

Phosphotyrosin-Phosphatasen und Zellpopulationen der Leber unter dem Einfluß von
Methotrexat

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von Kaiser, Guido Peter
aus Frankfurt/Main

Gießen 2005

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
Leiter Prof. Dr. med. Kummer
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Frau PD` Dr. rer. nat. Monika Wimmer-Röll

Gutachter: Herr PD Dr. S. Immenschuh

Tag der Disputation: 15.12.2005

Meinen Eltern, meiner Frau Sandra und
unseren beiden Kindern Luisa und Felix in
Liebe und Dankbarkeit gewidmet

Ich erkläre: „Ich habe die vorliegende Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

1	Einleitung	1
1.1	Einteilung der Phosphatasen	1
1.1.1	Alkalische und saure Phosphatasen	1
1.1.2	Proteinhistidinphosphatasen	2
1.1.3	Zweifach spezifische Proteinphosphatasen	2
1.1.4	Proteintyrosinphosphatasen	2
1.1.5	Rezeptor PTP-asen	2
1.1.6	Cytosolische PTP-asen	3
1.2	Aufbau und Funktion der Leber in ihren Untereinheiten	5
1.2.1	Einteilung der Leberzellen	7
1.2.1.1	Hepatozyten	8
1.2.1.2	Kupfferzellen	8
1.2.1.3	Ito Zellen	9
1.2.1.4	Pitzellen	9
1.2.2	Disseraum	10
1.3	Methotrexat	10
1.3.1	Einfluß von Methotrexat auf den Folsäure- und Vitamin B 12-Stoffwechsel	11
1.3.2	Aufgaben der Koenzyme	13
1.3.3	Wirkmechanismus von Methotrexat	14
1.4	Ziele der Arbeit	15
2	Material und Methoden	17
2.1	Tiere	17
2.1.1	Tierhaltung	17
2.1.2	Tierversuchsgenehmigung	17
2.1.3	Behandlung der Tiere	17
2.1.4	Tiertötung	18
2.2	Probengewinnung	19
2.2.1	Perfusionslösungen	19
2.2.1.1	Vorspüllösung, pH 7,3-7,4	19
2.2.1.2	Fixationslösung – Zamboni	19
2.2.1.3	Fixierung	19
2.3	Immuncytochemische Untersuchungen (ICC)	20
2.3.1	Puffer	20
2.3.1.1	Phosphatpuffer [PB]	20
2.3.1.2	Phosphatgepufferte Salzlösung [PBS]	20
2.3.1.3	Tris-HCl 0,01 molar, pH 8,2	21
2.3.1.4	Inkubationspuffer 0,1 molar, pH 7,4	21
2.3.1.5	Blocklösung 0,1 molar, pH 7,4	21
2.3.1.6	Gepuffertes Glycerol, pH 8,6	21
2.3.2	Herstellen von Cryostatschnitten und Vorbereitung der ICC	21
2.3.3	Immuncytochemie	22
2.3.3.1	Seren, Antikörper und Substrate	22
2.3.3.1.1	Primärantikörper	22
2.3.3.1.2	Sekundärantikörper	24
2.3.3.1.3	Fluoreszenzantikörper	24
2.3.3.1.4	Ziegenserum	24
2.3.3.1.5	Substratsysteme für alkalische Phosphatase und Peroxidase	24
2.3.3.1.6	SHP1/SHP2 Antigen	24
2.3.3.2	Durchführung der Immunfluoreszenzmethode	24
2.3.3.3	Antikörperdemaskierung	25
2.3.4	Lokalisationsstudien	26
2.3.4.1	Doppelimmunfluoreszenzsystem	26
2.3.4.2	Doppelfärbungen mit DAB/Fast Red	26
2.3.4.3	Kontrollen	27
2.4	Zellisolierung	28
2.4.1	Reagenzlösungen	28
2.4.1.1	D(+)-Glukose	28
2.4.1.2	HEPES	28
2.4.1.3	Krebs-Heinsleit (KH) Puffer	28
2.4.1.4	EGTA	28
2.4.1.5	CaCl ₂	28
2.4.1.6	L-Glutamin	28

2.4.1.7	Aminosäurelösung	29
2.4.2	Perfusionspuffer	30
2.4.2.1	EGTA Puffer	30
2.4.2.2	Collagenase Puffer.....	30
2.4.3	Durchführen der sterilen Perfusion in situ.....	30
2.4.4	Aufarbeitung der Kupffer- und Endothelzellen.....	31
2.4.5	Zentrifugale Elutriation	32
2.4.5.1	Vorbereitung des Elutriators.....	32
2.4.5.2	Durchführung	32
2.5	Biochemische Untersuchungen	34
2.5.1	Proteinextraktion	34
2.5.1.1	Puffer	34
2.5.1.1.1	Puffer I	34
2.5.1.1.2	Puffer II.....	35
2.5.1.2	Durchführung	35
2.5.1.3	Proteinbestimmung nach Bradford (1976)	35
2.5.1.3.1	Material	35
2.5.1.3.2	Durchführung.....	35
2.6	Aktivitätsbestimmungen der PTP.....	36
2.6.1	Optischer Enzymtest	36
2.6.1.1	Material	36
2.6.1.2	Durchführung	36
2.6.2	Radioaktivitätsbestimmung	37
2.6.2.1	Radioaktivitätsbestimmung von Proben mit proteingebundenem [³² P].....	37
2.6.2.2	Radioaktivitätsbestimmung nach Cerenkow	38
2.6.3	Substrate zur Bestimmung der Phosphataseaktivität.....	38
2.6.4	Herstellung des modifizierten Lysozyms	38
2.6.4.1	Material	38
2.6.4.1.1	Puffer I.....	38
2.6.4.1.2	Puffer II.....	38
2.6.4.2	Durchführung	39
2.6.4.2.1	Reduktion.....	39
2.6.4.2.2	Carboxymethylierung	39
2.6.4.2.3	Maleinylierung.....	39
2.6.4.2.4	Entsalzung und Aufbewahrung.....	39
2.6.5	Herstellung des Phospho-Proteinsubstrates.....	40
2.6.5.1	Material	40
2.6.5.1.1	Puffer I.....	40
2.6.5.1.2	Reagenzien.....	40
2.6.5.2	Durchführung	41
2.6.6	Auswertung der Phosphorylierungsreaktion	41
2.6.6.1	Gesamt- und proteingebundene Radioaktivität eines Phosphorylierungsansatzes	41
2.6.6.2	Bestimmung des Phosphatgehaltes phosphorylierter Proteine	42
2.6.6.3	Test zur Bestimmung der Proteinphosphatase-Aktivitäten.....	43
2.6.6.3.1	Material	43
2.6.6.3.2	Durchführung.....	43
2.6.6.3.3	Angabe der Proteinphosphatase-Aktivitäten.....	43
2.6.6.3.4	Spezifische Proteinphosphatase-Aktivität.....	45
2.6.7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	45
2.6.7.1	Herstellung der Proben	45
2.6.7.1.1	Material	45
2.6.7.2	Durchführung	47
2.6.7.2.1	Proben mit hohem Proteingehalt (≥0,1 mg/ml).....	47
2.6.7.2.2	Proben mit niedrigem Proteingehalt (<0,1 mg/ml)	47
2.6.7.3	Eichstandard.....	47
2.6.7.4	Herstellung von Polyacrylamidgelen.....	48
2.6.7.4.1	Material	48
2.6.7.4.2	Durchführung.....	49
2.6.7.5	Autoradiographie.....	50
2.7	Western-Blot	50
2.8	Statistik.....	51

3	Ergebnisse	54
3.1	Immuncytochemische Untersuchungen am Normaltier	54
3.1.1	Untersuchungen an perfusionsfixierten Lebern	54
3.1.1.1	PTP-1B/T-Zell PTP	54
3.1.1.2	SHP1/SHP2	54
3.1.1.3	Zellidentifikation	56
3.1.1.3.1	Endothelzellen	56
3.1.1.3.2	Identifikation der Ito und Kupffer-Zellen	57
3.1.1.3.3	Kupffer-Zellen	58
3.1.1.3.4	Ito-Zellen	59
3.1.1.3.5	Natural Killer-Zellen (NK-Zellen)	62
3.2	Isolation der Endothel- und Kupffer-Zellen am Normaltier	63
3.2.1	Endothelzellen	64
3.2.2	Kupffer-Zellen	64
3.3	Biochemische Untersuchungen am Normaltier	65
3.3.1	Aktivitätsbestimmung der Phosphatase	65
3.3.1.1	Leberhomogenate	65
3.3.1.2	Isolierte Zellen	66
3.3.1.2.1	Endothelzellen	67
3.3.1.2.2	Kupffer-Zellen	67
3.3.2	SDS-Page am Normaltier	68
3.3.2.1	Leberhomogenate	68
3.3.2.2	Isolierte Zellen	68
3.3.2.2.1	Endothelzellen	68
3.3.2.2.2	Kupffer-Zellen	70
3.4	Immuncytochemische Untersuchung am Methotrexat-Tier	71
3.4.1	Allgemeine Morphologie	71
3.4.2	PTP-1B/T-Zell PTP	72
3.4.3	SHP1/SHP2	72
3.4.4	Zellidentifikation	74
3.4.4.1	Endothelzellen	74
3.4.4.2	Identifikation der Ito und Kupffer-Zellen	74
3.4.4.3	Kupffer-Zellen	75
3.4.4.4	Ito-Zellen	77
3.4.4.5	Natural Killer-Zellen (NK-Zellen)	80
3.5	Isolation der Endothel- und Kupffer-Zellen am Methotrexat Tier	81
3.5.1	Endothelzellen	81
3.5.2	Kupffer-Zellen	82
3.6	Biochemische Untersuchungen am Methotrexat Tier	83
3.6.1	Aktivitätsbestimmung der Phosphatase	83
3.6.1.1	Leberhomogenate	83
3.6.1.2	Isolierte Zellen	83
3.6.1.2.1	Endothelzellen	83
3.6.1.2.2	Kupffer-Zellen	84
3.6.2	SDS-Page	85
3.6.2.1	Endothelzellen	85
3.6.2.2	Kupffer-Zellen	86
3.7	Vorkommen der SHP Subtypen SHP1 und SHP2 in den Parenchym- und Non-Parenchymzellen der Leber	87
3.7.1	Unbehandelte Tiere	87
3.7.1.1	Kupffer-Zellen	87
3.7.1.2	Ito-Zellen	88
3.7.1.3	NK-Zellen	89
3.7.1.4	Hepatocyten	90
3.7.2	MTX-Tiere	91
3.7.2.1	Non-Parenchymzellen	91
3.7.2.2	Hepatozyten	91
3.8	Biochemische Untersuchungen mit monoklonalen Antikörpern	92
3.9	Statistik	93
3.9.1	Wirkung von Methotrexat auf die individuelle Zahl der Non-Parenchymzellen	93
3.9.2	SHP1/SHP2 markierte Zellen	94
3.9.2.1	Kupffer-Zellen	94

3.9.2.2	Ito-Zellen	94
3.9.2.3	Natural Killer Zellen.....	95
4	Diskussion	96
4.1	SHP1/SHP2.....	98
4.1.1	SHP1	99
4.1.1.1	Kupfferzellen.....	101
4.1.1.2	Ito-Zellen.....	102
4.1.1.3	NK-Zellen.....	103
4.1.2	SHP2	104
4.1.2.1	Kupfferzellen.....	104
4.1.2.2	Ito-Zellen.....	106
4.1.2.3	NK-Zellen.....	108
4.2	Methotrexat.....	109
4.3	Biochemie	112
4.3.1	Leberhomogenate.....	113
4.3.2	Zellisolation.....	114
4.3.2.1	Endothelzellen.....	114
4.3.2.2	Kupfferzellen.....	115
4.3.3	Proteingehalt und Phosphataseaktivität der isolierten Zellen.....	115
4.3.3.1	Endothelzellen.....	116
4.3.3.2	Kupfferzellen.....	116
4.4	Zusammenfassung.....	118
4.5	Summary	119
5.	Literaturverzeichnis.....	121
	Danksagung	145

Abkürzungsverzeichnis

5'NT	5' Nucleotidas
AK	Antikörper
Alpha TMP	alpha tocopherol mediated peroxidation
CCL39	chinese hamster lung fibroblasts
CWFS	cold water fish gelatine
DAB	Diaminobenzidine
EGTA	Ethylen glycol bis(2-aminethylether)-N,N,N',N'-tetra acetic acid
EPO	Erythropoeitin
ERK	extracellular signal related kinase
FAK	focal adhesion kinase
FITC	Fluoresceinisothiocyant
G1 Phase	Gap1 Phase
G-CSF	granulocte colony stimulating factor
GFAP	glia fibrillary acid protein
GTP	Guanosintriphospat
HD	high density
HEPES	n-(2-hydroxyethyl) piperazine-n'-(2-ethanesulfonic acid) hemisodiumsalt
i.p	intraperitoneal
IL	Interleukin
INFalpha	Interferon
JAK	janus kinase
KH Puffer	Krebs Henseleit Puffer
KIR	killer cell inhibitory receptor
LD	low density
MAPK	mitogen activated protein kinase
MTX	Methothrexat
NF kappa B	nuclear factor kappa B
NK Zellen	natural killer cells
PAP	Peroxidase-anti-Peroxidase
PDGF	Platelet derived growth factor

PLC	Phospholipase
PTP	Protein Tyrosin Phosphatase
PTPase	Protein Tyrosin Phosphatase
RCLM	reduced, carboxaminomethylated, and maleylated lysozyme
RNA	ribonucleic acid
SDS Page	Sodiumdodecylsulfat
Serin-Threonin PP	Serin Threonin Protein Phosphatase
SHP	sarcoma homology
Siglec11	sialic acid-binding Ig-like lectin sialoadhesin
STAT	signal transducer and activator of transcription
TCA	trichloracetic acid
TCR	T-cell receptor
TEMD	n,n,n-tetraethylenediamine
TNF	tumor necrosis factor
TRA	triethanolamine

1 Einleitung

In allen Organismen laufen tausende chemischer Reaktionen im Rahmen der Stoffwechsel- und Kommunikationsvorgänge der Zellen ab. Dabei folgen diese Reaktionen einem einheitlichen Grundplan mit vielen gleichen Prinzipien. Die Hauptaufgabe des Stoffwechsels ist Erzeugung von Energie, Makromolekülvorstufen sowie die adäquate Reaktion auf die inter- und intrazelluläre Kommunikation. Der Stoffwechsel wird durch viele Mechanismen reguliert. Abhängig vom Enzymtyp können die Stoffwechselvorgänge sowohl durch die vorhandene Menge an Enzymen als auch durch die katalytische Aktivität der Enzyme reguliert werden. Proteinphosphorylierung wirkt dabei analog einem binären Code wie ein Ein-/Ausschalter, der die Übermittlung von extra- und intrazellulären Signalen entlang der Signalkaskaden erlaubt oder unterbindet. Proteinphosphorylierung und -dephosphorylierung, durch Protein-kinasen und Proteinphosphatasen katalysiert, nehmen daher eine herausragende Rolle bei der Regulation der Stoffwechselvorgänge ein. Binden Signalproteine an Rezeptoren der Zellwand, so sind die löslichen Phosphatasen in der Signalkaskade dafür verantwortlich, daß Signale weitergeleitet oder unterbunden werden (IL-6-Rezeptor, TNF- α -Rezeptor).

1.1 Einteilung der Phosphatasen

Man unterscheidet zwischen alkalischen und sauren Phosphatasen, Proteinhistidinphosphatasen, zweifach spezifischen Phosphatasen, und den Proteintyrosinphosphatasen.

1.1.1 Alkalische und saure Phosphatasen

Die alkalischen und sauren Phosphatasen sind zwei sehr heterogene Enzymklassen, die aus einer Vielzahl von Spezies und Geweben isoliert worden sind. Ihre physiologischen Substrate sind unbekannt. Sie spalten organische Phosphorsäuremonoester oder -diester in ihre Komponenten bei einem alkalischen bzw. sauren pH-Optimum (Lau et al. 1989, Fishman 1990).

1.1.2 Proteinhistidinphosphatasen

Die Phosphorylierung der Stickstoffatome in den Seitenketten der basischen Aminosäuren Histidin, Lysin und Arginin ist bei einer Reihe von Proteinen in eukaryonten Zellen gefunden worden. Dabei wurde Histidin- und Lysin-Phosphataseaktivität in Rattengewebe nachgewiesen (Wong et al. 1993).

1.1.3 Zweifach spezifische Phosphatasen

Als weitere Gruppe der Proteinphosphatasen existieren die zweifach spezifischen Phosphatasen. Diese können sowohl Serin- als auch Threonin- und Tyrosinreste dephosphorylieren (van Hoof 1996).

1.1.4 Proteintyrosinphosphatasen

Die Proteintyrosinphosphatasen (PTP-asen) untergliedern sich in lösliche, intrazellulär gelegene und transmembranös gelegene rezeptorähnliche Phosphatasen (Charbonneau und Tonks 1992, Walton und Dixon 1993).

Bei allen findet sich eine hoch konservierte Sequenz von 240 Aminosäuren, die als die katalytische Einheit angesehen wird. Für den postulierten katalytischen Mechanismus ist ein Cysteinrest essentiell, der durch das "HCXAGXXR(S/T)G" - Motiv, das PTP-asen gemeinsam haben, kodiert wird (Guan und Dixon 1991).

1.1.5 Rezeptor PTP-asen

Für die Struktur der transmembranösen PTP-asen dient CD 45 als Modell.

Alle transmembranösen Formen besitzen einen intrazellulären Abschnitt, welcher die konservierte PTP-ase-Region enthält, eine transmembranöse Domäne und einen variablen extrazellulären Abschnitt (Charbonneau und Tonks 1992). Als Beispiel der transmembranösen PTP-asen dient CD 45.

Bis auf menschliche PTP- β (Krüger et al. 1990) und Drosophila-PTP 10D (Tian et al. 1991) weisen alle rezeptorähnlichen PTP-asen intrazellulär zwei PTP-ase-Domänen auf. Aufgrund der großen Strukturunterschiede ihrer extrazellulären Segmente unterteilt man sie in fünf Klassen.

1.1.6 Zytoplasmatische PTP-Asen

Intrazelluläre PTP-Asen besitzen nur eine katalytische Domäne. Der Prototyp dieser Klasse ist die PTP 1 B, die aus der humanen Plazenta isoliert und als erste sequenziert wurde (Charbonneau et al. 1989).

Darüber hinaus wurden über Sequenzähnlichkeiten im Bereich der konservierten aktiven Domäne weitere PTP-Asen identifiziert.

Die zytoplasmatischen PTP-Asen flankieren die einzige katalytische Domäne und unterscheiden sich in ihren nicht katalytischen Segmenten. Diese Segmente sind strukturell mit Domänen anderer Proteine verbunden.

Ein Grund für diese Strukturformationen scheint das intrazelluläre Targeting der PTP-Asen zu sein. Diese Sequenzen (Mauro und Dixon 1994) dirigieren die intrazellulären PTP-Asen zu den richtigen intrazellulären Lokalisationen - wie membranassoziierte Domänen, dem Zytoskelett assoziierte Domänen, SH2-Domänen; hierbei handelt es sich um eine während der Evolution konservierte Aminosäuresequenz, die als Src-Homologie 2 (SH2) bezeichnet wird. Diese Domäne erhielt ihren Namen durch ihre Homologie mit einer Region der zytoplasmatischen Proteinkinase, die durch Src, ein Onkogen des Hühner Retrovirus Rous-sarcoma-Virus, dessen zelluläre Form als Src bezeichnet wird, kodiert und als Prototyp dieser Proteinkinasen angesehen wird. Ihre dreidimensionale Struktur unterscheidet sich kaum in den verschiedenen Proteinen.

Außerhalb der katalytischen Domäne regulieren spezifische Aminosäuresequenzen das Erkennen der spezifischen subzellulären Bindungsstellen der PTP-ase und modulieren ihre Aktivität.

So ist die PTP-ase 1 B am endoplasmatischen Retikulum lokalisiert (Frangioni et al. 1992).

Durch die Entdeckung von PTP-Asen, welche SH2-Domänen enthalten, ist ein wichtiges Bindeglied in der Signaltransduktionskaskade identifiziert worden (Tauchi et al. 1994).

Die PTP 1 C (Shen et al. 1991), die auch als SH-PTP 1, SHP1, HCP oder SAP bezeichnet wird (im nachfolgendem SHP1 genannt), wird hauptsächlich in hämatopoetischen Zellen exprimiert. Die PTP 1 D, auch als SHP2, SH-PTP 3, SYP, PTP 2 C oder SH-PTP 2 bezeichnet (im nachfolgenden SHP2 genannt), wird ubiquitär exprimiert (Freeman et al. 1992, Ahmad et al. 1993, Feng et al. 1993 und Vogel et al. 1993).

Die SH2-Domäne erlaubt diesen Proteinen, sich spezifisch an Moleküle mit phosphorylierten Tyrosinresten, wie den aktivierten Wachstumsfaktorrezeptor, zu binden.

Diese Interaktion kann eine sehr komplexe Regulation der Signalverarbeitung durch Interagieren von verschiedenen synchronen oder gestaffelten Signalkaskaden auslösen.

In allen Signalkaskaden hat die SHP1 eine inhibitorische Rolle, da sie nach Rezeptoraktivierung antiproliferative Signale auslöst (Sharlow et al. 1997).

Außerdem ist die SHP1 an der Differenzierung der Blutzellen beteiligt. Hier scheint sie den praematuren Übergang zur endgültigen Differenzierung in normale (Erythroidprogenitor) Zellen zu verhindern (Sharlow et al. 1997).

Die SHP2 enthält wie die SHP1 zwei N-terminale SH2-Domänen. Sie wird aktiviert als Reaktion auf die Stimulation mit Interleukin-6, EGF oder PDGF und ist wie die SHP1 an zytosolischen Signalkaskaden beteiligt und damit in die bei immunologischen und entzündlichen Reaktionen ablaufenden Signalkaskaden eingebunden. Innerhalb dieser Signalkaskaden hat die SHP2, soweit bis jetzt bekannt, immer eine positive regulatorische Funktion (Gadina et al. 2000), während die SHP1 negativ regulatorisch eingreift (Yamashita et al. 1999). Zu nennen ist hier auch die Beteiligung der SHP2 an der Zellteilung. Ohne die SHP2 kommt es zu einem Abbruch der Mitose in der G1-Phase (Roche et al. 1996). Eine hohe Expressionsrate der SHP2 findet sich in Gehirn, Herz, Niere, T- und B-Zellen.

Da die PTP's in fast sämtliche Signaltransduktionskaskaden eingreifen, ist ihre Funktion von zentraler Bedeutung. Von vielen dieser Enzyme kennt man noch nicht alle ihre Substrate und Funktionen. Da ihre Verteilung in den verschiedenen Organen noch nicht vollständig untersucht ist, erhofft man sich von Lokalisationsstudien Aufschluß sowohl über ihr Vorkommen als auch über ihre jeweiligen Funktionen zu erhalten.

In der Leber als zentralem Organ des Stoffwechsels ist eine genaueste und sensible Regulation der ablaufenden Reaktionen von essentieller Bedeutung. So kann vermutet werden, daß auch hier PTP's regulierend tätig sind. Es stellt sich daher die Frage, an welcher Stelle und bei welchen Stoffwechselfvorgängen die PTP's in der Leber regulierend eingreifen (Proteinsynthese, Entgiftungsreaktionen, Gluconeogenese etc.).

1.2 Aufbau und Funktion der Leber in ihren Untereinheiten

Die Leber, das größte Organ des Körpers, hat als zentrales Stoffwechselorgan ein höchst differenziertes katalytisches Potential. Im Körper hat sie metabolische Aufgaben, ist Abwehrzentrum, kontrolliert das hormonelle System und dient als Blutreservoir (Jungermann 1995). Diesen Funktionen muß auch ihre Morphologie angepasst sein.

Eine Aufteilung in ihre Untereinheiten ist sowohl nach funktionellen als auch nach morphologischen Gesichtspunkten möglich.

Durch die Verzweigung der Pfortaderäste innerhalb des Lebergewebes kommt es zur Segmentgliederung. Makroskopisch besteht die Leber aus vier Lappen, die wiederum in acht Unterlappen unterteilt werden.

Mikroskopisch ist als morphologisches Bauelement das etwa 1,2 mm x 2 mm große Leberläppchen, auch als Zentralvenenläppchen bezeichnet, zu nennen. Hierbei liegt die abführende Sammelvene im Zentrum des Läppchens und die Zellen laufen radiär auf die Vene zu. Die Blutdurchströmung erfolgt charakteristischerweise von peripher nach zentral. Funktionell kommt dem Zentralvenenläppchen keine Bedeutung zu.

Von funktioneller Bedeutung ist die Unterteilung der Leber in portale Läppchen.

Als portales Läppchen wird jener Bereich bezeichnet, in dessen Mittelpunkt sich eine Glisson'sche Trias befindet (bestehend aus einer Vene, einer Arterie und einem ableitenden Gallengang) und dessen Eckpunkte durch die umliegenden drei Zentralvenen gebildet werden. Die funktionelle Bedeutung dieser Einheit bezieht sich auf die Gallensekretion, die über den im Zentrum dieses Läppchens liegenden Gallengang der Glisson'schen Trias drainiert wird (Matsumoto 1979).

Die andere funktionelle Einteilung in Acini (Rappaport 1976, Katz 1989) orientiert sich an den Stoffwechselforgängen der Leber. Hier gelangt das Blut über Endäste der Portalvene und der Arteria hepatica in die Lebersinusoiden, welche in die in der vaskulären Peripherie gelegenen efferenten Venen (= Zentralvene) einmünden. Der Acinus ist demnach als mikrozirkulatorische Parenchymeinheit definiert, welche konzentrisch um die Achse der efferenten Gefäße lokalisiert ist. Anatomisch und funktionell kann der Acinus in drei Untereinheiten gegliedert werden: in eine

- periportale Zone,
- perivenöse Zone,
- intermediäre Zone.

Periportal findet sich eine hohe Konzentration an regulatorischen Hormonen, Nährstoffen und Sauerstoff, welche nach perivenös deutlich abnimmt (kontinuierlicher Gradient nach Jungermann 1995). Diese durch das Konzentrationsgefälle bedingte relative Unterversorgung der acinären Peripherie mit O₂ und Nährstoffen macht die perivenös liegenden Hepatozyten anfällig für Hepatotoxine und Sauerstoffmangel.

In diesem Zusammenhang ist der Weg des Blutes von entscheidender Bedeutung für die Funktion der Leber als zentralem Stoffwechselorgan. Die Vena portae sammelt das Blut der unpaaren Abdominalorgane und bringt es zur Leber. Es gelangt dann über ihre Endäste in die Sinusoide. Der Aufbau der Sinusoide ist maßgeblich an der Effizienz des Leberstoffwechsels beteiligt.

Durch variierende Sinusoidallumina kommt es zu einer starken Erweiterung der Strombahnen und damit einer Verlangsamung des Blutstromes. Eine bessere Ausnutzung des Sauerstoff- und Nährstoffangebotes wird so ermöglicht. Je nach Funktionszustand sind die Sinusoide zwischen 5 – 15 µm weit.

Das Endothel der Sinusoide weist Fenestrierungen auf. Durch diese Diskontinuität kann das Plasma des Pfortaderblutes aus dem Kapillarbett austreten und in den Disse'schen Raum, den Spaltraum zwischen den Leberzellen und den Gefäßendothelien, gelangen.

Die Hepatozyten haben zahlreiche unregelmäßige, in den Disseschen Raum hineinragende, Mikrovilli. Die Oberfläche der Hepatozyten vergrößert sich dadurch um das Fünf- bis Sechsfache, die Austauschvorgänge werden erheblich erleichtert (Rohen und Lütjen-Drecoll 1990). Diese Vorgänge erlauben sogar einen Übertritt von Teilchen bis zu einer Größe von 0,5 µm (Reinke 1987).

1.2.1 Einteilung der Leberzellen

Auf Grund ihrer komplexen Funktionen kann davon ausgegangen werden, daß die Leber sehr heterogen zusammengesetzt ist. Das Lebergewebe besteht aus fünf verschiedenen Zellpopulationen: den Hepatozyten, den Endothelzellen, den Kupffer-Zellen, den Pit-Zellen und den Ito-Zellen.

Die Hepatozyten machen 77 Prozent des hepatischen Zellvolumens und 60 Prozent der hepatischen Zellzahl aus (Sasse 1986).

Die verbleibenden 40% der Gesamtzellzahl werden von den sogenannten Nicht-Parenchymzellen gestellt. Diese setzen sich zu 70% aus Endothelzellen, zu 20% aus Kupffer-Zellen, zu 10% aus Ito-Zellen, den perisinusoidalen Fettspeicherzellen oder Stellat-Zellen (Knook 1977, Knook und Sleyster 1976, Knook und Sleyster 1980), und zu weniger als 1% aus Pit-Zellen, welche als organassoziierte natürliche Killerzellen betrachtet werden, zusammen (Wisse et al. 1976).

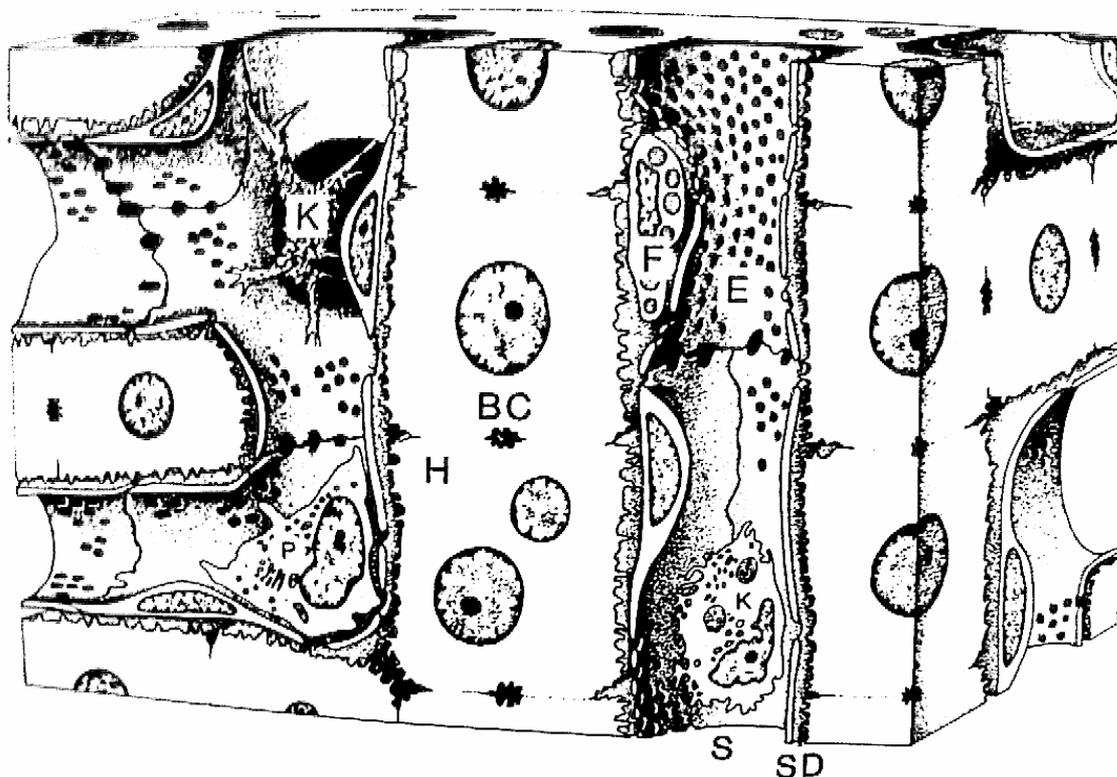


Abb 1: Schematische Darstellung des Aufbaus der Leber und ihrer Zellpopulationen. Gallengangskapillare (BC), Endothelzellen (E), Ito-Zellen (F), Hepatozyten (H), Kupffer-Zelle (K), Pit-Zelle (P), Sinusoid (S), Disse'scher Raum (SD).

1.2.1.1 Hepatozyten

Zu den Hauptaufgaben der Hepatozyten gehören die Bildung von Plasmaproteinen und der Metabolismus von Kohlenhydraten und Xenobiotika, ferner die Entgiftung von Aminosäuren und Ammoniak über die Harnstoffsynthese (Jungermann und Katz 1989, Feldmann et al. 1992, Jungermann und Thurman 1992, Misra et al. 1992). Periportal und perivenös gelegene Hepatozyten unterscheiden sich in ihrer enzymatischen Aktivität (Jungermann und Katz 1989) und haben daher auch unterschiedliche metabolische Fähigkeiten. Periportal erfolgt hauptsächlich der oxidative Energiestoffwechsel: die Gluconeogenese, die Glycogensynthese aus Pyruvat und der Glycogenabbau, die Cholesterolsynthese, der protektive Metabolismus mit Glutathion, die Peroxidation und Konjugation, die Gallenproduktion, die Produktion von Albumin und Fibrinogen. Perivenös erfolgt die Aufnahme von Glucose, die Glycolyse, die Glycogenproduktion aus Glucose und der Glycogenabbau zu Pyruvat, die Liponeogenese, die Glutaminproduktion aus NH_3 , der Xenobiotikametabolismus, die Glucoronidation, die Produktion von α -Fetoprotein, Angiotensinogen und α_1 -Antitrypsin (Jungermann 1995).

1.2.1.2 Kupffer Zellen

Die Kupffer-Zellen, die lebergewebetypischen Makrophagen, stellen das größte Reservoir von allen Makrophagen im Körper dar. Man findet sie vorzugsweise in der periportalen Region (43%), gefolgt von der perivenösen Zone (29%) und dem mittleren Bereich (28%) (Bouwens et al. 1986).

Die Kupffer-Zellen bilden mit den sinusoidalen Endothelzellen das retikuloendotheliale System der Leber.

Das retikuloendotheliale System ist aktiv am Erkennungsprozeß und Abbau von Makromolekülen sowie von Mikroorganismen aus dem Blutplasma beteiligt (Magnusson und Berk 1989, van Berkel et al. 1991, Dini et al. 1995a und b).

An die endotheliale Wand des Sinusoides angeheftet bilden die Kupffer-Zellen eine protektive Barriere zwischen portaler und systemischer Zirkulation (Abbildung 1). Potentiell schädliche Substanzen, die sich im portalen Blut befinden, wie Endotoxine, Mikroorganismen, Immunkomplexe, Tumorzellen und andere Antigene (Toth und Thomas 1992), werden von ihnen aus dem portalen Blut entfernt.

Darüber hinaus produzieren sie inflammatorische Mediatoren wie Zytokine, den Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) oder den Transforming-growth-factor- β (TFG- β) (Decker 1990).

Periportal scheint ihre endozytotische Funktion höher zu sein als perivenös. Perivenös ist ihre zytotoxische Funktion (Bouwens et al. 1992) höher als periportal.

Für den Umwandlungsprozess der Natural-killer-cells (NK) des peripheren Blutes zu den hochaktivierten hepatischen NK-Zellen sind sie ebenfalls essentiell (Vanderkerken et al. 1995).

1.2.1.3 Ito-Zellen

Die wichtigste metabolische Funktion der Ito-Zellen (perisinusoidale Fettspeicherzellen, Stellate-Zellen), die die sinusoidale Auskleidung umschließen (Abbildung 1), ist die Speicherung von Vitamin A (Retinol) in Lipidtröpfchen (Hendriks et al. 1985).

Ein spezifisches Verteilungsmuster analog zu dem der Kupffer-Zellen gibt es für die Ito-Zellen nicht. Sie sind gleichmäßig in der Leber verteilt (Wake 1980).

Da diese Zellen kontraktile Elemente besitzen, wird ihre Beteiligung an der praesinusoidalen (Suematsu et al. 1993) und der intrasinusoidalen (Kawada et al. 1993) Blutflußregulation diskutiert.

Außerdem synthetisieren und sezernieren sie extrazelluläre Matrixproteine innerhalb des Disse`scher Raumes (Bouwens et al. 1992) und sind an der Pathogenese der Fibrose und Zirrhose beteiligt (Gressner 1991, Lissos 1992a und b, Lissos und Davis 1992, Ramadouri et al. 1993, Paradies 1996).

Während einer Leberentzündung ist das Vorkommen der Ito-Zellen nicht mehr auf den Disse`scher Raum begrenzt. Es kommt zu einer Zellvermehrung im Bereich der entzündlichen Prozesse in enger Nachbarschaft zu den geschädigten Hepatozyten. Diese Ito-Zellen wandeln sich in myofibroblastenähnliche Zellen um, die eng mit den Lebermyofibroblasten verwandt, aber nicht mit ihnen identisch sind (Bouwens et al. 1992).

1.2.1.4 Pit-Zellen

Pit-Zellen, die auch als leberassoziierte Lymphozyten bezeichnet werden, sind natürliche Killerzellen. Sie haften lose an den Kupffer-Zellen oder auch an den sinusoidalen Endothelzellen (Burt et al. 1993, Wisse et al. 1997) (Abbildung 1).

Bei der Verteilung der Pit-Zellen läßt sich eine Zonierung entlang des Sinusoides feststellen. Periportal ist eine fast doppelt so hohe Anzahl an Pit-Zellen vorhanden wie perivenös.

Sie sind direkt zytotoxisch und spielen bei der Zerstörung von Tumorzellen eine wichtige Rolle. Dabei wird bei der Zielzelle entweder eine Apoptose induziert oder eine Zellnekrose ausgelöst.

Virusinfizierte Leberzellen können durch Pit-Zellen zerstört werden. Dabei ist der Interferon α (IFN α) - Anstieg am Beginn einer viralen Hepatitis ein potentes Signal zur Stimulation der Pit-Zellen. Die Aktivierung der Pit-Zellen erfolgt durch Interleukin II (Eddelston 1987).

1.2.2 Disse`cher Raum

Der Disse`sche Raum, der mit einer Matrix von ungewöhnlicher Dichte gefüllt ist (Mc Guire et al. 1992, Iredale und Arthur 1994), trägt nach der Indikatorverdünnungsmethode zu sechs bis sieben Prozent zum Lebervolumen bei (Henriksen et al. 1984) (Abbildung 1). Alle Metaboliten, die zwischen dem Blutstrom und den Hepatozyten ausgetauscht werden, passieren diesen Raum.

Ausgehend von diesen sehr unterschiedlichen Zelltypen stellt sich die Frage, ob und wo PTP`s an den Stoffwechselfvorgängen beteiligt sind sowie um welche PTP`s es sich handelt, wo diese lokalisiert sind und ob es eine Zonierung gibt.

Zur Klärung dieser Fragen sollte daher die Verteilung der PTP 1B/T-Zell und der SHP1/SHP2 untersucht werden. Ein Nachweis der PTP 1B/T-Zell PTP gelang mit der Immunfluoreszenz nicht.

Der Nachweis der SHP1/2 konnte in den Non-Parenchymzellen der Leber erbracht werden. Um das Verhalten dieser Zellpopulationen und das Vorkommen der PTP`s unter veränderten Bedingungen zu untersuchen, wurde eine Leberschädigung im Sinne einer beginnenden Fibrose, an deren Pathogenese die Stellate-Zellen beteiligt sind, chemisch induziert. Als geeignetes Agens erschien uns hierzu das Methotrexat, da es auch bei der Behandlung von Patienten eine hohe klinische Relevanz besitzt.

1.3 Methotrexat

Methotrexat ist ein Chemotherapeutikum und gehört in die Gruppe der Antimetaboliten. Es greift in den Folatstoffwechsel ein und vermindert die Übertragung von C1-Bausteinen im Organismus.

Methotrexat war das erste Chemotherapeutikum, das eine erfolgreiche temporäre Remission bei Leukämie bewirken konnte (Faber et al. 1948). Des Weiteren konnte es als erstes Medikament Chorioncarzinome dauerhaft heilen (Hertz 1963).

Die Bandbreite der Anwendung von Methotrexat hat sich durch die Einführung von Hochdosisregimen mit anschließendem Leukovorinrescue deutlich erweitert. Hierdurch sprechen zuvor methotrexatresistente Tumoren auf die Therapie ohne gravierende Steigerung der Nebenwirkungsrate an.

Auch bei entzündlichen Krankheiten kommt Methotrexat zur Anwendung. Hierzu zählen vor allem die Psoriasis (Mc Donald 1981), die rheumatoide Arthritis, die Wegener'sche Granulomatose (Jackson 1984, Sheppner et al. 1985) und die primäre biliäre Zirrhose (Kaplan 1989a und b).

Die MTX-Therapie kann gravierende Nebenwirkungen aufweisen. Mit zu den wichtigsten gehören die Lebertoxizität und, bei Langzeittherapie in niedriger Dosierung, die Leberzirrhose.

1.3.1 Einfluß von Methotrexat auf den Folsäure- und Vitamin-B12-Stoffwechsel

Folsäure und Vitamin-B12 müssen über die Nahrung zugeführt werden. Ein Mangel eines oder beider Vitamine führt zu einer gestörten DNA-Synthese in jeder sich teilenden Zelle. Daher sind Zellen mit einer hohen Teilungsrate besonders empfindlich für den Mangel eines dieser Vitamine.

Hierauf gründet sich der therapeutische Effekt von Folsäureantagonisten wie Methotrexat (MTX) in der Tumorthherapie.

Im intrazellulären Metabolismus spielen sowohl Vitamin-B12 als auch Folsäure eine große Rolle und können nur im Wechselspiel miteinander eine korrekte DNA-Synthese leisten. Intrazellulär kommt Vitamin-B12 in zwei aktiven Formen vor. Dabei handelt es sich um die beiden Koenzyme Methylkobalamin und Desoxyadenosylkobalamin (Stahlberg 1967, Linnell et al. 1971).

Während Desoxyadenosylkobalamin als Kofaktor für das mitochondriale Mutaseenzym an der Isomerisierung von L-Methylmalonyl-CoA zu Succinyl-CoA beteiligt ist (Huennekens 1968, Weissbach und Taylor 1968), wird Methylkobalamin für die Synthese von Methionin

benötigt. Methionin ist im Ablauf des Folat-Stoffwechsels von entscheidender Bedeutung (Weir und Scott 1983).

