

Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Die Rolle der Proteinkinase D in der Leberzirrhose

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr.med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Franziska Brunner, geb. Schmeil

geboren am 04.04.1989 in Halle/Saale

Betreuer: Prof. Dr.med Alexander Zipprich

Gutachter/Gutachterin: 1. Prof. Dr. Alexander Zipprich

2. Prof. Dr. Rüdiger Horstkorte

3. Prof. Dr. Matthias Dollinger, Landshut

14.01.2020

27.01.2021

Für Heike Reichmeister *05.03.1967 †05.09.2010

Referat

Die Leberzirrhose ist der Endzustand vieler Lebererkrankungen. Sie ist charakterisiert durch einen fibrotischen Umbau des Lebergewebes und die Bildung von Regeneratknoten. Pathomechanismen in der Leberfibrose beinhalten die Fibroseinduktion durch Hypoxie und Inflammation, verbunden mit Wachstumsfaktoren und Angiogenese. Auf zellulärer Ebene spielt die hepatische Sternzelle eine zentrale Rolle in der Fibrose- und Zirrhoseentstehung. Sie produziert im aktivierten Zustand pro-angiogenetische, pro-fibrotische und pro-inflammatorische Faktoren, die auf der einen Seite parakrin ihre eigene Aktivität erhöhen und andererseits das umgebende Milieu aus immunologischen Zellen und Endothelzellen in ihrer Funktion verändern und so das Voranschreiten der Fibrose zur Zirrhose verursachen.

Die Proteinkinase D, eine Seronin-/Threoninkinase der CaMK-Gruppe mit 3 Isoformen in Säugetieren, konnte in den letzten Jahren als neuer Mediator in vielen wichtigen Zellfunktionen identifiziert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die PKD-Familie eine Rolle in der Zellproliferation, dem Zellüberleben, der Zellmigration, Zellpolarität, dem Vesikeltransport vom Golgiapparat zur Zellmembran, in der immunologischen Regulation, sowie in der Angiogenese spielt.

Viele dieser Funktionen der PKD-Familie spielen eine zentrale Rolle in der Entstehung der Leberfibrose und Zirrhose. Die Bedeutung der PKD ist allerdings bisher im Zusammenhang mit der Entstehung einer Leberzirrhose nicht untersucht. Diese Arbeit zeigt zum ersten Mal mittels Western Blot, dass die Proteinkinase D 1,2 und 3 in Lebervolllysaten, sowie in primären Sternzellen der Ratte exprimiert und bei unterschiedlichen Zirrhosegraden in ihrer Expression moduliert werden. Besonders in der hepatischen Sternzelle konnten wir eine erhöhte Aktivität von PKD2 bei vermehrter Fibrose feststellen und konnten mit Hilfe einer Zelllinie und primären Rattensternzellen Hypoxie als möglichen auslösenden Faktor identifizieren.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die PKD-Familie und besonders PKD2 ein Element in der Zirrhoseentstehung und Voranschreiten der Fibrose darstellt.

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis Abkürzungen und Symbole	III
1 Einleitung	- 1 -
1.1 Leberzirrhose	- 1 -
1.1.1 Die Bedeutung der Leberzirrhose	- 1 -
1.1.2 Molekulare Mechanismen der Entstehung	- 2 -
1.2 Die hepatische Sternzelle.....	- 4 -
1.2.1 Rolle in der Zirrhoseentstehung	- 4 -
1.2.2 Molekulare Pathogenese.....	- 5 -
1.3 Proteinkinase D.....	- 8 -
1.3.1 Aufbau.....	- 8 -
1.3.2 Funktion.....	- 10 -
1.4 Zielstellung	- 16 -
2 Material und Methoden	- 17 -
2.1 Material	- 17 -
2.2 Methoden.....	- 17 -
2.2.1 Induktion der Zirrhose und Organentnahme	- 17 -
2.2.2 Zelllinien.....	- 18 -
2.2.3 Sternzellseparation.....	- 19 -
2.2.4 Hypoxieversuch	- 20 -
2.2.5 Proteinbestimmung nach der BCA Methode (Lowry 1951)	- 20 -
2.2.6 Western Blot - Tank Blot (Mahmood und Yang 2012).....	- 21 -
2.2.7 Statistik	- 22 -
3 Ergebnisse	- 23 -
3.1 Die Proteinkinase D in Gesamtleberlysaten	- 23 -
3.2 PKD-Expression in primären Sternzellen.....	- 26 -
3.3 PKD-Expression unter Hypoxie	- 30 -
3.3.1 PKD-Expression in HSC-B unter Hypoxie.....	- 31 -
3.3.2 PKD-Expression in primären Sternzellen unter Hypoxie.....	- 34 -
4 Diskussion.....	- 38 -
4.1 Rolle der PKD in der Leber	- 38 -
4.2 Rolle der PKD in primären Sternzellen.....	- 39 -
4.3 Einfluss von Hypoxie auf die PKD in Sternzellen	- 42 -

