

## Sonderpreis des Fördervereins der Hochschule Zittau/Görlitz 2010

Preisträger: Dipl.-Chem. (FH) Martin Krause, Fakultät Mathematik / Naturwissenschaften

Thema: Etablierung einer Western Blot-Methode zur qualitativen und quantitativen Analyse von Proteinen aus Humangewebe

### Thematischer Hintergrund und Zielstellung:

Proteine stellen neben Kohlenhydraten und Fetten die dritte Hauptstoffklasse lebender Organismen dar. Ihre Expression kann durch verschiedene, negative Einflüsse reguliert sein. Untersuchungen solcher Regulationen sind am Menschen nur schwer umsetzbar, und werden deshalb an Tier- oder Zellkulturmodellen durchgeführt, sodass es bisher nur wenige humane Studien gibt. Eine direkte Übertragbarkeit vom Untersuchungsmodell auf den Menschen ist jedoch nicht möglich. Deshalb war es Ziel dieser Arbeit eine Western Blot-Methode für die Analyse von Proteinregulationen in humanem, postmortal entnommenem Gewebe zu etablieren. Des Weiteren wurde eine Pilotstudie über die Regulation der Proteine GFAP, Trk B und Aktive Caspase 3 nach akuter (Schädel-Hirn-Trauma) und chronischer (Drogenabusus) Schädigung in verschiedenen Hirnarealen durchgeführt.

### Methoden:

#### SDS-PAGE und Western Blot:

Die aus Gewebeproben extrahierten Proteine werden auf ein poröses Gel aufgetragen und im elektrischen Gleichstromfeld entsprechend ihrem Molekulargewicht getrennt (SDS-PAGE). Anschließend werden die Proteine aus dem Gel heraus auf eine Membran transferiert (Western Blot). Die Detektion und Quantifizierung der Proteine erfolgt mittels spezifischer Antikörper und Auswertung von optischen Dichten HRP-katalysierter Chemolumineszenzreaktionen. Messwerte der untersuchten Proteine werden mit Messwerten von  $\beta$ -Actin normiert, welche auf dieselbe Weise aus denselben Proben gewonnen werden.

#### Immunhistochemische Färbung:

Entnommene Gewebeproben werden als Paraffinschnitte auf Objektträger aufgebracht. Proteine können. Proteine können innerhalb der Zellen von spezifischen Antikörpern gebunden werden. Die Detektion erfolgt über Fluoreszenzfarbstoffe, welche an den Antikörper gebunden sind und mittels Laserenergie zur Fluoreszenz angeregt werden (Laser Scanning Microscopy).

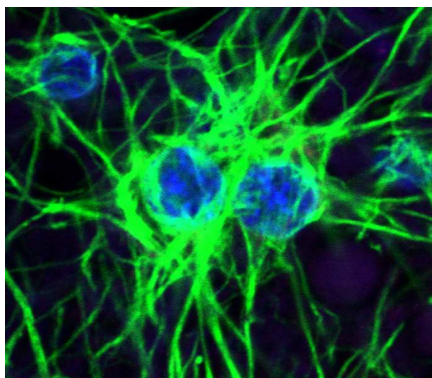


Abb. 1: Immunhistochemische Färbung von aktivierten Astrozyten im Hippocampus nach Schädel-Hirn-Trauma. Grün: GFAP; Blau: Zellkerne

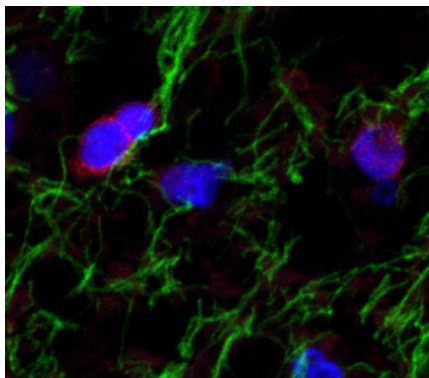


Abb. 2: Immunhistochemische Färbung von akut durch Schädel-Hirn-Trauma geschädigtem Cortexgewebe. Grün: GFAP; Rot: Trk B; Blau: Zellkerne