Die von Methyltetrahydrofolat ($\text{CH}_3\text{H}_4\text{PteGlu}_1$) zur Verfügung gestellten Methylgruppen werden zur Synthese von Methylkobalamin benötigt. Diese sind dann wiederum Methylgruppendonor bei der Konversion von Homozystein zu Methionin.

Ohne diese Folatkobalamininteraktion ist eine normale Purin- und Pyrimidinsynthese und konsekutiv eine normale DNA- und RNA- Synthese nicht möglich.

Die Methioninsynthesereaktion ist vornehmlich verantwortlich für die Kontrolle des Recyclings der Folat-Kofaktoren, für die Aufrechterhaltung der intrazellulären Folypolyglutamatkonzentration sowie durch die Synthese von Methionin und dessen Produkt S-Adenosylmethionin für die Aufrechterhaltung zahlreicher Methylierungsreaktionen.

Im Rahmen des Vitaminstoffwechsels im Körper wird den Zellen hauptsächlich Methyltetrahydrofolat zur Verfügung gestellt. Ein Transfer der Methylgruppe auf das Kobalamin ist daher unumgänglich, um den Zellen ausreichend Tetrahydrofolat ($\text{H}_4\text{PteGlu}_1$) für die verschiedenen Stoffwechselwege zur Verfügung zu stellen.

So können C1-Gruppen bei der Konversion von Serin zu Glycin auf Tetrahydrofolat übertragen werden. Es entsteht dabei 5,10-Methylen tetrahydrofolat ($5,10 \text{ CH}_2\text{H}_4\text{PteGlu}$). In einem weiteren Schritt wird die aufgenommene C1-Gruppe auf Desoxyuridin-Monophosphat (dUMP) übertragen. Es entsteht dabei Desoxythymidin-Monophosphat (dTMP). Dabei wird 5,10-Methylen tetrahydrofolat zu Dihydrofolat (H_2PtiGlu) überführt. Der Zyklus wird durch die Reduktion von Dihydrofolat zu Tetrahydrofolat durch die Dihydrofolatreduktase vollendet.

An dieser Stelle greifen die Folatantagonisten wie Methotrexat ein.

Der tägliche Bedarf an Folsäure beträgt etwa 50 – 100 μg . Mit der Nahrung werden täglich 150 – 200 μg in der Polyglutamatform aufgenommen, wie sie auch überwiegend in den Zellen vorkommt.

Zirka die Hälfte der angebotenen Menge wird vorwiegend im Ileum resorbiert.

Nach Abspaltung von Glutaminresten, ihrer Reduktion in den Mukosazellen und der Methylierung in der Leber findet man sie im Serum vorwiegend als Fünfmethyltetrahydrofolsäure.

In der zur Tetrahydrofolsäure reduzierten Form steht es als C 1-Akzeptor zur Verfügung.

Durch Anlagerung der C1-Gruppe an unterschiedliche Positionen innerhalb der Tetrahydrofolsäure entstehen unterschiedliche Formen von Koenzymen.

1.3.2 Aufgaben der Koenzyme

Zusammenfassend kann man die Rolle dieser Koenzyme wie folgt beschreiben:

- Konversion von Homozystein in Methionin. Diese Reaktion benötigt Methyltetrahydrofolat ($\text{CH}_3\text{H}_4\text{PteGlu}$) als Methylendonator und benutzt Vitamin-B12 als Kofaktor.
- Konversion von Serin in Glycin. Diese Reaktion benötigt die Tetrahydrofolsäure als Methylgruppenakzeptor des Serins, und Pyridoxalphosphat wird als Kofaktor verwendet. Hierdurch entsteht 5,10- $\text{CH}_2\text{H}_4\text{PteGlu}$, ein essentielles Koenzym der Thymidylat-Synthese.
- Synthese von Thymidylat. 5,10- $\text{CH}_2\text{H}_4\text{PteGlu}$ liefert eine Methylengruppe und Reduktionsäquivalente, die bei der Thymidylat-Synthese auf Desoxyuridylat übertragen werden. Hierbei handelt es sich um eine die DNA-Syntheserate limitierende Reaktion.
- Im Histidinmetabolismus wirkt Tetrahydrofolsäure als Forminogruppenfänger bei der Konversion von Forminoglutaminsäure zu Glutaminsäure.
- Bei der Purinbiosynthese werden Kohlenstoffatome an den Positionen 2 und 8 in den wachsenden Purinring mit Folsäurederivaten als Kofaktoren eingebaut.
- Beim Auf- und Abbau von Format wird in einer reversiblen Reaktion sowohl Tetrahydrofolsäure als auch 10-Formyltetrahydrofolat benötigt (10- $\text{CHOH}_4\text{PteGlu}$). Es wird mit der Gallenflüssigkeit sezerniert und im Darm wieder aufgenommen (Steinberg et al. 1979).
- Das Enzym Dihydrofolatreduktase katalysiert die Reduktion von Dihydrofolat zu Tetrahydrofolat, welches, wie bereits oben beschrieben, ein vitaler Faktor in der Purin- und Pyrimidinsynthese ist.
- Die Hemmung der Dihydrofolatreduktase durch Methotrexat führt zu einer partiellen Verarmung an Tetrahydrofolatkofaktoren in der Zelle (Sheppner et al. 1985, Chu et al. 1993a und b).

Die Hydrofolatinhibitoren unterscheiden sich in ihrem Hemmpotential des Enzyms in unterschiedlichen Spezies.

Kristallografische Studien erklärten auf atomarer Ebene die hohe Affinität von Methotrexat zur Dihydrofolatreduktase (Schweitzer et al. 1989, Bystroff und Kraut 1991).

Da Folsäure und ihre Analoga sehr polare Moleküle sind, werden spezifische Transportmechanismen für die Aufnahme in die Zelle benötigt (Elwood 1989, Dixon et al. 1994). In der Zelle werden zusätzlich Glutamyreste an Methotrexat gebunden (Cichowicz und Shane 1987). Methotrexat kann als Polyglutamat bis zu sechs Glutamyreste tragen und deswegen dann die Zellmembranen schlecht bis gar nicht überwinden. Dies erklärt die verlängerte Retention von Methotrexat in Tumoren und normalem Gewebe, wie zum Beispiel der Leber. Als Polyglutamat besteht eine höhere Affinität gegenüber einem Monoglutamat für die folatabhängigen Enzyme, die für die Purin- und Tymidylatsynthese notwendig sind. Bei der Dihydrofolatreduktase trifft dies nicht zu.

1.3.3 Wirkmechanismus von Methotrexat

Wie die meisten Antimetaboliten ist auch Methotrexat nur bedingt selektiv für Tumorzellen und entwickelt seine Toxizität auch an anderen sich schnell teilenden Zellen des Organismus. Hierbei sind besonders das Knochenmark und das Darmepithel hervorzuheben. Folatantagonisten führen zu einem Absterben der Zellen in der S-Phase des Zellzyklus. Daher ist es nur verständlich, daß Methotrexat seine höchste Wirksamkeit in der exponentiellen Wachstumsphase und nicht in der Plateauphase entwickelt.

Des Weiteren inhibiert Methotrexat die RNA-Synthese und damit folglich auch die Proteinsynthese, was zu einem verlangsamten Eintritt der Zelle in die S-Phase führt. Die zytotoxische Reaktion von Methotrexat wurde daher auch als selbstlimitierend beschrieben. Seine Wirkung als antiinflammatorisch wirksame Substanz bei der Therapie der primären biliären Zirrhose, der Psoriasis und der immunsuppressiven Therapie entfaltet es nicht als Folatantagonist. Es scheint, daß Methotrexat aufgrund einer Strukturhomologie mit dem Interleukin-1 β die Bindung des Interleukin an den Interleukinrezeptor unterbindet (Kaplan 1989).

Der Wirksamkeit von Methotrexat stellen die Zellen mehrere erworbene Resistenzmechanismen entgegen.

Hierzu zählen der verschlechterte Transport von Methotrexat in die Zellen (Assaraf und Schimke 1987, Trippett et al. 1992), die Produktion einer strukturell veränderten Dihydrofolatreduktase mit geringerer Affinität zu Antimetaboliten (Srimatkandada et al. 1989), gesteigerte intrazelluläre Dihydrofolatkonzentrationen (Pauletti et al. 1990), die verminderte Fähigkeit zur Synthese von Methotrexatpolyglutamaten (Li et al. 1992) und eine herabgesetzte Thymidilatsyntheseaktivität (Curt et al. 1985).

Bei Leukämiepatienten, die mit Methotrexat behandelt wurden, kommt es innerhalb weniger Tage zu einem merklichen Anstieg der Dihydrofolatreduktase in den leukämischen Zellen. Dies spricht für eine Induktion der Enzymsynthese (Chu et al. 1993).

Eine über einen längeren Zeitraum durchgeführte Behandlung mit Methotrexat amplifiziert ebenfalls die Bildung der Dihydrofolatreduktase; Tumorzellpopulationen mit deutlich erhöhtem Dihydrofolatreduktasespiegel treten in Erscheinung (Stark und Wahl 1984, Curt et al. 1983). Um die MTX-Resistenz zu überwinden, kann durch hohe MTX-Dosen unter Leukovorinschutz der Eintritt der Substanz in Zellen mit Transportdefekt mit der Folge ausreichend hoher intrazellulärer Methotrexatspiegel zur Inaktivierung der Dihydrofolatreduktase erzwungen werden.

In den Zellen verbleibt das Methotrexat als Polyglutamat sehr lange. Es kann in Nierenzellen noch Wochen und in Leberzellen noch Monate nach Abschluss der Therapie nachgewiesen werden. Zusätzlich unterliegt es auch einem enterohepatischen Kreislauf.

Methotrexat wird, niedrig dosiert, in der Psoriasis-therapie und bei therapierefraktärer rheumatoider Arthritis (Hoffmeister 1983) eingesetzt.

Mit großem Erfolg wird Methotrexat auch bei der Therapie der akuten lymphoblastischen Leukämie im Kindesalter, bei Chorioncarzinomen und den damit in Zusammenhang stehenden Trophoblastentumoren eingesetzt.

1.4 Ziele der Arbeit

In dieser Untersuchung soll das Vorkommen der verschiedenen PTP's in der Leber untersucht werden. Weiterhin ist die Zuordnung der PTP's zu den einzelnen, in der Leber vorkommenden Zellpopulationen geplant.

Durch Methotrexat wird eine Lebergewebeschädigung hervorgerufen. Ein möglicherweise bestehender Zusammenhang der Methotrexat- bedingten Veränderungen mit dem

Vorkommen der PTP`s soll diskutiert und der Einfluß des Methotrexats auf die einzelnen Zellpopulationen untersucht werden. Hierzu wird folgende These formuliert:

Unter Methotrexat kommt es in Rattenlebern sowohl periportal als auch perivenös zu einer Veränderung in den spezifischen Leberzellpopulationen. Die Zellanzahl von Kupffer-Zellen, Ito-Zellen und Natürlichen Killerzellen weicht in der Leber von behandelten Versuchstieren von der Zellanzahl bei unbehandelten Versuchstieren ab. Es wird erwartet, daß die Mittelwerte von Experimental- (MTX-Behandlung) und Kontrollgruppe (keine Behandlung) sich statistisch signifikant voneinander unterscheiden.

Die Überprüfung der Hypothese erfolgt für jede Messung und jeden Zelltyp sowohl periportal als auch perivenös mittels des Fisher-Pitman-Randomisierungstests für zwei unabhängige Stichproben. Der Test wird zweiseitig durchgeführt und das Signifikanzniveau auf $\alpha = 0,05$ festgesetzt.

Es lassen sich also folgende Ziele stichwortartig zusammenfassen:

- Untersuchungen zum Vorkommen verschiedener PTP`s in der Leber;
- Zuordnung der PTP`s zu den einzelnen Zellpopulationen;
- Zuordnung der PTP`s zu den einzelnen Zellstrukturen soweit möglich.
- Ermittlung des Einflusses von Methotrexat auf die einzelnen Zellpopulationen der Leber und Untersuchung der Veränderung auf statistische Signifikanz;
- Diskussion über den möglicherweise bestehenden Zusammenhang der methotrexatbedingten Veränderungen mit dem Vorkommen der PTP`s.

2 Material und Methoden

2.1 Tiere

2.1.1 Tierhaltung

Für die Versuche wurden insgesamt 33 männliche Wistar-Ratten (Winkelmann, Borchon) verwendet. Sie wurden mit einem Gewicht von 180-200 g geliefert. Die Adaptationszeit betrug 3 Tage. Es wurde je ein Tier pro Käfig gehalten. Die Tiere wurden mit Rattenfutter in pelletierter Form ad libitum gefüttert, Wasser stand ebenfalls ausreichend zur Verfügung.

2.1.2 Tierversuchsgenehmigung

Die „Genehmigung zur Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren“ wurde vom Regierungspräsidium Gießen am 28. April 1997 unter dem Aktenzeichen 17a-19c20-15(1)-1/97-Gi20/23-2/97 erteilt.

2.1.3 Behandlung der Tiere

Für die Untersuchung wurden die Tiere in Gruppen eingeteilt. Jede Versuchsgruppe bis auf Gruppe VI umfaßte fünf Ratten.

Um in den ersten beiden Gruppen trotz niedriger Methotrexat-(MTX)-Dosis einen Wirkspiegel zu erreichen, wurde hier das MTX intraperitoneal (i.p.) verabreicht. Hierdurch sollte der First-pass-Effekt der Leber umgangen werden.

Die Tiere der Gruppen I-V wurden für die lichtmikroskopischen und biochemischen Untersuchungen verwendet.

Gruppe	Applikationsart/-zeitpunkt	Dosis	Untersuchungen
I	Intraperitoneal (i.p.) Für 4 Tage, jeweils 9 Uhr	5mg MTX pro kg Körpergewicht	Lichtmikroskopie, Aktivitätsbestimmung, SDS Page
II	Intraperitoneal (i.p.) Für 4 Tage, jeweils 9 Uhr	7,5mg MTX pro kg Körpergewicht	Lichtmikroskopie, Aktivitätsbestimmung, SDS Page
III	Oral (p.o. durch Magensonde) Für 4 Tage, jeweils 9 Uhr	15mg MTX pro kg Körpergewicht	Lichtmikroskopie, Aktivitätsbestimmung, SDS Page
IV	Oral (p.o. durch Magensonde) Für 4 Tage, jeweils 9 Uhr	20mg MTX pro kg Körpergewicht	Lichtmikroskopie, Aktivitätsbestimmung, SDS Page
V	Intraperitoneal (i.p.) Oral (p.o. durch Magensonde) Für 4 Tage, jeweils 9 Uhr	NaCl pro kg Körpergewicht	Lichtmikroskopie, Aktivitätsbestimmung, SDS Page
VI	Intraperitoneal (i.p.) Für 4 Tage, jeweils 9 Uhr	7,5mg MTX pro kg Körpergewicht	Zellisolation, Lichtmikroskopie, Aktivitätsbestimmung, SDS Page
VII	Intraperitoneal (i.p.) Für 4 Tage, jeweils 9 Uhr	7,5mg MTX pro kg Körpergewicht	Lichtmikroskopie, Aktivitätsbestimmung, SDS Page

Tabelle 1: Aufstellung der einzelnen Versuchstiergruppen. Die Tiertötung erfolgte immer am ersten Tag nach der letzten Applikation von MTX oder NaCl.

2.1.4 Tiertötung

Die Tiere wurden immer am Tag nach der letzten MTX-Gabe getötet. Hierzu wurden Sie in einem gasdichten Gefäß mit Chloroform (Merck, Darmstadt) narkotisiert. Im Toleranzstadium erfolgte der Medianschnitt über dem Abdomen und dem Thorax.

2.2 Probengewinnung

Je zwei behandelte und eine unbehandelte Ratte wurden nach dem Medianschnitt perfusionsfixiert. Den verbleibenden drei Ratten eines Kollektivs wurden die Organe im unfixierten Zustand entnommen.

2.2.1 Perfusionslösungen

2.2.1.1 Vorspüllösung, pH 7,3-7,4

Polyvinylpyrolidon K 30 (Roth, Karlsruhe)	25g
NaCl 0,9% (Roth, Karlsruhe)	9g
Procainhydrochlorid (Merck, Darmstadt)	5g
Aqua destillata	1000ml

Membranfiltration 3 µm und 0,6 µm Porengröße.

Direkt vor der Perfusion werden 2 ml Heparin (Liquemin[®], Roche) zugegeben.

2.2.1.2 Fixationslösung – Zamboni

Für 1 Liter

Formaldehydlösung, 37%ig (Merck, Darmstadt)	50ml
Phosphatpuffer, 0,2 molar, pH 7,4 (siehe Immunhistochemie)	500ml
Gesättigte wässrige Pikrinsäure (Merck, Darmstadt), filtriert	150ml
Aqua destillata	300ml

2.2.1.3 Fixierung

Zur Perfusionsfixierung wurden das rechte Herzohr und die linke Herzkammer eröffnet. Eine Kanüle wurde durch die Öffnung der Kammer in die Aorta vorgeschoben und dort fixiert. Zunächst erfolgte eine Entblutung der Ratte durch 200ml mit Heparin (Liquemin[®], Roche) angereicherter Vorspüllösung. Danach erfolgte die Perfusion mit 500ml Zamboni.

Nach erfolgter Fixierung wurde die Leber entnommen, in 1cm x 1cm x 1cm große Blöcke geschnitten und in Phosphatpuffer über 24 Stunden gespült. Dabei wurde der Puffer mindestens achtmal gewechselt.

Anschließend wurde das Gewebe für 24 Stunden in 20%ige Saccharoselösung eingelegt, um einen ausreichenden Gefrierschutz zu gewährleisten.

Hiernach erfolgte das Einbetten der Leberproben in Tissue-Tek (Sakura, Holland) und das Einfrieren in flüssigem Stickstoff.

Diese Proben wurden ausschließlich für immunzytochemische Untersuchungen verwendet.

Bei der Entnahme von Gewebe aus den unfixierten Tieren erfolgte zunächst das Ausbluten. Im Anschluß wurde die Leber entnommen und in 1cm x 1cm x 1cm große Stücke portioniert. Einige Stücke davon wurden in Tissue-Tek (Sakura, Holland) eingebettet und in Isopentan (Merck, Darmstadt), das von flüssigem Stickstoff umspült wurde, schockgefroren. Die restlichen Proben wurden ohne Tissue-Tek schockgefroren.

Das unfixierte Gewebe wurde für immunzytochemische Untersuchungen und biochemische Analysen verwendet.

Sämtliche Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

2.3 Immunzytochemische Untersuchungen (ICC)

2.3.1 Puffer

2.3.1.1 Phosphatpuffer [PB]

Für 1 Liter 0,2 molar, pH 7,4

KH_2PO_4 (Merck, Darmstadt)	5,44g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt)	56,82g
Aqua destillata	1000ml

2.3.1.2 Phosphatgepufferte Salzlösung [PBS]

Für 1 Liter 0,1 molar, pH 7,4

KH_2PO_4 (Merck, Darmstadt)	2,72g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt)	28,41g
NaCl 0,9% (Roth, Karlsruhe)	9g
Aqua destillata	1000ml

2.3.1.3 Tris-HCl 0,01 molar, pH 8,2

Tris-HCL-Puffer (Sigma, USA)	1,32g
HCl (Roth, Karlsruhe)	nach pH
Aqua destillata	1000ml

2.3.1.4 Inkubationspuffer 0,1 molar, pH 7,4

0,1 molarer Phosphatpuffer	pH 7,4
NaCl 1,8% (Roth, Karlsruhe)	18g/l
Rinderserum Albumin [BSA] (Sigma, USA)	0,5%
Cold-Water-Fish-Gelatine [CWFS] (Aurion, Köln)	0,1%

2.3.1.5 Blocklösung 0,1 molar, pH 7,4

0,1 molarer Phosphatpuffer	pH 7,4
NaCl 1,8% (Roth, Karlsruhe)	18g/l
Rinderserum Albumin [BSA], (Sigma, USA)	5%
CWFS (Aurion, Köln)	0,1%

2.3.1.6 Gepuffertes Glycerol, pH 8,6

Natriumhydrogencarbonat [NaHCO ₃] 0,5 molar (Merck, Darmstadt)	50ml
Dinatriucarbonat [Na ₂ CO ₃] 0,5molar (Merck, Darmstadt)	nach pH
Glycerol (Merck, Darmstadt)	100ml

2.3.2 Herstellen von Cryostatschnitten und Vorbereitung der ICC

Zur Aufarbeitung der Proben wurden sowohl von den fixierten als auch von den unfixierten Gewebeproben ca. 10 µm dicke Cryostatschnitte (Leica CM 1900 Wetzlar) angefertigt.

Das Schneiden erfolgte bei einer Kammertemperatur von -20°C und einer Objekttemperatur von -17°C.

Die Schnitte wurden auf mit Gelatine beschichtete Objektträger aufgezogen und im Anschluß bei Raumtemperatur in einer Küvette für 30 Minuten getrocknet.

Für die immunhistologische Darstellung der verschiedenen zellulären Antigene wurden von jedem Leberblock Folgeschnitte hergestellt.

Die weiteren Schritte der Fluoreszenzfärbung erfolgten dann je nach Fixierung des Gewebes und erstem Antikörper.

2.3.3 Immunzytochemie

Für den immunhistologischen Nachweis von PTP-1C / 1D wurde sowohl die Methode der indirekten Immunfluoreszenz als auch die der Peroxidasereaktion gewählt. Im Gegensatz zur Peroxidase/ABC-Methode (Hsu et al. 1981a, b und c) treten bei der Immunfluoreszenz keine unerwünschten Hintergrundreaktionen der endogenen Peroxidase auf. Die bei der Immunfluoreszenzmethode gelegentlich festgestellte endogene Autofluoreszenz ist leichter als Hintergrundreaktion zu identifizieren. Die Peroxidasereaktion ist dagegen deutlich sensitiver. Ihr wurde daher für Doppelfärbungen mit zwei primären Maus-Antikörpern der Vorzug gegeben, während in allen anderen Fällen die Immunfluoreszenz zum Einsatz kam. Auch weist die Immunfluoreszenz in der Dokumentation deutliche Vorteile auf, da auf Grund der eingesetzten Komplementärfarben eine bessere Darstellung auf Farb- und Diapositiven möglich ist.

2.3.3.1 Seren, Antikörper und Substrate

2.3.3.1.1 Primärantikörper

Zur Erkennung der Posphotyrosinphosphatasen (PTP-asen) in den Zellen der Leber wurde ein Antikörper gegen SHP1/SHP2 verwendet.

Dieser Antikörper wurde gegen die gesamte Aminosäuresequenz des Proteins entwickelt. Er erfaßt daher die SHP1 und SHP2, da diese beiden Proteine über eine sehr hohe Sequenzhomologie verfügen. Es werden keine Rezeptor PTP-asen erfaßt.

Der Antikörper entstammt dem Kaninchen und wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Hofer, Universität Konstanz, zur Verfügung gestellt.

Da diese Kreuzreaktivität des verwendeten Antikörpers mit den beiden PTP's besteht, wurden in einem weiteren Schritt monoklonale Antikörper gegen die SHP1 und SHP2 verwendet.

Für die Lokalisationsanalyse des Enzyms in den einzelnen Subpopulationen der Leberzelle wurden für die jeweiligen Zellpopulationen spezifische Antikörper verwendet.

Zur Erkennung der Kupffer-Zellen wurden Antikörper gegen die Oberflächenantigene ED-1 und ED-2 sowie OX-6 eingesetzt.

Die Detektion der Natural-Killer-Zellen erfolgte mit dem 3.2.3 Antikörper.

Die Ito-Zellen wurden über Desmin und GFAP (glial fibrillary acidic protein) identifiziert.

Antikörper	Verdünnung	Isotyp	Bezugsquelle
SHP1/SHP2 Polyklonal	1:50	Rabbit IgG	Prof. Dr. Hofer Konstanz
SHP1 Monoklonal	1:100	Mouse IgG	PharMingen Heidelberg
SHP2 Monoklonal	1:100	Mouse IgG	PharMingen Heidelberg
ED-1	1:200	Mouse IgG	Serotec Oxford GB
ED-2	1:200	Mouse IgG	Serotec Oxford GB
Ox-6	1:200	Mouse IgG	Cedar Lane Laboratories Ontario USA
3.2.3	Arbeitsverdün- nung	Mouse IgG	Serotec Oxford GB
Smoth Muscle Actin	1:10	Mouse IgG	Sigma Aldrich Taufkirchen
Desmin	1:4	Mouse IgG	Boeringer Mannheim
GFAP	1:100	Rabbit IgG	Dako Hamburg
GFAP	1:100	Mouse IgG	Bio Genex

Tabelle 2: Verwendete primäre Antikörper

2.3.3.1.2 Sekundärantikörper

Biotiniliertes Ziegen-anti-Kaninchen-Immunglobulin (Amersham Life science, Braunschweig), in einer Verdünnung von 1:100

Biotiniliertes Ziegen-anti-Maus-Immunglobulin (Amersham Life science, Braunschweig), in einer Verdünnung von 1:100

Alkalische-Phosphatase-gekoppeltes Ziegen-anti-Maus-Immunglobulin (Sigma, St. Lois, USA), in einer Verdünnung von 1:100

Peroxidase-gekoppeltes Ziegen-anti-Maus-Immunglobulin (Sigma, St. Lois, USA), in einer Verdünnung von 1:100

2.3.3.1.3 Fluoreszenzantikörper

Streptavidin-gekoppeltes Texas-Rot (Amersham Life science, Braunschweig), in einer Verdünnung von 1:200

FITC-gekoppeltes Ziegen-anti-Kaninchen-Immunglobulin (Dianova, Hamburg), in einer Verdünnung von 1:500

2.3.3.1.4 Ziegenserum

kommerziell erworbenes Ziegenserum (Dako Hamburg).

2.3.3.1.5 Substratsysteme für alkalische Phosphatase und Peroxidase

Fast-Red/Naphthol-AS-TR-Phosphatase (Sigma, St. Lois, USA) als Substrat der alkalischen Phosphatase

3,3'-Diaminobenzidine [DAB] (Sigma, St. Lois, USA) als Substratsystem der Peroxidase

2.3.3.1.6 SHP1/SHP2 Antigen

Das Antigen wurde freundlicherweise genau wie der Antikörper gegen die SHP1/SHP2 von Herrn Prof. Dr. Hofer, Universität Konstanz, zur Verfügung gestellt.

2.3.3.2 Durchführung der Immunfluoreszenzmethode

Die Immunfluoreszenz wurde wie folgt durchgeführt (siehe auch: Blakeslee und Baines 1976; Bunka 1990):

1. Umranden der Schnitte mit einem PAP-PEN® (Science Services, München), anschließend dreimaliges Spülen in PBS für jeweils 5 Minuten.

2. Inkubation mit Blocklösung für 30 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur, um unspezifische Bindungsstellen der Antikörper zu blockieren.
3. Absaugen der Blocklösung und Auftragen des verdünnten Erstantikörpers. Inkubation in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur über Nacht.
4. Absaugen des Erstantikörpers und dreimaliges Spülen der Schnitte in PBS für jeweils 5 Minuten.
5. Auftragen des verdünnten, biotinilierten Sekundärantikörpers unter Berücksichtigung der Herkunft des Primärantikörpers.
6. Inkubation in einer feuchten Kammer für 1 Stunde bei Raumtemperatur.
7. Absaugen des Sekundärantikörpers und dreimaliges Spülen in PBS für jeweils 5 Minuten.
8. Auftragen des verdünnten, fluoreszenzmarkierten Streptavidinkomplexes. Inkubation in einer feuchten Kammer für 1 Stunde bei Raumtemperatur und Dunkelheit.
9. Absaugen des Streptavidinkomplexes und dreimaliges Spülen in PBS für jeweils 5 Minuten in Dunkelheit.
10. Eindeckeln der Schnitte in gepuffertes Glycerol, Lagern der Präparate bei 4°C und Dunkelheit.

2.3.3.3 Antikörperdemaskierung

Bei Verwendung der Erstantikörper ED-1 und OX-6 an fixiertem Gewebe erfolgte vor der ICC eine Antigendemaskierung mittels Kochen in der Mikrowelle (Shi et al. 1991, Werner et al. 1996) nach folgender Arbeitsvorschrift:

1. Spülen der Schnitte in Tris-Puffer-HCl dreimal für 5 Minuten bei Raumtemperatur.
2. Erhitzen der in einer Tris-Puffer-HCl gefüllten Küvette stehenden Schnitte in der Mikrowelle für 10 Minuten bei einer Leistung von 600 Watt.
3. Spülen der Schnitte in Tris-Puffer-HCl dreimal 5 Minuten bei Raumtemperatur.

Im Anschluß daran wurde die ICC wie oben beschrieben durchgeführt.

2.3.4 Lokalisationsstudien

2.3.4.1 Doppelimmunfluoreszenzsystem

Zur Bestimmung der Lokalisation wurden Doppelimmunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Das oben beschriebene Protokoll wurde dazu wie folgt abgewandelt:

Die Inkubation der Erstantikörper erfolgte gepoolt in den oben angegebenen Verdünnungen.

Der biotinierte Sekundärantikörper war immer IgG-Ziege-anti-Maus.

Die fluoreszenzgekoppelten Antikörper wurden wieder mit den gleichen Verdünnungen, wie bei der Einzelfluoreszenz gepoolt, zugesetzt.

Es wurden hier Streptavidin, gekoppelt mit Texas-Rot, und IgG-Ziege-anti-Kaninchen, gekoppelt mit FITC, eingesetzt.

2.3.4.2 Doppelfärbungen mit DAB/Fast Red

1. Blocken der endogenen Peroxidase mit 1,5% iger H_2O_2 Methanollösung für 5 Minuten.
2. Dreimaliges Spülen in PBS für jeweils 5 Minuten.
3. Umranden der Schnitte mit einem PAP-PEN[®](Science Services, München), anschließend dreimaliges Spülen in PBS für jeweils 5 Minuten.
4. Inkubation mit Blocklösung für 30 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur, um unspezifische Bindungsstellen der Antikörper zu blockieren.
5. Absaugen der Blocklösung und Auftragen des verdünnten Erstantikörpers. Inkubation in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur über Nacht.
6. Absaugen des Erstantikörpers und dreimaliges Spülen der Schnitte in PBS für jeweils 5 Minuten.
7. Auftragen des verdünnten, mit Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörpers unter Berücksichtigung der Herkunft des Primärantikörpers.
8. Inkubation in einer feuchten Kammer für 1 Stunde bei Raumtemperatur.
9. Absaugen des Sekundärantikörpers und dreimaliges Spülen in PBS für jeweils 5 Minuten.
10. Inkubation in einer 0,1%igen DAB-Lösung für 10 Minuten bei Dunkelheit und Raumtemperatur.

11. Erneute Inkubation in einer 0,1%igen DAB-Lösung, die mit 1% H₂O₂ 30%ig versetzt wird für 10 Minuten bei Dunkelheit und Raumtemperatur.
12. Dreimaliges Spülen in PBS für jeweils 5 Minuten.
13. Inkubation mit Blocklösung für 30 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur, um unspezifische Bindungsstellen der Antikörper zu blockieren.
14. Absaugen der Blocklösung und Auftragen des verdünnten zweiten Erstantikörpers. Inkubation in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur über Nacht.
15. Absaugen des Erstantikörpers und dreimaliges Spülen der Schnitte in PBS für jeweils 5 Minuten.
16. Auftragen des verdünnten, mit alkalischer Phosphatase gekoppelten Sekundärantikörpers unter Berücksichtigung der Herkunft des Primärantikörpers.
17. Inkubation in einer feuchten Kammer für 1 Stunde bei Raumtemperatur.
18. Absaugen des Sekundärantikörpers und dreimaliges Spülen in Tris-HCl für jeweils 5 Minuten.
19. Inkubation mit der Fast-Red-Fertiglösung für 10 Minuten bei Raumtemperatur und Dunkelheit.
20. Dreimaliges Spülen in Tris-HCl für jeweils 5 Minuten in Dunkelheit.
21. Eindeckeln der Schnitte in gepuffertes Glycerol, Lagern der Präparate bei 4°C und bei Dunkelheit.

2.3.4.3 Kontrollen

Als Kontrolle für die Spezifität der immunhistologischen Reaktion wurden bei jeder Inkubation Proben mitgeführt, bei denen der Erst-, Zweit- oder Drittantikörper durch PBS ersetzt wurde.

Zur Kontrolle der Spezifität des ersten Antikörpers gegen SHP1 wurde zunächst eine Präabsorption des Antikörpers mit dem Antigen durchgeführt. Dies geschah bei 4°C und über Nacht. Anschließend wurde dieses Gemisch statt des SHP1 Erstantikörpers auf die Proben pipettiert.

Dies geschah sowohl für das Kontrolltier als auch für die behandelten Tiere.

2.4 Zellisolierung

2.4.1 Reagenzlösungen

2.4.1.1 D(+)-Glukose

D(+)-Glukose (Merck, Darmstadt) 9,0 g/l

2.4.1.2 HEPES

pH 7,6

HEPES (Sigma, St. Lois, USA) 60,0 g/l

NaOH (Roth, Karlsruhe) nach pH

Aqua destillata 1000ml

2.4.1.3 Krebs-Heinsleit (KH) Puffer

pH 7,6

NaCl 0,9% (Roth, Karlsruhe) 70,0 g/l

KCl (Merck, Darmstadt) 1,75 g/l

KH₂PO₄ (Merck, Darmstadt) 1,60 g/l

Aqua destillata 1000ml

2.4.1.4 EGTA

EGTA (Sigma, St. Lois, USA) 47,5 mg/l

Aqua destillata 1000ml

2.4.1.5 CaCl₂

CaCl₂ x 2 H₂O (Merck, Darmstadt) 19,0 g/l

Aqua destillata 1000ml

2.4.1.6 L-Glutamin

L-Glutamin (Sigma, St. Lois, USA) 7,0 mg/ml

Aqua destillata 1000ml

2.4.1.7 Aminosäurelösung

pH 7,6

L-Alanin (Sigma, St. Lois, USA)	0,27 g/l
L-Aspartat (Sigma, St. Lois, USA)	0,14 g/l
L-Asparagin (Sigma, St. Lois, USA)	0,40 g/l
L-Citrullin (Sigma, St. Lois, USA)	0,27 g/l
L-Cystein (Sigma, St. Lois, USA)	0,14 g/l
L-Histidin (Merck, Darmstadt)	1,00 g/l
L-Glutaminsäure (Sigma, St. Lois, USA)	1,00 g/l
Glycin (Sigma, St. Lois, USA)	1,00 g/l
L-Isoleucin (Sigma, St. Lois, USA)	0,40 g/l
L-Leucin (Sigma, St. Lois, USA)	0,80 g/l
L-Lycin (Sigma, St. Lois, USA)	1,30 g/l
L-Methionin (Sigma, St. Lois, USA)	0,55 g/l
L-Ornithin (Sigma, St. Lois, USA)	0,65 g/l
L-Phenylalanin (Sigma, St. Lois, USA)	0,55 g/l
L-Prolin (Sigma, St. Lois, USA)	0,55 g/l
L-Serin (Sigma, St. Lois, USA)	0,65 g/l
L-Threonin (Sigma, St. Lois, USA)	1,35 g/l
L-Tryptophan (Sigma, St. Lois, USA)	0,65 g/l
L-Tyrosin (Sigma, St. Lois, USA)	0,55 g/l
L-Valin (Sigma, St. Lois, USA)	0,80 g/l

Die Aminosäuren werden in 950 ml Aqua destillata aufgelöst. Nach 10 Minuten wird NaOH tropfenweise zugegeben, bis sich die Lösung klärt. Danach wird der pH wieder auf 7,6 mit HCl eingestellt und die Lösung auf 1000 ml aufgefüllt.

2.4.2 Perfusionspuffer

2.4.2.1 EGTA-Puffer

Glucose	186ml
HEPES	30ml
KH-Puffer	30ml
Aminosäuren	45ml
EGTA	1200µl
Glutamin (Sigma, St. Lois, USA)	3ml

2.4.2.2 Collagenase-Puffer

Glucose	186ml
HEPES	30ml
KH-Puffer	30ml
Aminosäuren	45ml
CaCl ₂	7,2ml
Glutamin (Sigma, St. Lois, USA)	3ml
Collagenase (Boehringer, Ingelheim)	150mg
Pronase E (Merck, Darmstadt)	50mg

2.4.3 Durchführen der sterilen Perfusion in situ

Das Verfahren der Elutriation basiert auf einem Zentrifugationsverfahren. Hierbei werden die zu trennenden Zellpopulationen als Suspension in eine Kammer des Zentrifugenrotors eingespült. Durch die Möglichkeit dieser Gegenstromzentrifugation kann über den regulierbaren Flüssigkeitsstrom eine Auftrennung der Zellen nach Größe und Masse vorgenommen werden.

Bei diesem Verfahren kann die höchste Ausbeute an Zellen erzielt und eine Verunreinigung des Eluates mit anderen Zellpopulationen weitgehend vermieden werden.

Die Isolierung der Kupffer-Zellen erfolgte durch eine zweistufige, nicht rezirkulierende, Perfusionstechnik (Seglen 1973a und b, Glatt et al. 1981).

Die steril filtrierte Puffer (200 ml EGTA-Puffer und 200 ml Kollagenase-Pronase-E-Puffer) wurden auf 38°-40°C temperiert.

Der EGTA-Puffer wurde vor der Perfusion mit einer Durchflußrate von 7-10 ml/min rezirkulierend durch den autoklavierten Perfusionsschlauch geleitet.

Die Versuchstiere wurden durch eine i.p.-Injektion mit Pentobarbital, 60 mg/kg Körpergewicht, betäubt, anschließend auf der Versuchsanordnung fixiert und der Bauch mit 70% igem Ethanol desinfiziert.

Mit sterilem Präparierbesteck wurde der Bauchraum eröffnet, die Pfortader freigelegt und durch einen kleinen Schnitt kanüliert.

Im Anschluß daran mußte sofort das Zwerchfell durch einen seitlichen Einschnitt eröffnet und die Hohlvene durchtrennt werden, um einen erhöhten Druck in der Leber zu vermeiden und eine rasche Entblutung zu gewährleisten.

Der kalziumfreie EGTA-Puffer konnte so frei mit 7-10 ml/min. abfließen.

Nach ca. 10 min. wurde die Leber durch Umstecken des Perfusionsschlauches mit Kollagenase-Pronase-E-Puffer mit einer Durchflußrate von 10-15 ml/min. durchflossen.

Eine sichtbare Größenzunahme der Leber sowie eine deutliche Erweichung signalisierten eine erfolgreiche Lösung der Zellen aus ihrem Verband.

Nach etwa 15-20 min. konnte die Leber entnommen werden und in eine sterile, mit Puffer (GBSS) gefüllte Petrischale überführt werden.

Die Glisson-Kapsel wurde abgehoben, und die Zellen wurden mittels Spatel und Pinzette durch Zupfen und Schaben vorsichtig suspendiert, wobei es durch die hohe Durchflußrate der Lösung und die Pronase E zu einer präferentiellen Schädigung der Hepatozyten kam.

2.4.4 Aufarbeitung der Kupffer- und Endothelzellen

Nach der Kollagenase-Pronase-Perfusion wurde die Zellsuspension 30 min. bei 4°C in 200 ml GBSS, versetzt mit 50 mg Kollagenase und 50 mg Pronase E, unter starkem Rühren inkubiert.

Hierdurch wurden verbleibende Hepatozyten sowohl mechanisch als auch enzymatisch zerstört. Eine anschließende Zentrifugation bei 1400 x g für ca. 5 min. führte zu einer starken Anreicherung der Nichtparenchymzellen im Sediment.

Nach sorgfältiger Resuspension in GBSS folgte eine Dichtegradientenzentrifugation in Nycodenzlösung.

Hierzu wurde aus der Zellsuspension und der Nycodenzlösung ein Gemisch im Verhältnis 5:7 hergestellt und jeweils 11 ml in ein 15 ml fassendes Zentrifugationsröhrchen pipettiert.

Nach vorsichtigem Überschichten mit je 2 ml GBSS erfolgte eine Zentrifugation bei 400 x g für 20 min. Mit der in der Interphase befindlichen Zellfraktion konnte dann der Elutriator geladen werden.

2.4.5 Zentrifugale Elutriation

Die Auftrennung der Nichtparenchymzellen in Kupffer- und Endothelzellen erfolgt durch Gegenstromzentrifugation.

Bei gleichbleibender Rotorgeschwindigkeit (2500 U/min.) wurde die Durchflußrate des eisgekühlten GBSS-Puffers schrittweise erhöht, wodurch die Zellen ihrer Größe nach eluiert werden.

2.4.5.1 Vorbereitung des Elutriators

Vor Beginn der Elutriation wurde das System mit 1 Liter GBSS gespült.

Danach wurde bei laufendem Rotor (2500 U/min.) die Eichung durchgeführt. Hierzu wurde die Einstellung der Pumpe kontrolliert, bei der die gewünschte Durchflußrate erreicht wurde.

2.4.5.2 Durchführung

Der Elutriator wurde auf die Durchflußrate von 11 ml/min. eingestellt und mittels einer 10 ml-Spritze mit der Zellsuspension geladen.

Entscheidend für die gute Trennung und ein geringes Pelletieren der Zellsuspension war das kompakte Eintreten der Zellen in die Kammer.

Bei einer Durchflußrate von 12 ml/min. für eine Dauer von 15-20 min. wurden hauptsächlich die Zelltrümmer und kleinere Zellen ausgeschwemmt.