4.4	Limitation und Ausblick	- 43 -
5	Zusammenfassung	- 45 -
6	Anhang	- 47 -
7	Literatur	- 59 -
8	Thesen	- 70 -
9	Abbildungsverzeichnis	- 71 -
10	Tabellenverzeichnis	- 72 -

Verzeichnis Abkürzungen und Symbole

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
AM	Antimouse
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AR	Antirabbit
ARF-1	ADP-Ribosylationsfaktor 1
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Bovinesserumalbumin
c	Konzentration
CaMK	Kalzium-/Calmodulin abhängige Proteinkinase
CCl4	Tetrachlormethan
CERT	Ceramid-Transfer-Protein
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CREB	cAMP responsive element binding protein
CRM1	Exportin 1
CXCR-3	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 3, CD 183
DAB	3,3 Diaminabenzidin
DAG	Diacylglycerol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ECL	Entry-level Peroxidase
EDTA	Ethylendiamintetraacetic Acid
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EMT	epitheliale-mesenchymale Transformation
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ERK	Extracellular-signal regulated Kinase
ET-1	Endothelin-1
FGF	Fibroblasten Growth Faktor
FGFR	Fibroblasten Growth Faktor Rezeptor
FKS	Fetales Kälberserum
FLIP	fluorescence loss in photobleaching

G	Fallbeschleunigung
g	Gramm
GBSS	Grey's balanced salt solution
GIT1	G-Protein-coupled Receptor kinase-interacting Protein 1
GPCR	G-Protein coupled Receptors
GSK3 β	Glykogensynthasekinase 3 beta
h	Stunden
HCC	Heptozelluläres Karzinom
HDAC	Histondeacetylase
HIF	Hypoxia-Inducible Factors
HRP	Horseradish Peroxidase
HSC	Hepatische Sternzelle
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cell
IFN	Interferon
IFNAR 1	Interferonrezeptor 1
IgE	Immunglobulin der Klasse E
IgG	Immunglobuline der Klasse G
IKK-Komplex	I κ B Kinase Komplex
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
IPP	Immunpräzipitationspuffer
JNK	C-Jun-N-terminale Kinase
kDa	Kilodalton
l	Liter
LPA	Lysophosphatidyl-Säure
LPS	Lipopolysaccharide
mA	Milliamper
MAP-Kinase	Mitogen-activated Protein Kinase
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MEF 2	Myocyte enhancer factor 2
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MMP	Matrixmetalloproteinase
MnSOD	Manganes-abhängige Superoxiddismutase
MP	Milchpulver

n	Menge
NFκB	Nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B-cells
NR4A1	Nervenwachstumsfaktor IB
nur77	Orphan steroid nuclear receptor
O ₂	Sauerstoff
OSPB	Outer surface protein B
PBS	Phosphate buffered saline
PDGF	Platelet derived growth factor
pHSC	Primäre hepatische Sternzelle
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PI4KIIIβ	Phosphatidylinositol 4 Kinase IIIβ
PKC	Proteinkinase C
PKD	Proteinkinase D
PLC	Phospholipase C
PLGF	Plazentawachstumsfaktor
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RIN1	Ras and Rab Interactor 1
ROS	Reactive oxgen species
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standard Error of the Mean
SOD2	Superoxiddismutase 2
TBST	Tris-Buffered Saline and Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF-β	Transforming Growth Factor β
TGN	Transgolginetzwerk
TIMP	Tissue Inhibitor Matrixmetalloproteinase
TNFα	Tumor necrosis Faktor alfa
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	Octylphenylpoly(ethylenglykoether)
V	Volt
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor
Vps34	Phosphatidylinositol-3-Kinase