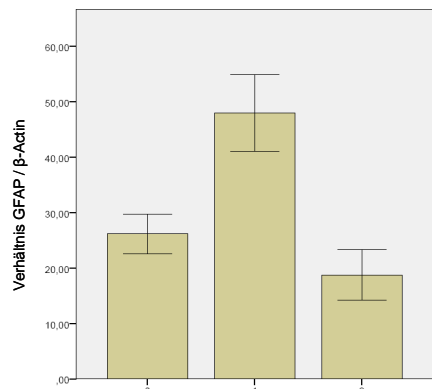


Abb. 3: Ergebnisse der GFAP-Studie im Hippocampus durch Drogenmissbrauch chronisch geschädigter Probanden. 0: Kontrollgruppe; 1: Heroingruppe; 2: Methadongruppe

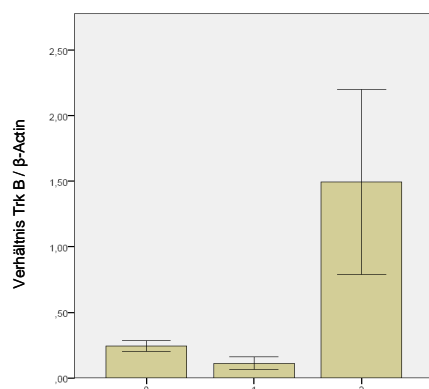


Abb. 4: Ergebnisse der Trk B-Studie im Hippocampus durch Drogenmissbrauch chronisch geschädigter Probanden. 0: Kontrollgruppe; 1: Heroingruppe; 2: Methadongruppe

### Ergebnisse (Auswahl):

Die Immunhistochemischen Untersuchungen in humanem Hippocampus zeigen eine Aktivierung von Astrozyten (Astrogliose) nach akuter Schädigung durch Schädel-Hirn-Trauma (siehe Abb. 1). Zellen exprimieren verstärkt GFAP und bilden eine Narbe um das geschädigte Areal, damit umliegendes gesundes Gewebe geschützt wird.

Obwohl Trk B ein Transmembranrezeptor ist, zeigen die immunhistochemischen Aufnahmen auch intrazelluläre Lokalisation (siehe Abb. 2). Nach akuter Schädigung wird Trk B kurzzeitig verstärkt exprimiert und fördert Proliferation von Zellen und Wiedereinwachsen von Neuronen in geschädigtes Gewebe. Dieser Zustand hält jedoch nur wenige Stunden an.

Die Western Blot-Analysen von chronisch durch Heroinkonsum geschädigtem Hippocampusgewebe zeigen eine verstärkte GFAP-Expression. Dies ist ebenfalls auf Astrogliose zurückzuführen, jedoch verläuft dieser Prozess bei chronischen Schädigungen langsamer als bei akuter Schädigung. Obwohl Methadon an denselben Rezeptor bindet wie Heroin zeigt sich der GFAP-Spiegel hier leicht erniedrigt (siehe Abb. 3).

Bei der Expression von Trk B ist es umgekehrt, Methadon bewirkt eine Erhöhung, Heroin eine Erniedrigung der Trk B-Expression (siehe Abb. 4).

Aufgrund niedriger Fallzahlen lassen diese Ergebnisse einen Trend vermuten, müssen jedoch in weiterführenden Analysen bestätigt werden. Dies geschieht zur Zeit und aktuelle Ergebnisse bestätigen die vorliegende Pilotstudie.

**Danksagung:** Frau Prof. A. Fuchs; Frau PD Dr. H. Franke; Herrn Dr. Marco Weber; allen Mitarbeitern des Rudolf-Boehm-Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Leipzig; allen Mitarbeitern des Instituts für Rechtsmedizin der Universität Leipzig