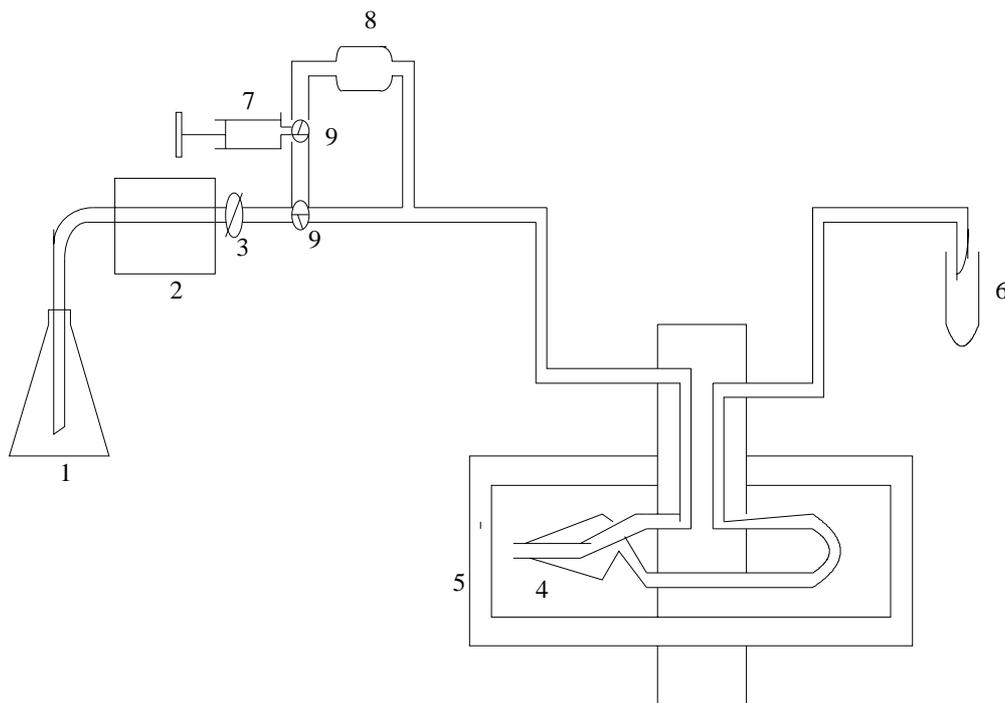


Abb. 2: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Elutriation (nach Seibert 1989). Aus dem eisgekühlten Vorratsgefäß (1) beförderte die Pumpe (2) den Elutriationspuffer über den Druckanzeiger (3) zur Trennkammer (4) in den Rotor (5) des Elutriators. 50 ml Zentrifugenröhrchen (6) dienten als eisgekühlte Vorlage zum Aufnehmen des Puffers nach Verlassen des Rotors. Die Zellsuspension wurde mittels einer 10ml Spritze (7) in die Einfüllkammer (8) injiziert. Dabei fanden sich die Dreiwegehähne (9) in der oben gezeigten Stellung. Nach dem Einfüllen der Zellen wurden beide Dreiwegehähne um 45° nach rechts gedreht und somit der Flüssigkeitsstrom durch die Einfüllkammer geleitet (gestrichelte Pfeile). Der Puffer schwemmte die Zellen in den Elutriator, während die Zellklumpen in der Einfüllkammer liegenblieben.

Durch eine Erhöhung auf 15 ml/min. für 15 min. werden Lymphozyten und fettspeichernde Zellen eluiert.

Endothelzellen werden bei einer Durchflußrate von 24 ml/min. und Kupfferzellen bei 41ml/min. aufgefangen.

Die Eluate der ersten beiden Durchflußraten werden verworfen, für Kupffer- und Endothelzellen werden jeweils 3 sterile 50 ml-Zentrifugenröhrchen gefüllt.

Die stark verdünnten Zellsuspensionen wurden bei 1400 x g für 5 min. abzentrifugiert, die sorgfältige Resuspension vereint und nach der Entnahme des Aliquots zur Bestimmung der Viabilität und Zellzahl bis zur weiteren Verwendung auf Eis gestellt.

Ein Teil der Zellen wurde mit Zamboni fixiert, der andere Teil nach nochmaligem Abzentrifugieren als Pellets bei -80°C gelagert.

2.5 Biochemische Untersuchungen

Die biochemischen Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Professor Dr. Hofer, Universität Konstanz, in Konstanz durchgeführt. Die von den unfixierten Ratten gewonnenen Leberproben bzw. die isolierten Endothel- und Kupffer-Zellen wurden in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und zur Weiterverarbeitung nach Konstanz gebracht. Hier erfolgte dann zunächst die Bestimmung des Proteingehaltes, getrennt nach löslicher und korpuskulärer Fraktion, anschließend wurde aus diesem Material sowohl über eine Spektralphotometeranalyse als auch über den Umsatz von radioaktiv markiertem Phosphat in der Probe die Aktivität der Phosphatasen in dem zu untersuchenden Material getestet.

Zur Identifizierung der Phosphatasen wurde das in den Probenansätzen gelöste Protein nach Größe entlang eines SDS-Pages aufgespalten. Die Darstellung erfolgte dann mittels Autoradiographie der getrockneten Gele. Als Eichstandard, um das Molekulargewicht der Proben zu bestimmen, wurden die folgenden Makromoleküle ebenfalls in einer separaten Säule des SDS-Pages aufgespalten.

2.5.1 Proteinextraktion

2.5.1.1 Puffer

2.5.1.1.1 Puffer I

Trimethanolamin [TRA] (Merck, Darmstadt) -HCl, pH 7,5	50 mM
2-Mercaptoethanol [2-ME] (Merck, Darmstadt)	15 mM
Aprotinin (Bayer, Leverkusen)	1 $\mu\text{l/ml}$
Pepstatin (Sigma, St. Lois, USA)	40 $\mu\text{l/ml}$

2.5.1.1.2 Puffer II

Puffer I

Triton X-100

1%

2.5.1.2 Durchführung

Um den Proteingehalt des Gewebes bzw. der zu untersuchenden Zellen zu bestimmen, mußte das Untersuchungsmaterial zunächst homogenisiert werden und die Proteinfraction extrahiert werden.

Dazu wurden die Proben in einen Glaspotter überführt und je nach Materialmenge mit Puffer I versetzt und homogenisiert.

Nach dem Überführen in Eppendorfgläser wurde die Probe bei 22.000 g und 4°C für 10 min. zentrifugiert. Der dabei entstandene Überstand wurde abpipettiert, aufgehoben und das Sediment erneut mit Puffer I versetzt, in Suspension gebracht und nochmals, wie oben beschrieben, zentrifugiert.

Der Nachextrakt wurde ebenfalls abpipettiert und aufgehoben.

Danach wurde das Sediment mit Puffer II versetzt und erneut gelöst. Anschließend wurde nochmals zentrifugiert und der Überstand abpipettiert.

Dieser Vorgang wurde zur Nachextraktion des Sedimentes ein zweites Mal durchgeführt.

2.5.1.3 Proteinbestimmung nach Bradford (1976)

2.5.1.3.1 Material

Coomassie-Brilliant-Blue-Farbstoffkonzentrat (Bio-Rad, USA)

Phosphorsäure (Sigma, St. Lois, USA)

Methanol (Roth, Karlsruhe)

2.5.1.3.2 Durchführung

Das Farbstoffkonzentrat wurde vor Gebrauch 1:5 in Wasser verdünnt.

20 µl der zu messenden Probe (20 µl Puffer als Blindwert) werden mit dem Farbstoffkonzentrat auf einen Milliliter aufgefüllt, gemischt und 30 min. bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Absorption des Ansatzes wurde bei $\lambda = 595 \text{ nm}$ in Halbmikroküvetten mit einem Zeiss PM 72 Spektralphotometer gemessen.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde eine Eichgerade mit bekannten Proteinkonzentrationen einer Rinderalbumin-Lösung (0,1-1 mg/ml) erstellt.

Auch hier diente als Blindwert der Ansatz, in welchem die Proteinlösung durch Puffer ersetzt worden war.

Da die Proteinkonzentration den Absorptionswerten nur bis 0,8 proportional ist, waren Vorverdünnungen bei Proben mit hohem Proteingehalt notwendig.

2.6 Aktivitätsbestimmungen der PTP

2.6.1 Optischer Enzymtest

2.6.1.1 Material

para-Nitrophenolphosphat [pNPP] (Merck, Darmstadt)	10 mM
Ethylendiamintetraacetat [EDTA] (Merck, Darmstadt)	1 mM
NaOH pH 5,0 (Roth, Karlsruhe)	30 mM
2-Mercaptoethanol [2-ME] (Merck, Darmstadt)	0,1 %
Triton X 100	0,2 %

2.6.1.2 Durchführung

Der optische Enzymtest wurde bei Raumtemperatur in einem Spektralphotometer (Lambda 2, Perkin und Elmer) in Halbmikroküvetten durchgeführt. Bei einer Wellenlänge von 405 nm wurde gemessen.

Das Volumen der Testlösung betrug 50 μl .

Die Reaktion wurde mit 5 μl Proben für das jeweils erste Extrakt mit und ohne Triton X100 gestartet.

Für den Nachextrakt wurden jeweils 10 μl Probenlösung verwendet.

Nach dem Starten der Reaktion erfolgte eine 20 minütige Inkubation, die abschließend mit 0,2 M NaOH gestoppt wurde, indem die Probe mit 0,2 M NaOH auf einen Milliliter aufgefüllt wurde.

Direkt nach dem Stoppen der Reaktion wurde die Absorption bestimmt.

Die Auswertung erfolgte nach dem Gesetz von Lambert-Beer:

$$U = \frac{\Delta E / \text{min} * TV}{\varepsilon * d * PV}$$

dabei ist:	U(nits)	Substratumsatz in $\mu\text{mol}/\text{min}$.
	$\Delta E/\text{min}$.	Änderung der Extinktion/min.
	TV	Testvolumen in ml
	PV	Probenvolumen in ml
	d	Schichtdicke der Küvette in cm
	ε	Extinktionskoeffizient der gemessenen Substanz

2.6.2 Radioaktivitätsbestimmung

Das Prinzip der Aktivitätsmessung von Proteinphosphatasen beruht auf der Bestimmung der freigesetzten Menge an ^{32}P aus Phospho-Substraten. Alle Radioaktivitätsmessungen wurden an einem Beckmann-LS 1801-Szintillations-Zähler durchgeführt. Dabei wurde zur Messung von ^{32}P eine Energiefensterung von Kanal 300-1000, zur Bestimmung von ^{32}P nach Cerenkov wurde eine Energiefensterung von 1-400 gewählt.

Die Zähldauer betrug je nach Art der Messung 0,2 oder 1 Minute.

2.6.2.1 Radioaktivitätsbestimmung von Proben mit proteingebundenem ^{32}P

Die 2cm x 2cm großen Papierstücke, deren Gehalt an $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ bestimmt werden sollte, wurden in ein Polyethylenzählergefäß mit 10ml Szintillationsflüssigkeit (Xylol und 3g/l Diphenyloxazol [PPO] Merck, Darmstadt) gegeben.

2.6.2.2 Radioaktivitätsbestimmung nach Cerenkov

Dieser Methode liegt zugrunde, daß die β -Emission von [^{32}P] Wassermoleküle zur Fluoreszenz anregt, welche bei der Diskriminatoreinstellung des Szintillationszählers für (^3H) gemessen werden kann.

Dabei muß jedoch mit einer Einbuße der Zählerausbeute um ca. 50% gerechnet werden.

2.6.3 Substrate zur Bestimmung der Phosphatase-Aktivität

Die Bestimmung der Phosphatase-Aktivitäten erfolgt mit zwei unterschiedlichen Substratklassen, den Phosphoproteinen und den niedermolekularen Substanzen.

Als niedermolekulare Substanz wurde pNPP (para-Nitrophenolphosphat) verwendet. Es diente als Substrat für den optischen Enzymtest, wobei in diesem Test hauptsächlich die Aktivität der alkalischen Phosphatase erfaßt wird.

Für die Aktivitätsbestimmungen nach Cerenkow diente als Phosphoprotein ein modifiziertes Lysozym.

Die Modifikation erfolgte in Anlehnung an die Methode von Tonks (Tonks et al. 1988). Damit wurde die Substratspezifität der tyrosinspezifischen Proteinkinase für Lysozym erhöht. Hierdurch lagen die Tyrosinreste exponiert vor.

2.6.4 Herstellung des modifizierten Lysozyms

2.6.4.1 Material

2.6.4.1.1 Puffer I

Bicine / NaOH, pH 8,5 gelöst in Guanidin-HCl, 6M (Merck, Darmstadt)

2.6.4.1.2 Puffer II

Bicine / NaOH, pH 8,5 gelöst in Harnstoff-Lösung, 6M

DTE (1,4-Dimercaptobutan-2,4diol) (Merck, Darmstadt) 1,54 g/ml

Imidazol-HCl, pH7,2 (Merck, Darmstadt) 50 mM

Jodacetamid (Sigma, St Lois, USA) 8 mg/ml

Maleinsäureanhydrid (Merck, Darmstadt) 82 mg/ml

β-Mercaptoethanol (Merck, Darmstadt)	180 mM
NaOH 1M (Roth, Karlsruhe)	nach pH
Lysozym (Sigma, St Lois, USA)	1 g
Phosphorylase (Kaninchen)	0,1 g

2.6.4.2 Durchführung

2.6.4.2.1 Reduktion

Das Substrat wurde in 12,5ml Puffer I gelöst und unter Stickstoff begast.

Nach Zugabe von DTE in einer Endkonzentration von 10mM wurde der Ansatz unter Stickstoffbegasung bei 50°C im Dunkeln für 90 Minuten inkubiert und auf Eis abgekühlt.

2.6.4.2.2 Carboxymethylierung

Der Start der Reaktion erfolgte durch Jodacetamid, welches in einer Endkonzentration von 45mM zugesetzt wurde.

Der Ansatz wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, durch Zugabe von 150µl 2-Mercaptoethanol wurde die Reaktion gestoppt.

Durch eine 20 minütige Dialyse gegen Wasser wurde das Protein ausgefällt und in einem SS-34 Rotor bei 10.000 x g 20 Minuten sedimentiert.

2.6.4.2.3 Maleinylierung

Das Pellet wurde in 50mM-Bicine-Harnstoff gelöst.

Anschließend wurden portionsweise 3 ml Maleinsäureanhydrid zugegeben und der pH-Wert mit 1M NaOH auf 8,7 eingestellt.

Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur für 2 Stunden inkubiert.

2.6.4.2.4 Entsalzung und Aufbewahrung

Die Entsalzung und Aufbewahrung erfolgte durch eine 12 stündige Dialyse gegen Wasser.

Anschließend wurde das Protein lyophilisiert und bei -20°C gelagert.

2.6.5.2 Durchführung

Der Phosphorylierungsansatz enthielt 0,1 mM ATP mit einer spezifischen Radioaktivität von 1 MBq/nmol sowie 5 mM MgCl₂.

Zusätzlich enthielt der Ansatz Vanadat bzw. Ammoniummolybdat und Zinkchlorid (100 µM), um eine endogene Substratdephosphorylierung zu verhindern.

Zur Phosphorylierung wurden das Substrat und die Proteinkinase in ein Reagenzglas gegeben.

Alle weiteren Lösungen wurden in ein Eppendorfgefäß pipettiert und der Proteinlösung zugegeben. Inkubiert wurde bei 30°C für 30 bis 60 Minuten.

Am Ende der Phosphorylierungsreaktion wurden die proteingebundene Radioaktivität und die Gesamtradioaktivität des Phosphorylierungsansatzes zur Bestimmung des Phosphatgehaltes der Substratproteine ermittelt.

Die Phosphorylierungsreaktion von RCML wurde durch die Zugabe von TCA-Lösung (Endkonzentration 10 %) gestoppt.

Der Ansatz wurde für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das ausgefallene Protein für fünf Minuten in einer Eppendorfschüttelzentrifuge sedimentiert, erneut in TCA-Lösung aufgenommen und abzentrifugiert.

Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt.

Abschließend wurde das Pellet in 2M-Tris-HCl-Lösung aufgenommen und über Nacht bei mehrmaligem Wechsel gegen Tris-HCl-Puffer dialysiert.

Nach der Dialyse wurden die Phosphoproteine in Aliquoten bei -20°C gelagert.

2.6.6 Auswertung der Phosphorylierungsreaktion

2.6.6.1 Gesamt- und proteingebundene Radioaktivität eines Phosphorylierungsansatzes

Die Gesamtradioaktivität des Ansatzes wurde bestimmt, indem 20 µl einer 1:50 Verdünnung des Testansatzes in 3ml Szintillationsflüssigkeit (3 Teile Xylol, 1 Teil Triton X-114, 3g PPO/l) ausgezählt wurden.

Zur Bestimmung der proteininkorporierten Radioaktivität wurden 20µl des Testansatzes auf Whatman-3 MM-Chromatographiepapier, welches mit 20% TCA-Lösung getränkt worden war, gebracht.

Nach dem Antrocknen der Probe wurde das Filterpapier in einer Schale auf einem Laborschüttler für 3 x 10 Minuten in 5% TCA und 1 x 5 Minuten in Ethanol gewaschen.

Das Filterpapier wurde bei 100°C getrocknet, danach die Radioaktivität des Filterpapiers bestimmt, indem es in einem Polyethylengefäß mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit (Xylol, 3g/l PPO) gezählt wurde.

2.6.6.2 Bestimmung des Phosphatgehaltes phosphorylierter Proteine

Der nach der Phosphorylierung erreichte Phosphatgehalt des Substrates in mol

Phosphat pro mol Substrat ergibt sich aus:

$$PG = \frac{cpm}{sR * AV} * \frac{MG * 10^{-6}}{C}$$

Dabei ist:	PG	Phosphatgehalt eines Substrates, angegeben in mol Phosphat/ mol Substrat
	cpm	der um den Blindwert korrigierte Meßwert
	sR	spezifische Radioaktivität des ATP im Testansatz in cpm/ pmol
	AV	Volumen des Aliquots
	MG	Molekulargewicht des Substrates
	C	Konzentration des Substratproteins im Testansatz in mg/ ml

2.6.6.3 Test zur Bestimmung der Proteinphosphatase-Aktivitäten

2.6.6.3.1 Material

2.6.6.3.1.1 Puffer

Tra-HCl, pH 7,5	50 mM
2-Mercaptoethanol (Merck, Darmstadt)	15 mM

2.6.6.3.1.2 Chemikalien

Rinderserumalbumin	30 mg/ml
Trichloressigsäure TCA (Roth, Karlsruhe)	20 %
Phospho-Proteinlösung	4 μ M

2.6.6.3.2 Durchführung

Die Testlösung enthielt neben dem Puffer Rinderserumalbumin (2 mg/ml) und Phospho-Proteinlösung in einer Endkonzentration von 4 μ M.

Zum Zeitpunkt t_0 wurde 20 μ l Probe mit 20 μ l Testlösung gemischt.

Nach 1-30 minütiger Inkubation des Ansatzes bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von 40 μ l TCA beendet, für 2 Minuten in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert und 40 μ l des Überstandes zu 1 ml Wasser in ein Eppendorfgefäß gegeben.

Die Radioaktivitätsbestimmung erfolgte nach der Cerenkov-Methode.

Neben der Gesamtradioaktivität von 20 μ l Testlösung wurde ein Blindwert gemessen, bei welchem die Probe durch Testpuffer ersetzt worden war.

2.6.6.3.3 Angabe der Proteinphosphatase-Aktivitäten

Eine Unit Proteinphosphatase-Aktivität wurde definiert als die Aktivität, welche aus einem Substrat ein pmol Phosphat freisetzt.

Die Proteinphosphatase-Aktivität ergibt sich aus:

$$PPA = \frac{cpm * ZF * 2}{sR * Z} * \frac{1}{PV}$$

Dabei ist	PPA	Proteinphosphatase-Aktivität in (pmol P/ml x min)
	cpm	der um den Blindwert korrigierte Meßwert
	ZF	zeitabhängiger Zerfallsfaktor der ³² P
	sR	spezifische Radioaktivität des ATP im Testansatz in (cpm/pmol)
	t	Inkubationszeit in Minuten
	PV	Volumen der Probe in ml

Dabei kann der Zeitfaktor folgendermaßen berechnet werden:

$$N = N_0 * e^{-(x/t_{1/2}) * \ln 2}$$

Daraus ergibt sich:

$$ZF = N^{-1}$$

Dabei ist:	N ₀	1
	x	Anzahl der Tage nach der Herstellung
	t _{1/2}	Halbwertszeit von [³² P] (14,3 Tage)

2.6.6.3.4 Spezifische Proteinphosphatase-Aktivität

Die spezifische Aktivität wurde auf ein Milligramm Proteinphosphatase bezogen:

$$sPPA = \frac{PPA}{c}$$

Dabei ist:	sPPA	spezifische Proteinphosphatase-Aktivität in (pmol P/ mg x min.)
	PPA	Proteinphosphatase-Aktivität in (pmol P/ ml x min.)
	c	Konzentration der Proteinphosphatase in (mg/ml)

2.6.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mittels der SDS-PAGE-Methode (Laemmli 1970), deren Prinzip auf der Verwendung von Sammel- und Trenngel mit unterschiedlichem Vernetzungsgrad und pH-Wert beruht, wurden Proteine in SDS-Polyacrylamidgelen nach ihrer molekularen Größe aufgetrennt.

Durch die starke Beladung der Proteine mit negativ geladenen Molekülen wie SDS (Natrium-Dodecylsulfat) wird die Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld von der Eigenladung der Proteine unabhängig.

Das Verhältnis von Ladung zu Molekülgröße ist für jedes Protein gleich. Damit hängen die Wanderungsgeschwindigkeit und die Wanderstrecke in einem Polyacrylamidgel nur vom Molekulargewicht des Proteins und vom Vernetzungsgrad des Gels ab.

Aus diesem Grund ist es möglich, aus der Wanderstrecke von bestimmten Markerproteinen mit bestimmten Molekulargewichten nach SDS-PAGE eine Eichgerade zu erstellen, mit welcher Molekulargewichte anderer Proteine bestimmt werden können.

2.6.7.1 Herstellung der Proben

2.6.7.1.1 Material

2.6.7.1.1.1 Lyselösung

Tris-(hydroxymethyl-) Aminoethan

[Tris-HCl] (Sigma, St. Lois, USA) 0,625 M, pH 6,8

Dodecylnatriumsalz [SDS] (Roth, Karlsruhe) 2,3 % (w/v)

Glycerin (Sigma, St Lois, USA) 20 %

Bromphenol-Blau (Merck, Darmstadt) 0,1 %

2.6.7.1.1.2 Trichloressigsäure (TCA) Lösung

20 %, bzw 100 % Trichloressigsäure (Roth, Karlsruhe) (w/v)

2.6.7.1.1.3 Triethanolamin Hydrochlorid (Tra-HCl)

30% Triethanolamin HCl (Merck, Darmstadt) (v/v)

2.6.7.2 Durchführung

2.6.7.2.1 Proben mit hohem Proteingehalt ($\geq 0,1\text{mg/ml}$)

Aus Proben, deren Proteingehalt mindestens $0,1\text{mg/ml}$ betrug, wurde ein Aliquot entnommen, welches die gewünschte Proteinmenge enthielt ($2\text{-}100\mu\text{g}$).

Die Fällung des Proteins erfolgte durch Zugabe eines entsprechenden Volumens an adäquat konzentrierter TCA-Lösung, so daß die Endkonzentration von TCA-Lösung 10% betrug.

Der Ansatz wurde für zwei Minuten in einer Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert, der Überstand verworfen.

In einem weiteren Arbeitsschritt wurde das Sediment in einem entsprechenden Volumen an Lyselösung aufgenommen. Die Proben wurden durch Zugabe von $1\text{-}3\mu\text{l}$ Tra-HCl (30%) neutralisiert und für fünf Minuten bei 95°C inkubiert.

2.6.7.2.2 Proben mit niedrigem Proteingehalt ($< 0,1\text{mg/ml}$)

Proben, deren Proteingehalt unter $0,1\text{mg/ml}$ betrug, wurden durch Ultrazentrifugation ("Centrikons 10", Fa. Amicon) mittels einer zweistündigen Zentrifugation bei $10000 \times g$ eingeeengt.

Anschließend wurde mit den Proben, wie oben beschrieben, verfahren.

2.6.7.3 Eichstandard

Um Molekulargewichte von Proteinen zu bestimmen, wurde ein Eichstandard (High Molecular Weight Standard Mixture Fa. Sigma, St. Lois, USA) verwendet, der folgende Proteine enthielt:

Das lyophilisierte Proteingemisch (3mg) wurde in zwei Milliliter Lyselösung (s.o.) aufgenommen, wobei die Konzentration eines jeden Proteins $0,25\text{mg/ml}$ betrug.

Die Lösung wurde in einem Wasserbad bei 56°C für 30 Minuten inkubiert, aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

Für ein SDS-Gel der Größe $14\text{cm} \times 9\text{cm}$ wurden $20\mu\text{l}$ des Eichstandards (entsprechend $5\mu\text{g}$ pro Markerprotein) eingesetzt.

Makerprotein	Molekulargewicht
Myosin	205000
β -Galaktosidase	116000
Phosphorylase	97000
Rinderserumalbumin	66000
Ovalbumin	45000
Carboanhydrase	29000

Tabelle 4: Eichstandard zur Molekulargewichtsbestimmung

2.6.7.4 Herstellung von Polyacrylamidgelen

2.6.7.4.1 Material

Acrylamidlösung (Roth, Karlsruhe): 30% Acrylamid,

0,8% Bisacrylamid

Tris-(hydroxymethyl-) Aminomethan (Roth, Karlsruhe) Tris-HCl 1 M, pH 8,8

Tris-(hydroxymethyl-) Aminomethan (Roth, Karlsruhe) Tris HCl 1 M, pH 6,8

Ammoniumpersulfat [APS] (Merck, Darmstadt) 10%

Dodecylsulfat-Natriumsalz [SDS] (Roth, Karlsruhe) 10%

N,N,N',N'-Tetraethylendiamin [TEMED]

Laufpuffer (5 Liter) 15,17g Tris-(hydroxymethyl-) Aminomethan (Roth, Karlsruhe)

72g Glycin (Sigma, St. Lois, USA)

5g Dodecylsulfat-Natriumsalz [SDS] (Roth, Karlsruhe)

2.6.7.4.2 Durchführung

Für die SDS-Gelelektrophorese wurden Kammern der Firma Hoefer (14cm x 9cm Gele) und Bio-Rad (8cm x 6cm Gele) verwendet.

Die Geltiefe betrug jeweils 1mm. In Tabelle 4 ist die Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele gezeigt.

Die angegebenen Volumina sind für zwei Gele der Größe 14cm x 9cm bzw. für vier Gele der Größe 8cm x 6cm bemessen.

Bestandteile	Sammelgel 5%	Trenngel 7,5%	Trenngel 10%	Trenngel 12,5%
Wasser	28,84ml	21,27ml	16,27ml	11,27ml
30 % Acrylamid	6,67ml	15,00ml	20,00ml	25,00ml
1M Tris-HCl, pH 8,8	-	22,00ml	22,50ml	22,50ml
1M Tris-HCl, pH 6,8	5,00ml	-	-	-
10% SDS	0,40ml	0,60ml	0,60ml	0,60ml
10% APS	0,40ml	0,60ml	0,60ml	0,60ml
TEMED	0,03ml	0,03ml	0,03ml	0,03ml

Tabelle 5: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele. Die Angaben sind für 5% Sammelgele und für verschiedene Konzentrationen an Trenngelen gemacht

Für die Trenngele wurden die Acrylamidlösung, Tris-HCl und das Wasser vereinigt und mittels einer Wasserstrahlpumpe 15 Minuten entgast.

Es erfolgte zuerst die Zugabe von SDS, dann von APS und zum Schluß von TEMED.

Nachdem das Trenngel in die zuvor aufgebaute Vorrichtung gegossen worden war, wurde es mit Isopropanol überschichtet, um eine ebene Oberfläche zu garantieren.

Nach Polymerisation des Gels wurde der Alkohol entfernt und das Sammelgel in gleicher Weise gegossen wie das Trenngel. In das flüssige Sammelgel wurde ein Teflonkamm eingebracht, der das Auftragen von bis zu 10 Proben ermöglichte.

Nach der Polymerisation des Sammelgels wurden der obere Teil der Kammer mit Laufpuffer gefüllt und der Kamm vorsichtig entfernt.

Darauf erfolgte der Probenauftrag.

Bei Gelelektrophoresen in Hoefer-Kammern ergab sich eine Laufzeit von 5 Stunden mit einer Stromstärke von 50 mA und einer Spannung von ca. 140 Volt.

Bei der Verwendung von Bio-Rad-Kammern reduzierte sich die Laufzeit auf zwei Stunden bei einer Stromstärke von 30 mA und einer Spannung von ca. 120 Volt.

2.6.7.5 Autoradiographie

Die Identifikation von [³²P]-markierten Proteinen im Polyacrylamid-Gel erfolgte durch eine Autoradiographie der getrockneten Gele.

In einer Filmkassette (Kodak X-Omatic-Regular-Screen) wurde auf das getrocknete Gel ein Röntgenfilm (Amersham, hypersensitiv) aufgelegt und bei -70°C exponiert. Die Expositionsdauer hing von der Stärke der radioaktiv markierten Proteine ab.

Der exponierte Film wurde entwickelt:

5 Minuten im Röntgenentwickler (LX-24, Kodak)

5 Minuten im Wasser

10 Minuten im Röntgenfilmentwickler (AL-4, Kodak)

2.7 Western Blots

Nach dem Auftauen wurden den Proben 0,2% Mercaptoethanol zugegeben, um die in den Proteinen enthaltenen Disulfidbrücken aufzuspalten. Zur Inkubation wurden die Proben erneut 10min bei 95°C belassen. Anschließend wurde kurz anzentrifugiert.

Als Trenngel wurde ein SDS-Polyacrylamid-Gel (10% Acrylamid) verwendet und auf Immobilon-PVDF-Membran (Millipore, Schwalbach) geblotet. Unspezifische Proteinbindungen wurden mit 10% Magermilchpulver, gelöst in TTBS (0,025M Tris-HCl, pH 8,0, 0,15 M NaCl, Tween 20 0,05% (v/v)), für 1h geblockt und anschließend mit Anti-P51-AntiSerum (1:500) in TTBS mit 5% Magermilchpulver über Nacht inkubiert. Nach einem Waschschrift mit TTBS (3x10min) erfolgte die Inkubation mit anti-Kaninchen IgG-Antikörper, gekoppelt an alkalische Phosphatase (1:10000; Sigma, St. Luis), in TTBS mit 5% Magermilchpulver für 1h, gefolgt von einem weiteren Waschschrift mit TTBS (2x10min).

Abschließend wurde nochmals 1x10min mit TM (0,1M Tris-HCl, pH 8,0, 0,1M NaCl, 5 mM MgCl₂) gespült. Dann wurde die Aktivität der an das Sekundärreagenz gekoppelten alkalischen Phosphatase mit BCIP/NBT Phosphatase Substrate 1-C (KPL, Maryland USA) durch Farbreaktion nachgewiesen

2.8 Statistik

Zur statistischen Analyse der Meßwerte der Versuchstiere wurden die Mittelwerte der Messungen pro Tier, Zelltyp und -ort zuerst in Excel als Datenmatrix organisiert. Diese Daten wurden zur Berechnung der deskriptiven Statistiken in das Statistikprogrammpaket „SPSS“ importiert.

Als deskriptive statistische Kennwerte zur Beschreibung der Stichproben wurden die Anzahl der Fälle, das arithmetische Mittel, die Standardabweichung, Summe, Minimum, Maximum und Spannweite der Zellzahlen für die Kontrolltiere, die MTX-Tiere und alle Versuchstiere insgesamt bestimmt. Auf die Ermittlung weiterer deskriptiver Maße wurde verzichtet, da sie - wie etwa der Modus - entweder wenig aussagekräftig sind oder da, wie im Falle verteilungsbeschreibender Kennwerte (Schiefe, Exzess), sich aufgrund der kleinen Stichproben eine Interpretation verbietet.

Inferenzstatistisch sollte für die periportalen und perivenösen Meßwerte der verschiedenen Zelltypen und -maße jeweils einzeln ein signifikanter Unterschied der Mittelwerte der Gruppen von Kontroll- und behandelten Tieren geprüft werden. Der für den Vergleich von Mittelwerten zweier unabhängiger Stichproben häufig durchgeführte t-Test war in dieser Arbeit ungeeignet, da die hier verwendeten Stichproben mit drei (Kontrollgruppe) und sechs Versuchstieren (Experimentalgruppe) zu klein waren.

Für den Fall kleiner Stichproben, die keine Aussagen über die ihnen zugrundeliegende Verteilung erlauben, sind verteilungsfreie Verfahren zu verwenden. Für den Fall des Vergleichs zweier Mittelwerte empfehlen Bortz und Lienert (1998) den Fisher-Pitmans-Randomisierungstest für zwei unabhängige Stichproben. Dieser Test stellt ein exaktes Verfahren dar und geht bei zunehmendem N asymptotisch in den parametrischen t-Test über.

Andere verteilungsfreie Verfahren für kleine Stichproben sind weniger geeignet. So prüft der Kolmogoroff-Smirnov-Omnibustest (KSO-Test) den Unterschied von Verteilungen. Dies beinhaltet über die zentrale Tendenz hinaus auch Unterschiede in Dispersion, Schiefe und

Exzess. Der U-Test (Mann-Whitney) greift lediglich auf Rangdaten zurück und schöpft somit die vorliegenden Informationen nicht vollständig aus. Des weiteren ist er bei Decken- und Bodeneffekten sowie deutlich unterschiedlichen Stichprobenumfängen weniger effizient.

Der Fisher-Pitman-Randomisierungstest greift auf die exakten Meßwerte in den Stichproben zurück. Deshalb liegen keine Tabellen für kritische Werte vor, sondern er ist jeweils vollständig neu zu berechnen. Der Aufwand hierfür ist bis zu einem N von insgesamt 15 für beide Stichproben noch manuell zu bewältigen. Das Testprinzip beruht darauf, alle Möglichkeiten zu ermitteln, wie sich die gefundenen Meßwerte der beiden Stichproben auf zwei Gruppen mit Gruppengrößen wie in den beiden Stichproben verteilen lassen. Für jede dieser Möglichkeiten lassen sich die Gruppenmittelwerte bzw. Mittelwertdifferenzen ermitteln. Es läßt sich nun exakt bestimmen, wie wahrscheinlich das Auftreten des empirisch beobachteten Mittelwertunterschiedes der beiden Stichproben oder eines noch extremeren Unterschiedes ist. Diese Überschreitungswahrscheinlichkeit dient zur Entscheidung über Null- und Alternativhypothese. Ist sie geringer als das festgelegte Signifikanzniveau, so wird die Nullhypothese verworfen und die Alternativhypothese angenommen.

Die rechnerische Durchführung des Fisher-Pitman-Tests für unabhängige Stichproben kann unterschiedlich vorgenommen werden. Hier wurde dem Vorschlag von Bortz und Lienert (1998, S. 192ff.) gefolgt. Zur Bestimmung der zweiseitigen Wahrscheinlichkeit bei einer Experimentalgruppe von sechs und einer Kontrollgruppe von drei Tieren müssen alle Möglichkeiten, die neun Meßwerte auf die mit drei Versuchstieren kleinere Stichprobe zu verteilen, ermittelt werden. Für jede dieser 84 (neun über drei) Werte-Tripel ist die Summe zu bilden. Des weiteren ist die empirisch erhobene tatsächlich vorliegende Summe der Kontrolltiere zu bestimmen. Nun wird unter den 84 theoretisch möglichen Summen ausgezählt, wie häufig der tatsächlich gefundene Wert vorkommt (z). Des weiteren wird bestimmt, wie viele extremere (kleinere oder größere) Summen theoretisch auftreten können (Z). Nach Bortz und Lienert (S. 193) errechnet sich die zweiseitige Wahrscheinlichkeit hier nun nach der Formel $P' = (2 Z + z) / 84$.

Die praktische Durchführung dieses Tests wurde in Excel realisiert. Hier wurden alle 84 Möglichkeiten, die Ziffern eins bis neun ohne Berücksichtigung der Reihenfolge zu drei Ziffern zu kombinieren, in drei Zellen über 84 Zeilen eingegeben. Diese Ziffern wurden systematisch durch Zellbezüge zu einem fest definierten Zellbereich, in den die Meßwerte der Kontroll- und MTX-Tiere kopiert wurden, ersetzt. Außerdem wurde für jede Zeile und die Werte der Kontrolltiere automatisch die Summe gebildet. Die Summen wurden dann

aufsteigend sortiert und Z und z ausgezählt. Die so ermittelten Summenhäufigkeiten wurden in fest definierte Zellen eingegeben, aus denen wieder automatisch über Zellbezug P' mit der oben genannten Formel gerechnet wurde. Somit war die Bestimmung der Wahrscheinlichkeiten bei den jeweiligen Tests ökonomisch, zuverlässig und leicht überprüfbar durchzuführen.

3 Ergebnisse

Für die Untersuchungen wurden zunächst Antikörper gegen verschiedene Protein-Tyrosin-Phosphatasen verwendet. Eingesetzt wurden Antikörper gegen die T-Zell PTP, die PTP-1B, ein polyklonaler Antikörper gegen die SHP1/SHP2, sowie monoklonale Antikörper gegen die SHP1 und SHP2.

3.1 Immunzytochemische Untersuchungen am Normaltier

3.1.1 Untersuchungen an perfusionsfixierten Lebern

3.1.1.1 PTP-1B/T-Zell PTP

Zunächst sollte die zytosolisch vorkommende PTP-1B und die ihr sehr verwandte T-Zell PTP im Lebergewebe nachgewiesen werden. Hierzu wurden Schnitte perfusionsfixierter Leber von Wistar-Ratten verwendet. Auf lichtmikroskopischer Ebene ergab sich aber für diese beiden Antikörper keine eindeutig definierbare Reaktion. Weder ließen sich positiv markierte Hepatozyten noch Non-Parenchymzellen nachweisen.

3.1.1.2 SHP1/SHP2

Im zweiten Schritt wurde ein polyklonaler Antikörper gegen SHP1/SHP2 verwendet. Hier zeigten die Leberschnitte unbehandelter Kontrollratten nach der Immunzytochemie keine einheitliche Reaktion der verschiedenen Leberzellen (Abbildung 3). Die Reaktion beschränkte sich vielmehr auf einzelne Zellen, die nach Lage und Morphologie den Non-Parenchymzellen zugeordnet werden mussten.

Innerhalb der funktionellen Einheit der Leber, dem Acinus, ließ sich ein Unterschied zwischen dem periportalen Feld und dem perivenösen Bereich erkennen. Die SHP1/SHP2-positiven Zellen waren vermehrt in der periportalen Zone (Tabelle 6). Für die Auswertung wurde zwischen perivenöser, periportaler und intermediärer Zone unterschieden, wobei letztere nicht quantitativ ausgewertet wurde.

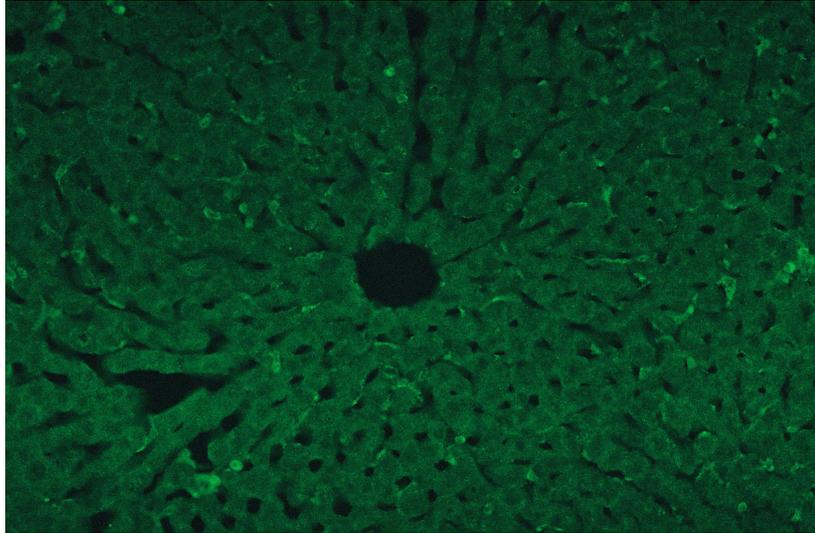


Abb. 3: Leber einer unbehandelten Ratte. Verschiedene Zellen mit dem polyklonalen Antikörper gegen SHP1/SHP2 markiert.

Zu welcher der vier sinusoidalen/perisinusoidalen Zellpopulationen die Zellen gehören, war mit dieser Methode nicht zu klären. Entsprechend ihrer morphologischen Verteilung kann man annehmen, daß es sich um Pit-, Ito- und Kupffer-Zellen handelt, während Endothelzellen keine Reaktivität zeigten.

Ratte	AK	Lokalisation	X ± S
Kontrolltier 1	SHP1/SHP2 Polyklon.	Periportal	26,1 ± 1,85
		Perivenös	16,2 ± 2,20
Kontrolltier 2	SHP1/SHP2 Polyklon.	Periportal	26,5 ± 2,28
		Perivenös	16,1 ± 3,75
Kontrolltier 3	SHP1/SHP2 Polyklon.	Periportal	27,7 ± 1,49
		Perivenös	17,6 ± 0,96

Tabelle 6: Quantitative Auswertung SHP1/SHP2 positiver Zellen in periportalen und perivenösen Bereichen des Acinus. Mittelwert und Standardabweichung aus N = 10 gezählten Feldern (0,25mm x 0,25mm)

3.1.1.3 Zellidentifikation

3.1.1.3.1 Endothelzellen

Der Nachweis, daß Endothelzellen nicht zu den reaktiven Zellen gehören, erfolgte über die Markierung dieser Zellen durch den Nachweis von Enos.

Die Doppelmarkierung zeigte keine Kolo-kalisation der beiden Antigene im Bereich der Sinusoide. Die Enos-reaktiven Endothelzellen, die mit Texas-Rot markiert waren, zeigten keine Grünfärbung durch die mit FITC-markierten SHP1/SHP2 Antikörper. Die SHP1/SHP2-markierten Zellen stellten eine völlig separate Zellpopulation dar. Siehe Abbildung 4.