1 Einleitung

1.1 Leberzirrhose

1.1.1 Die Bedeutung der Leberzirrhose

Im Jahr 2013 verstarben 15 von 100.000 Einwohnern in Deutschland an einer Erkrankung der Leber, davon allein 7808 an den Folgen und Komplikationen einer äthyltoxischen Leberzirrhose. In der Gesamttodesstatistik der Bundesrepublik gehört die Fibrose und die Zirrhose der Leber zu den Top 40 Todesursachen seit mehreren Jahren (Gesundheitsberichterstattung des Bundes 25.03.2015 26.11.2014). Leider gibt es bis heute mit Ausnahme der Lebertransplantation keine kausale Therapie für Patienten mit einer chronischen Lebererkrankung im Endstadium, die das Überleben der Patienten langfristig verbessert (D'Amico et al. 2006; Merion et al. 2005). Daher ist ein weiteres Verstehen der molekularbiologischen Mechanismen für diese Erkrankung von großer Bedeutung und Dringlichkeit. Als Leberzirrhose wird der Endzustand der Leberfibrose von chronisch hepatischen Erkrankungen unterschiedlicher Ätiologie zusammengefasst. Sie ist charakterisiert durch die Bildung sogenannter Regeneratknoten im Parenchym mit Bildung von fibrotischen Septen, welche die physiologische Organ- und Gefäßstruktur zerstören und die Funktionsfähigkeit der Leber einschränken (Novo et al. 2014). Als häufigste Ursachen für eine Leberzirrhose kommen neben dem Alkoholmissbrauch und chronisch viralen Hepatitiden, auch autoimmune Lebererkrankungen, metabolische Störungen (Diabetes mellitus, Adipositas) und genetische Erkrankungen (Hämochromatose, M.Wilson) in Frage (Mormone et al. 2011).

Akute oder chronische toxische Stimuli auf das Lebergewebe führen zunächst zu einer inflammatorischen Reaktion, bei der es zu einem nekrotischen und apoptotischen Verlust der Hepatozyten kommt. Die damit verbundene Lyse der Zellen bedingt die Freisetzung von Mediatoren, welche für die Infiltration von Immunzellen (v.a. Monozyten) und die Aktivierung der hepatischen Sternzelle zu einer myofibroblasten-ähnlichen Zelle sorgen. Zusätzlich kommt es auch zu klassischen Wundheilungsreaktionen mit aktivierten Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten, welche wiederum die Einwanderung von T-Lymphozyten und Monozyten und somit das klassische Bild einer akuten Entzündung bedingen (Heymann und Christian Trautwein and Frank Tacke 2009). Bei fortschreitendem toxischem Reiz werden kontinuierlich Entzündungszellen rekrutiert. Es kommt zu einem Untergang der Hepatozyten und einer vermehrten Kollagenablagerung (Tacke und Weiskirchen 2010).

1.1.2 Molekulare Mechanismen der Entstehung

Als Fibrose versteht man die Vernarbung der Leber als Wundheilungsreaktion. Dabei ist eine Vielzahl von Zellen und Zytokinen beteiligt (Friedman 2008). Durch den Untergang der Hepatozyten oder die Einwanderung von inflammatorischen Zellen werden die etablierten Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte zerstört und neue, die Fibrose unterstützende bilden sich aus (Mormone et al. 2011). Es kommt vor allem zu Veränderungen im Bereich der extrazellulären Matrix und im Raum von Disse. Im Rahmen der Fibrose setzt sich die extrazelluläre Matrix vor allem aus fibrillärem Kollagen I und III, sowie Proteoglykanen, Fibronectin und Hyaluronsäure zusammen (George et al. 2004). Ein wichtiger Triggerfaktor zur Ausbildung der Fibrose ist die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Diese bedingen im Lebergewebe über die Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden und Transkriptionsfaktoren wie JNK und NFκB die erhöhte Regulation von fibrose-aktivierenden Genen wie COL1A1, COL1A2, MCP1, TIMP1 (Bataller und Brenner 2005). Eine weitere wichtige Rolle in der Entstehung der Fibrose ist das Ungleichgewicht aus Matrix-Metalloproteinasen und Metallopeptidase-Inhibitoren (Mormone et al. 2011). Der Mediator mit dem höchsten pro-fibrogenetischem Potential ist TGF-β mit vielseitigen Wirkungsmöglichkeiten. Neben der Aktivierung und Transdifferenzierung von hepatischen Sternzellen zu Myofibroblasten, steigert es die Expression der extrazellulären Matrix und hemmt gleichzeitig den Abbau durch Matrixmetalloproteinasen. Außerdem befeuert es die Apoptose der Hepatozyten und hemmt die Leberzellproliferation (Tacke und Weiskirchen 2010). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass TGF-β auch in der epithelialen-mesenchymalen Transformation von Hepatozyten zu Fibroblasten eine Rolle zu spielen scheint (Zeisberg et al. 2007). Ein anderer wichtiger Wachstumsfaktor im Rahmen der Fibrose ist der Platelet-derived Growth-Factor (PDGF). Er stimuliert die Proliferation aktivierter hepatischer Sternzellen und erhöht damit die zur Sekretion von extrazellulärer Matrix befähigten Zellen (Tacke und Weiskirchen 2010).

