleich der Kollagen XVII -Expression in humanen Keratinozyten von jungen und alten Probanden.....	37
Abbildung 6: Nachweis der Kollagen XVII-Ektodomäne im Zellkulturmedium.....	39
Abbildung 7: Vergleich des Ektodomänen-Sheddings von Keratinozyten alter Männer zu Keratinozyten alter Frauen	40
Abbildung 8: Repräsentatives Bild eines Agarosegels mit den spezifischen DNA- Amplifikaten.....	41
Abbildung 9: Repräsentatives Agarosegel der Amplifikate für die Plasminogenaktivatoren.....	43
Abbildung 10: Nachweis der uPA -Expression.....	44

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: SDS-PAGE Proteinstandards	19
Tabelle 2: Pipettierschema für Minigele (Biometra)	27
Tabelle 3: Pipettierschema für die RT-PCR	32
Tabelle 4 : Auflistung der Primer	33
Tabelle 5: Nachweis der Vollform des Kollagen XVII.	37
Tabelle 6: Nachweis der Kollagen XVII -Ektodomäne im Medium.	39
Tabelle 7: Relative Expression von Kollagen XVII, TACE und TIMP-3	42
Tabelle 8: Nachweis der tPA- und uPA-Expression.	43