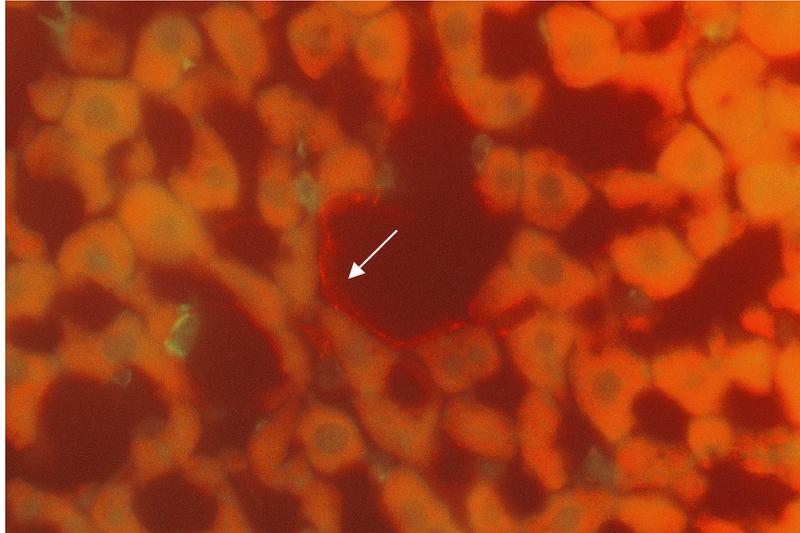


Abb. 4: Leber einer unbehandelten Ratte. Doppelfärbung Endothelzellen (rot) und SHP1/SHP2-positive Zellen (grün). Keine der Endothelzellen zeigt eine Doppelfärbung mit SHP1/SHP2

3.1.1.3.2 Identifikation der Ito- und Kupffer-Zellen

Die Population der Ito-Zellen und Kupffer-Zellen wurde mit dem AK gegen Vimentin identifiziert. Die Doppelmarkierung mit dem PTP-AK zeigte, daß alle Vimentin-positiven Zellen auch SHP1/SHP2-positiv sind, aber nicht alle SHP1/SHP2-positiven Zellen auch mit dem Vimentin-Antikörper reagierten.

Da Vimentin sowohl die Ito-, als auch die Kupffer-Zellen markiert, ist zum einen eine weitere Differenzierung dieser beiden Populationen notwendig, zum andern muß die Identifizierung der nicht Vimentin-, aber SHP1/SHP2-positiv markierten Zellen erfolgen. Siehe Abbildung 5

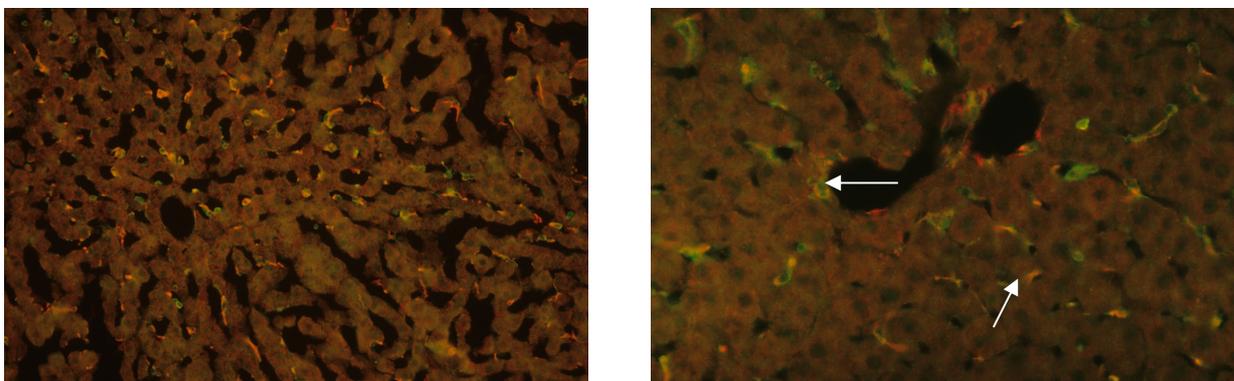


Abb. 5: Leber einer unbehandelten Ratte. Doppelfärbung mit Vimentin (rot) und SHP1/SHP2-positiven Zellen (grün). Zellen, die mit beiden Antikörpern reagieren, sind gelblich gefärbt.

3.1.1.3.3 Kupffer-Zellen

Zur weiteren Subklassifikation der SHP1/SHP2-positiven Zellen wurden nur für Kupffer-Zellen spezifische Marker eingesetzt. Dies sind Antikörper gegen ED-1, dessen Antigen die lysosomale Membran (Glykoproteinkette, 97kDa) von Myeloidzellen (Makrophagen, Blut-Granulozyten) der Ratte ist, gegen ED-2, dessen Antigen ein Membranantigen (95, 160, 175 kDa) von Gewebemakrophagen der Ratte ist, und gegen OX-6, dessen Antigen der Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) Klasse II (Ia Region) von B-Lymphozyten, dendritischen Zellen und Makrophagen der Ratte ist.

Hier wurden alle drei Antikörper verwendet jeweils in Kombination mit dem Antikörper gegen SHP1/SHP2.

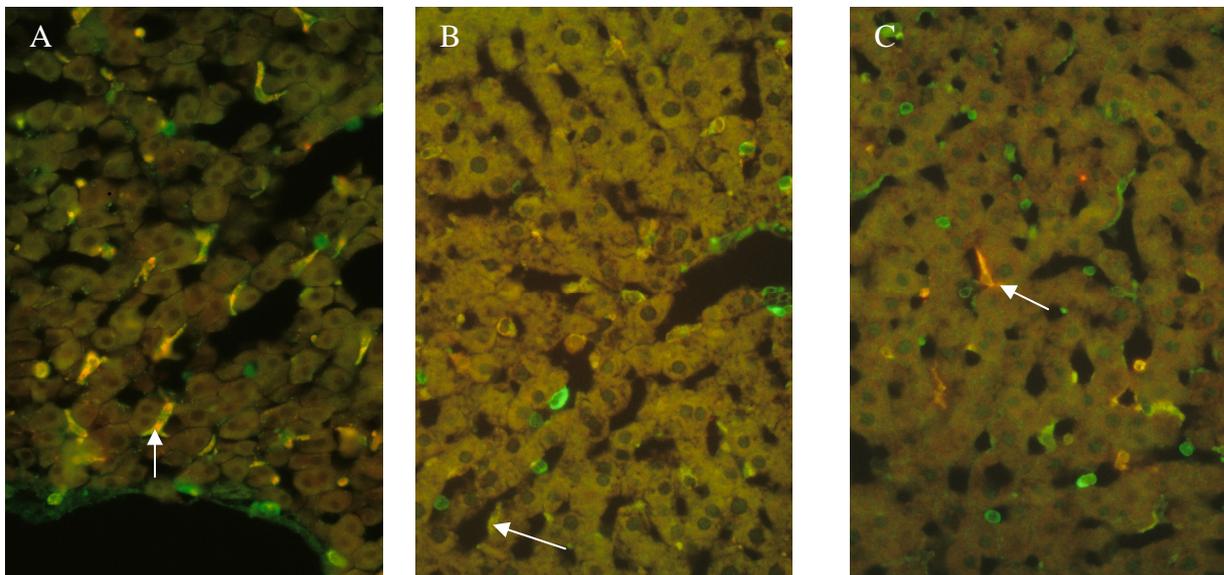


Abb. 6: Leber einer unbehandelten Ratte. Doppelfärbung.

A) Reaktion SHP1/SHP2 (grün) und ED1 als spez. Kupffer-Zellmarker (rot).

B) Reaktion SHP1/SHP2 (grün) und ED2 als spez. Kupffer-Zellmarker (rot).

C) Reaktion SHP1/SHP2 (grün) und Ox6 als spez. Kupffer-Zellmarker (rot)

Alle drei Reaktionen zeigen eine spezifische Doppelfärbung für die Kupffer-Zellen.

Durch die Doppelfärbung zeigen die Kupffer-Zellen eine gelb-orange Färbung.

Alle ED-1 positiv markierten Zellen waren auch SHP1/SHP2 positiv. Das gleiche Verteilungsmuster, das für ED-1 positiv markierten Zellen beobachtet werden konnte, ließ

sich bei der Färbung mit den Antikörpern gegen ED-2 und OX-6 reproduzieren. Dies bedeutet, daß alle als Kupffer-Zellen erkannten Zellen das Protein SHP1/SHP2 enthalten.

Wie bereits bei der Reaktion mit Vimentin waren nicht alle SHP1/SHP2-positiven Zellen ED-1- positiv. Siehe Abbildung 6.

Entsprechend der Zonierung der Kupffer-Zellen findet sich periportal eine größere Anzahl an SHP1/SHP2-positiven Kupffer-Zellen als perivenös. Die Kupffer-Zellen wurden getrennt nach periportal und perivenös ausgezählt. Siehe Tabelle 7.

Da die Zahl der Vimentin-markierten SHP1/SHP2-positiven Zellen höher lag als die der Kupffer-Zellen, ließ sich schließen, daß auch die Ito-Zellen SHP1/SHP2 enthalten müssen.

Ratte	AK	Lokalisation	X ± S
Kontroll-Tier 1	ED-1	Periportal	15,1 ± 0,99
	ED-2	Periportal	15,6 ± 0,84
	ED-1	Perivenös	11,0 ± 1,25
	ED-2	Perivenös	11,2 ± 1,14
Kontroll-Tier 2	ED-1	Periportal	14,9 ± 1,37
	ED-2	Periportal	15,0 ± 0,82
	ED-1	Perivenös	11,1 ± 1,29
	ED-2	Perivenös	10,8 ± 1,03
Kontroll-Tier 3	ED-1	Periportal	16,3 ± 1,77
	ED-2	Periportal	15,4 ± 0,52
	ED-1	Perivenös	11,7 ± 1,16
	ED-2	Perivenös	11,8 ± 1,23

Tabelle 7: Quantitative Auswertung ED-1- und ED-2-positiver Zellen in periportal und perivenösen Bereichen des Acinus. Mittelwert und Standardabweichung aus N = 10 gezählten Feldern (0,25mm x 0,25mm)

3.1.1.3.4 Ito-Zellen

Antikörper gegen das zytoskeletale Desmin und GFAP (=glia fibrillary acidic protein) ermöglichen eine spezifische Anfärbung der Ito-Zellen. Allerdings hängt die Reaktivität mit

dem jeweiligen AK vom Funktionszustand der Zelle ab. Unter normalen Bedingungen regulieren die Ito-Zellen die Kontraktilität der Sinusoide und sind für den Umsatz der extrazellulären Matrix verantwortlich. Durch eine akute Schädigung der Hepatozyten transformieren die Ito-Zellen in Myofibroblasten ähnliche Zellen und spielen eine Schlüsselrolle bei der fibrotisch entzündlichen Antwort der Leber. Zur vollständigen Erfassung aller Ito-Zellen wurden daher beide Antikörper gepoolt eingesetzt.

Die Doppelfärbung der zellspezifischen Antikörper in Kombination mit dem Antikörper gegen SHP1/SHP2 zeigte eine eindeutige Doppelmarkierung aller Desmin- und GFAP-positiven Zellen mit SHP1/SHP2 (Abbildung 7).

Die intraacinäre Verteilung dieser doppelmarkierten Zellen entspricht der bereits in der Literatur beschriebenen Verteilung für Ito-Zellen mit einer etwas geringeren Zellzahl perivenös (Tabelle 8).

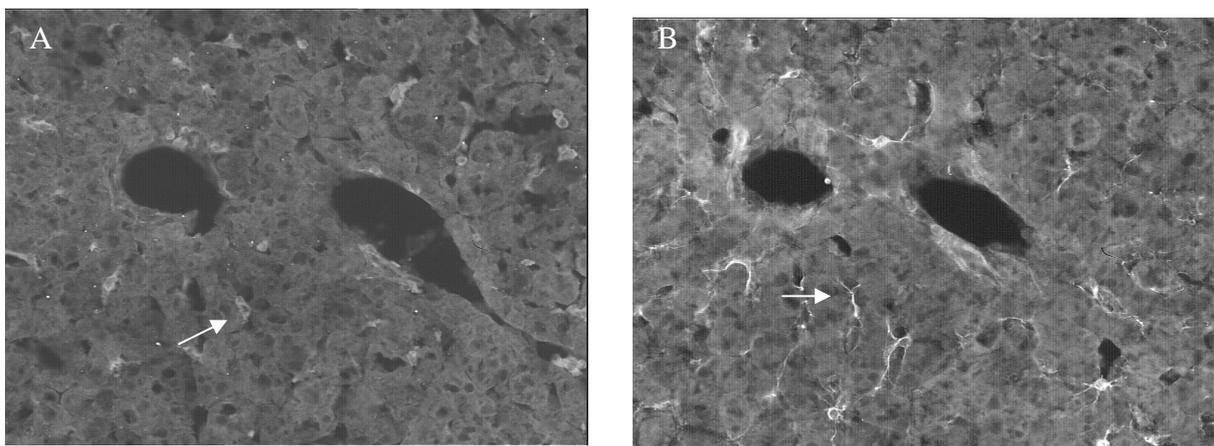


Abb. 7: Leber einer unbehandelten Ratte. Parallelschnitte.

A): Reaktion mit polyklonalem Antikörper gegen SHP1/SHP2.

B) Reaktion mit Antikörpern gegen Desmin und GFAP, beides Marker für Ito-Zellen. Eine der Zellen, die sowohl Desmin/GFAP als auch SHP1/SHP2 enthalten, ist exemplarisch mit einem Pfeil markiert. Da Ito-Zellen sehr lange Zellausläufer haben, scheint es so, als ob mehr Ito- als SHP1/SHP2-positive Zellen in den Schnitten vorkommen. Dies ist aber nicht der Fall.

Zusätzlich wurde der Aktivierungszustand der Ito-Zellen untersucht. Nur aktivierte Ito-Zellen exprimieren das Smooth-muscle-actin. Deshalb wurden Leberschnitte mit einem Antikörper gegen Smooth-muscle-actin inkubiert.

Die Ito-Zellen zeigten eine sehr diskrete positive Reaktion. Das Fluoreszenzsignal war punktuell im Zytoplast zu erkennen. Siehe Abbildung 8.

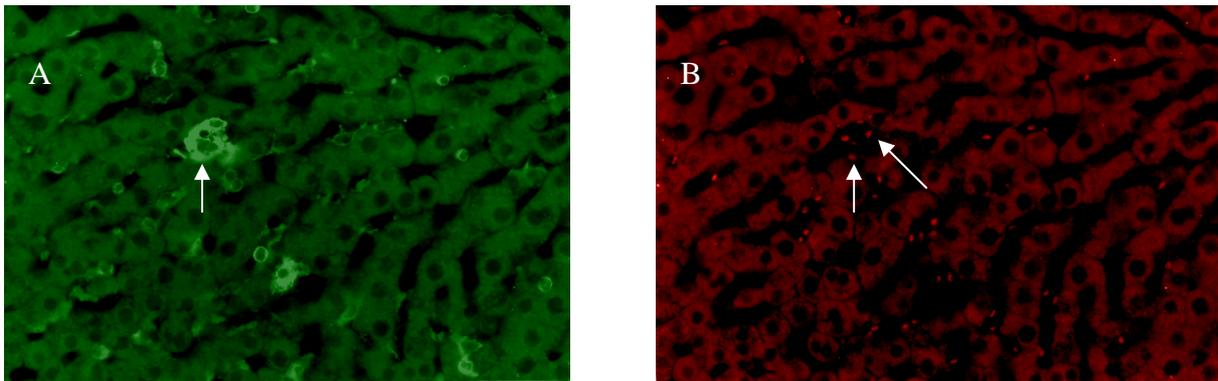


Abb 8: Leber einer unbehandelten Ratte. Doppelfärbung

A) Reaktion mit polyklonalem Antikörper gegen SHP1/SHP2.

B) Reaktion mit Antikörper gegen Smooth-muscle-actin.

Es zeigt sich nur eine punktuelle Färbung im Cytosol der Ito-Zellen für Smooth Muscle Actin, während die Färbung mit SHP1/SHP2 die gesamte Zelle färbt. Beispiel in beiden Bildern mit Pfeil markiert.

Ratte	AK	Lokalisation	X ± S
Kontrolltier 1	Desmin/GFAP	Periportal	13,4 ± 2,17
		Perivenös	13,1 ± 1,29
Kontrolltier 2	Desmin/GFAP	Periportal	13,0 ± 1,76
		Perivenös	12,1 ± 1,91
Kontrolltier 3	Desmin/GFAP	Periportal	13,5 ± 0,71
		Perivenös	12,5 ± 1,08

Tabelle 8: Quantitative Auswertung Desmin-/GFAP-positiver Zellen in periportalen und perivenösen Bereichen des Acinus. Mittelwert und Standardabweichung aus N = 10 gezählten Feldern (0,25mm x 0,25mm)

3.1.1.3.5 Natural-Killer-Zellen (NK-Zellen)

Die Identifizierung der SHP1/SHP2-positiven, aber Vimentin-negativen Zellen erfolgte über den monoklonalen Antikörper gegen das spezifische Oberflächenantigen 3.2.3 der Natural-Killer-Zellen, da diese NK-Zellen eine weitere Subpopulation der Nonparenchymzellen der Leber darstellen.

Die doppelimmunzytochemische Reaktion mit dem Antikörper 3.2.3 und dem Antikörper gegen SHP1/SHP2 zeigte eine Doppelfärbung der intra-sinusoidalen NK-Zellen (Abbildung 9). Eine signifikante Zonierung der NK-Zellen im Verlauf der sinusoidalen Austauschstrecke war nicht zu erkennen (Tabelle 9), jedoch scheinen periportal mehr NK-Zellen zu liegen.

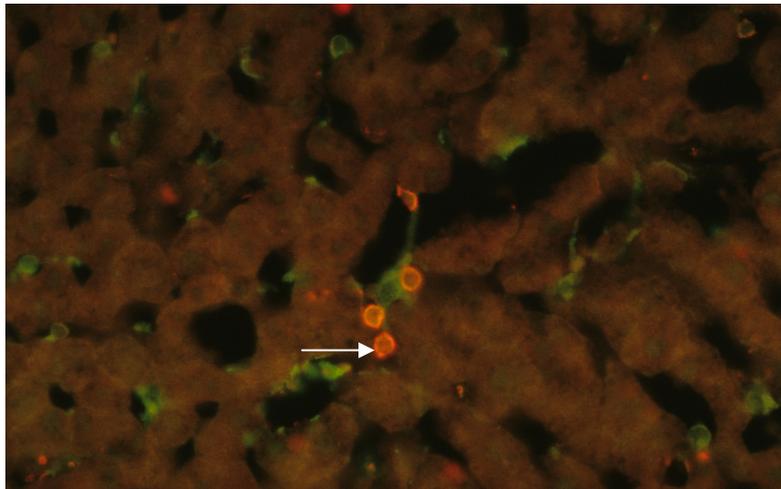


Abb. 9: Leber einer unbehandelten Ratte. Doppelfärbung mit SHP1/SHP2 und mit Antikörpern gegen 3.2.3 (spezifischer NK-Zellen-Marker). Mit Pfeilen markiert sind exemplarisch zwei NK-Zellen, die sowohl SHP1/SHP2 als auch 3.2.3-positiv sind.

Ratte	AK	Lokalisation	X ± S
Kontrolltier 1	3.2.3.	Periportal	1,5 ± 0,71
		Perivenös	1,2 ± 0,92
Kontrolltier 2	3.2.3.	Periportal	1,40 ± 0,84
		Perivenös	1,20 ± 1,03
Kontrolltier 3	3.2.3.	Periportal	1,40 ± 0,84
		Perivenös	1,10 ± 0,88

Tabelle 9: Quantitative Auswertung 3.2.3-positiver Zellen in periportalen und perivenösen Bereichen des Acinus. Mittelwert und Standardabweichung aus N = 10 gezählten Feldern (0,25mm x 0,25mm)

3.2 Isolation der Endothel- und Kupffer-Zellen am Normaltier

Zur weiteren Analyse erfolgte eine Zellisolation. Als Isolationsverfahren wurde die Elutriation gewählt. Bei der Elutriation ist es möglich, Endothel- und Kupffer-Zellen in einem Arbeitsgang zu isolieren. Dabei lag das Augenmerk auf den Kupffer-Zellen, so dass, der Methode geschuldet und trotz eines anderen Zahlenverhältnisses in der Leber, mehr Kupffer- als Endothelzellen isoliert wurden. Im Rahmen dieses Isolationsverfahrens kommt es zu einem Untergang aller anderen Zellpopulationen, so daß die anderen Zellpopulationen nicht eluiert werden können. Die Isolation der Ito- und NK-Zellen war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

3.2.1 Endothelzellen

Bei der Elutriation konnten in einem ersten Schritt Endothelzellen isoliert werden, die im weiteren sowohl lichtmikroskopisch als auch biochemisch aufgearbeitet wurden. Insgesamt konnten 24×10^6 Zellen isoliert werden.

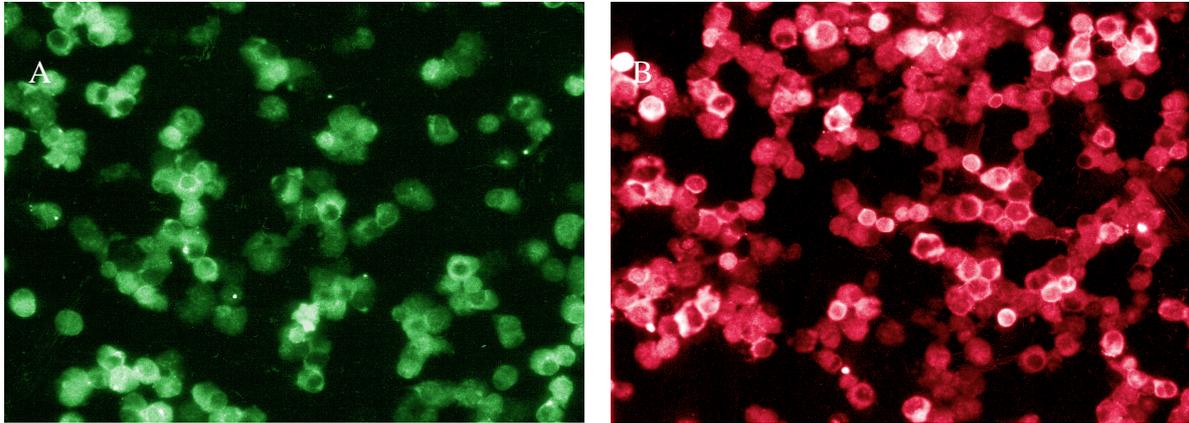


Abb. 10: Färbung der isolierten Endothelzellen mit SHP1/2 (A) und Enos (B). Eine mit Immunfluoreszenz nachweisbare Reaktion mit SHP1/2 findet sich bei den Endothelzellen nicht (A). Eine spezifische Färbung mit Enos ist bei den Endothelzellen (B) möglich.

Die isolierten immersionsfixierten Endothelzellen wurden zur Zellidentifikation parallel mit dem endothelspezifischen Antikörper Enos und dem polyklonalen Antikörper gegen SHP1/SHP2 inkubiert. Nachfolgend wurde eine Doppelimmunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Hierbei konnten die gewonnenen Zellen mit Enos markiert und so als Endothelzellen identifiziert werden. Diese Zellen wiesen keine SHP1/SHP2-positive Reaktion auf. Siehe Abbildung 10.

3.2.2 Kupffer-Zellen

Im zweiten Schritt wurde die Durchflußrate der Spüllösung durch den Rotor der Elutriationszentrifuge erhöht, so daß dadurch die Kupffer-Zellen aus der Zellsuspension gewonnen wurden. Hierbei wurden 52×10^6 Zellen isoliert.

Die Identifikation der Zellen erfolgte durch eine Markierung der Zellen mit den Antikörpern gegen OX-6, parallel wurde das Vorkommen der SHP1/SHP2 überprüft.

Die identifizierten Kupffer-Zellen waren SHP1/SHP2-positiv. Siehe Abbildung 11.

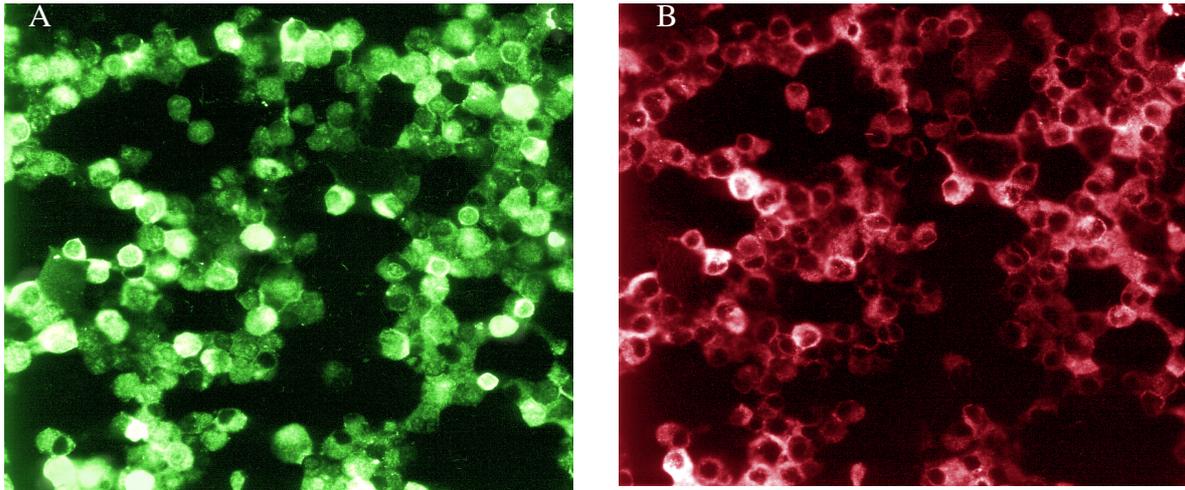


Abb. 11: Färbung der isolierten Kupferzellen mit SHP1/2 (A) und OX-6 (B). Eine mit Immunfluoreszenz nachweisbare Reaktion mit SHP1/2 findet sich bei den Kupfer-Zellen (A), ebenso eine spezifische Färbung mit OX-6 (B).

3.3 Biochemische Untersuchungen am Normaltier

3.3.1 Aktivitätsbestimmung der Phosphatasen

3.3.1.1 Leberhomogenate

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen wurden durch biochemische Analysen an Lebergewebs- und Endothel- und Kupfer-Zellhomogenaten ergänzt.

Zunächst erfolgten Untersuchungen zur Bestimmung der Phosphataseaktivität. Eine Aufteilung nach Zelltypen erfolgte während dieses Schrittes noch nicht. Untersucht wurde getrennt nach löslicher und membrangebundener Proteinfraction, da bestimmte Phosphatasen sowohl löslich als auch membrangebunden in der Zelle vorkommen.

Um einen Bezugswert zu haben, erfolgte als erstes die Bestimmung des in den Extrakten enthaltenen Proteingehaltes.

Die Bestimmung der Phosphataseaktivitäten erfolgte in allen extrahierten Fraktionen. Sowohl von der löslichen als auch von der membrangebundenen Fraktion wurde jeweils ein Extrakt und ein Nachextrakt hergestellt. Die Bestimmung der Phosphataseaktivitäten in den Nachextrakten erfolgte, um die Güte des Extraktionsverfahrens zu bestimmen.

Tier	Proteingehalt mg pro mg Gewebe	Phosphatase- Aktivität	Überstand 1	Überstand II	Überstand III	Überstand IV
Kontroll- tier 4	3,18mg/mg	pmol/min x ml	2500	190	1860	398
		pmol/min x mg	786	59,7	585	125
Kontroll- tier 5	3,07mg/mg	pmol/min x ml	2500	360	2040	357
		pmol/min x mg	814	117	665	116

Tabelle 10: Aktivitäten der Protein-Tyrosin-Phosphatasen in Leberhomogenaten. Überstand I und II sind Proteinextrakt und -nachextrakt aus der löslichen Fraktion der Zellen, während Überstand III und IV die Extrakte der unlöslichen Fraktion der Leberhomogenate sind (Werte mit Hilfe der Methode nach Cerenkow gewonnen).

3.3.1.2 Isolierte Zellen

Im Anschluß wurden die Aktivitätsbestimmungen der Phosphatasen an isolierten Kupffer- und Endothelzellen durchgeführt. Die Zellen wurden homogenisiert, um die in ihnen enthaltenen Proteine zu extrahieren. Die Proteinextraktion erfolgte in zwei Arbeitsgängen getrennt nach der zytosolischen löslichen und der membrangebunden unlöslichen Fraktion. Die gemessenen Aktivitäten sind in Tabelle 11 für die Endothel- und in Tabelle 12 für die Kupffer-Zellen aufgeführt.

3.3.1.2.1 Endothelzellen

Tier	Proteingehalt mg/mg Gewebe	Phosphatase- Aktivität	Überstand I	Überstand II	Überstand III	Überstand IV
Kontroll- tier 6	5,7	pmol/min x ml	2760	269	1500	135
		pmol/min x mg	484	47	262	24

Tabelle 11: Protein-Tyrosin-Phosphatase-Aktivitäten isolierter Endothelzellen in den unterschiedlichen Extrakten. Sowohl aus der zytosolischen als auch aus der membrangebundenen Fraktion wurden jeweils zwei Extrakte gewonnen (Werte mit Hilfe der Methode nach Cerenkow gewonnen).

3.3.1.2.2 Kupffer-Zellen

Tier	Proteingehalt mg/mg Gewebe	Phosphatase- Aktivität	Überstand I	Überstand II	Überstand III	Überstand IV
Kontroll- tier 6	5,58	pmol/min x ml	19362	1868	4420	598
		pmol/min x mg	3470	219	519	70

Tabelle 12: Protein-Tyrosin-Phosphatase-Aktivitäten isolierter Kupffer-Zellen in den unterschiedlichen Extrakten. Sowohl aus der zytosolischen als auch aus der membrangebundenen Fraktion wurden jeweils zwei Extrakte gewonnen (Werte mit Hilfe der Methode nach Cerenkow gewonnen).

3.3.2 SDS-Page am Normaltier

3.3.2.1 Leberhomogenate

Der erste und dritte Extrakt aus den Leberhomogenaten wurden für die Anfertigung des SDS-Page verwendet, da in diesen beiden Extrakten die größten Proteinmengen aus der löslichen und der membrangebundenen Zellfraktion extrahiert werden konnten.

Untersucht wurden die Homogenate sowohl auf das Vorkommen der T-Zell-PTP als auch der SHP1. An Hand der parallel mitlaufenden Markerproteine mit genau definierter Größe zeigte sich in den Blots, nach Färbung der Proteine mit spezifischen Antikörpern, für beide Extrakte eine deutliche Bande im Bereich des 68/72kDa Molekulargewichtes bzw. bei 50kDa. Das Molekulargewicht der PTP1B/Tc liegt bei 50kDa, das der SHP1/SHP2 bei 68/72kDa. Eine semiquantitative Auswertung erfolgte nicht (Abbildung 12).

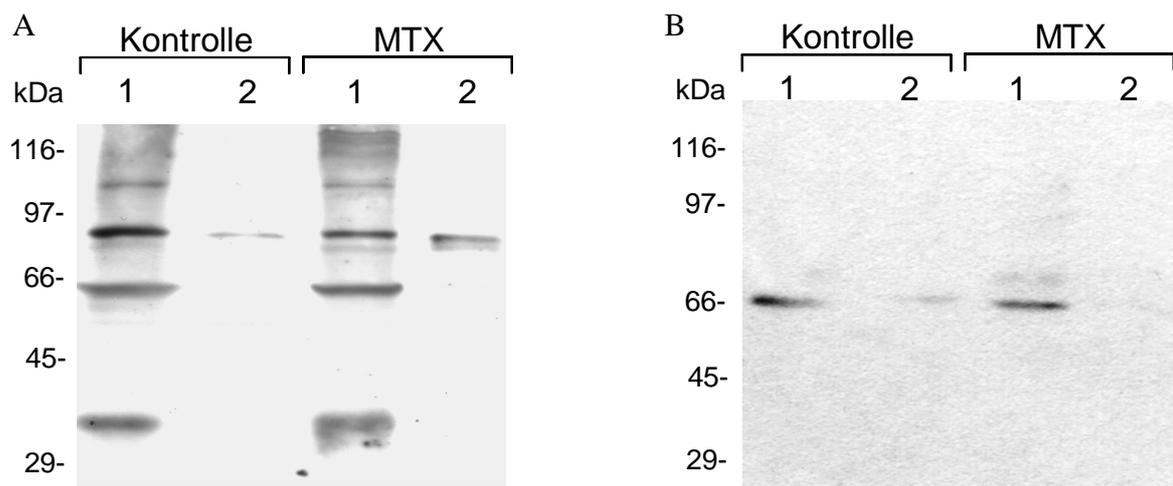


Abb.12: Nachweis der TcPTP (A) und SHP1/SHP2 (B) im SDS-Page. Für den SDS-Page wurden Leberhomogenate eines normal- und eines MTX behandelten Tieres verwendet. Linie 1 zeigt jeweils den Nachweis der jeweiligen PTP in der löslichen Proteinfraction, Linie 2 repräsentiert die membrangebundene Fraktion der PTP.

3.3.2.2 Isolierte Zellen

3.3.2.2.1 Endothelzellen

Um die in den Extrakten enthaltene Proteinfraction genauer zu charakterisieren, erfolgte im Anschluß mit Hilfe des SDS-PAGE die Auftrennung nach Proteingröße.

Bei der durchgeführten SDS-Page zeigt sich in dem Extrakt aus Endothelzellen eine starke Bande bei 68kDa und ein sehr breiter Bandenkomplex unterhalb der 68/72kDa Bande bei dem unbehandelten Tier in der löslichen Proteinfraktion. Siehe Abbildung 13.

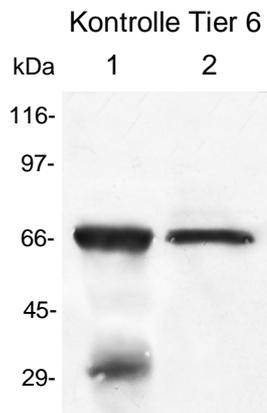


Abb 13: SDS-Page isolierter Endothelzellen. Für die SDS-Pages wurden jeweils das erste Proteinextrakt der löslichen Proteinfraktion und der membrangebundenen Proteinfraktion verwendet. Linie 1: lösliche Proteinfraktion, Linie 2: membrangebundene Proteinfraktion.

Bei der semiquantitativen Auswertung wird die Intensität des Farbsignals der SDS-Page in Relation zueinander gesetzt. Direkt vergleichbar mit den absolut gemessenen Phosphataseaktivitäten sind diese Ergebnisse nicht. Eine Vergleichbarkeit ist nur innerhalb des gleichen SDS-Pages möglich, da hier sämtliche Labor- und Untersuchungsbedingungen identisch sind. In der hier vorliegenden Untersuchung sind daher die semiquantitativen Auswertungen von Kupffer- und Endothelzellen nicht miteinander vergleichbar, da sie aus unterschiedlichen Blots gewonnen wurden.

Für die Extrakte ergaben sich folgende Werte:

Extrakt I (lösliche/zytosolische Fraktion): 772Units/mg Protein

Extrakt III (feste/membrangebundene Fraktion): 154Units/mg Protein

Siehe Abbildung 14, exemplarisch für die lösliche Fraktion.

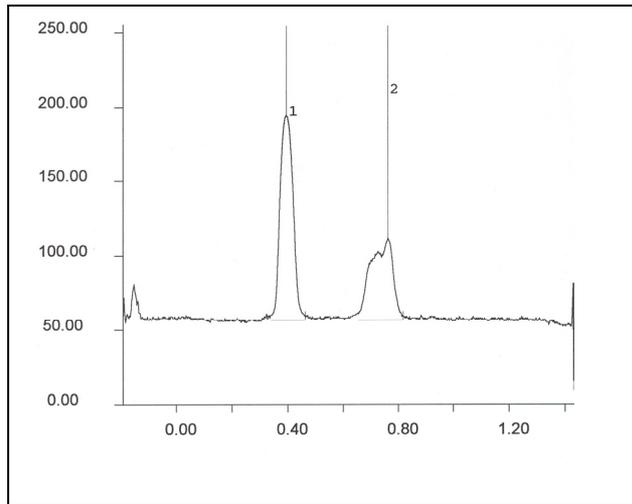


Abb 14: Semiquantitative Auswertung der SDS-Page isolierter Endothelzellen (unbehandeltes Tier)

3.3.2.2.2 Kupffer-Zellen

Die nach der Isolation durchgeführte Gelelektrophorese mit der SDS-Page zeigt ein ähnliches Verteilungsmuster, wie es sich auch bei den Endothelzellen fand.

Ein breiter Bandenkomplex für die lösliche und membrangebundene Fraktion des unbehandelten Tieres lag unterhalb der 66kDa-Marke und eine scharfe Bande bei 68/72kDa. Siehe Abbildung 15.

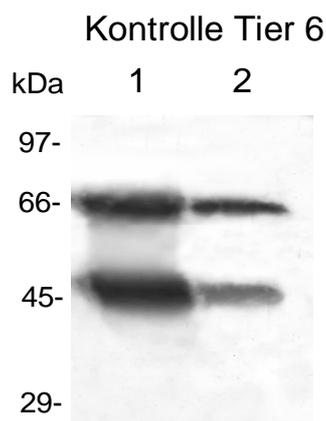


Abb 15: SDS-Page isolierter Kupffer-Zellen. Für die SDS-Pages wurden jeweils das erste Proteinextrakt der löslichen Proteinfraction und der membrangebundenen Proteinfraction verwendet. Linie 1: lösliche Proteinfraction, Linie 2: membrangebundene Proteinfraction. Bei der 45 kDa-Bande handelt es sich um SHP1/SHP2-Bruchstücke, die durch den Separationsvorgang entstanden sind.

Die semiquantitative Auswertung des SDS-Page der Extrakte I und III ergab für die Kupffer-Zellen: Extrakt I (lösliche/zytosolische Fraktion) einen Wert von 985Units/mg Protein.

Der Extrakt III (feste/membrangebundene Fraktion) ergab einen Wert von 402Units/mg Protein. Exemplarisch wird hier das Scan-Pack-Bild des Extraktes I in Abbildung 16 dargestellt.

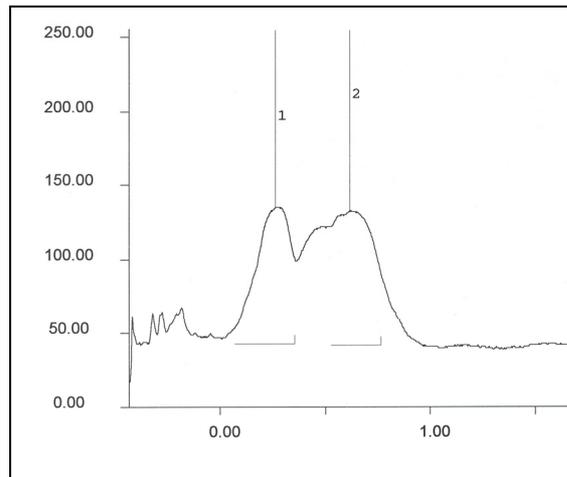


Abb. 16: Semiquantitative Auswertung der membrangebundenen Fraktion in Kupffer-Zellen (unbehandeltes Tier) mittels Scan-Pack.

3.4 Immunzytochemische Untersuchung am Methotrexat-Tier

Nach den Untersuchungen der unbehandelten Tiere schlossen sich die Lokalisationsstudien für die SHP1/SHP2 bei Methotrexat (MTX)-behandelten Tieren an.

In Vorversuchen wurde die ideale Konzentration des applizierten MTX ermittelt. Wir erachteten 7,5 mg MTX/ kg KG i.p. als ideal.

3.4.1 Allgemeine Morphologie

Das Lebergewebe war deutlich verändert. Die Zellen der Leber waren nicht mehr in den so stark geordneten Verbänden zu sehen wie zuvor bei den unbehandelten Tieren. Die Struktur

der Sinusoide war nicht mehr eindeutig zu erkennen, und die Zellen zeigten unregelmäßigere Strukturen.

3.4.2 PTP-1B/T-Zell-PTP

Es wurde untersucht, ob möglicherweise die PTP-1B oder die T-Zell-PTP durch die Behandlung induziert worden war. Dazu wurde zunächst der Nachweis für die Antigene T-Zell-PTP bzw. PTP-1B durchgeführt. Auch hier gab es auf lichtmikroskopischer Ebene keine aussagekräftigen Ergebnisse.

3.4.3 SHP1/SHP2

Es zeigte sich hier wie zuvor bei den unbehandelten Tieren eine auf wenige Zellen beschränkte Reaktion. Zellen des Leberparenchyms wiesen keine eindeutig positive Färbung für SHP1/SHP2 auf.

Wieder waren es sinusoidale/ perisinusoidale Zellen, die ein sehr deutlich positives Signal nach der Immunzytochemie zeigten. Periportal war eine Anhäufung der SHP1/SHP2-positiv gefärbten Zellen zu beobachten (Tabelle 13). Bei der quantitativen Auswertung der SHP1/SHP2-positiven Zellen war eine Abnahme der periportal positiv reagierenden Zellen im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten. Im perivenösen Bereich bestand kein Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Tieren. Siehe Abbildung 17.

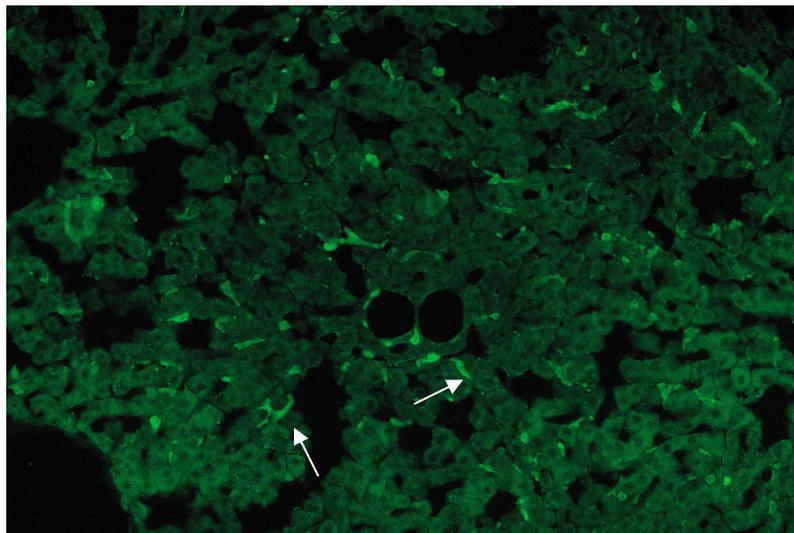


Abb. 17: Leber einer behandelten Ratte. Färbung mit SHP1/SHP2. Wie zuvor beim unbehandelten Tier sind mehrere Zelltypen reaktiv. Eine Reaktion der Hepatozyten findet sich nicht.

Ratte	AK	Lokalisation	X ± S
MTX – Tier 1	SHP1/SHP2 Polyklon.	Periportal	23,6 ± 1,65
		Perivenös	16,7 ± 1,49
MTX – Tier 2	SHP1/SHP2 Polyklon.	Periportal	23,7 ± 1,83
		Perivenös	16,4 ± 1,35
MTX – Tier 3	SHP1/SHP2 Polyklon.	Periportal	23,9 ± 2,73
		Perivenös	16,5 ± 2,72
MTX – Tier 4	SHP1/SHP2 Polyklon.	Periportal	21,4 ± 1,17
		Perivenös	17,5 ± 1,43
MTX – Tier 5	SHP1/SHP2 Polyklon.	Periportal	21,1 ± 3,03
		Perivenös	16,7 ± 2,79
MTX – Tier 6	SHP1/SHP2 Polyklon.	Periportal	23,1 ± 2,33
		Perivenös	16,3 ± 1,34

Tabelle 13: Quantitative Auswertung SHP1/SHP2-positiver Zellen. in periportalen und perivenösen Bereichen des Acinus; behandeltes Tier. Mittelwert und Standardabweichung aus N = 10 gezählten Feldern (0,25mm x 0,25mm)

3.4.4 Zellidentifikation

Wie bei den unbehandelten Tieren war eine Differenzierung der einzelnen Zellpopulationen notwendig. Dies erfolgte wieder an Hand der zellspezifischen Antikörper. Die Zellen wurden über Doppelfärbungen charakterisiert.

3.4.4.1 Endothelzellen

Um das Vorkommen von SHP1/SHP2 in den Endothelzellen auszuschließen, wurden bei Doppelfärbungen die Endothelzellen mit Enos markiert. Ein Vorkommen von SHP1/SHP2 in den Endothelzellen der Leber bei MTX-behandelten Tieren konnte im Lichtmikroskop ausgeschlossen werden (Abbildung 18).

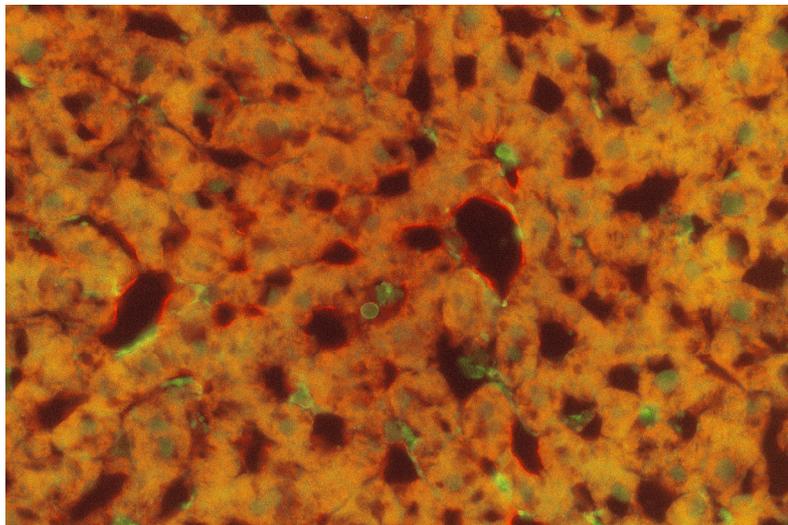


Abb. 18: Leber einer behandelten Ratte. Doppelfärbung mit SHP1/SHP2 (grün) und Enos als spezifischer Endothelzellmarker (rot). Es findet sich, wie auch beim unbehandelten Tier, keine Doppelmarkierung der Endothelzellen.

3.4.4.2 Identifikation der Ito- und Kupffer-Zellen

Die weitere Differenzierung der reaktiven Zellen erfolgte mit dem Antikörper gegen Vimentin. Wie zuvor bei den unbehandelten Tieren waren alle Vimentin-positiven Zellen auch SHP1/SHP2 positiv.

Somit kann davon ausgegangen werden, daß alle Kupffer- und Ito-Zellen SHP1/SHP2 exprimieren. Vergleiche dazu Abbildung 19.

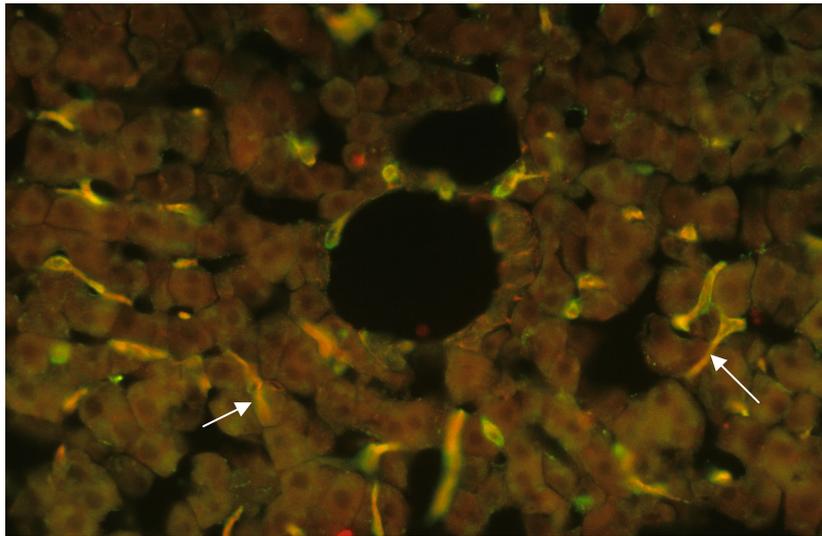


Abb. 19: Leber einer mit MTX behandelten Ratte. Doppelfärbung mit Vimentin (rot) und SHP1/SHP2 (grün). Zellen, die mit beiden Antikörpern reagieren, erscheinen gelblich gefärbt.

3.4.4.3 Kupffer-Zellen

Zur Absicherung dieser Beobachtung wurden, wie bei den unbehandelten Lebern, die Kupffer-Zellen mit Antikörpern gegen ED-1, ED-2 und OX-6 identifiziert, ferner wurden Doppelfärbungen mit der SHP1/SHP2 durchgeführt.

Dies bestätigte, daß alle Kupffer-Zellen auch eine positive Immunreaktion für den SHP1/SHP2-Antikörper zeigen.

Die bei den unbehandelten Tieren beschriebene periportale Häufung von SHP1/SHP2-positiven Kupffer-Zellen findet sich auch bei den MTX-Tieren. Exemplarisch für die Kupffer-Zellen werden nur die Parallelfärbungen für ED1 und SHP1/SHP2 dargestellt, da sie für OX-6 und ED2 das gleiche Muster ergeben (Abbildung 20).

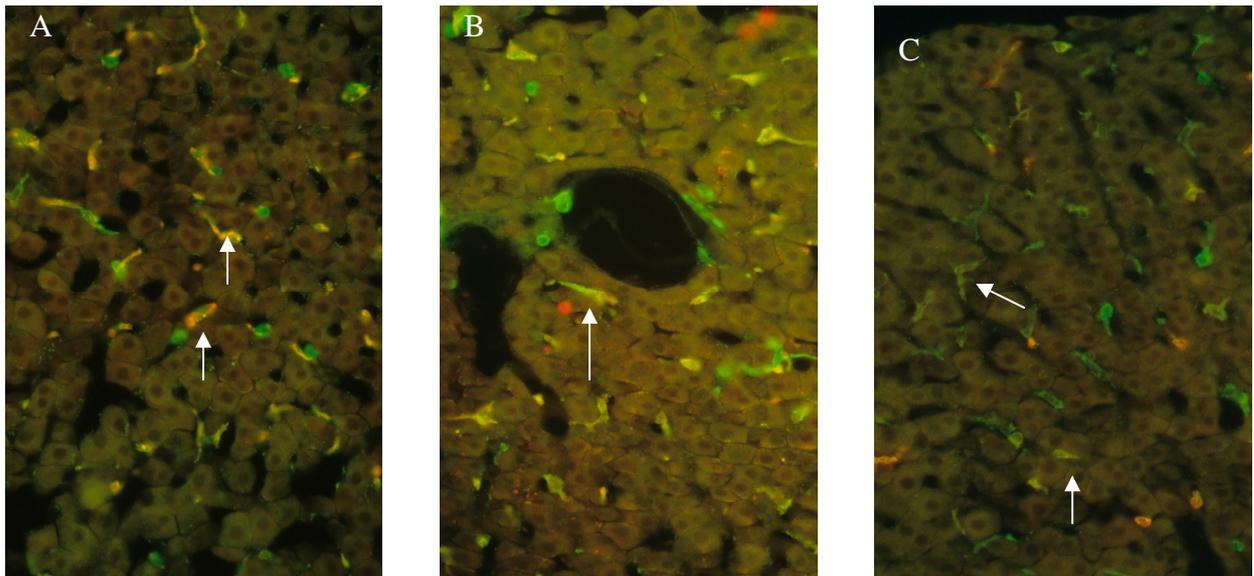


Abb. 20: Leber einer mit MTX behandelten Ratte. Doppelfärbung.

A) Reaktion SHP1/SHP2 (grün) und ED1 als spez. Kupffer-Zellmarker (rot).

B) Reaktion SHP1/SHP2 (grün) und ED2 als spez. Kupffer-Zellmarker (rot).

C) Reaktion SHP1/SHP2 (grün) und OX-6 als spez. Kupffer-Zellmarker (rot)

Alle drei Reaktionen zeigen eine spezifische Doppelfärbung für die Kupffer-Zellen.

Durch die Doppelfärbung zeigen die Kupffer-Zellen eine gelb-orange Färbung.

Die Gesamtzahl der Kupffer-Zellen hat sowohl perivenös als auch periportal gering abgenommen. (Tabelle 14)

Ratte	AK	Lokalisation	X ± S
MTX- Tier 1	ED-1	Periportal	13,2 ± 1,75
	ED-2		13,7 ± 0,95
	ED-1	Perivenös	11,1 ± 0,88
	ED-2		12,1 ± 1,20
MTX- Tier 2	ED-1	Periportal	13,3 ± 1,77
	ED-2		12,0 ± 1,15
	ED-1	Perivenös	10,6 ±
	ED-2		9,70 ± 0,67
MTX- Tier 3	ED-1	Periportal	14,0 ± 1,33
	ED-2		13,9 ± 1,29
	ED-1	Perivenös	9,20 ± 1,87
	ED-2		9,90 ± 0,74
MTX- Tier 4	ED-1	Periportal	12,9 ± 1,29
	ED-2		13,3 ± 1,34
	ED-1	Perivenös	10,3 ± 1,25
	ED-2		9,90 ± 1,20
MTX- Tier 5	ED-1	Periportal	13,0 ± 1,41
	ED-2		13,2 ± 0,79
	ED-1	Perivenös	9,90 ± 0,88
	ED-2		9,80 ± 1,03
MTX- Tier 6	ED-1	Periportal	13,8 ± 1,23
	ED-2		12,6 ± 1,26
	ED-1	Perivenös	11,4 ± 0,97
	ED-2		10,3 ± 1,57

Tabelle 14: Quantitative Auswertung ED-1- und ED-2-positiver Zellen. in periportalen und perivenösen Bereichen des Acinus; behandeltes Tier. Mittelwert und Standardabweichung aus N = 10 gezählten Feldern (0,25mm x 0,25mm)

3.4.4.4 Ito-Zellen

Die Ito-Zellen wurden mit Antikörpern gegen GFAP und Desmin identifiziert.

Wie zuvor bei den unbehandelten Tieren zeigte sich erneut, daß alle als Ito-Zellen identifizierten Zellen SHP1/SHP2-positiv sind.

Ratte	AK	Lokalisation	X ± S
MTX – Tier 1	Desmin/ GFAP	Periportal	13,9 ± 1,10
		Perivenös	12,6 ± 1,17
MTX – Tier 2	Desmin/ GFAP	Periportal	12,9 ± 0,99
		Perivenös	12,5 ± 1,08
MTX – Tier 3	Desmin/ GFAP	Periportal	14,0 ± 0,94
		Perivenös	11,9 ± 1,91
MTX – Tier 4	Desmin/ GFAP	Periportal	13,0 ± 1,56
		Perivenös	11,6 ± 0,97
MTX – Tier 5	Desmin/ GFAP	Periportal	12,1 ± 0,99
		Perivenös	11,0 ± 1,05
MTX – Tier 6	Desmin/ GFAP	Periportal	13,1 ± 2,23
		Perivenös	10,8 ± 0,79

Tabelle 15: Quantitative Auswertung Desmin/GFAP-positiver Zellen in periportalen und perivenösen Bereichen des Acinus; behandeltes Tier. Mittelwert und Standardabweichung aus N = 10 gezählten Feldern (0,25mm x 0,25mm)

Eine deutliche zonale Verteilung der Ito-Zellen bei behandelten Tieren war nicht vorhanden. Im Vergleich zu den unbehandelten Tieren ist eine geringe periportale Häufung der Ito-Zellen bei den behandelten Tieren zu erkennen, während ihre Anzahl bei den behandelten Tieren perivenös gering abgenommen hat. Die Gesamtzahl der Ito-Zellen blieb konstant. Wie später gezeigt, sind diese Veränderungen nicht statistisch relevant. Siehe Tabelle 15.

Um wie auch bei den unbehandelten Tieren eine Aussage über den Aktivierungszustand der Ito-Zellen treffen zu können, wurde eine zusätzliche Inkubation mit einem Antikörper gegen das Smooth-muscle-actin in Kombination mit dem Antikörper gegen die SHP1/SHP2 durchgeführt.

Die Ito-Zellen wiesen ein sehr deutliches Signal für Smooth-muscle-actin auf, wobei dasselbe Verteilungsmuster wie bei der Desmin-/GFAP-Färbung vorlag. Jede mit dem Antikörper gegen das Smooth-muscle-actin reaktive Zelle war SHP1/SHP2 positiv.

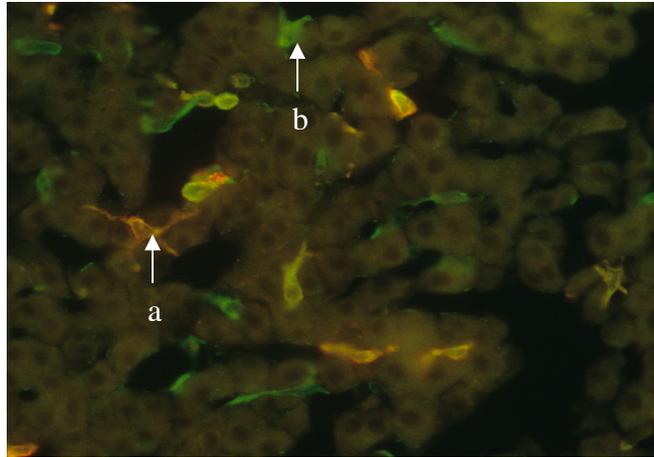


Abb. 21: Leber einer MTX-behandelten Ratte. Doppelfärbung. Desmin/GFAP (Texas-Rot, rote Fluoreszenz), SHP1/SHP2 (FITC, grüne Fluoreszenz).

Die doppelt markierten Zellen erscheinen gelb (a). Nach wie vor sind auch nur SHP1/SHP2-markierte Zellen zu erkennen, die, wie in den anderen Färbungen gezeigt, den Kupffer- und NK-Zellen entsprechen (b).

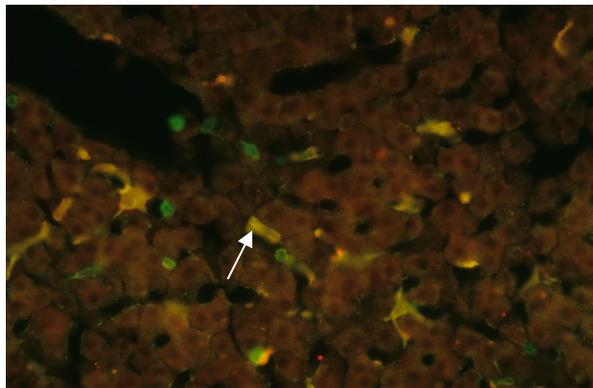


Abb 22: Leber einer MTX-behandelten Ratte. Doppelfärbung Reaktion mit polyklonalem Antikörper gegen SHP1/SHP2 und Reaktion mit Antikörper gegen Smooth-muscle-actin. Es zeigte sich hier im Vergleich zum unbehandelten Tier eine deutlich stärkere Färbung. Dies spricht für einen deutlich gesteigerten Aktivitätszustand der Ito-Zellen unter der MTX-Behandlung.

3.4.4.5 Natural-Killer-Zellen (NK-Zellen)

Nach einer MTX-Behandlung der Tiere waren die NK-Zellen – identifiziert mittels 3.2.3-Antikörper - wie bei den unbehandelten Tieren SHP1/SHP2-positiv. Analog zu den unbehandelten Tieren war kein zonales Verteilungsmuster festzustellen (Abbildung. 23).

Die Zahl der im Schnitt detektierten NK-Zellen nach der MTX-Behandlung hat sich im periportal und perivenösen Bereichen des Acinus ungefähr verdoppelt (Tab. 16).

Ratte	AK	Lokalisation	X ± S
MTX – Tier 1	3.2.3.	Periportal	3,70 ± 1,34
		Perivenös	3,10 ± 0,74
MTX – Tier 2	3.2.3.	Periportal	3,40 ± 1,78
		Perivenös	1,50 ± 0,97
MTX – Tier 3	3.2.3.	Periportal	2,70 ± 1,34
		Perivenös	1,80 ± 1,14
MTX – Tier 4	3.2.3.	Periportal	3,30 ± 1,34
		Perivenös	1,60 ± 0,84
MTX – Tier 5	3.2.3.	Periportal	2,50 ± 0,85
		Perivenös	2,10 ± 1,20
MTX – Tier 6	3.2.3.	Periportal	2,80 ± 1,32
		Perivenös	1,80 ± 0,63

Tabelle 16: Quantitative Auswertung 3.2.3 (spezifischer NK-Zell-Marker) positiver Zellen. In periportal und perivenösen Bereichen des Acinus; behandeltes Tier. Mittelwert und Standardabweichung aus N = 10 gezählten Feldern (0,25mm x 0,25mm)

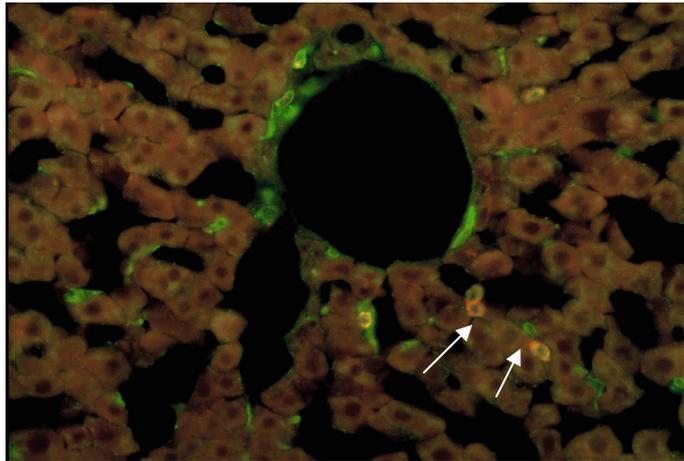


Abb. 23: Leber einer MTX-behandelten Ratte. Doppelfärbung, Reaktion mit polyklonalem Antikörper gegen SHP1/SHP2 und Reaktion mit Antikörper gegen 3.2.3 (spezifischer NK-Zellen-Marker). Die doppelt markierte NK-Zelle ist mit einem Pfeil markiert.

3.5 Isolation der Endothel- und Kupffer-Zellen am Methotrexat Tier

Vordringlich erfolgte die Isolation der Kupffer-Zellen. Verfahrensbedingt war es nicht möglich, alle Endothelzellen zu isolieren, so daß trotz umgekehrter Verhältnisse in situ mehr Kupffer-Zellen isoliert wurden.

3.5.1 Endothelzellen

Aus MTX-Tieren isolierte Endothelzellen wurden sowohl lichtmikroskopisch als auch biochemisch aufgearbeitet. Dabei konnten aus dem MTX-Tier 7 $6,02 \times 10^6$ Endothelzellen und aus MTX-Tier 8 $8,2 \times 10^6$ Endothelzellen gewonnen werden.

Wie zuvor bei den Schnitten wurde zur Identifikation der Endothelzellen wieder der endothelspezifische Antikörper Enos eingesetzt.

Die im Eluat gewonnen Zellen konnten als Endothelzellen identifiziert werden (Enos-Reaktion) und wiesen, wie schon bei den unbehandelten Tieren, keine Färbung mit dem Antikörper gegen SHP1/SHP2 auf. Siehe Abbildung 24.

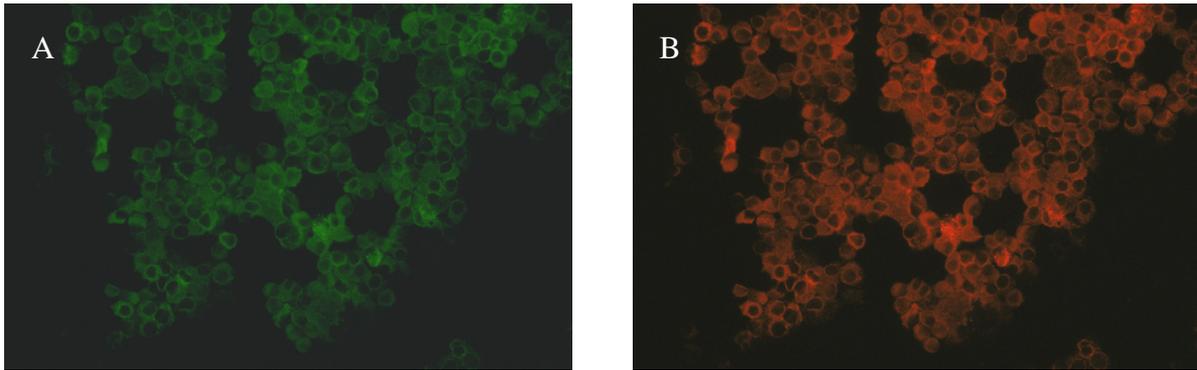


Abb. 24: Isolierte Endothelzellen. Keine Fluoreszenzreaktion mit SHP1/SHP2 (A). Reaktion mit Enos (B) als spezifischem Endothelzellmarker.

3.5.2 Kupffer-Zellen

Nach der Elutriation der Endothelzellen wurden die Kupffer-Zellen eluiert. Dabei konnten aus dem MTX-Tier 7 $10,6 \times 10^6$ Kupffer-Zellen und aus MTX-Tier 8 $15,4 \times 10^6$ Kupffer-Zellen gewonnen werden. Die Zellen wurden sowohl für biochemische als auch lichtmikroskopische Untersuchungen aufgearbeitet.

Zur Identifikation der Zellen als Kupffer-Zellen wurde der ED-2-Antikörper verwendet. Nach positiver Identifikation erfolgte die Doppelfärbung mit SHP1/SHP2 und ED-2.

Der Untersuchungsbefund an den Gefrierschnitten der Leber bestätigte sich auch an den isolierten Zellen. Jede der ED-2-positiven Zellen wies auch eine positive Immunreaktion mit dem Antikörper gegen SHP1/SHP2 auf. Siehe Abbildung 25.

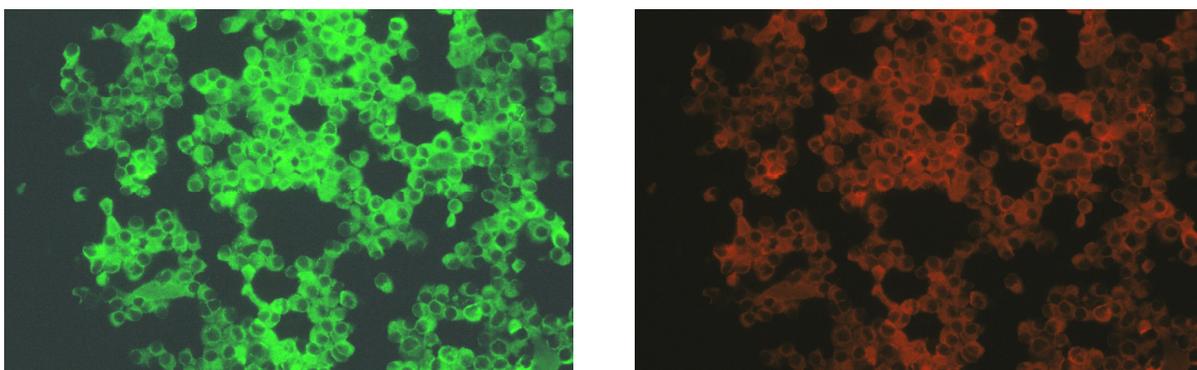


Abb.25: Isolierte Kupffer-Zellen. Fluoreszenzreaktion mit SHP1/SHP2 (A). Reaktion mit OX-6 (B) als spezifischem Kupfferzellmarker.

3.6 Biochemische Untersuchungen am Methotrexat-Tier

3.6.1 Aktivitätsbestimmung der Phosphatase

3.6.1.1 Leberhomogenate

Wie zuvor bei den unbehandelten Tieren wurden auch Untersuchungen zur Gesamtphosphataseaktivität an homogenisierten Leberproben durchgeführt. Die Leber der beiden untersuchten Tiere, die ebenfalls mit 7,5mg MTX i.p. behandelt wurden, wiesen im Vergleich zu den unbehandelten Tieren keine großen Unterschiede in der Gesamt-Tyrosin-Phosphataseaktivität auf. Siehe Tabelle 17.

Tier	Proteingehalt mg/mg Gewebe	Tyrosin- Phosphatase- Aktivität	Überstand 1	Überstand II	Überstand III	Überstand IV
MTX- Tier 7	3,84	pmol/min x ml	2640	218	1950	380
		pmol/min x mg	688	56,8	508	99
MTX- Tier 8	2,93	pmol/min x ml	2470	247	2100	402
		pmol/min x mg	843	84,3	717	137

Tabelle17: Aktivitäten der PTP in Leberhomogenaten MTX-behandelter Ratten (Bestimmung der Aktivitäten nach Cerenkow).

3.6.1.2 Isolierte Zellen

Die biochemischen Untersuchungen der Endothel- und Kupffer-Zellen wurden mit den homogenisierten Zellen durchgeführt. Es erfolgte zunächst die Proteinextraktion aus den Zellsuspensionen, diese sind nach Zellart und Tier getrennt.

3.6.1.2.1 Endothelzellen

Für Proteingehalt und Tyrosin-Phosphataseaktivität der Endothelzellen siehe Tabelle 18.

Tier	Proteingehalt mg/mg Gewebe	Tyrosin Phosphatase Aktivität	Überstand I	Überstand II	Überstand III	Überstand IV
MTX- Tier 9	3,29	Pmol/min x ml	1373	228	1131	120
		Pmol/min x mg	417	69	343	36
MTX- Tier 10	1,85	Pmol/min x ml	515	96	479	54
		Pmol/min x mg	278	52	259	29

Tabelle 18: Aktivitäten der Tyrosin- Phosphatase isolierter Endothelzellen, (Bestimmung der Aktivitäten nach Cerenkow).

3.6.1.2.2 Kupffer-Zellen

Für die Kupffer-Zellen ergaben sich folgende Werte:

Tier	Proteingehalt mg/mg Gewebe		Überstand I	Überstand II	Überstand III	Überstand IV
MTX- Tier 9	4,7	pmol/min x ml	3753	160	1656	308
		pmol/min x mg	798	34	352	65
MTX- Tier 10	5,58	pmol/min x ml	4062	630	1247	510
		pmol/min x mg	728	113	224	91

Tabelle 19: Aktivitäten der Tyrosin-Phosphatase isolierter Kupffer-Zellen (Bestimmung der Aktivitäten nach Cerenkow).

3.6.2 SDS-Page

Zur Größenbestimmung der Protein-Phosphatasen wurde das SDS-Page-Verfahren herangezogen. Wie zuvor bei den Zellen aus unbehandelten Tieren wurde eine semiquantitative Auswertung der Blots durchgeführt. Eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen Endothel- und Kupffer-Zellen ist nicht gegeben, da es sich bei den Untersuchungen um unterschiedliche Blots handelt und nur die Ergebnisse aus ein und demselben Arbeitsgang miteinander vergleichbar sind.

3.6.2.1 Endothelzellen

Bei den Endothelzellen der behandelten Tiere (Abbildung 26) läßt sich nur bei den Extrakten für die lösliche Proteinfraction eine starke Bande bei 68/72kDa (Abbildung 26 Linie 1) nachweisen. Für die Extrakte aus der membrangebundenen Proteinfraction (Abbildung 26 Linie 2) findet sich eine leichte Bande.

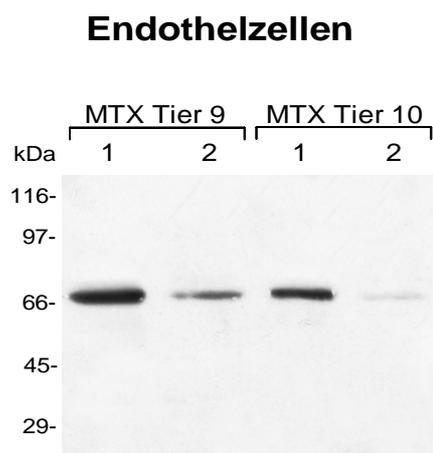


Abb. 26: SDS-Page isolierter Endothelzellen. Für die SDS-Pages wurden jeweils das erste Proteinextrakt der löslichen Proteinfraction (Linie 1) und der membrangebundenen Proteinfraction (Linie 2) verwendet.

Die sich anschließende semiquantitative Auswertung der Blots zeigte, daß die Tyrosin-Phosphataseaktivität der löslichen/zytosolischen Proteinfraction der Endothelzellen des MTX-Tieres 9 556Units/mg Protein beträgt. Für das MTX-Tier 10 beträgt dieser Wert 378Units/mg Protein. Extrakt III (unlösliche/membrangebundene Proteinfraction, Linie 2) konnte nicht semiquantitativ ausgewertet werden, da sich hier nur eine sehr schwache Bandenfärbung bei

68 kDa im SDS-Page zeigte, obwohl alle sechs Blots auf dem gleichen Gel und somit unter gleichen Voraussetzungen liefen.

3.6.2.2 Kupffer-Zellen

Für die Kupffer-Zellen wurde nach dem gleichen Prinzip verfahren. Der SDS-Page zeigt ein ähnliches Verteilungsmuster, wie es sich auch bei den Endothelzellen fand. Ein breiter Bandenkomplex zeigte sich unterhalb der 66kDa-Marke für die jeweils ersten Extrakte, also die lösliche Proteinfraction (Linie 1 Abbildung 27). Sowohl für die lösliche als auch für die membrangebundene Proteinfraction findet sich eine scharfe spezifische Bande für SHP1/SHP2 bei 68/72kDa, Abbildung 27.

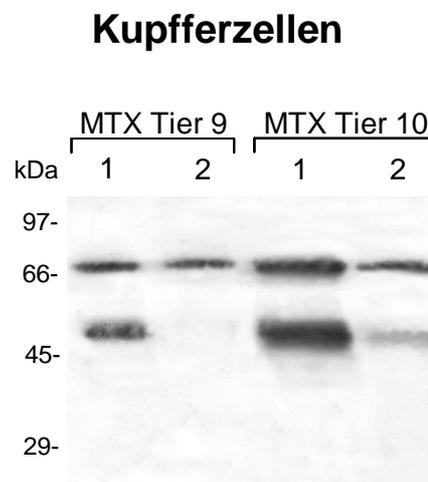


Abb. 27: SDS-Page isolierter Kupffer-Zellen. Für die SDS-Pages wurden jeweils das erste Proteinextrakt der löslichen Proteinfraction (Linie 1) und der membrangebundenen Proteinfraction (Linie 2) verwendet.

Die semiquantitative Auswertung des SDS-Page von Kupffer-Zellen ergab eine Tyrosin-Phosphataseaktivität der löslichen Proteinfraction der Kupffer-Zellen des MTX-Tieres 9 von 391Units/mg Protein. Die Phosphataseaktivität der aus den unlöslichen Zellkompartimenten gewonnenen Proteinmenge beträgt bei MTX-Tier 9 253Units/mg Protein.

Für das MTX-Tier 10 betragen diese Werte für die lösliche Komponente 1074Units/mg Protein, für die unlösliche Komponente 531Units/mg Protein.

3.7 Vorkommen der SHP-Subtypen SHP1 und SHP2 in den Parenchym- und Non-Parenchymzellen der Leber

Zur weiteren detaillierten Analyse wurden dann monoklonale Antikörper gegen SHP1 und SHP2 eingesetzt. Die biochemischen Untersuchungen waren schon mit den monoklonalen Antikörpern durchgeführt worden, so daß noch eine Verifizierung der lichtmikroskopischen Ergebnisse ausstand. Es erfolgte daher im weiteren Verlauf eine detaillierte Analyse des SHP-Typs in den Non-Parenchymzellen. Hierzu wurden an drei Tieren exemplarisch, mittels typspezifischer monoklonaler SHP-Antikörper, Immunreaktionen durchgeführt. Da sowohl die monoklonalen Antikörper gegen SHP1 und SHP2 als auch die Antikörper zur Zellidentifizierung in der Maus exprimiert wurden, mußte eine Doppelfärbung mit einer Kombinationstechnik aus verstärktem DAB und Fast-Red erfolgen. In den nachfolgenden Abbildungen ist der monoklonale Antikörper gegen SHP1, SHP2 jeweils mit DAB nachgewiesen (braun/schwarz), der Antikörper zur Zellidentifizierung wurde mit Fast-Red (rot) sichtbar gemacht. Zur optischen Verstärkung des Farbkontrastes auf den Fotos wurden unterschiedliche Farbfilter in den Strahlengang des Mikroskopes eingebracht. Hierbei handelte es sich um im Mikroskop fest eingebaute Filter in den Farben Blau, Hell- und Dunkelgrau. Die Farbreaktion am Objekt wird durch diese Filter nicht beeinträchtigt. Für die nachfolgenden Aufnahmen wurde daher individuell der Filter gewählt, der optisch den besten Farbkontrast lieferte.

Die zuvor gewonnenen Ergebnisse konnten durch die Färbungen mit den monoklonalen Antikörpern bestätigt werden. Die einzelnen Zellpopulationen der Non-Parenchymzellen weisen jeweils eine Doppelfärbung mit DAB und Fast-Red auf.

3.7.1 Unbehandelte Tiere

3.7.1.1 Kupffer-Zellen

Es wurden Färbungen sowohl mit ED-1- als auch ED-2-Antikörpern durchgeführt. Wie zuvor war auch hier ein identisches Muster der Kupffer-Zell-Verteilung zwischen ED-1 und ED-2 zu beobachten. Exemplarisch für die Kupffer-Zellen zeigt Abbildung. 28 eine ED-1- SHP1- und ED-1- SHP2-Kolokalisation in diesen Zellen.

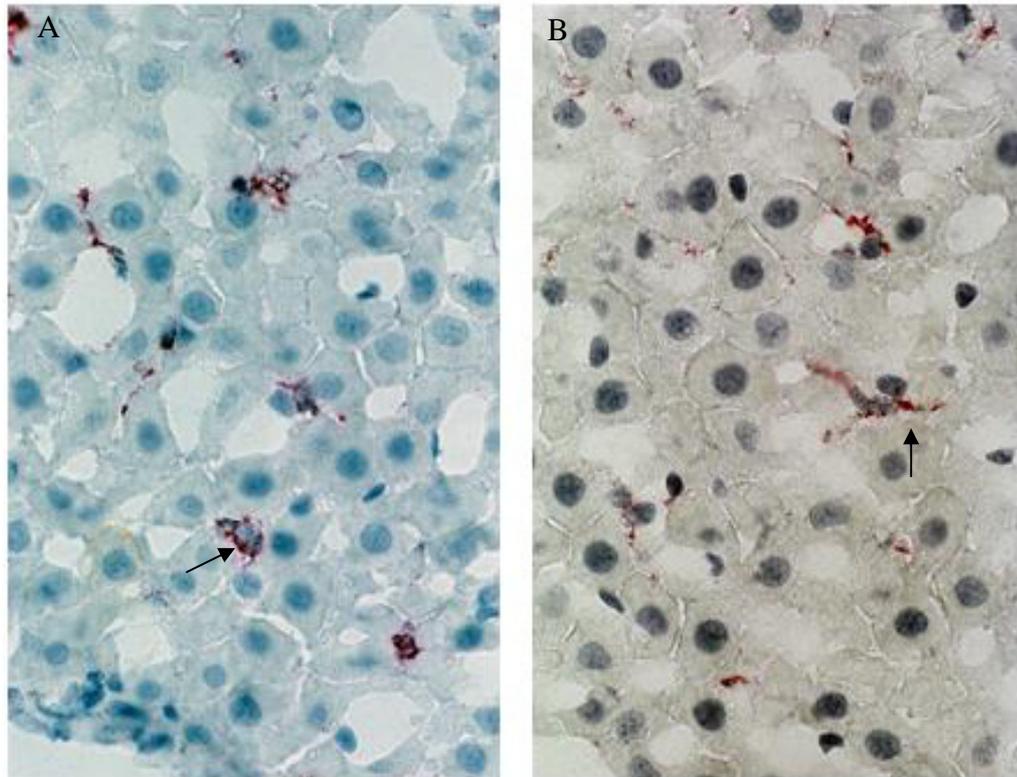


Abb. 28: Unbehandeltes Tier. Doppelfärbung mit SHP1 monoklonal (A) bzw. SHP2 monoklonal (B) (schwarz-bräunliche DAB-Farbreaktion) und ED-1 als spezifischer Kupffer-Zellmarker (rote Farbreaktion des Fast-Red). Gegenfärbung mit Methylen-Blau. Die Kupffer-Zellen weisen eine Doppelmarkierung mit beiden Antikörpern auf (Zellen mit Pfeilen markiert).

Doppelfärbungen wurden ebenfalls mit dem monoklonalen Antikörper gegen SHP2 und den Kupffer-Zellmarkern ED-1 und ED-2 durchgeführt. Wie zuvor bei der SHP1 wies auch hier jede Kupffer-Zelle eine Färbung mit SHP2 auf. Sowohl SHP1 als auch SHP2 kommen in den Kupffer-Zellen vor.

3.7.1.2 Ito-Zellen

Auch bei den Ito-Zellen konnte das zuvor gewonnene Ergebnis verifiziert werden. Es findet sich eine Doppelfärbung dieser Zellen für SHP1 und Desmin/GFAP. Die SHP2 konnte ebenfalls in den Ito-Zellen über eine Doppelfärbung nachgewiesen werden. Siehe Abbildung 29

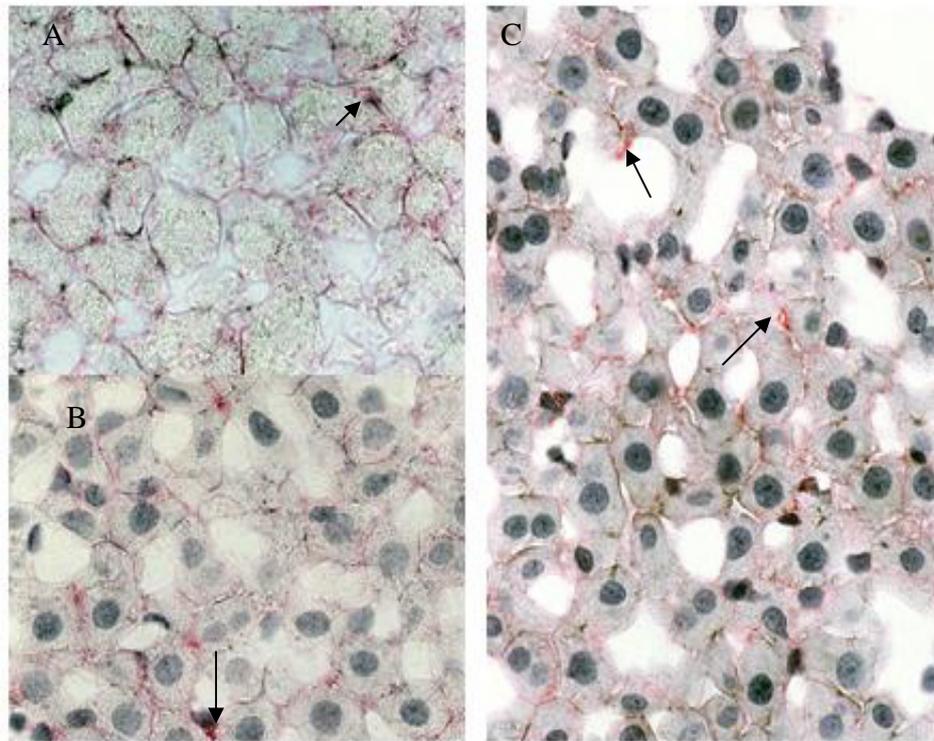


Abb. 29: Unbehandeltes Tier. Doppelfärbung mit SHP1monoklonal (A und B) und SHP2 (C) (schwarz-bräunliche DAB-Farbreaktion) und Desmin/GFAP als spezifischer Ito-Zellmarker (rote Farbreaktion des Fast-Red). Gegenfärbung mit Methylen-Blau (für B und C). Reaktion ohne Gegenfärbung im Vergleich (A). Die Ito-Zellen weisen in allen Abbildungen Doppelmarkierung mit beiden Antikörpern auf (Zellen mit Pfeilen markiert). Gefärbtes Plasma der Hepatozyten mit SHP1 bzw. SHP2.

3.7.1.3 NK-Zellen

In den NK-Zellen konnte auf lichtmikroskopischer Ebene SHP1 und SHP2 mit monoklonalen Antikörpern nachgewiesen werden. Siehe hierzu Abbildung 30.

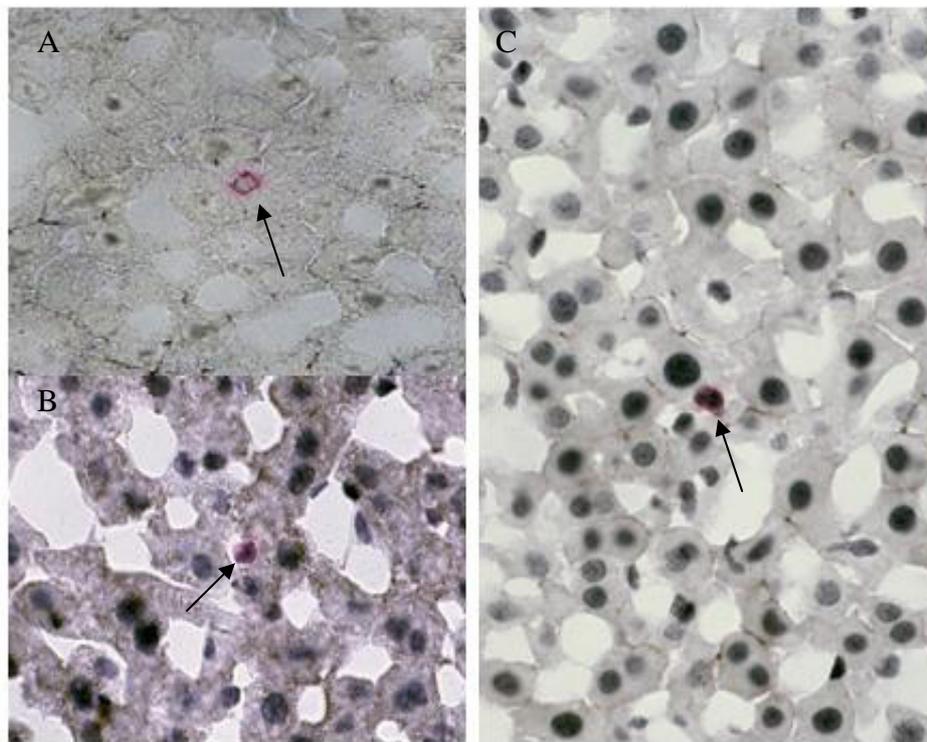


Abb. 30: Unbehandeltes Tier. Doppelfärbung mit SHP1 monoklonal (A und B) und SHP2 monoklonal (schwarz-bräunliche DAB-Farbreaktion) und 3.2.3-Antikörper als spezifischer NK-Zellmarker (rote Farbreaktion des Fast-Red). Gegenfärbung mit Methylen-Blau (B und C). Als Vergleich (A) ohne Gegenfärbung mit Methylen-Blau. Die NK-Zellen weisen Doppelmarkierung mit beiden Antikörpern auf (Zellen mit Pfeilen markiert). Zytoplasma und Nukleolus der Hepatozyten SHP1-positiv

3.7.1.4 Hepatozyten

Eine positive Reaktion für die SHP1 findet sich aber nicht nur in den bereits beschriebenen Zellpopulationen, sondern auch in den Hepatozyten. Das Hepatozytenplasma weist eine feinkörnige, an Vesikel erinnernde Färbung auf. Eine ebensolche feinkörnige Färbung findet sich im Nukleolus der Hepatozytenkerne.

Die Hepatozytenmembranen, Kernmembranen, Endothelien und Gefäßmuskulatur weisen keine SHP1 positive Markierung auf.

Die SHP2 weist im Vergleich zur SHP1 in den Hepatozyten eine andere Verteilung der angefärbten Strukturen auf. Hier finden sich positive Reaktionen an der Hepatozytenkernmembran. Kern und Nukleolus im besonderen sind nicht gefärbt. Im

Zytoplasma ist für die SHP2-Form ebenfalls eine feinkörnige Färbung zu sehen. Weiterhin fällt eine positive Markierung der Gefäßendothelien größerer Gefäße im Parenchym und eine zusätzliche sporadische Anfärbung der glatten Gefäßmuskulatur auf.

3.7.2 MTX-Tiere

3.7.2.1 Non-Parenchymzellen

Bei den behandelten Tieren wurden die oben genannten Färbungen ebenfalls durchgeführt. In den Non-Parenchymzellen ergab sich für die SHP1 und SHP2 kein anderes Verteilungsmuster. Auf Abbildungen wird daher verzichtet. Siehe Abbildung 31.

3.7.2.2 Hepatozyten

In den Hepatozyten war wie bei den unbehandelten Tieren die granuläre Färbung des Zytoplasmas zu sehen, nur ist sie in der Gruppe der behandelten Tiere sehr viel stärker ausgebildet.

Um den Kern der Hepatozyten findet sich bei der SHP1-Form ein heller Halo, der Nukleolus ist weiterhin gefärbt. Zusätzlich ist nun auch noch die Zellmembran/ Gallenkapillarmembran der Hepatozyten deutlich angefärbt.

Bei der SHP2 weist der Kern der Hepatozyten weiterhin keine Farbreaktion auf. Die an den behandelten Tieren beschriebene Membranfärbung für SHP1 tritt bei der SHP2 nicht auf. Endothelien großer Gefäße und Muskulatur sind weiterhin vereinzelt SHP2-positiv markiert. Siehe Abbildung 31.

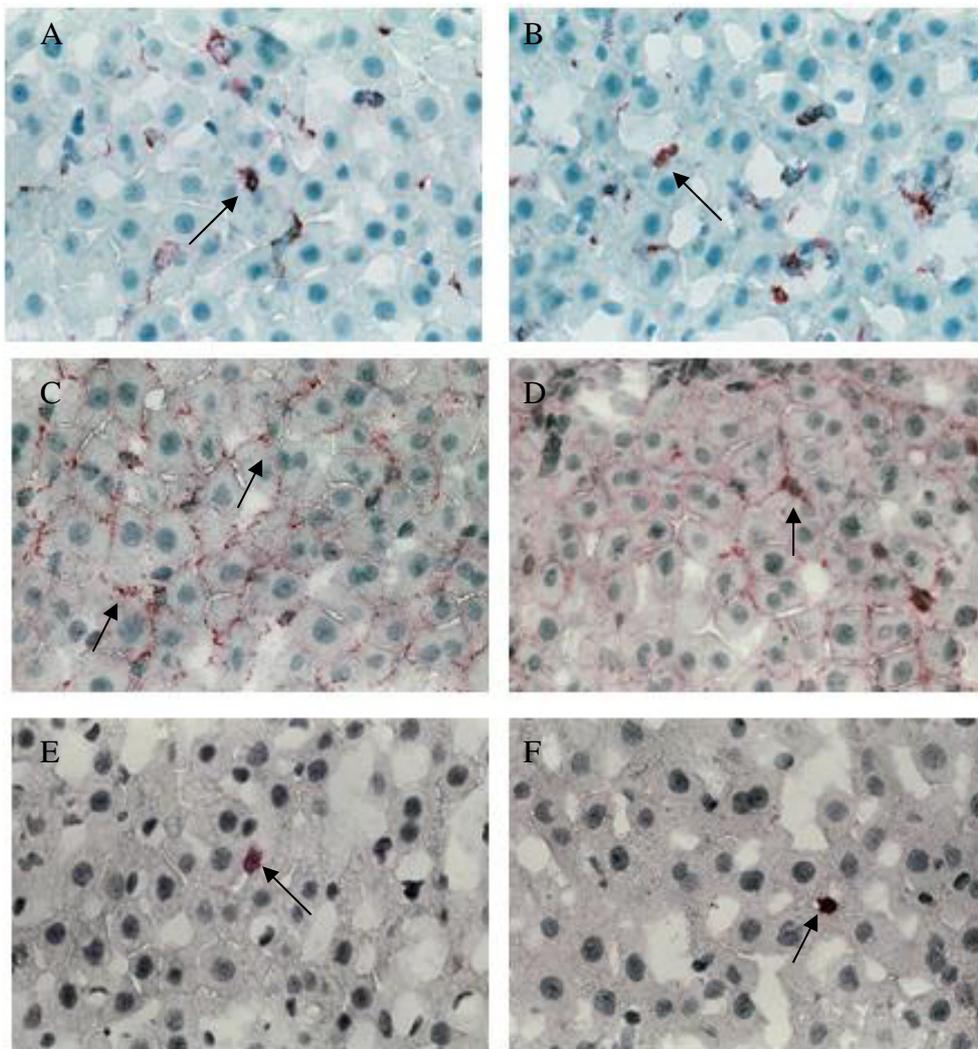


Abb.31: Doppelfärbungen mit DAB (SHP1 monoklonal, linke Spalte und SHP2 monoklonal, rechte Spalte) und Fast-Red mit ED-1 für Kupffer-Zellen (A und B), Desmin/GFAP für Ito-Zellen (C und D), sowie 3.2.3-Antikörper für NK-Zellen (E und F).
Es zeigt sich das oben beschriebene Verteilungsmuster der SHP1 und SHP2 unter MTX-Behandlung.

3.8 Biochemische Untersuchungen mit monoklonalen Antikörpern

Zusätzlich zur Lichtmikroskopie wurden an Leberhomogenaten unbehandelter Tiere Western-Blots mit monoklonalen Antikörpern gegen SHP1 und SHP2 durchgeführt. Es konnte ein Vorkommen beider Enzyme in den Homogenaten nachgewiesen werden. Siehe Abbildung 19.

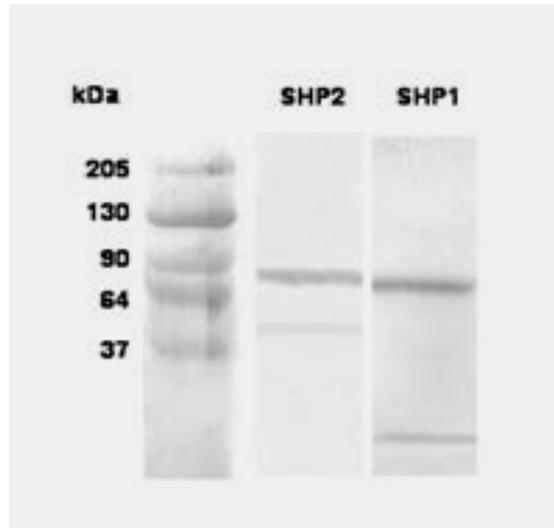


Abb. 32: Western-Blot mit monoklonalen SHP1- und SHP2-Antikörpern beim unbehandelten Tier.

3.9 Statistik

3.9.1 Wirkung von Methotrexat auf die individuelle Zahl der Non-Parenchymzellen

Zunächst wurde das Vorkommen von SHP1/2-positiven Zellen in Lebern behandelter und unbehalteter Tiere, unabhängig von der Zuordnung der Zellen zu den einzelnen Zellpopulationen, statistisch untersucht.

Periportal liegt der Durchschnittswert für SHP1/2 bei Tieren, die mit Methotrexat behandelt sind, mit 22,80 deutlich unter dem arithmetischen Mittel der unbehalteten Kontrolltiere (26,77). Das Maximum der Experimentalgruppe liegt mit 23,9 deutlich unter dem Minimum der Kontrollgruppe (26,1). Die Werteverteilungen beider Gruppen überschneiden sich also nicht. Alle behandelten Ratten haben periportal niedrigere Werte als alle unbehalteten Versuchstiere. Dieser schon deskriptiv deutliche Unterschied beider Gruppen zeigt sich auch inferenzstatistisch. Bei einer Wahrscheinlichkeit von $P' = 0,012$ wird das festgesetzte Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ unterschritten. Der Unterschied zwischen behandelten und unbehalteten Versuchstieren ist statistisch bedeutsam.

Die durchschnittlichen Meßergebnisse für beide Gruppen in der perivenösen Zone liegen mit einem arithmetischen Mittelwert von 16,68 bei behandelten und 16,63 bei unbehalteten

Tieren vergleichsweise enger zusammen. Gleichzeitig finden sich für alle Methotrexat-Tiere Kontrolltiere mit kleineren oder größeren SHP1/2-Werten. Demgemäß führt der Fisher-Pitman-Randomisierungstest zu keinem signifikanten Befund ($P' = 0,869$).

Im Anschluß daran wurden die statistischen Auswertungen getrennt nach den einzelnen Zellpopulationen durchgeführt.

3.9.2 SHP1/SHP2-markierte Zellen

3.9.2.1 Kupffer-Zellen

Die periportalen ED-1-Messungen für Kupffer-Zellen zeigen einen bedeutsamen Unterschied zwischen Experimental- und Kontrollgruppe ($P' = 0,012$). Der Mittelwert für MTX-Tiere beträgt 13,37, der für die unbehandelten Tiere 15,43. Das Maximum von 14,0 in der Methotrexat-Gruppe liegt unter dem Minimum der Kontrollgruppe (14,9). Beide Verteilungen überschneiden sich also nicht; alle behandelten Tiere haben periportal weniger Kupffer-Zellen als unbehandelte Tiere.

Perivenös ist kein signifikanter Unterschied nachweisbar ($P' = 0,119$). Zwar fällt der Mittelwert der behandelten Tiere mit 10,42 geringer aus als der der Kontrollgruppe (11,27), doch überschneiden sich beide Werteverteilungen nicht unerheblich. Der größte Wert der behandelten Tiere liegt bei 11,4, der kleinste Wert der unbehandelten Tiere bei 11,0.

Die Messungen für Kupffer-Zellen über ED-2 führen zu sehr ähnlichen deskriptiven Statistiken und zu exakt den gleichen inferenzstatistischen Entscheidungen.

Periportal haben MTX-Tiere ein Mittel von 13,12 mit einem Minimum von 12,0 und einem Maximum von 13,9. Die Kontrolltiere haben eine durchschnittliche Zellanzahl von 15,33 (Minimum = 15,0; Maximum = 15,6). Der Unterschied der Anzahl von Kupffer-Zellen (ED-2) zwischen Experimental- und Kontrollgruppe ist signifikant ($P' = 0,012$).

Perivenös kommt es auch bei ED-2 zu keinem signifikanten Befund ($P' = 0,131$). Behandelte Tiere haben hier einen Mittelwert von 10,28 (Minimum = 9,7; Maximum = 12,1). Sie variieren in einem Wertebereich, der die Meßergebnisse der Kontrolltiere einschließt (Mittelwert = 11,27; Minimum = 10,8; Maximum 11,8).

3.9.2.2 Ito-Zellen

Die durchschnittliche Anzahl der Ito-Zellen unterscheidet sich sowohl in der periportalen als auch in der perivenösen Zone der Leber zwischen Experimental- und Kontrollgruppe

statistisch nur unbedeutend. Die Fisher-Pitman-Tests führen periportal zu einer Wahrscheinlichkeit von $P' = 0,833$ und perivenös zu $P' = 0,119$. Beide Werte sind größer als $\alpha = 0,05$. Die Nullhypothesen werden beibehalten.

Deskriptiv haben die MTX-Tiere periportal einen Mittelwert von 13,17. Minimum und Maximum liegen bei 12,1 bzw. 14,0. Die durchschnittliche Anzahl von Ito-Zellen ist bei den Kontrolltieren 13,30. Minimum und Maximum betragen 13,0 und 13,5.

Perivenös werden bei behandelten Tieren durchschnittlich 11,73 Ito-Zellen gemessen (Minimum = 10,8; Maximum = 12,6). Der Mittelwert der unbehandelten Tiere ist 12,57 (Minimum = 12,1; Maximum = 13,1).

3.9.2.3 Natural-Killer-Zellen

Im periportalen Bereich haben die behandelten Tiere durchschnittlich 3,07 Natürliche Killerzellen pro Messung. Dies sind mehr als bei den unbehandelten Tieren (Mittelwert = 1,43). Darüber hinaus haben alle behandelten Tiere eine größere Anzahl von Killerzellen (Minimum = 2,5) als alle unbehandelten Tiere (Maximum = 1,5). Die Mittelwerte beider Gruppen unterscheiden sich statistisch signifikant ($P' = 0,012$).

Perivenös fällt der Befund im gleichen Sinne aus. Die behandelten Tiere haben durchschnittlich mehr Natürliche Killerzellen (Mittelwert = 1,98) als die unbehandelten Versuchstiere (Mittelwert = 1,17). Dieser Unterschied ist statistisch bedeutsam ($P' = 0,012$). Alle MTX-Tiere haben mehr Killerzellen (Minimum = 1,5) als alle Kontrolltiere (Maximum = 1,2).

Zusammenfassend zeigt sich ein heterogener Befund für die Wirkung der Behandlung mit Methotrexat auf verschiedene Zelltypen in unterschiedlichen Zonen der Leber. Zum einen führt die Gabe von Methotrexat in der periportal Zone der Leber der behandelten Gruppe zu einer geringeren Anzahl von SHP1/2 und Kupffer-Zellen gegenüber der Kontrollgruppe. Perivenös läßt sich allerdings kein Effekt nachweisen.

Des weiteren ist für die Ito-Zellen gar keine Behandlungswirkung nachweisbar. Sowohl periportal als auch perivenös sind die beobachteten Unterschiede beider Gruppen inferenzstatistisch unbedeutend.

Schließlich findet sich hinsichtlich der Natürlichen Killerzellen sowohl periportal als auch perivenös eine signifikante Wirkung des Medikaments. In beiden Zonen der Leber ist die Anzahl der Natürlichen Killerzellen höher bei Behandlung mit Methotrexat als im Normaltier.

4 Diskussion

Ziel der hier vorgelegten Arbeit war es, das Vorkommen der PTP-asen in der Leber der Ratte zu untersuchen sowie deren mögliche Änderungen unter dem Einfluß von Methotrexat zu beschreiben. Die Untersuchungen erfolgten mittels verschiedener polyklonaler Antikörper, die einerseits sowohl die PTP1B und die T-Zell-PTP erkennen bzw. sowohl die SHP1 als auch die SHP2-Form erkennen, da die jeweiligen Enzympaare bis auf ihre katalytischen Domänen eine nahezu identische Aminosäuresequenz besitzen. Als Antigen diente das gesamte Protein der T-Zell-PTP bzw. der SHP1. Im weiteren wurden dann auch monoklonale Antikörper gegen die SHP1 und SHP2 verwendet, die die mit dem polyklonalen Antikörper gewonnenen Ergebnisse bestätigten und im Bezug auf die Hepatozyten zum Teil auch ergänzten.

Die Untersuchungen zur morphologischen Verteilung der PTP-asen erfolgte an Cyrostatschnitten der Leber. Als sekundäres Nachweissystem dienten, je nach Fragestellung, Immunfluoreszenz oder das PAP-System (Hsu et al. 1981a, b und c, Blakeslee und Baines 1976).

Mit diesen Methoden war kein Nachweis für das Vorkommen der PTP1B bzw. T-Zell-PTP in der Leber zu erbringen. Da bei den Aktivitätsbestimmungen, wie im weiteren ausgeführt, ein Vorkommen der PTP 1B/T-Zell-PTP nicht auszuschließen ist, ist von einem Vorkommen unter der Nachweisgrenze unserer Fluoreszenzmethode auszugehen. In unseren Aktivitätsbestimmungen wird ein unspezifisches Substrat verwendet, das aber seine Präferenz für die PTP 1B und T-Zell-PTP hat. Die hohen Aktivitäten stammen daher nicht nur von der SHP1/SHP2. Bei erfolgreicher Anwendung der Immunhistochemie sowohl mit Fluoreszenz als auch im PAP-System für andere Erstantikörper, ist ein methodischer Fehler hierfür sicher nicht verantwortlich. Als Ursache könnte ein fehlerhafter erster Antikörper in Betracht kommen. Ebenso könnte aber auch die Methode nicht sensitiv genug sein, um die vorhandenen Antigene sichtbar zu machen. Da es in vielen Voruntersuchungen nicht gelang, einen lichtmikroskopischen Nachweis für die PTP 1B/T-Zell-PTP zu erbringen, wurden die nachfolgenden Untersuchungen lediglich mit dem polyklonalen Antikörper gegen die SHP1 sowie zur weiteren Differenzierung mit den monoklonalen Antikörpern gegen die SHP1 und SHP2 durchgeführt.

Was die SHP1/SHP2 betraf so zeigte sich eine inhomogene Verteilung SHP1/SHP2-positiv markierter Zellen im gesamten Parenchym der Leber. Diese Zellen ließen zunächst keine

eindeutige Zuordnung zu bestimmten Zellpopulationen der Non-Parenchym-Zellen zu. Eine sichere Zuordnung der einzelnen positiv markierten Zellen war nur mittels Doppelimmunfluoreszenz möglich (Janossy et al. 1980).

Eine erfolgreiche Färbung mit dieser Methode setzt voraus, daß die Antigene, an die die Erstantikörper binden, einen ausreichenden Abstand zueinander haben, da die Antikörper sonst auf Grund Ihrer Größe um die Bindungsstellen konkurrieren und beide Antikörper nicht parallel binden können. Eine definitive Aussage ist dann durch eine Doppelfärbung am gleichen Präparat nicht zu erzielen. Gleiches gilt natürlich auch für die Brückenantikörper und die mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Antikörper. Diese Voraussetzungen waren gegeben. Somit konnte gezeigt werden, daß alle Non-Parenchym-Zellen außer den Endothelzellen positiv reagierten.

Für die weiterreichende Analyse des Vorkommens der SHP1 und SHP2 in den einzelnen Zellpopulationen des Leberparenchyms wurde eine zweite Versuchsreihe mit spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen die SHP1 und SHP2 durchgeführt. Da die monoklonalen Antikörper gegen SHP1 und SHP2 in der gleichen Spezies expremiert wurden wie die zellpopulationsspezifischen Antikörper, konnte die Doppelfärbung nur mit Hilfe des PAP-Systems durchgeführt werden.

Doppelfärbungen mit primären Antikörpern, die in der gleichen Spezies expremiert werden, stellen hohe Anforderungen an das Färbesystem. Zunächst gelten die gleichen Voraussetzungen wie für Doppelfärbungen mit zwei Erstantikörpern, die in unterschiedlichen Spezies expremiert wurden. Zusätzlich besteht immer die Gefahr, daß die verwendeten Nachweissysteme mit den Erstantikörpern kreuzreagieren. Es ist daher erforderlich, den zuerst aufgetragenen Primärantikörper so zu deaktivieren oder abzuschirmen, daß das für den nächsten Erstantikörper bestimmte Nachweissystem nicht an den zuerst aufgetragenen Primärantikörper binden kann. Dies wird bei einer Färbung mit DAB (Diaminobenzidin) ermöglicht. Der bei der Farbreaktion entstehende DAB-Komplex ist so groß, daß die Bindungsstellen des Primärantikörpers komplett verdeckt werden. Eine weitere Reaktion mit einem anderen Farbsystem ist durch diesen so abgeschirmten Primärantikörper unterbunden. Der bei der Nachweisreaktion entstandene DAB-Komplex ist im weiteren Verlauf der Doppelfärbung areaktiv, so daß es zu keiner Umlagerung und zu keiner Kreuzreaktion mit dem als nächstem aufgetragenen Primärantikörper kommen kann. Nachteil dieser Methode ist, daß der entstandene DAB-Farbkomplex relativ groß ist. Ein Binden eines zweiten Primärantikörpers ist daher nur möglich, wenn sich das nachzuweisende Antigen in

ausreichender Entfernung zum DAB-Komplex befindet, wie es hier der Fall ist (Valnes und Brandtzaeg 1984, Falini et al. 1986). Hierdurch wird die Sensitivität reduziert. Deshalb wurde die Methode nur für die Fragestellung der SHP-Differenzierung verwendet.

Eine alternative Möglichkeit der Doppelfärbung bestünde darin, den zunächst verwendeten Erstantikörper durch eine enzymatische Verdauung von seiner Bindungsstelle zu lösen oder seine noch vorhandenen Bindungsstellen zu entfernen. Dies ist aber nur auf Kosten einer deutlich verschlechterten Gewebeerhaltung möglich; daher wäre diese Methode auf Grund der MTX-bedingten, schlechteren Gewebeerhaltung für diese Untersuchung nicht einsetzbar gewesen.

Die nachfolgende Diskussion der Ergebnisse bezieht sich sowohl auf die monoklonalen käuflich erworbenen Antikörper gegen SHP1 und SHP2 als auch auf den polyklonalen Antikörper. Mit allen drei Antikörpern wurden identische Lokalisationen für SHP1 und SHP2 in den Non-Parenchymzellen der Rattenleber gefunden.

4.1 SHP1/SHP2

Bei der SHP1 und SHP2 handelt es sich um primär zytosolisch lokalisierte Phospho-Tyrosin-Phosphatasen. Für die SHP1 ist im aktiven Zustand eine Umlagerung an die Zellmembran bekannt (Zhao et al. 1994). Beide Phosphatasen besitzen SH2-Domänen und unterscheiden sich nur in ihren nicht-katalytischen Segmenten. Die Domäne erlaubt es den beiden PTP-asen spezifisch an Moleküle zu binden, die an ihren Tyrosinresten phosphoryliert sind. Die SHP1 wurde zunächst in hämatopoetischen Zellen nachgewiesen, ein Vorkommen ist aber mittlerweile auch in anderen Zellen, wie weiter unten ausgeführt, beschrieben. Die SHP2 im Gegensatz dazu ist in fast allen Zellen expremiert.

Ein paralleles Vorkommen beider SHPs ist für die hämatopoetischen Zelllinien (Yang et al. 2002, Wheadon et al. 2002) sowie in einer humanen embryonalen Nierenzellen-Linie (HEK293) (Strack et al. 2002) beschrieben.

SHP1 und SHP2 sind an den unterschiedlichsten rezeptorvermittelten Signalkaskaden beteiligt. Sie agieren nicht direkt als Botenstoff in der Signaltransduktion, sondern greifen an unterschiedlichen Stellen in der Signalkaskade regulatorisch ein; während der SHP1 hier eine negativ regulatorische Wirkung zugeschrieben wird, greift die SHP2 positiv regulierend ein.

4.1.1 SHP1

Der Nachweis der SHP1 erfolgte zunächst in hämatopoetischen Zellen (Shen et al. 1991, Plutzki et al. 1992). Hier ist die SHP1 vor allem an der Regulation der durch Cytokine ausgelösten Signalkaskaden beteiligt. Es werden sowohl die Rezeptoren als auch die nachfolgenden Elemente der intrazellulären Signalkaskaden an ihren Tyrosinresten dephosphoryliert. Bei einigen hämatopoetischen Cytokinrezeptoren wurde die SHP1 bereits als negativer Regulator beschrieben. An erster Stelle sind hier der T-Zell-Rezeptor, der B-Zell-Rezeptor und die Rezeptoren für den Macrophage-colony-stimulating-factor, den Stem-cell-factor, Interleukin-3 und für Erythropoetin (Sharlow et al. 1997) zu nennen. Werden die Rezeptoren aktiviert, kommt es zu einer Dephosphorylierung der Rezeptoren oder nachgeschalteter Signalproteine an ihren Tyrosinresten. Die SHP1 ist auch an der Signalkaskade des Il-2 Rezeptors beteiligt. Ihre regulatorische Wirkung entfaltet sie beim Il-2-Rezeptor durch Dephosphorylierung der dem Rezeptor assoziierten JAK-3-Kinase. Ähnlich der Beteiligung am Il-2-Rezeptor ist die SHP1 an der T-Zell-Antigen-Rezeptor-Signalkaskade (TCR) (Brockdorff et al. 1999) beteiligt. Fehlt die SHP1, kann es zu einer Entartung der T-Zellen kommen, da hier die negativ regulatorische Wirkung der SHP1 entfällt. Es kommt zu einer Persistenz der in diesen Zellen durch Il-2, TCR und vermutlich auch durch andere Rezeptorkomplexe vermittelten Signale. Eine Entartung der T-Zellen bei SHP1-Depletion wurde zunächst an Mäusen nachgewiesen (Brockdorff et al. 1999). Ein Zusammenhang mit der Pathogenese von T-Zell-Lymphomen in einer konzertierten Aktion mit anderen rezeptorkomplexvermittelten Signalen (Zhang et al. 2000) wurde später hergestellt.

Neben der Beteiligung an den Signalkaskaden in den T-Zellen ist die SHP1 an der Differenzierung der Erythrozyten beteiligt (Sharlow et al. 1997). Ihr kommt bei der Hämatopoese eine wichtige Rolle zu, da sie negativ regulierend in die Signalkaskade der erythropoetinvermittelten Erythrozytendifferenzierung eingreift. Die SHP1 ist mit dem EPO-Rezeptor assoziiert und reguliert hier mitogene Signale negativ. Dabei gibt es zwei EPO-aktivierte Signalkaskaden. Es handelt sich hier zum einen um das JAK/STAT-System, zum anderen um das MAPK-System, die die Transkriptionssignale übertragen. Des Weiteren wirkt die SHP1 an den Signalkaskaden mit, die an der Unterdrückung der Apoptose beteiligt sind (Bittorf et al. 1999).

Die Aktivität der SHP1 und die der Serin/Threonin-Phosphatasen-PP2A, -B und -C reguliert zusammen mit Proteinkinasen als Gegengewicht die Phosphorylierung der

Transkriptionsfaktoren. Dabei ist die Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren Teil der Signalkaskade in glatten Muskelzellen von Gefäßen als Antwort auf Wachstumsstimulatoren. Ocerotid als ein Somatostatin-Analogon stimuliert die Phosphataseaktivität und unterbindet das Zellwachstum (Yamashita et al. 1999). Wird bei Tumorzellen der Somatostatinrezeptor aktiviert, so wird das Wachstum von Tumorzellen direkt und durch Blockade der mitogenen Signalkaskaden inhibiert. Dadurch kommt es zu einem Wachstumsstopp und zur Induktion von Apoptose in den betroffenen Zellen. Während dieses Prozesses kommt es zu einer Translokation der SHP1 vom Zytosol an die Membran (Patel et al. 1996).

Die SHP1 spielt auch bei der negativen Regulation des Il-4-Rezeptors eine wichtige Rolle (White et al. 2001).

Während die SHP1 in den hämatopoetischen Zellen viele Cytokin-Rezeptor-Signalkaskaden negativ reguliert, sind die genaue Funktion und die nötigen Substrate in den nicht hämatopoetischen Zellen nicht bekannt. Nachgewiesen wurde die SHP1 vor allem in malignen epithelialen Zelllinien. Ein Nachweis konnte des weiteren auch in Leberkrebs-Zellkulturen (Saito et al. 1996), in Pankreaskrebs-Zellkulturen (Morisset et al. 1998) und in Hepatozyten-Zellkulturen (Ram und Waxman 1997) geführt werden. Ebenso kommt die SHP1 in den Zellen der CCL39 Zelllinie vor. Es handelt sich dabei um eine Fibroblasten-Zelllinie der Lunge. In diesen Zellen wurde die SHP1-Aktivität signifikant durch Insulin gesteigert, änderte sich jedoch nicht unter dem Einfluß von PDGF (platelet derived growth factor). Eine erhöhte Phosphorylierung der SHP1 wurde jedoch als Reaktion auf beide Stoffe gefunden (Rivard et al. 1995).

Yu Z et al. zeigten 1998 die Assoziation der SHP1 mit dem tyrosinphosphorylierten PDGF-Rezeptor und der p85-Untereinheit der Phosphatidylinositol-3-Kinase in MCF-7 (estrogenrezeptorpositive Brustkrebs-Zelllinie) und TRMP (Trachealepithel Zelllinie) Zellen. Dabei interagiert die SHP1 unabhängig sowohl mit p85-Rezeptor als auch mit dem PDGF-Rezeptor.

In diesen Zellen wurde die SHP1-Aktivität signifikant durch Insulin gesteigert, änderte sich jedoch nicht unter dem Einfluß von PDGF. Eine erhöhte Phosphorylierung der SHP1 wurde jedoch als Reaktion auf beide Stoffe gefunden.

Die SHP2-Aktivität wurde dagegen nur gering durch Insulin gesteigert, aber signifikant durch PDGF reduziert, obwohl die Tyrosin-Phosphorylierung als Reaktion auf diesen Agonisten gesteigert wurde (Rivard et al. 1995).

4.1.1.1 Kupffer-Zellen

Weiterhin fand sich eine positive Reaktion der Kupffer-Zellen. Dies erscheint schlüssig, da die Kupffer-Zellen ortsständige Makrophagen in der Leber sind. Als Makrophagen entstammen sie dem Knochenmark. Sie proliferieren und reifen unter dem Einfluß verschiedener spezifischer Mediatoren. Zu diesen Mediatoren gehören der Macrophage-colony-stimulating-factor, der Granulocyte/Macrophage-stimulating-factor Interleukin-3 und Interleukin-4. Die endgültige Differenzierung der Makrophagen in ihre einzelnen Subtypen scheint auch durch topologische Faktoren beeinflusst zu sein (Decker 1990). Trotz ihrer Diversität haben die Makrophagen vier Gemeinsamkeiten: Sie präsentieren Antigene, phagozytieren, vermitteln unspezifische Immunreaktionen und “starten biochemische Angriffe”.

Kupffer-Zellen verfügen über Rezeptoren für Il-3 sowie für die anderen oben genannten Faktoren. Diese sind allesamt mit der SHP1 assoziiert. Dies wird durch die hier vorgelegten Befunde belegt. Die Reaktion der SHP1 ist eindeutig im Zytoplasma der Kupffer-Zellen lokalisiert. Die SHP1 verhindert in Makrophagen eine überschießende Reaktion nach einer Stimulation mit dem Colony-stimulating-factor (Yeung et al. 1992). Dies gilt wohl auch für Kupffer-Zellen. Für den Il-3-Rezeptor gilt, daß die SHP1 in die interleukinvermittelte Wachstumssteuerung eingreift, wodurch die Wirkung der Wachstumssignale begrenzt wird. Dies geschieht über eine Dephosphorylierung der zytosolischen Komponente des Il-3-Rezeptors und der Jak2-Kinase. So wird erreicht, daß der Rezeptorkomplex in Abwesenheit des Wachstumsfaktors nicht kontinuierlich stimuliert ist. Auch einer solchen Regulation müssen Kupffer-Zellen unterworfen sein, da es sonst zu einem unkontrollierten Wachstum der Kupffer-Zellen kommen würde. Angata et al. führten (2002) den indirekten Beweis, daß SHP1 oder auch SHP2 in den Kupffer-Zellen vorkommen müssen. Ihnen gelang es, Siglec-11 zu klonen und zu charakterisieren. Hierbei handelt es sich um ein Lectin aus der Reihe der Immunoglobuline. Wie auch andere Proteine aus dieser Untergruppe wird Siglec-11 an seinem Tyrosin-Rest der zytosolischen Domäne phosphoryliert und dephosphoryliert. Dies geschieht durch die SHP1 und SHP2. Siglec-11 konnte nicht in den peripheren Leukozyten, aber in Gewebemakrophagen wie den Kupffer-Zellen nachgewiesen werden. Ein direkter Nachweis der SHP1 in den Kupffer-Zellen erfolgte jedoch nicht durch diese Gruppe.

4.1.1.2 Ito-Zellen

Bei den Ito-Zellen handelt es sich um die fettspeichernden Zellen der Leber. Ein Vorkommen der SHP1 in den Ito-Zellen ist noch nicht beschrieben. Mit den Doppelimmunfärbungen im DAB/Fast-Red-System ist ein eindeutiger Nachweis der SHP1 in diesen Zellen gelungen. Das Vorkommen der SHP1 in diesen Zellen erstaunt um so mehr, da bis auf wenige Ausnahmen die SHP1 nur in Zellen des blutbildenden Systems vorkommt. Hier wirkt die SHP1 als negativer Regulator der EPO-induzierten Erythrozytendifferenzierung (Sarlow et al. 1997). EPO wird in der Niere in den peritubulären Typ 1-Fibroblasten produziert. Auch in der Leber sind unter bestimmten Umständen Fibroblasten sowie die Hepatozyten Ort der EPO-Expression. Die unter anderem dafür essentielle 5`Nucleotidase (5`NT) findet sich sowohl in den Typ 1-Fibroblasten der Niere als auch in den Ito-Zellen der Leber (Bachmann und Ramasubbu 1997). Die SHP 1 ist, wie oben beschrieben, mit dem EPO-Rezeptor assoziiert. EPO-Rezeptoren bei Fibroblasten und Ito-Zellen sind in der Literatur bisher nicht beschrieben. Da aber EPO auch einer Autoregulation unterliegen muß, können diese, da hier auch die 5`NT und die SHP1 gefunden wird, für die Ito-Zelle postuliert werden. Angestoßen wird die Produktion von EPO durch Hypoxie, zusätzlich findet in der Leber im Embryonalstadium eine EPO-Produktion, am ehesten ausgelöst durch Retinol, statt (Sasaki 2003). Des weiteren wird EPO auch im ZNS von Astrozyten produziert und dient hier als schützendes Agens für die Neurone. Wie es dann zur Signaltransduktion mit anschließender vermehrter Produktion von EPO kommt, ist noch nicht abschließend geklärt. Ein Modell sieht hier das Interagieren der c-Src, des GTP-binding-protein-Ras und des MAP-Kinase-Stoffwechsels vor (Wang und Semenza 1996). Dies könnte das Vorkommen der SHP1 in Ito-Zellen erklären.

Die Untersuchungsergebnisse, die mit Hilfe des polyklonalen Antikörpers gegen SHP1/SHP2 gewonnen wurden, konnten durch Untersuchungen mit dem monoklonalen Antikörper gegen SHP1 bestätigt werden. Zusätzlich fand sich aber noch eine positive Reaktion in den Hepatozyten. Für Hepatozyten-Zellkulturen wurde dies bereits von Waxmann et al. 1997 beschrieben. Wie zuvor oben erwähnt, ist ein Substrat für die SHP1 in nicht-hämatopoetischen Zellen nicht bekannt. Zu vermuten steht aber, daß die PTP auch hier in die rezeptorvermittelten Signalkaskaden regulatorisch eingreift. Die feinkörnige Färbung im Nukleolus könnte dafür sprechen, daß die PTP im weiteren Sinne auch innerhalb der Kernmembran an der Regulierung der Proteintranscription beteiligt ist.

Das Vorkommen der SHP1 in Kupffer- und Ito-Zellen war in der Literatur vorher nicht beschrieben. Der Nachweis der SHP1 in diesen Zellen konnte über Lichtmikroskopie und zum Teil durch Western-Blots erbracht werden. Ebenso ist ein Vorkommen in Hepatozyten außerhalb der Zellkulturen nicht beschrieben, wobei dies auf Grund der Ergebnisse von Waxmann zu erwarten gewesen wäre.

4.1.1.3 NK- Zellen

Die Natural-Killer (NK)-Zellen des Blutes differenzieren sich aus den haematopoetischen Vorläuferzellen. Ein Vorkommen der SHP1 in diesen Zellen galt als sehr wahrscheinlich und der Nachweis konnte von Olcese et al. 1996 erbracht werden. Die in der Leber vorkommenden Natural-Killer-Zellen sind eine Untergruppe der im Blut vorkommenden Natural-Killer-Zellen (Vanderkerken et al. 1993). Wenn diese in die Leber einwandern, durchlaufen sie einen von Kupffer-Zellen abhängigen weiteren Differenzierungsprozeß, wobei offensichtlich die SHP1 erhalten bleibt (Vanderkerken et al. 1995). In den unterschiedlichen Differenzierungsstadien unterscheiden sich die NK-Zellen der Leber deutlich in Funktion und Morphologie von denen des Blutes oder in anderen Organen sessilen NK-Zellen (Vanderkerken et al. 1993). Man kann nach der Isolation dieser Zellen zwei Gruppen unterscheiden: zum einen die mit einer hohen Dichte (HD) und die mit einer geringen Dichte (LD). Diese zuletzt genannte Fraktion repräsentiert eine in Morphologie und Funktion einzigartige Gruppe. Diese Zellen haben eine deutlich höhere Tumorzytotoxizität als die NK-Zellen des Blutes. Die leberspezifischen NK-Zellen hoher Dichte sind in Morphologie und Funktion ein Mittelding zwischen denen des Blutes und den NK-Zellen geringer Dichte (Vanderkerken et al. 1993). Diesen Differenzierungsprozeß durchlaufen die NK-Zellen der Leber von periportal nach perivenös. Auf Grund ihrer Herkunft ist ein Vergleich mit den NK-Zellen des Blutes möglich. Nachgewiesen wurde die SHP1 an Rezeptoren der NK-Zellen des Blutes, am KIR (Killer-Cell-inhibitory-Receptor) und am NKG2A und B-Rezeptor, wobei ein Vorkommen dieser Rezeptoren bei den NK-Zellen der Leber nicht explizit beschrieben ist. Bei der Interaktion der NK-Zellen mit ihren Ziel-Zellen kommt es zur Ausbildung immunologischer Synapsen. Im Rahmen dieses Geschehens werden der KIR und die SHP1 phosphoryliert (Vyas et al. 2004). Der NK-Zellrezeptor KLRL1 ist ebenfalls mit der SHP1 und SHP2 vergesellschaftet (Han et al. 2004). Als inhibitorischer Rezeptor ist er ebenfalls für die Zytotoxizität der NK Zellen verantwortlich Um ihren zytotoxischen Aufgaben gerecht werden zu können, muß auch die NK-Zelle der Leber diese Rezeptoren besitzen, so daß man

davon ausgehen kann, daß auch diese Zellen über die SHP1 negativ reguliert werden. Dies gilt in erster Linie für die HD-NK-Zellen der Leber, da diese denen des Blutes in Funktion und Morphologie am ähnlichsten sind, aber auch die LD-NK-Zellen der Leber müssen einer negativen Regulation unterliegen, da sie eine sehr viel höhere zytotoxische Wirkung besitzen. Könnte diese nicht negativ reguliert werden, würden sie diese uneingeschränkt mit verheerenden Folgen für das umgebende Gewebe entfalten. Eine negative Regulation ihrer Aktivierungskaskaden ist daher zwingend notwendig. Da sie der gleichen Zelllinie entstammen und es sich nur um unterschiedliche Differenzierungsstadien handelt, kann davon ausgegangen werden, daß auch im LD-Differenzierungsstadium der KIR die NKG2A-Rezeptoren und NKG2B-Rezeptoren vorhanden sind, an die die SHP1 bindet.

Außerdem sind NK-Zellen des Blutes mit Il-2-Rezeptoren ausgestattet. Auch dieser Rezeptor ist mit der SHP1 assoziiert (Brockdorff et al. 1999). Am Differenzierungsprozess, den die NK-Zellen des Blutes von der pluripotenten Stammzelle ausgehend durchlaufen, sind weitere Wachstumsfaktoren beteiligt. Zu nennen sind hier Il-6, Il-3, Il-4, der GM-CSF. Auch in diesen Rezeptorkaskaden ist die SHP1 ein essentieller Baustein.

Die Behandlung mit Il-2 führt zu einer Vermehrung der NK-Zellen (Pit-Zellen) der Leber. Dies geschieht sowohl über eine vermehrte Einwanderung von NK-Zellen des Blutes in die Leber als auch über Mitose der vorhandenen NK-Zellen.

Stebbins et al. (2003) vermuten, daß die Aktivierung der NK-Zellen einer negativen Regulation durch inhibitorische Rezeptoren unterliegt. Es scheint, daß diese Rezeptoren SHP1 rekrutieren, wenn die NK-Zellen über ihren Major-Histokompatibilitätskomplex der Klasse 1 an ihre Zielzellen binden. Auch dieser Mechanismus sollte in den NK-Zellen der Leber erhalten sein, da auch diese einer Regulation unterworfen sein müssen.

Dies wird durch die hier erhobenen Befunde belegt.

4.1.2 SHP2

4.1.2.1 Kupffer-Zellen

Für die Produktion von Il-1 sind in der Leber Kupffer- und sinusoidale Endothelzellen verantwortlich (Minami et al. 2001). Häufig unterliegen die Produktion von Cytokinen und inflammatorisch wirksamen Substanzen einer Autoregulation. Einer unkontrollierten

Ausschüttung solcher Substanzen wird so vorgebeugt. Für diese Autoregulation läßt sich ein Rezeptor an den Kupffer-Zellen postulieren, der ebenfalls der Regulation durch die SHP2 bedarf. Für die Endothelzellen konnte keine Reaktion der SHP2 nachgewiesen werden. Ursache hierfür könnte ein Vorkommen der SHP2 unter der lichtmikroskopischen Nachweisgrenze oder aber ein anderer Regulationsmechanismus sein.

Il-2 wird vornehmlich in T-Zellen produziert und löst in T- und B-Zellen sowie in Makrophagen rezeptorvermittelte Reaktionen aus. Bindet Il-2 an seinen Rezeptor, scheint SHP2 mit verschiedenen Molekülen in der Signalkaskade vergesellschaftet zu sein. So konnte es zusammen mit Grb2 und der p85-Untereinheit der Phosphatidylinositol-3-Kinase durch Coimmunoprecipitation nachgewiesen werden. Weiterhin war die SHP2 mit JAK 1 und JAK 3 assoziiert und an der Amplifikation der STAT-abhängigen Gentranskription beteiligt. Die SHP2 spielt dabei jedesmal eine positive regulatorische Rolle (Gadina et al. 1998, Gadina et al. 2000). Insbesondere die STAT-5-Aktivierung erfolgt durch die Il-2-Signalkaskade. Yu et al. konnten (2000) zeigen, daß SHP2 STAT 5 direkt dephosphoryliert. Eine Interaktion der SHP1 konnte hierbei nicht nachgewiesen werden. Da Kupffer-Zellen ortsständige Makrophagen sind, läßt sich ihre positive Immunfluoreszenzreaktion mit dem Antikörper gegen SHP2 erklären. Allen Makrophagen ist das Vorkommen von SHP1 und SHP2 gemeinsam.

Die Aktivierung des Beta-Rezeptors für PDGF durch seinen Liganden führt zu einer Autophosphorylierung an einer Reihe von Tyrosinresten. Nach der Phosphorylierung am Tyrosinrest 763 kommt es hier zu einer Assoziation mit der SHP2. Auch mit dem Tyrosinrest 1009 geht die SHP2 eine Bindung ein. Gemäß den Untersuchungen von Ronnstrand et al. (1999) kommt der SHP2 eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion der Chemotaxis zu. Auch Qi JH et al. konnten (1999) nachweisen, daß das Binden der SHP2 an den β -Rezeptor des PDGF für die Zellmigration und für Chemotaxis nach Stimulation mit PDGF von essentieller Bedeutung ist. Es scheint, daß über den PDGF- β -Rezeptor eine Regulation der FAK (p125-Fokal-Adhäsion-Kinase)-Aktivität erfolgt. Die FAK-Aktivität ist dann für die Zellmigration verantwortlich. Kupffer-Zellen als Makrophagen besitzen die Fähigkeit zur Migration. Nur so erreicht ihre Aktivität den maximalen Wirkungsgrad. Da für die Zellmigration die SHP2 ein essentieller Bestandteil ist, kann sie auch lichtmikroskopisch über Immunfluoreszenz nachgewiesen werden.

Interleukin-6 (Il-6) wird genau wie Il-1 in den Kupffer-Zellen produziert. Kupffer-Zellen müssen daher einen Rezeptor für Il-1 besitzen, um über dessen Aktivierung eine Produktion

von Il-6 zu ermöglichen. Da aber bei Fehlen der SHP2 keine Produktion von Il-6 erfolgt, muß die SHP2 in den originären Kupffer-Zellen vorkommen und auch nachweisbar sein, wie es im Rahmen dieser Arbeit mittels Immunhistochemie und Western-Blots möglich war.

4.1.2.2 Ito-Zellen

Wie die SHP1 ist auch die SHP2 an zytosolischen Signalkaskaden beteiligt, deren Aktivierung über Rezeptoren an den Zelloberflächen erfolgt. Der genaue Ablauf der Signalkaskaden und die Funktion der SHP2 innerhalb dieser Abläufe ist noch nicht endgültig geklärt.

Für die Aktivierung der Ito-Zellen sind vor allem Mediatoren aus der Gruppe der Zytokine verantwortlich. Unterteilt werden sie in mitogene Zytokine, hierzu zählen Transforming-growth-factor-alpha, Platelet-derived-growth-factor, Interleukin-1, Tumor-necrosis-factor-alpha und Insulin-like-growth-factor und fibrinogene Zytokine, denen der Transforming-growth-factor-beta und Interleukin-6 zugerechnet werden. Potentielle Hersteller dieser Zytokine sind Kupffer-Zellen, endotheliale Zellen, Lymphozyten, Thrombozyten, Hepatozyten und aktivierte Ito-Zellen (Tsukamoto 1999)

Möglicherweise dient die SHP2 in den Ito-Zellen zur Regulation verschiedener Signalkaskaden, die an folgenden Reaktionen beteiligt sind:

1). Die Ito-Zellen der Leber durchlaufen unter bestimmten Voraussetzungen einen Differenzierungsprozeß zu myofibroblastenähnlichen Zellen (Szantova und Kupcova 1999). Um diesen Prozeß anzustoßen, muß eine Stimulation der Ito-Zellen mit Platelet-derived-growth-factor (PDGF), Transforming-growth-factor-alpha und -beta (TGF- α , TGF- β), mit Lymphokinen und Monokinen, die von T-Lymphozyten und Makrophagen freigesetzt werden, und Interleukin-1-alpha (IL-1-alpha) und Interferon-tau erfolgen.

Werden Fibroblasten mit Il-1 und TNF- α stimuliert, so kommt es in den Fibroblasten zu einer Produktion von Il-6. Fehlt den Fibroblasten jedoch die SHP2, so bleibt die Antwort auf die Stimulation aus (You et al. 2001). In der durch Il-1 und TNF- α ausgelösten Signalkaskade ist die SHP2 für die Modulation des Nuclear-factor (NF)-kappa B verantwortlich. Dabei wird die MAP-Kinase-Signalkaskade umgangen (You et al. 2001).

2.) Interleukin-1-beta (Il-1-beta) produziert Stickstoff-Monoxid (NO) in den glatten Muskelzellen von Gefäßen. Auch in Ito-Zellen kommt es zu einer Produktion von NO unter Il-1-beta-Stimulation (Rockey und Chung 1995) sowie zu einer Entspannung der Zellen

durch die Bildung von cGMP (Sakamoto et al. 1997). Die Signalkaskade, über die Il-1-beta diese Reaktion auslöst, ist noch nicht bekannt, doch könnte, da auch Signalkaskaden, die durch Il-1-alpha ausgelöst werden, mit der SHP2 vergesellschaftet sind, dies der Fall sein.

3.) Wenn eine Transformation der Ito-Zellen in Myofibroblasten erfolgen kann, so ist davon auszugehen, daß die entstandenen Zellen auch alle Aufgaben der Fibroblasten übernehmen können. Hierzu ist auch das Vorkommen von Il-1 und TNF- α -Rezeptoren erforderlich. Ein Nachweis der SHP2 in den Fibroblasten war daher zu erwarten und bestätigte sich in den Untersuchungen.

In der CHO-K1-Zelllinie antagonisiert Somatostatin die proliferativen Effekte des Fibroblast-growth-factors. Hier wird durch das Somatostatin die Signalkaskade der MAP-Kinase aktiviert und verstärkt die fibroblast-growth-faktor- vermittelte ERK-Aktivität. Eine entscheidende Rolle spielt hier die SHP2 (Florio et al. 1999). Es wird vermutet, daß die SHP2 sowohl oberhalb als auch unterhalb von Ras/Erk in der Signalkaskade eingreift (Zhang et al. 2004)

Lu et al. zeigten 1998, daß die SHP2 in Fibroblasten für die Zellproliferation mit verantwortlich ist. Fehlt in Fibroblasten eine funktionsfähige SHP2, so erfolgte auf Stimulation mit PDGF eine deutlich verminderte DNA-Synthese und eine deutlich reduzierte Aktivität der Erk (Extracellular-regulated-kinase). Ebenso konnte in diesen Zellen keine mRNA des PDGF- β -Rezeptors nachgewiesen werden, so daß davon auszugehen ist, daß die SHP2 nicht nur an der Signalkaskade für Wachstumsstimuli beteiligt ist, sondern auch die Expression von PDGF- β -Rezeptors aktiv reguliert und so auf die Proliferation der Fibroblasten Einfluß nehmen kann.

In den Untersuchungen von Roche et al. (1996) stellte sich heraus, daß es bei einer Inhibition der SHP2 in PDGF- stimulierten Zellen zu einem Abbruch der Mitose in der G1-Phase kommt. Ohne SHP2, PLC-Gamma, Shc und NcK kann es nicht zu einem Eintritt der Zelle in die S-Phase kommen. PLC-Gamma, SHP2 und Shc waren hier für die ligandeninduzierte cFos-Expression essentiell. Aus diesen Daten kann man schließen, daß es bei einer Aktivierung der Zelle mit PDGF zu Ras- abhängigen und Ras- unabhängigen Signalkaskaden kommt, die dann in die DNA-Synthese einmünden.

Die SHP2 interagiert dabei direkt mit dem PDGF-Rezeptor über ihre SH2-Domänen. Es kommt zu einer Phosphorylierung der Tyrosinreste. Die phosphorylierte SHP2 bindet dann wiederum an die SH2-Domäne des GRB2 und dient so als Adapter für die Signaltransduktion vom aktivierten PDGF-Rezeptor auf die Ras- und MAP-Kinase-Signalkaskaden. Weiterhin

kommt es zu einer Kolokalisation der SHP2 mit Actin-Molekülen in den PDGF-aktivierten Zellen. Cossette et al. (1996) kommen anhand ihrer Experimente zu dem Schluß, daß die SHP2 neben ihrer positiven Funktion in den MAP-Kinase-Signalkaskaden auch eine negativ regulierende Rolle bei den Signalkaskaden, die die Zellmembranbeweglichkeit beeinflussen, haben muß.

Nach einer Stimulation der Zelle mit Il-3 oder Epo kommt es zu einer Phosphorylierung des SH2/SH3-beinhaltenden Adapterprotein Crkl und zu einer vorübergehenden Assoziation von SHP2 mit diesem Protein. Im weiteren Verlauf der Signalkaskade ist Crkl mit dem Guanine-Nucleotide-exchange-factor C3G vergesellschaftet (Chin et al. 1997) und bindet an den Erythropoetinrezeptor (EpoR). Crkl ist also ein Baustein in der nachgeschalteten Signalkaskade des EpoR und des Il-3-Rezeptors. Die Interaktion zwischen Crkl und den Signalkaskaden geschieht wahrscheinlich über tyrosinphosphorylierte SHP2 und Shc.

Sowohl SHP1 als auch SHP2 sind mit der beta-Untereinheit des humanen Interleukin-3-Rezeptors nach der Stimulation mit Il-3 assoziiert. Insbesondere scheint hier die Phosphorylierung des Tyrosinrests 612 der Schlüssel zur Assoziation der beiden Phosphatasen mit der Rezeptoruntereinheit zu sein (Bone et al. 1997). Das Binden beider SHP's an den Il-3-Rezeptor scheint die Il-3-abhängigen Signalkaskaden regulatorisch zu beeinflussen.

Il-3 und G-CSF aktivieren in hämatopoetischen Zellen die gleiche Signalkaskade (Rausch und Marshall 1997).

Ein Nachweis der SHP2 in Ito-Zellen war auf Grund dieser Daten zwingend.

Ein spezifisches Substrat für die SHP1 bzw. SHP2 ist bis heute noch nicht gefunden. Jedoch dienen häufig phosphorylierte Tyrosinreste entlang der Signalkaskaden als Substrat.

4.1.2.3 NK-Zellen

NK-Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Elimination virusinfizierter oder veränderter Zellen. Interleukin-2-aktivierte NK-Zellen induzieren bei den befallenen oder veränderten Zellen eine Apoptose. Alternativ können sie auch nekrotische Effekte an den Hepatozyten auslösen, die dann ebenfalls zum Zelluntergang führen (Blom et al. 1999).

Die NK-Zellen sind auf ihre Fähigkeit zur Migration und Chemotaxis angewiesen, um die ihnen gestellten Aufgaben zu erfüllen. Auch hier ist wie bei den Kupffer-Zellen durch PDGF eine Aktivierung über den Beta-Rezeptoren denkbar. Erfolgt die Auslösung der Signalkaskade

über den PDGF-beta-Rezeptor, so sind vermutlich auch die intrazellulären Abläufe der Signalkaskaden weitestgehend mit denen der Kupfer-Zellen identisch. Eine Beteiligung der SHP2 kann postuliert werden. Lichtmikroskopisch findet sich eine Anfärbbarkeit der NK-Zellen für die SHP2.

Die katalytische Aktivität der SHP2 scheint eine direkte Rolle bei der inhibitorischen Funktion des KIR (Killer-cell-Ig-like-Receptor) zu spielen. Die geschieht im engen Verbund mit der SHP1 (Yusa und Campbell 2003).

4.2 Methotrexat

Im weiteren wird die Auswirkung des Methotrexat auf die Non-Parenchymzellen der Leber untersucht und die Auswirkung des Methotrexat auf Signalkaskaden unter Berücksichtigung der SHP1 und SHP2 diskutiert werden. In hohen Dosierungen wird durch Methotrexat eine direkte Zellschädigung verursacht. In niedrigeren Dosen kommt es zu einem Einfrieren der Zellteilung in der G₁-Phase. Durch die so eingeleitete Zellzerstörung durch MTX kommt es zu einer lokalen Entzündungsreaktion mit Freisetzen von Entzündungsmediatoren, die dann die Leberschädigung auslöst.

Wie bei den unbehandelten Tieren wurden lichtmikroskopisch auch bei den behandelten Tieren bis auf die Endothelzellen alle Non-Parenchymzellen mit den poly- und monoklonalen Antikörpern gegen die SHP1 und SHP2 markiert. Eine Reduktion der SHP1/SHP2-positiven Zellen fiel auf. Für die Auswirkungen des Methotrexat auf die Non-Parenchymzellen der Leber kann also bei den behandelten Tieren die Anzahl der SHP1/SHP2-positiv-markierten Zellen herangezogen werden. Dies wird durch die SDS-Page (Abbildung 12) bestätigt.

Bei behandelten und unbehandelten Tieren wurden die SHP1-positiv-markierten Zellen getrennt nach periportal und perivenös ausgezählt. Periportal lag das Maximum der SHP1-positiven Zellen mit 23,9 pro Einheit deutlich über dem Minimum der Kontrollgruppe. Dieser bereits deskriptiv deutliche Unterschied läßt sich interferenzstatistisch beweisen und führt zu einem signifikanten Ergebnis. Perivenös ergab sich kein Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Tieren. Durch die Behandlung der Ratten kam es schon nach der sehr kurzen Behandlungsdauer zu einer signifikanten Reduktion der periportalen Non-Parenchymzellen. (Zusammenfassung der Veränderungen unter MTX siehe Tabelle 20.) Um eine genauere Aussage über die Zellverteilung im einzelnen treffen zu können, erfolgte die

immunhistochemische Differenzierung der Zellen im Gefrierschnitt. Hierzu wurden die bereits oben erwähnten Färbemethoden eingesetzt. Zunächst wurde mittels Doppelfärbungen geklärt, daß alle Zellen, die mit einem spezifischen Marker für die jeweilige Zellpopulation markiert waren, eine Reaktion mit dem SHP1/SHP2-AK zeigten. Auch bei den mit Methotrexat behandelten Tieren zeigten alle mit dem spezifischen Zellmarker gefärbten Zellen auch eine positive Immunreaktion für die SHP1/SHP2. So konnte auf lichtmikroskopischer Ebene nachgewiesen werden, daß es in den Non-Parenchymzellen unter kurzer hochdosierter MTX-Behandlung zu keiner Depletion der SHP1 bzw. SHP2 kommt. Dies wird auch durch Aktivitätsbestimmungen untermauert. Die Gesamtposphataseaktivitäten (wie nachfolgend diskutiert) der Leberhomogenate behandelter und unbehandelter Tiere unterschieden sich nicht. Da die Zellzahl der Non-Parenchymzellen unter MTX abgenommen hatte, könnte man sogar von einem relativen Anstieg der Phosphataseaktivität pro Zelle reden. Auf Grund der fünf unterschiedlichen Zellpopulationen in der Leber kann die Zunahme der Phosphataseaktivität im Homogenat keiner Population zugeordnet werden. Hinzu kommt noch, daß mit dem Aktivitätstest ganz unterschiedliche Phosphatasen erfaßt werden und so keine definitive Aussage zum Verhalten von SHP1 und SHP2 getroffen werden kann.

Betrachtet man die einzelnen Zellpopulationen, die getrennt nach perivenöser und periportal Lokalisation ausgezählt wurden, fand sich bei den Kupffer-Zellen eine geringe Reduktion der Zellzahl perivenös und periportal in den behandelten Tieren. Die Zellen in der periportal Region zeigten bei der Markierung sowohl mit ED1 als auch mit ED2 eine stärkere Abnahme ihrer Zahl als in der perivenösen. Periportal war diese Abnahme statistisch signifikant, während perivenös keine statistisch relevante Änderung der Kupfferzellzahl nachzuweisen war. (Siehe Tabelle 20.) Erklärt werden kann das mit der Resorption des Methotrexat. Da es i.p. appliziert wurde, wurde das Methotrexat über das Peritoneum aufgenommen. Da die peritoneale Applikation mit einer oralen Gabe vergleichbar ist (Balis et al. 1986), ist auch davon auszugehen, daß das MTX nach der Resorption zunächst die Leber passieren mußte. Die periportal gelegenen Zellen kamen also als erste in der Leber mit dem Methotrexat in Kontakt. Je höher die Dosis, die auf eine Zelle einwirkt, desto höher auch die Toxizität des Methotrexat (Keefe et al. 1982). Es ist daher durchaus verständlich, daß die Kupffer-Zellen an dieser Stelle auf Grund der höheren Toxizität eine stärkere Reduktion erfahren haben. Spekulieren läßt sich, daß bei einer über einen längeren Zeitraum erfolgenden Applikation des Methotrexat eine deutlich stärkere Reduktion der Kupffer-Zellen auch im perivenösen Bereich aufgetreten wäre.

Bei den Ito-Zellen treten im Vergleich zwischen behandeltem und unbehandeltem Tier periportal keine Differenzen auf. (Siehe Tabelle 20.) Die Zellzahl bleibt nahezu identisch. Perivenös gestaltet sich das Verteilungsmuster etwas anders. Bei einem Teil der behandelten Tiere kam es zu einer geringen Abnahme der Zellzahl im Vergleich zu den Kontrolltieren, während sie bei den anderen behandelten Tieren nicht abnahm. Perivenös und periportal gibt es keine statistisch signifikanten Unterschiede. Grund hierfür könnte sein, daß die Applikationsdauer für das Methotrexat zu kurz gewählt wurde. Auf der anderen Seite sind die Ito-Zellen für die unter Methotrexat-Gabe entstehende Leberfibrose verantwortlich, so daß unter einer längeren Therapie eher von einer Vermehrung und Aktivierung dieser Zellen auszugehen ist als von einer Reduktion. Bereits bei der hier eingesetzten MTX-Konzentration kam es zu einer Aktivierung der Ito-Zellen, wie an Hand eines erhöhten Alpha-smooth-muscle-actin zu erkennen war. Smooth-muscle-actin wird in Ito-Zellen erst im aktivierten Zellzustand expremiert. Die Aktivierung der Ito-Zellen erfolgt über die Zytokinkaskaden. Eine quantitative Aussage über den Aktivitätszustand der Ito-Zellen wäre nur im Zusammenhang mit Zellisolationen und an den isolierten Zellen durchgeführten biochemischen Untersuchungen möglich gewesen. Die Zellisolation konnte aber im Rahmen dieser Arbeit nicht weiterverfolgt werden.

Als letzte SHP1/2-positive Zellpopulation der Leber wurden die NK-Zellen untersucht. Im Vergleich zu allen anderen untersuchten Zellen zeigten sie die deutlichsten Veränderungen in der Zellzahl. Periportal kam es fast zu einer Verdopplung der NK-Zellen, perivenös stieg ihre Zahl geringer, aber auch statistisch signifikant, an. (Siehe Tabelle 20.) Bei den NK-Zellen der Leber handelt es sich um aus dem Blut eingewanderte (Ito et al. 1999, Poggi und Mengari 1995, Baccarini et al. 1988, Lukomska et al. 1983) NK-Zellen, die in der Leber langsam von periportal nach perivenös wandern, um dort einen weiteren Differenzierungsprozeß zu durchlaufen. Da Methotrexat auch inflammatorische Reize setzt, kann es zu einer vermehrten Einwanderung von NK-Zellen des Blutes in die Leber kommen. Dies würde erklären, warum es periportal nach der kurzen Behandlung mit Methotrexat bereits zu einer Verdoppelung der NK-Zellen gekommen ist, während perivenös nur ein geringer, wenn aber auch bereits signifikanter, Anstieg zu verzeichnen ist. Da die Tötung der behandelten Tiere bereits nach 5 Tagen erfolgte, konnte ein weiterer Anstieg der Zellzahl in der perivenösen Zone nicht mehr erfolgen.

Wie zuvor bei den unbehandelten Tieren beschrieben, waren auch hier die Parenchymzellen der Leber SHP1- bzw. SHP2-positiv. Das lichtmikroskopisch erkennbar veränderte Verteilungsmuster der SHP1 bzw. SHP2 in den Zellen (Färbung der Kernmembran, aber

keine weitere Kernfärbung) spricht für ein Eingreifen des MTX in den Stoffwechsel der Hepatozyten. Vermutlich sind Rezeptoren aktiviert worden, die zu einer Umlagerung in eine membrangebundene Form der SHP1 verantwortlich sind. Welche Auswirkungen dies auf den Zellstoffwechsel hat, darüber kann nur spekuliert werden. In der Literatur liegen hierzu keine Aussagen vor. Weiterführende Untersuchungen wären hierfür notwendig.

	Perivenös	Periportal
Gesamt-Zellzahl	Keine Veränderung der Gesamtzahl an Non-Parenchymzellen unter MTX	Statistisch signifikante Reduktion der Non-Parenchymzellen unter MTX
Kupffer-Zellen	Statistisch nicht signifikante Abnahme der Zellzahl unter MTX	Statistisch signifikante Abnahme der Zellzahl unter MTX
Ito-Zellen	Keine einheitliche Änderung der Zellzahl unter MTX	Keine Änderung der Zellzahl unter MTX
NK-Zellen	Statistisch signifikante Zunahme der Zellzahl unter MTX	Statistisch signifikante Zunahme der Zellzahl unter MTX

Tab. 20: Verhalten der untersuchten Zellpopulationen unter MTX-Gabe.

4.3 Biochemie

Im Anschluß an die Lichtmikroskopie erfolgten biochemische Untersuchungen, um die gewonnenen Ergebnisse zu bestätigen.

Die Aktivitätsmessungen sind mangels spezifischer Substrate leider nicht einer PTP-Form zuzuordnen, so daß hier keine abschließende Aussage getroffen werden kann. Ebenso schließt ein mangelnder lichtmikroskopischer Nachweis ein Vorkommen der PTP 1B/T-Zell-PTP nicht aus, wie durch den SDS-Page (Abbildung 12) gezeigt wurde. Die durchgeführten SDS-

Pages zeigten jedoch eindeutig ein Vorkommen der SHP1 bzw. SHP2 in den Leberhomogenaten, in den Kupffer- und den Endothelzellen.

In der zytosolischen Fraktion war bei den Aktivitätsbestimmungen eine deutlich erhöhte Phosphataseaktivität im Vergleich zu der in der membrangebundenen Fraktion gefundenen festzustellen. Dieses Ergebnis deckt sich auch mit der Tatsache, daß es sich sowohl bei der SHP1 als auch bei der SHP2 um eine zytosolische Protein-Phosphatase handelt. Die bereits lichtmikroskopisch erhobenen Ergebnisse konnten so bestätigt werden.

Bei den SDS-Pages wurden neben der als spezifisch anzusehenden Bande, die sowohl die 68kDa (SHP1) als auch die 72kDa (SHP2) enthält, weitere unspezifische Banden gefunden. Diese sind Bruchstücke/Abbauprodukte des nachzuweisenden Enzyms, die ebenfalls mit dem Antikörper nachgewiesen wurden.

4.3.1 Leberhomogenate

Außer dem lichtmikroskopischen Nachweis wurde die Phosphataseaktivität an Leberhomogenaten bestimmt.

Auch wenn auf Grund des zu kleinen Kollektivs keine statistisch valide Aussage zu treffen ist, zeichnet sich hier doch ein Trend ab. Sowohl in der löslichen als auch in der membrangebundenen Proteinfraction unterscheiden sich die Aktivitäten zwischen behandeltem und unbehandeltem Tier nicht. Ebenso unterscheidet sich der Proteingehalt bei behandelten und unbehandelten Tieren in den Leberhomogenaten nicht. Mangels eines spezifischen Substrates für die SHP1 und SHP2 wurde für die Aktivitätsbestimmungen RCML herangezogen. Dabei handelt es sich um ein unspezifisches Substrat für mehrere Phosphotyrosin-Phosphatasen. Es reagieren PTP-asen der T-Zell- und der PTP-1B-Familie mit diesem Substrat; in deutlich geringerer Ausprägung aber auch die SHP1 und SHP2. Auf Grund dieser Tatsache ist eine definitive Aussage zum Verhalten der SHP1 und SHP2 unter Methotrexatgabe an Hand der Aktivitätsbestimmungen nicht möglich. Jede eventuelle Aktivitätsänderung der SHP1 und SHP2 wird von den anderen beiden mit den RCML-reagierenden PTP-Familien so stark überlagert, daß eine Bewertung im Bezug auf SHP1 und SHP2 nicht möglich ist.

Bei den SDS-Pages wurden die Leberhomogenate auf das Vorkommen sowohl der SHP1 als auch der T-Zell-PTP polyklonal untersucht. Bei beiden Antikörpern konnte sowohl bei den unbehandelten als auch den behandelten Tieren das Vorkommen nachgewiesen werden. Der verwendete AK zum Nachweis der SHP1/SHP2 war polyklonal, so daß, wie bereits oben

beschrieben, auf Grund der Sequenzhomologie sowohl die SHP1 als auch die SHP2 in den Leberhomogenaten nachgewiesen wurden. Da in den LM-Färbungen, die deutlich unsensibler reagieren als die biochemischen Untersuchungen, mit den monoklonalen Ak sowohl für die SHP1 als auch die SHP2 eine positive Reaktion zu sehen war, kann auch hier davon ausgegangen werden, daß in den Homogenaten die SHP1 und die SHP2 nachgewiesen wurden.

Des Weiteren wurden noch Western-Blots von homogenisiertem Lebergewebe unbehandelter Ratten mit monoklonalen Antikörpern gegen die SHP1 und SHP2 durchgeführt. Auch hier zeigte sich eine deutliche Bande bei 68 kDa für SHP1 und bei 72kDa für SHP2, so daß auch so ein Vorkommen beider SHP`s in der Leber bewiesen ist. Eine Aussage zum quantitativen Vorkommen beider SHP`s in den einzelnen Zellpopulationen ist dadurch aber nicht möglich.

4.3.2 Zellisolation

Da SHP1/2-positiven Zellen keine einheitlichen Zellpopulationen darstellen, sollten die erhobenen Befunde in einer weiteren Versuchsreihe an isolierten Zellen der einzelnen Leberzellpopulationen verifiziert werden. Auf Grund fehlender Gerätschaften konnte die Zellisolation in unseren Laboren nicht durchgeführt werden. Die Isolation der Kupffer- und Endothelzellen erfolgte in Zusammenarbeit mit PD Dr. P. Steinberg, Mainz. Auf Grund beschränkter Laborkapazitäten konnte die Isolation nur bei einem kleinen Kollektiv durchgeführt werden. Für die Isolation von NK-Zellen und Ito-Zellen konnten keine Kooperationspartner gewonnen werden, so daß auf eine Isolation dieser Zellpopulationen verzichtet wurde.

4.3.2.1 Endothelzellen

Beim Vergleich der Anzahl der gewonnenen Zellen zwischen behandelten und unbehandelten Tieren fällt bei den behandelten Tieren eine deutliche Abnahme auf. Bei den behandelten Tieren konnten ca. 6 bzw. 8 Millionen Endothelzellen gewonnen werden, während es bei dem unbehandelten Tier 24 Millionen Zellen waren. Diese Differenz ist ein Zeichen der bereits nach kurzer MTX-Behandlungsdauer einsetzenden Schädigung der Leber. Fuskevag et al. zeigten (2000) in ihren elektronenmikroskopischen Untersuchungen, daß unter MTX-Gabe die Endothelzellen der Sinusoide anschwellen, sie ihre pinozytose Vesikel verlieren; ihre luminal gelegene Plasmamembran zeigte deutliche Unregelmäßigkeiten und zum Teil hatten die Sinusoide gänzlich ihre endotheliale Auskleidung verloren.

4.3.2.2 Kupffer-Zellen

Auch hier kam es zu einer deutlichen Differenz zwischen behandelten und unbehandelten Tieren. Bei dem Kontrolltier konnten ca. 52 Millionen Zellen, bei den behandelten nur ca. 15 bzw. 10 Millionen Kupffer-Zellen isoliert werden. Dieses Ergebnis deckt sich auch mit dem an den Cryostatschnitten gewonnenen Ergebnis. Hier kam es, wie oben beschrieben, zu einer signifikanten Abnahme der Kupffer-Zellen im periportalen Bereich. Auch dies ist wieder ein Ausdruck der schon nach kurzer Zeit einsetzenden Leberschädigung durch Methotrexat.

Zusammenfassend kann man sagen, daß die Zahl der Kupffer-Zellen signifikant unter der MTX-Gabe abgenommen hatten, während es bei den NK-Zellen zu einer signifikanten Zunahme ihrer Anzahl unter MTX-Behandlung kam. Was Fuskevåg et al. (2000) für die Endothelzellen zeigten, kann, da die Kupffer-Zellen innerhalb der Sinusoide liegen, in ähnlicher Weise für die Schädigungen der Kupffer-Zellen durch MTX gelten. Werden die Zellen in ihrer Integrität angegriffen kommt es zum Zelluntergang, was dann die geringere Kupffer-Zellen-Anzahl erklären würde. Die nur periportal niedrigere Anzahl unter MTX-Gabe läßt sich durch die kurze Applikationsdauer in unserem Versuchsaufbau zusammen mit der periportal naturgemäß höheren MTX-Konzentration erklären. Bei längerer Applikation wäre vermutlich auch perivenös eine Reduktion der Kupffer-Zellen aufgetreten. Der Anstieg der NK-Zellen ist vermutlich durch eine Entzündungsreaktion zu erklären, die in den Lebersinusoiden abläuft, nachdem die Endothelschicht geschädigt oder sogar zum Teil zerstört worden ist.

4.3.3 Proteingehalt und Phosphataseaktivität der isolierten Zellen

Die gewonnenen Endothel- und Kupffer-Zellen wurden für die biochemischen Untersuchungen aufgearbeitet.

Der Proteingehalt der isolierten Endothelzellen und Kupffer-Zellen ist bei den behandelten Tieren deutlich geringer als bei den unbehandelten Tieren. Bei der Aktivitätsbestimmung wurde sowohl im unbehandelten als auch im MTX-Tier in der cytosolischen Fraktion eine deutlich höhere Phosphataseaktivität im Vergleich zu der in der membrangebundenen Fraktion gefundenen, was das zytosolische Vorkommen der PTP-ase bestätigt. Ebenso fällt die Phosphataseaktivität sowohl in der zytosolischen als auch in der membrangebundenen Fraktion deutlich geringer aus.

Da MTX die DNA- und RNA-Synthese beeinflusst und als zytostatikum vor allem Zellen mit einer hohen Teilungsrate schädigt, ist in den Leberhomogenaten eine Verminderung des Proteingehaltes und der Phosphataseaktivität unter Berücksichtigung der lichtmikroskopischen Ergebnisse nicht zwingend zu erwarten gewesen. Lediglich die Zahl der Kupffer-Zellen hat signifikant abgenommen. Das Leberzellgewebe gehört nicht zu den sich schnell teilenden Geweben.

Wie zuvor bei den Homogenaten wurde nun das Vorkommen der SHP1/2 an den isolierten Zellen untersucht.

Vergleicht man die Aktivitäten der Tyrosinphosphatasen im Lebergesamthomogenat mit den Homogenaten der isolierten Zellen, so findet sich eine fast achtmal höhere Aktivität pro ml bzw. viermal höhere Aktivität pro mg Protein bei den Kupffer-Zellen im Vergleich zum Gesamthomogenat der Leber. Hierdurch wird ein hauptsächliches Vorkommen der Phosphatasen in den Non-Parenchymzellen bestätigt.

4.3.3.1 Endothelzellen

Bei den Endothelzellen fand sich im SDS-Page eine für die SHP1 spezifische Bande bei 68kDa bzw. für SHP2 bei 72kDa. Lichtmikroskopisch ist bei den Endothelzellen kein Nachweis der SHP1/2 gelungen. Eine Erklärung für dieses differente Ergebnis könnte sein, daß die SDS-Page Gelelektrophorese als Nachweissystem deutlich sensitiver reagiert als die Immunfluoreszenz. Ebenso wurde auch in den Endothelzellen eine wenn auch geringere Phosphataseaktivität gemessen, so daß auch dadurch die Banden in den Blots zu erklären sind. (Siehe Abbildung 26.)

4.3.3.2 Kupffer-Zellen

Wie auf Grund der immunhistochemischen Befunde erwartet, bildete sich beim SDS-Page eine breite spezifische Bande im Bereich von 68 bis 72kDa aus. Damit gelang der Nachweis des SHP1/2-Vorkommens in den Kupffer-Zellen auf biochemischer Ebene, wenn man die lichtmikroskopischen Ergebnisse mit den monoklonalen Antikörpern beachtet. Siehe (Abbildung 27.)

Neben der als spezifisch anzusehenden Bande sind weitere unspezifische Banden in den durchgeführten Blots der Endothel- und Kupffer-Zellen zu sehen. Die nachzuweisenden Enzyme waren, geschuldet der Methode, beim Auftragen auf das Gel nicht immer in einem

intakten Zustand. Bei den unterhalb der spezifischen Bande liegenden Banden handelt es sich also um Bruchstücke der SHP1, die ebenfalls mit dem Antikörper nachgewiesen wurden.

Am SDS-Page konnte eine semiquantitative Auswertung der SHP1/SHP2-Aktivität anhand der Farbintensität erfolgen. Hierbei zeigte sich, daß es zu einer deutlichen Abnahme der Phosphataseaktivität, die aus den isolierten Zellen behandelte Tiere gewonnen werden konnte, kam.

Eine Abnahme der Phosphataseaktivität im MTX-Tier gemäß der semiquantitativen Auswertung der Kupffer-Zellen in der löslichen Fraktion ergab sich nicht. Das Ergebnis der semiquantitativen Auswertung ist jedoch nicht aussagekräftig, da die beiden gewonnenen Werte sowohl für die cytosolische als auch für die membrangebundene Fraktion eine viel zu große Schwankungsbreite haben. Dies wird wahrscheinlich seine Ursache im unterschiedlichen Ansprechverhalten der beiden Individuen auf MTX haben. Auch sind die Ergebnisse der semiquantitativen Auswertungen von Kupffer- und Endothelzellen nicht miteinander vergleichbar, da sie nicht vom gleichen Page gewonnen wurden. Eine Vergleichbarkeit der Werte ist daher nur für Kupffer- und nur für Endothelzellen innerhalb ihres Kollektivs möglich.

Unter Berücksichtigung aller Ergebnisse kann man davon ausgehen, daß Methotrexat durch Beeinflussung der DNA- und RNA- Synthese auch die Protein-Biosynthese stört. Je nachdem wie stark die einzelne Zelle bereits durch das MTX geschädigt worden ist, ist auch die Protein-Biosynthese beeinträchtigt. Es kommt unter der Behandlung mit MTX zu einer verminderten RNA-Synthese mit nachfolgendem geringerem Proteinvorkommen in den Zellen. Ob es dabei nur zu einer geringeren SHP1/SHP2-Produktion kommt oder an einer anderen Stelle in die Signaltransduktion eingegriffen wird und in Folge geringere SHP1/SHP2-Mengen exprimiert werden, kann an Hand der Untersuchungen nicht gesagt werden. So ist auch nicht abschließend zu klären, ob MTX die PTP direkt oder indirekt beeinflusst. Auf Grund seines Wirkmechanismus´ ist aber von einer direkten Beeinflussung nicht auszugehen. Ebenso kann keine eindeutige Aussage über die Aktivitätsveränderungen der PTP`s unter Methotrexat getroffen werden, da im Rahmen der Aktivitätsbestimmungen mehrere PTP-Familien gleichzeitig erfaßt wurden. Ein Test, der sich isoliert auf die SHP1 bezieht, ist mangels spezifischen Substrates nicht möglich. So ist auch keine Aussage über die Phosphataseaktivitäten der SHP1 und SHP2 zu treffen. Insgesamt scheint es so zu sein, daß unter MTX die Signaltransduktion aktiviert wird. Die PTP`s sind an diesem Geschehen beteiligt, so daß davon ausgegangen werden kann, daß es darüber zu einer

Aktivitätssteigerung bzw. zu einer vermehrten PTP-Produktion kommt. Dies würde dann, wie hier beobachtet, bei geringerer Zellzahl zu einem konstanten Wert für die Phosphataseaktivität in den Homogenaten führen.

4.4 Zusammenfassung

In der hier vorgelegten Arbeit wurde das Vorkommen spezifischer Phosphotyrosin-Phosphatasen – PTP1B bzw. TcellPTP und SHP1 bzw. SHP2 - in der Leber von Ratten untersucht. Eine genauere Analyse erfolgte für SHP1/PTP1C und SHP2/PTP1D. Zusätzlich wurde das Verhalten der Tyrosinphosphatasen unter dem Einfluß von Methotrexat (MTX) analysiert.

Das Erfassen von PTP1B und TcPTP in Leberschnitten mittels Immunfluoreszenztechnik war nicht möglich. Jedoch konnte mittels des sensitiveren SDS-Page das Vorkommen dieser beiden Formen in der Leber bestätigt werden.

Die weiteren immunzytochemischen Untersuchungen beschränkten sich auf die SHP1 bzw. SHP2-Form. Diese wurden sowohl mit einem polyklonalen Antikörper, der auf Grund der großen Sequenzhomologie der Enzyme beide Formen gleichzeitig erfaßt, als auch mit monoklonalen Antikörpern durchgeführt.

Es gelang der lichtmikroskopische Nachweis dieser beiden Enzyme in der Leber, wobei ihr Vorkommen auf die Non-Parenchymzellen beschränkt war. Die Identifikation dieser reaktiven Zellen erfolgte über Doppelfärbungen einerseits mit zelltypspezifischem Antikörper und dem Antikörper gegen die Tyrosinphosphatase. So konnte gezeigt werden, daß sowohl die SHP1- als auch die SHP2-Form in den Ito- (spezifischer Antikörper: Desmin, GFAP), Kupffer- (spezifischer Antikörper: ED1, ED2, OX6) und NK- (spezifischer Antikörper: 3.2.3 Antikörper gegen NKR-P1) Zellen vorkommt.

Das Vorkommen der SHP1 in den Kupffer- und Ito-Zellen wurde hier zum ersten Mal beschrieben.

Die biochemische Analyse erfolgte sowohl am Gesamtleberhomogenat als auch an zwei isolierten Zellpopulationen, nämlich an Endothel- und Kupffer-Zellen, die über das Elutriationsverfahren gewonnen wurden. Die Messung der Gesamtaktivität der PTP's bestätigte in gewisser Weise die morphologischen Beobachtungen. Die Gesamtaktivität der PTP's war an den Kupffer-Zellen ca. 4mal so hoch wie in dem Gesamthomogenat, während die Aktivität der Endothelzellen nur etwa 60% der Aktivität des Leberhomogenats entsprach.

Weitere Analysen erfolgten mittels Western-Blotting sowohl im Gesamtleberhomogenat als auch im Homogenat der isolierten Zellen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Lebern nach Methotrexat-Behandlung untersucht. In den Hepatozyten der behandelten Lebern ließ sich weder PTP1b noch TcPTP nachweisen. Für die Non-Parenchymzellen ergab sich das gleiche Muster – SHP1 und SHP2 in allen Zellen außer den Endothelzellen – wie bei den unbehandelten Tieren.

Unter dem Einfluß von MTX kam es zu Veränderungen periportal gelegener Non-Parenchymzellen. Die Populationsanalyse ergab quantitative Veränderungen sowohl bei den Kupffer-, als auch den bei den NK-Zellen. Während die Zahl der Kupffer-Zellen signifikant unter der Behandlung mit MTX abnahm, verdoppelte sich die Zahl der NK-Zellen. Dies gilt auch für die NK-Zellen der perivenösen Zone. Für die Ito-Zellen konnte noch zusätzlich deren Aktivierung durch MTX gezeigt werden.

4.5 Summary

The presented study deals with the occurrence of selected proteintyrosine phosphatases – PTP1B and TcellPTP, PTP1C and PTP1D - in rat liver. The experiments were mainly focused on one group of these PTPs, namely PTP1C/SHP1 and PTP1D/SHP2. In addition those tyrosine phosphatases were screened in liver from animals submitted to methotrexate treatment.

Proteintyrosine phosphatase 1B, as well as the closely related form Tcell PTP could not be detected by immunofluorescence technique. Yet, the more sensitive Western blotting technique revealed the existence of both these forms in rat liver.

Further detailed immunofluorescence experiments were restricted to SHP1 and SHP2. These PTPs were traced as well with polyclonal antibody, which detects both forms simultaneously because of the high sequence homology, as with monoclonal antibodies.

Both forms were detected in rat liver, yet, their presence was restricted to non-parenchymal cells. These reactive cells were identified by double immunostaining together with a cell type specific second antibody in combination with the specific antibody to PTP. This way, the presence of both forms - SHP1 and SHP2 – in Ito cells, Kupffer cells and liver specific Natural-Killer cells was shown.

This was the first time to demonstrate the occurrence of SHP1 in Kupffer cells and Ito cells.

Biochemical data were retrieved as well from whole liver homogenates and from two isolated cell populations, endothelial cells and Kupffer cells, which were won by the technique of elutriation. Comparison of PTP activity determination of the whole homogenate with the activity of Kupffer cells stressed the morphologic results. The activity of Kupffer cells surpassed the activity of whole liver by more than 4 times. In contrast the activity of endothelial cells was only 60 % of whole liver activity.

Whole liver homogenate and homogenate of isolated cells were analyzed by Western blotting.

The second part of the study comprised the experiments performed with livers of methotrexate treated rats. Comparable to control livers neither PTP1B nor Tcell PTP were detected by immunfluorescence techniques. Non-parenchymal cells reacted the same way as observed in control livers: SHP1 and SHP2 were found in all non parenchymal cells, but endothelial cells.

MTX treatment resulted in changes in the number of periportal non-parenchymal cells. Kupffer cells were reduced in their number, whereas Natural-Killer cells were doubled not only periportally, but also perivenously. In addition, Ito cells were altered in their activity state.

5 Literaturverzeichnis

Ahmad, S., Banville, D., Zhao, Z., Fischer, E. H., and Shen, S. H. (1993).

A widely expressed human protein-tyrosine phosphatase containing src homology 2 domains.
Proc Natl Acad Sci U S A 90[6], 2197-2201

Angata, T., Kerr, S. C., Greaves, D. R., Varki, N. M., Crocker, P. R., and Varki, A. (2002).

Cloning and characterization of human Siglec-11. A recently evolved signaling that can interact with SHP-1 and SHP-2 and is expressed by tissue macrophages, including brain microglia.

J Biol Chem 277[27], 24466-24474

Assaraf, Y. G. and Schimke, R. T. (1987).

Identification of methotrexate transport deficiency in mammalian cells using fluoresceinated methotrexate and flow cytometry.

Proc Natl Acad Sci U S A 84[20], 7154-7158

Baccarini, M., Hao, L., Decker, T., and Lohmann-Matthes, M. L. (1988).

Macrophage precursors as natural killer cells against tumor cells and microorganisms.

Nat Immun Cell Growth Regul 7[5-6], 316-327

Bachmann, S. and Ramasubbu, K. (1997).

Immunohistochemical colocalization of the alpha-subunit of neutrophil NADPH oxidase and ecto-5'-nucleotidase in kidney and liver.

Kidney Int 51[2], 479-482

Balis, F. M., Murphy, R. F., Lester, C. M., and Poplack, D. G. (1986).

The influence of route of administration on the hepatic uptake of methotrexate.

Cancer Drug Deliv 3[4], 239-242

Berlin, N. I., Rall, D., Mead, J. A., Freireich, E. J., Vanscott, E., Hertz, R., and Lipsett, M. B. (1963).

Folic acid antagonist. effects on the cell and the patient. Combined clinical staff conference at the national institutes of health.

Ann Intern Med 59, 931-956

Bittorf, T., Seiler, J., Zhang, Z., Jaster, R., and Brock, J. (1999).

SHP1 protein tyrosine phosphatase negatively modulates erythroid differentiation and suppression of apoptosis in J2E erythroleukemic cells.

Biol Chem 380[10], 1201-1209

Blakeslee, D. and Baines, M. G. (1976).

Immunofluorescence using dichlorotriazinylaminofluorescein (DTAF). I. Preparation and fractionation of labelled IgG.

J Immunol Methods 13[3-4], 305-320

Blom, W. M., De Bont, H. J., Meijerman, I., Kuppen, P. J., Mulder, G. J., and Nagelkerke, J. F. (1999).

Interleukin-2-activated natural killer cells can induce both apoptosis and necrosis in rat hepatocytes.

Hepatology 29[3], 785-792

Bone, H., Dechert, U., Jirik, F., Schrader, J. W., and Welham, M. J. (1997).

SHP1 and SHP2 protein-tyrosine phosphatases associate with betac after interleukin-3-induced receptor tyrosine phosphorylation. Identification of potential binding sites and substrates.

J Biol Chem 272[22], 14470-14476

Bortz, J., Lienert, G. A. (1998).

Kurzgefasste Statistik für die klinische Forschung.

Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 192-195

Bouwens, L., Baekeland, M., and Wisse, E. (1986).

Cytokinetic analysis of the expanding Kupffer-cell population in rat liver.

Cell Tissue Kinet 19[2], 217-226

Bouwens, L., Baekeland, M., De Zanger, R., and Wisse, E. (1986).

Quantitation, tissue distribution and proliferation kinetics of Kupffer cells in normal rat liver.

Hepatology 6[4], 718-722

Bouwens, L., De Bleser, P., Vanderkerken, K., Geerts, B., and Wisse, E. (1992).

Liver cell heterogeneity: functions of non-parenchymal cells.

Enzyme 46[1-3], 155-168

Bradford, M. M. (1976).

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.

Anal Biochem 72, 248-254

Brockdorff, J., Williams, S., Couture, C., and Mustelin, T. (1999).

Dephosphorylation of ZAP-70 and inhibition of T cell activation by activated SHP1.

Eur J Immunol 29[8], 2539-2550

Burt, A. D., Le Bail, B., Balabaud, C., and Bioulac-Sage, P. (1993).

Morphologic investigation of sinusoidal cells.

Semin Liver Dis 13[1], 21-38

Bystroff, C. and Kraut, J. (1991).

Crystal structure of unliganded Escherichia coli dihydrofolate reductase. Ligand-induced conformational changes and cooperativity in binding.

Biochemistry 30[8], 2227-2239

Charbonneau, H., Tonks, N. K., Kumar, S., Diltz, C. D., Harrylock, M., Cool, D. E., Krebs, E. G., Fischer, E. H., and Walsh, K. A. (1989).

Human placenta protein-tyrosine-phosphatase: amino acid sequence and relationship to a family of receptor-like proteins.

Proc Natl Acad Sci U S A 86[14], 5252-5256

Charbonneau, H. and Tonks, N. K. (1992).

1002 protein phosphatases?

Annu Rev Cell Biol 8, 463-493

Chin, H., Saito, T., Arai, A., Yamamoto, K., Kamiyama, R., Miyasaka, N., and Miura, O. (1997).

Erythropoietin and IL-3 induce tyrosine phosphorylation of CrkL and its association with Shc, SHP-2, and Cbl in hematopoietic cells.

Biochem Biophys Res Commun 239[2], 412-417

Chin, H., Wakao, H., Miyajima, A., Kamiyama, R., Miyasaka, N., and Miura, O. (1997).

Erythropoietin induces tyrosine phosphorylation of the interleukin-3 receptor beta subunit (betaIL3) and recruitment of Stat5 to possible Stat5-docking sites in betaIL3.

Blood 89[12], 4327-4336

Chu, E., Takimoto, C. H., Voeller, D., Grem, J. L., and Allegra, C. J. (1993).

Specific binding of human dihydrofolate reductase protein to dihydrofolate reductase messenger RNA in vitro.

Biochemistry 32[18], 4756-4760

Chu, E., Johnston, P. G., Takimoto, C. H., Politi, P. M., Grem, J. L., Chabner, B. A., and Allegra, C. J. (1993).

Antimetabolites.

Cancer Chemother Biol Response Modif 14, 1-25

Coggeshall, K. M., Nakamura, K., and Phee, H. (2002).

How do inhibitory phosphatases work?

Mol Immunol 39[9], 521-529

Coggeshall, K. M. (2002).

Negative signaling.

Mol Immunol 39[9], 519-520

Cook, J. D., Cichowicz, D. J., George, S., Lawler, A., and Shane, B. (1987).

Mammalian folylpoly-gamma-glutamate synthetase. 4. In vitro and in vivo metabolism of folates and analogues and regulation of folate homeostasis.

Biochemistry 26[2], 530-539

Cossette, L. J., Hoglinger, O., Mou, L., and Shen, S. H. (1996).

Localization and down-regulating role of the protein tyrosine phosphatase PTP2C in membrane ruffles of PDGF-stimulated cells.

Exp Cell Res 223[2], 459-466

Curt, G. A., Jolivet, J., Carney, D. N., Bailey, B. D., Drake, J. C., Clendeninn, N. J., and Chabner, B. A. (1985).

Determinants of the sensitivity of human small-cell lung cancer cell lines to methotrexate.

J Clin Invest 76[4], 1323-1329

Decker, K. (1990).

Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells).

Eur J Biochem 192[2], 245-261

Dini, L., Rossi, L., Lentini, A., De Martino, A., and Rotilio, G. (1995).

Immunocytochemical study of binding and internalization of carrier-free Cu, Zn Superoxide dismutase by cultured rat hepatocytes.

Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) 41[8], 1051-1059

Dini, L., Lentini, A., Diez, G. D., Rocha, M., Falasca, L., Serafino, L., and Vidal-Vanaclocha, F. (1995).

Phagocytosis of apoptotic bodies by liver endothelial cells.

J Cell Sci 108 (Pt 3), 967-973

Dixon, K. H., Lanpher, B. C., Chiu, J., Kelley, K., and Cowan, K. H. (1994).

A novel cDNA restores reduced folate carrier activity and methotrexate sensitivity to transport deficient cells.

J Biol Chem 269[1], 17-20

Elwood, P. C. (1989).

Molecular cloning and characterization of the human folate-binding protein cDNA from placenta and malignant tissue culture (KB) cells.

J Biol Chem 264[25], 14893-14901

Falini, B., Abdulaziz, Z., Gerdes, J., Canino, S., Ciani, C., Cordell, J. L., Knight, P. M., Stein, H., Grignani, F., and Martelli, M. F. (1986).

Description of a sequential staining procedure for double immunoenzymatic staining of pairs of antigens using monoclonal antibodies.

J Immunol Methods 93[2], 265-273

Feldmann, G., Scoazec, J. Y., Racine, L., and Bernuau, D. (1992).

Functional hepatocellular heterogeneity for the production of plasma proteins.

Enzyme 46[1-3], 139-154

Feng, G. S., Hui, C. C., and Pawson, T. (1993.)

SH2-containing phosphotyrosine phosphatase as a target of protein-tyrosine kinases.

Science 259[5101], 1607-1611

Fishman, W. H. (1990).

Alkaline phosphatase isozymes: recent progress.

Clin Biochem 23[2], 99-104

- Florio, T., Yao, H., Carey, K. D., Dillon, T. J., and Stork, P. J. (1999).
Somatostatin activation of mitogen-activated protein kinase via somatostatin receptor 1 (SSTR1).
Mol Endocrinol 13[1], 24-37
- Frangioni, J. V., Beahm, P. H., Shifrin, V., Jost, C. A., and Neel, B. G. (1992).
The nontransmembrane tyrosine phosphatase PTP-1B localizes to the endoplasmic reticulum via its 35 amino acid C-terminal sequence.
Cell 68[3], 545-560
- Freeman, R. M. Jr, Plutzky, J., and Neel, B. G. (1992).
Identification of a human src homology 2-containing protein-tyrosine-phosphatase: a putative homolog of Drosophila corkscrew.
Proc Natl Acad Sci U S A 89[23], 11239-11243
- Gadina, M., Stancato, L. M., Bacon, C. M., Larner, A. C., and O'Shea, J. J. (1998).
Involvement of SHP-2 in multiple aspects of IL-2 signaling: evidence for a positive regulatory role.
J Immunol 160[10], 4657-4661
- Gadina, M., Sudarshan, C., Visconti, R., Zhou, Y. J., Gu, H., Neel, B. G., and O'Shea, J. J. (2000).
The docking molecule gab2 is induced by lymphocyte activation and is involved in signaling by interleukin-2 and interleukin-15 but not other common gamma chain-using cytokines.
J Biol Chem 275[35], 26959-26966
- Glatt, H. R., Billings, R., Platt, K. L., and Oesch, F. (1981).
Improvement of the correlation of bacterial mutagenicity with carcinogenicity of benzo(a)pyrene and four of its major metabolites by activation with intact liver cells instead of cell homogenate.
Cancer Res 41[1], 270-277

Gressner, A. M. (1991).

Liver fibrosis: perspectives in pathobiochemical research and clinical outlook.

Eur J Clin Chem Clin Biochem 29[5], 293-311

Guan, K. L. and Dixon, J. E. (1991).

Evidence for protein-tyrosine-phosphatase catalysis proceeding via a cysteine-phosphate intermediate.

J Biol Chem 266[26], 17026-17030

Han, Y., Zhang, M., Li, N., Chen, T., Zhang, Y., Wan, T., Cao, X (2004)

KLRL1, a novel killer cell lectinlike receptor, inhibits natural killer cell cytotoxicity

Blood 104[9], 2858-66

Hendriks, H. F., Verhoofstad, W. A., Brouwer, A., de Leeuw, A. M., and Knook, D. L. (1985).

Perisinusoidal fat-storing cells are the main vitamin A storage sites in rat liver.

Exp Cell Res 160[1], 138-149

Henriksen, J. H., Horn, T., and Christoffersen, P. (1984).

The blood-lymph barrier in the liver. A review based on morphological and functional concepts of normal and cirrhotic liver.

Liver 4[4], 221-232

Hoffmeister, R. T. (1983).

Methotrexate therapy in rheumatoid arthritis: 15 years experience.

Am J Med 75[6A], 69-73

Hsu, S. M. and Raine, L. (1981).

Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry.

J Histochem Cytochem 29[11], 1349-1353

Hsu, S. M., Raine, L., and Fanger, H. (1981).

The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase techniques.

Am J Clin Pathol 75[6], 816-821

Hsu, S. M., Raine, L., and Fanger, H. (1981).

Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures.

J Histochem Cytochem 29[4], 577-580

Huennekens, F. M. (1968).

Folic acid coenzymes in the biosynthesis of purines and pyrimidines.

Vitam Horm 26, 375-394

Iredale, J. P. and Arthur, M. J. (1994).

Hepatocyte-matrix interactions.

Gut 35[6], 729-732

Ito, D., Back, T. C., Shakhov, A. N., Wiltrout, R. H., and Nedospasov, S. A. (1999).

Mice with a targeted mutation in lymphotoxin-alpha exhibit enhanced tumor growth and metastasis: impaired NK cell development and recruitment.

J Immunol 163[5], 2809-2815

Jackson, R. C. (1984).

Biological effects of folic acid antagonists with antineoplastic activity.

Pharmacol Ther 25[1], 61-82

Janossy, G., Thomas, J. A., Pizzolo, G., Granger, S. M., McLaughlin, J., Habeshaw, J. A., Stansfeld, A. G., and Sloane, J. (1980).

Immuno-histological diagnosis of lymphoproliferative diseases by selected combinations of antisera and monoclonal antibodies.

Br J Cancer 42[2], 224-242

Jungermann, K. and Katz, N. (1989).

Functional specialization of different hepatocyte populations.

Physiol Rev 69[3], 708-764

Jungermann, K. and Thurman, R. G. (1992).

Hepatocyte heterogeneity in the metabolism of carbohydrates.

Enzyme 46[1-3], 33-58

Jungermann, K. (1995).

Zonation of metabolism and gene expression in liver.

Histochem Cell Biol 103[2], 81-91

Kaplan, M. M. (1989).

Methotrexate treatment of chronic cholestatic liver diseases: friend or foe?

Q J Med 72[268], 757-761

Kaplan, M. M. (1989).

Medical treatment of primary biliary cirrhosis.

Semin Liver Dis 9[2], 138-143

Kaplan, M. M. (1989).

Chronic liver diseases: current therapeutic options.

Hosp Pract (Off Ed) 24[3], 111-3, 126

Katz, N. R. (1989).

Methods for the study of liver cell heterogeneity.

Histochem J 21[9-10], 517-529

Kawada, N., Tran-Thi, T. A., Klein, H., and Decker, K. (1993).

The contraction of hepatic stellate (Ito) cells stimulated with vasoactive substances. Possible involvement of endothelin 1 and nitric oxide in the regulation of the sinusoidal tonus.

Eur J Biochem 213[2], 815-823

Keefe, D. A., Capizzi, R. L., and Rudnick, S. A. (1982).

Methotrexate cytotoxicity for L5178Y/Asn- lymphoblasts: relationship of dose and duration of exposure to tumor cell viability.

Cancer Res 42[5], 1641-1645

Knook, D. L. and Sleyster, E. C. (1976).

Lysosomal enzyme activities in parenchymal and nonparenchymal liver cells isolated from young, adult and old rats.

Mech Ageing Dev 5[6], 389-398

Knook, D. L. (1977).

The role of lysosomal enzymes in protein degradation in different types of rat liver cells.

Acta Biol Med Ger 36[11-12], 1747-1752

Laemmli, U. K. (1970).

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

Nature 227[259], 680-685

Lau, K. H., Farley, J. R., and Baylink, D. J. (1989).

Phosphotyrosyl protein phosphatases.

Biochem J 257[1], 23-36

Li, W. W., Lin, J. T., Schweitzer, B. I., Tong, W. P., Niedzwiecki, D., and Bertino, J. R. (1992).

Intrinsic resistance to methotrexate in human soft tissue sarcoma cell lines.

Cancer Res 52[14], 3908-3913

- Linnell, J. C., Hoffbrand, A. V., Peters, T. J., and Matthews, D. M. (1971).
Chromatographic and bioautographic estimation of plasma cobalamins in various disturbances
of vitamin B12 metabolism.
Clin Sci 40[1], 1-16
- Lissoos, T. W., Beno, D. W., and Davis, B. H. (1992).
Hepatic fibrogenesis and its modulation by growth factors.
J Pediatr Gastroenterol Nutr 15[3], 225-231
- Lissoos, T. W. and Davis, B. H. (1992).
Pathogenesis of hepatic fibrosis and the role of cytokines.
J Clin Gastroenterol 15[1], 63-67
- Lu, X., Qu, C. K., Shi, Z. Q., and Feng, G. S. (1998).
Downregulation of platelet-derived growth factor receptor-beta in Shp-2 mutant fibroblast cell
lines.
Oncogene 17[4], 441-448
- Lukomska, B., Ruffa, T., Olszewski, L., and Engeset, A. (1983).
Natural killer lymphocytes in rat liver sinusoidal blood.
Lymphology 16[4], 202-208
- Magnusson, S. and Berg, T. (1989).
Extremely rapid endocytosis mediated by the mannose receptor of sinusoidal endothelial rat
liver cells.
Biochem J 257[3], 651-656
- Mauro, L. J. and Dixon, J. E. (1994).
'Zip codes' direct intracellular protein tyrosine phosphatases to the correct cellular 'address'.
Trends Biochem Sci 19[4], 151-155

McDonald, C. J. (1981).

The uses of systemic chemotherapeutic agents in psoriasis.

Pharmacol Ther 14[1], 1-24

McGuire, R. F., Bissell, D. M., Boyles, J., and Roll, F. J. (1992).

Role of extracellular matrix in regulating fenestrations of sinusoidal endothelial cells isolated from normal rat liver.

Hepatology 15[6], 989-997

Minami, S., Furui, J., and Kanematsu, T. (2001).

Role of carcinoembryonic antigen in the progression of colon cancer cells that express carbohydrate antigen.

Cancer Res 61[6], 2732-2735

Mishra, A. K., Zhang, A., Niu, T., Yang, J., Liang, X., Zhao, Z. J., and Zhou, G. W. (2002.)

Substrate specificity of protein tyrosine phosphatase: differential behavior of SHP-1 and SHP-2 towards signal regulation protein SIRPalpha1.

J Cell Biochem 84[4], 840-846

Misra, U. K., Bradford, B. U., Handler, J. A., and Thurman, R. G. (1992).

Chronic ethanol treatment induces H₂O₂ production selectively in pericentral regions of the liver lobule.

Alcohol Clin Exp Res 16[5], 839-842

Olcese, L., Lang, P., Vely, F., Cambiaggi, A., Marguet, D., Blery, M., Hippen, K. L.,

Biassoni, R., Moretta, A., Moretta, L., Cambier, J. C., and Vivier, E. (1996).

Human and mouse killer-cell inhibitory receptors recruit PTP1C and PTP1D protein tyrosine phosphatases.

J Immunol 156[12], 4531-4534

Paessler, M., Kossev, P., Tsai, D., Raghunath, P., Majewski, M., Zhang, Q., Ramalingam, P., Schuster, S., Tomaszewski, J., Arber, D. A., Hsi, E., and Wasik, M. A. (2002).

Expression of SHP-1 phosphatase indicates post-germinal center cell derivation of B-cell posttransplant lymphoproliferative disorders.

Lab Invest 82[11], 1599-1606

Paling, N. R. and Welham, M. J. (2002).

Role of the protein tyrosine phosphatase SHP-1 (Src homology phosphatase-1) in the regulation of interleukin-3-induced survival, proliferation and signalling.

Biochem J 368[Pt 3], 885-894

Patel, Y. C., Greenwood, M., Panetta, R., Hukovic, N., Grigorakis, S., Robertson, L. A., and Srikant, C. B. (1996).

Molecular biology of somatostatin receptor subtypes.

Metabolism 45[8 Suppl 1], 31-38

Pauletti, G., Lai, E., and Attardi, G. (1990).

Early appearance and long-term persistence of the submicroscopic extrachromosomal elements (amplisomes) containing the amplified DHFR genes in human cell lines.

Proc Natl Acad Sci U S A 87[8], 2955-2959

Plutzky, J., Neel, B. G., and Rosenberg, R. D. (1992).

Isolation of a src homology 2-containing tyrosine phosphatase.

Proc Natl Acad Sci U S A 89[3], 1123-1127

Poggi, A. and Mingari, M. C. (1995).

Development of human NK cells from the immature cell precursors.

Semin Immunol 7[2], 61-66

Qi, J. H., Ito, N., and Claesson-Welsh, L. (1999).

Tyrosine phosphatase SHP-2 is involved in regulation of platelet-derived growth factor-induced migration.

J Biol Chem 274[20], 14455-14463

Qu, C. K. (2002).

Role of the SHP-2 tyrosine phosphatase in cytokine-induced signaling and cellular response.

Biochim Biophys Acta 1592[3], 297-301

Ram, P. A. and Waxman, D. J. (1997).

Interaction of growth hormone-activated STATs with SH2-containing phosphotyrosine phosphatase SHP-1 and nuclear JAK2 tyrosine kinase.

J Biol Chem 272[28], 17694-17702

Rappaport, A. M. (1976).

The microcirculatory acinar concept of normal and pathological hepatic structure.

Beitr Pathol 157[3], 215-243

Rausch, O. and Marshall, C. J. (1997).

Tyrosine 763 of the murine granulocyte colony-stimulating factor receptor mediates Ras-dependent activation of the JNK/SAPK mitogen-activated protein kinase pathway.

Mol Cell Biol 17[3], 1170-1179

Reinke, P. and David, H. (1987).

[Structure and function of the sinusoidal wall of the liver ("the perisinusoidal functional unit"). A review].

Z Mikrosk Anat Forsch 101[1], 91-136

Rivard, N., McKenzie, F. R., Brondello, J. M., and Pouyssegur, J. (1995).

The phosphotyrosine phosphatase PTP1D, but not PTP1C, is an essential mediator of fibroblast proliferation induced by tyrosine kinase and G protein-coupled receptors.

J Biol Chem 270[18], 11017-11024

Roche, S., McGlade, J., Jones, M., Gish, G. D., Pawson, T., and Courtneidge, S. A. (1996). Requirement of phospholipase C gamma, the tyrosine phosphatase Syp and the adaptor proteins Shc and Nck for PDGF-induced DNA synthesis: evidence for the existence of Ras-dependent and Ras-independent pathways.

EMBO J 15[18], 4940-4948

Rockey, D. C. and Chung, J. J. (1995).

Inducible nitric oxide synthase in rat hepatic lipocytes and the effect of nitric oxide on lipocyte contractility.

J Clin Invest 95[3], 1199-1206

Rohen, J. W. und Lütjen-Decroll E.

Funktionelle Histologie des Menschen

Schattauer Verlag, 3. Auflage 1990

Ronnstrand, L., Arvidsson, A. K., Kallin, A., Rorsman, C., Hellman, U., Engstrom, U., Wernstedt, C., and Heldin, C. H. (1999).

SHP-2 binds to Tyr763 and Tyr1009 in the PDGF beta-receptor and mediates PDGF-induced activation of the Ras/MAP kinase pathway and chemotaxis.

Oncogene 18[25], 3696-3702

Saito, S., Hashimoto, N., Tokita, K., Toyoda, M., Suzuki, Y., Goldstein, B. J., Suzuki, H., Makino, H., and Saito, Y. (1996).

Changes of expressions of phosphotyrosine phosphatases in rat hepatocellular carcinoma induced by 3'-methyl-4-dimethylamino-azobenzene.

Biochem Biophys Res Commun 227[2], 406-412

Sakamoto, M., Ueno, T., Sugawara, H., Torimura, T., Tsuji, R., Sujaku, K., Sata, M., and Tanikawa, K. (1997).

Relaxing effect of interleukin-1 on rat cultured Ito cells.

Hepatology 25[6], 1412-1417

Sasaki, R. (2003).

Pleiotropic functions of erythropoietin.

Intern Med 42[2], 142-149

Schweitzer, B. I., Srimatkandada, S., Gritsman, H., Sheridan, R., Venkataraghavan, R., and Bertino, J. R. (1989).

Probing the role of two hydrophobic active site residues in the human dihydrofolate reductase by site-directed mutagenesis.

J Biol Chem 264[34], 20786-20795

Seglen, P. O. (1973).

Preparation of rat liver cells. 3. Enzymatic requirements for tissue dispersion.

Exp Cell Res 82[2], 391-398

Seglen, P. O. (1973).

Preparation of rat liver cells. II. Effects of ions and chelators on tissue dispersion.

Exp Cell Res 76[1], 25-30

Sharlow, E. R., Pacifici, R., Crouse, J., Batac, J., Todokoro, K., and Wojchowski, D. M. (1997).

Hematopoietic cell phosphatase negatively regulates erythropoietin-induced hemoglobinization in erythroleukemic SKT6 cells.

Blood 90[6], 2175-2187

Shen, S. H., Bastien, L., Posner, B. I., and Chretien, P. (1991).

A protein-tyrosine phosphatase with sequence similarity to the SH2 domain of the protein-tyrosine kinases.

Nature 352[6337], 736-739

Shi, S. R., Key, M. E., and Kalra, K. L. (1991).

Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections.

J Histochem Cytochem 39[6], 741-748

Srimatkandada, S., Schweitzer, B. I., Moroson, B. A., Dube, S., and Bertino, J. R. (1989).

Amplification of a polymorphic dihydrofolate reductase gene expressing an enzyme with decreased binding to methotrexate in a human colon carcinoma cell line, HCT-8R4, resistant to this drug.

J Biol Chem 264[6], 3524-3528

Stahlberg, K. G., Radner, S., and Norden, A. (1967).

Liver B12 in subjects with and without vitamin B12 deficiency. A quantitative and qualitative study.

Scand J Haematol 4[4], 312-330

Stark, G. R. and Wahl, G. M. (1984).

Gene amplification.

Annu Rev Biochem 53, 447-491

Stebbing, C. C. Watzl, C., Billadeau, D. D., Leibson, P. J., Burshtyn, D. N. and Long, E. O. (2003).

Vav1 dephosphorylation by tyrosine phosphatase SHP-1 as a mechanism for inhibition of cellular cytotoxicity.

Mol. Cell Biol. 23[17], 6291-9

Steinberg, S. E., Campbell, C. L., and Hillman, R. S. (1979).

Kinetics of the normal folate enterohepatic cycle.

J Clin Invest 64[1], 83-88

Strack, V., Krutzfeldt, J., Kellerer, M., Ullrich, A., Lammers, R., and Haring, H. U. (2002).
The Protein-tyrosine-phosphatase SHP2 is phosphorylated on serine residues 576 and 591 by
protein kinase C isoforms alpha, beta 1, beta 2, and eta.
Biochemistry 41[2], 603-608

Suematsu, M., Oda, M., Suzuki, H., Kaneko, H., Watanabe, N., Furusho, T., Masushige, S.,
and Tsuchiya, M. (1993).
Intravital and electron microscopic observation of Ito cells in rat hepatic microcirculation.
Microvasc Res 46[1], 28-42

Szantova, M. and Kupcova, V. (1999).
[Biochemical markers of fibrogenesis in liver diseases].
Bratisl Lek Listy 100[1], 28-35

Tauchi, T., Feng, G. S., Shen, R., Song, H. Y., Donner, D., Pawson, T., and Broxmeyer, H. E.
(1994).
SH2-containing phosphotyrosine phosphatase Syp is a target of p210bcr-abl tyrosine kinase.
J Biol Chem 269[21], 15381-15387

Tian, S. S., Tsoulfas, P., and Zinn, K. (1991).
Three receptor-linked protein-tyrosine phosphatases are selectively expressed on central
nervous system axons in the Drosophila embryo.
Cell 67[4], 675-680

Tonks, N. K., Diltz, C. D., and Fischer, E. H. (1988).
Purification of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta.
J Biol Chem 263[14], 6722-6730

Toth, C. A. and Thomas, P. (1992).

Liver endocytosis and Kupffer cells.

Hepatology 16[1], 255-266

Trippett, T., Schlemmer, S., Elisseyeff, Y., Goker, E., Wachter, M., Steinherz, P., Tan, C., Berman, E., Wright, J. E., and Rosowsky, A. (1992).

Defective transport as a mechanism of acquired resistance to methotrexate in patients with acute lymphocytic leukemia.

Blood 80[5], 1158-1162

Tsukamoto, H. (1999).

Cytokine regulation of hepatic stellate cells in liver fibrosis.

Alcohol Clin Exp Res 23[5], 911-916

Valnes, K. and Brandtzaeg, P. (1984).

Paired indirect immunoenzyme staining with primary antibodies from the same species.

Application of horseradish peroxidase and alkaline phosphatase as sequential labels.

Histochem J 16[5], 477-487

Van Berkel, T. J., De Rijke, Y. B., and Kruijt, J. K. (1991).

Different fate in vivo of oxidatively modified low density lipoprotein and acetylated low density lipoprotein in rats. Recognition by various scavenger receptors on Kupffer and endothelial liver cells.

J Biol Chem 266[4], 2282-2289

Vanderkerken, K., Bouwens, L., De Neve, W., Van den Berg, K., Baekeland, M., Delens, N., and Wisse, E. (1993).

Origin and differentiation of hepatic natural killer cells (pit cells).

Hepatology 18[4], 919-925

Vanderkerken, K., Bouwens, L., Van Rooijen, N., Van den Berg, K., Baekeland, M., and Wisse, E. (1995).

The role of Kupffer cells in the differentiation process of hepatic natural killer cells.
Hepatology 22[1], 283-290

Vogel, W., Lammers, R., Huang, J., and Ullrich, A. (1993).

Activation of a phosphotyrosine phosphatase by tyrosine phosphorylation.
Science 259[5101], 1611-1614

Vyas, Y. M., Maniar H., Lyddane C. E., Sadelain M., Dupont B (2004)

Ligand binding to inhibitory killer cell Ig-like receptors induce colocalisation with Src homology domain 2-containing protein tyrosine phosphatase 1 and interruption of ongoing activation signals

J Immunol 173[3], 1571-8

Wake, K. (1980).

Perisinusoidal stellate cells (fat-storing cells, interstitial cells, lipocytes), their related structure in and around the liver sinusoids, and vitamin A-storing cells in extrahepatic organs.
Int Rev Cytol 66, 303-353

Walton, K. M. and Dixon, J. E. (1993).

Protein tyrosine phosphatases.
Annu Rev Biochem 62, 101-120

Wang, G. L. and Semenza, G. L. (1996).

Molecular basis of hypoxia-induced erythropoietin expression.
Curr Opin Hematol 3[2], 156-162

Weissbach, H. and Taylor, R. T. (1968).

Metabolic role of vitamin B12.
Vitam Horm 26, 395-412

Werner, M., Von Wasielewski, R., and Komminoth, P. (1996).

Antigen retrieval, signal amplification and intensification in immunohistochemistry.

Histochem Cell Biol 105[4], 253-260

Wheadon, H., Paling, N. R., and Welham, M. J. (2002).

Molecular interactions of SHP1 and SHP2 in IL-3-signalling.

Cell Signal 14[3], 219-229

White, E. D., Andrews, R. P., and Hershey, G. K. (2001).

Sulfhydryl-2 domain-containing protein tyrosine phosphatase-1 is not a negative regulator of interleukin-4 signaling in murine mast cells.

J Leukoc Biol 69[5], 825-830

Wisse, E., van't Noordende, J. M., van der Meulen, J., and Daems, W. T. (1976).

The pit cell: description of a new type of cell occurring in rat liver sinusoids and peripheral blood.

Cell Tissue Res 173[4], 423-435

Wisse, E., Luo, D., Vermijlen, D., Kanellopoulou, C., De Zanger, R., and Braet, F. (1997).

On the function of pit cells, the liver-specific natural killer cells.

Semin Liver Dis 17[4], 265-286

Wong, C., Faiola, B., Wu, W., and Kennelly, P. J. (1993).

Phosphohistidine and phospholysine phosphatase activities in the rat: potential protein-lysine and protein-histidine phosphatases?

Biochem J 296 (Pt 2), 293-296

Xu, F., Xu, M. J., Zhao, R., Guerrah, A., Zeng, F., and Zhao, Z. J. (2002).

Tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2 are associated with distinct tyrosine-phosphorylated proteins.

Exp Cell Res 272[1], 75-83

Yamashita, M., Dimayuga, P., Kaul, S., Shah, P. K., Regnstrom, J., Nilsson, J., and Cercek, B. (1999).

Phosphatase activity in the arterial wall after balloon injury: effect of somatostatin analog octreotide.

Lab Invest 79[8], 935-944

Yang, W., Tabrizi, M., and Yi, T. (2002).

A bipartite NLS at the SHP-1 C-terminus mediates cytokine-induced SHP-1 nuclear localization in cell growth control.

Blood Cells Mol Dis 28[1], 63-74

Yeung, Y. G., Berg, K. L., Pixley, F. J., Angeletti, R. H., and Stanley, E. R. (1992).

Protein tyrosine phosphatase-1C is rapidly phosphorylated in tyrosine in macrophages in response to colony stimulating factor-1.

J Biol Chem 267[33], 23447-23450

You, M., Flick, L. M., Yu, D., and Feng, G. S. (2001).

Modulation of the nuclear factor kappa B pathway by Shp-2 tyrosine phosphatase in mediating the induction of interleukin (IL)-6 by IL-1 or tumor necrosis factor.

J Exp Med 193[1], 101-110

Yu, C. L., Jin, Y. J., and Burakoff, S. J. (2000).

Cytosolic tyrosine dephosphorylation of STAT5. Potential role of SHP-2 in STAT5 regulation.

J Biol Chem 275[1], 599-604

Yu, Z., Su, L., Hoglinger, O., Jaramillo, M. L., Banville, D., and Shen, S. H. (1998).

SHP-1 associates with both platelet-derived growth factor receptor and the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase.

J Biol Chem 273[6], 3687-3694

Yusa, S. and Campbell, K. S. (2003).

Src homology region 2-containing protein tyrosine phosphatase-2 (SHP-2) can play a direct role in the inhibitory function of killer cell Ig-like receptor in human NK cells.

J Immunol 170[9], 4539-47

Zhang, Q., Raghunath, P. N., Vonderheid, E., Odum, N., and Wasik, M. A. (2000).

Lack of phosphotyrosine phosphatase SHP-1 expression in malignant T-cell lymphoma cells results from methylation of the SHP-1 promoter.

Am J Pathol 157[4], 1137-1146

Zhang S. Q., Yang, W., Kontaridis, M. I., Bivona, T. G., Wen, G., Araki, T., Luo, J., Thompson, J. A., Schraven, B. L., Philips, M. R., Neel, B. G. (2004)

Shp2 regulates Src family kinase activity and Ras/Erk activation by controlling Csk recruitment

Mol cell 13, 341-355

Zhao, Z., Shen, S. H., and Fischer, E. H. (1994).

Phorbol ester-induced expression, phosphorylation, and translocation of protein-tyrosine-phosphatase 1C in HL-60 cells.

Proc Natl Acad Sci U S A 91[11], 5007-5011

Zheng, C. F. and Guan, K. L. (1993).

Dephosphorylation and inactivation of the mitogen-activated protein kinase by a mitogen-induced Thr/Tyr protein phosphatase.

J Biol Chem 268[22], 16116-16119

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Frau PD Dr. Monika Wimmer-Röll für die Überlassung des Themas und die hervorragende und ausdauernde Betreuung in allen Arbeitsphasen sowie für ihre stete Bereitschaft, mit zeitlichem Engagement und konstruktiven Anregungen für das reibungslose Fortkommen der Arbeit Sorge zu tragen.

Herrn Prof. Dr. W. Hofer danke ich für die zur Verfügung gestellten Antikörper sowie für die Durchführung der Aktivitätsbestimmungen und der SDS-Pages.

Herrn PD Dr. P. Steinberg möchte ich für die Hilfe bei der Endothel- und Kupffer-Zellen - Elutriation und für die Zur-Verfügung-Stellung seines Labors in Mainz danken.

Einen nicht unerheblichen Anteil am Gelingen dieser Arbeit haben die MTA`s des Instituts für Anatomie und Zellbiologie der Universität Gießen, insbesondere Frau Claudia Tag. Ohne ihre Unterstützung wäre das Erlernen der einzelnen Methoden und die Durchführung der Arbeit nur schwer möglich gewesen.

Nicht zuletzt liegt dem Erfolg dieser Arbeit die Unterstützung durch meine Frau Sandra, meiner Familie in Maintal, Reutlingen und Hannover sowie all meiner Freunde zu Grunde. Sie hatten für Erfolg und Misserfolg, für Freude und Frustration bei meiner Arbeit immer ein offenes Ohr und standen mir immer verständnisvoll, motivierend und liebevoll zur Seite. In stillem Gedenken sei hier vor allen Dingen meine Mutter genannt.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Guido Peter Kaiser
Geburtsdatum 29.10.1970
Geburtsort Frankfurt/Main
Staatsbürgerschaft deutsch
Familienstand verheiratet, zwei Kinder

Schulbildung

1977-1981 Grundschule Maintal
1981-1983 Dietrich-Bonhoeffer-Schule Maintal
1983-1990 Hohe Landesschule Hanau
Juni 1990 Abitur

1990-1991 Wehrdienst: Sanitätsbataillon 2, Marburg
1991-1992 Freiwilliges soziales Jahr:
St.-Vinzenz-Krankenhaus Hanau

Studium

1992-1998 Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität
Gießen
März 1993 Ärztliche Vorprüfung
August 1994 Erste ärztliche Prüfung
April 1997 Zweite ärztliche Prüfung
1997-1998 Praktisches Jahr am Kreiskrankenhaus Bad Hersfeld,
Lehrkrankenhaus der Universität Gießen. Wahlfach: Pädiatrie
Oktober 1998 Dritte ärztliche Prüfung
August 2000 Approbation
September 2004 Facharzt für Chirurgie

Berufliche Tätigkeit

1998-2000 Arzt im Praktikum an der Berufsgenossenschaftlichen
Unfallklinik und Eberhard-Karls-Universität Tübingen
Ärztliche Leitung: Univ. Prof. Dr. med. K. Weise
2000-2001 Assistenzarzt am Herzzentrum Dresden
Ärztliche Leitung: Univ. Prof. Dr. med. S. Schüler
Seit 2001 Assistenzarzt am Kreiskrankenhaus Reutlingen, Lehrkrankenhaus
der Universität Tübingen.
Ärztliche Leitung: Bis 2003 Prof. Dr. med. W. Padberg
Ab 2003 Prof. Dr. med. T. Zimmermann