Die Angiogenese ist ein durch Hypoxie stimulierter und durch Wachstumsfaktoren abhängiger Prozess. Er bedingt die Bildung von neuen Blutgefäßen aus bereits vor bestehenden Blutgefäßen. Dieser Prozess tritt auch bei chronischen Leberschäden auf und ist eng mit der Fibrogenese und Inflammation verknüpft (Fernandez et al. 2009). Die Angiogenese ist einerseits durch die massive Überexpression von einzelnen Wachstumsfaktoren (PDGF, VEGF, FGF, TGF-β), Zytokinen und Metalloproteinasen im Rahmen der chronischen Wundheilung (Pinzani und Marra 2001; Shackel et al. 2002) und andererseits durch das zunehmende hypoxischen Milieu im Lebergewebe bedingt.

Klassischerweise beginnen durch die Expression von VEGF-A und die folgende Stimulation des VEGFR-2 die Angiogenese und Vaskulogenese. Es kommt über die Aktivierung der eNOS zu einer Vasodilation mittels erhöhter Freisetzung von Stickstoffmonoxid (Kroll und Waltenberger 2000). Des Weiteren vermittelt der VEGF-A die Expression von anti-apoptotischen Proteinen über die Aktivierung des Phosphatidylinositol-3-Kinase-Signaltransduktionswegs und vermittelt ein längeres Zellüberleben der Endothelzelle (Coulon et al. 2011). Auch in Sternzellen und Hepatozyten konnte der Plazentawachstumsfaktor (PLGF) nachgewiesen werden. Er stimuliert am ehesten die Angiogenese auf einen indirekten Weg. Er sättigt den Decoy-Rezeptor VEGFR-1 ab, welcher keine weiteren Signale ins Zellinnere weiterleitet, und ermöglicht somit, dass mehr VEGF-A an den VEGFR-2 binden kann. Der PLGF und auch der VEGFR-1 sind beides Schlüsselmediatoren der Angiogenese im pathologischen Milieu (van Steenkiste et al. 2009; Carmeliet et al. 2001). Typisch für die Angiogenese der chronischen Lebererkrankung, die schlussendlich in einer Zirrhose mündet, ist ein prolongierter Prozess der Fibrose und Inflammation im Lebergewebe. Durch die vermehrte Fibrose mit Bildung von Narbengewebe und fibrotischen Septen kommt es zu einem erhöhten vaskulären intrahepatischen Widerstand, welcher die Blut-, sowie Sauerstoffversorgung stört. Dies bedingt Hypoxie und die Freisetzung des Hypoxie inducible Faktors (HIF). Des Weiteren kommt es zu einer Umverteilung des Mischblutverhältnisses in der Leber. Der arterielle Anteil nimmt durch den erhöhten vaskulären Widerstand zu und es kommt zu einer Adaptation der Hepatozyten an einen erhöhten Sauerstoffgehalt (Le Couteur et al. 1999). Im weiteren Verlauf der Fibrose verliert die lebereigene Endothelzelle ihren charakteristischen fenestrierten Phänotyp und es kommt zur Ausbildung einer organisierten Basalmembran durch die aktivierten Sternzellen. Dies führt trotz des sauerstoffreichen arteriellen Blutes zu einer Verteilungsstörung des Sauerstoffs und folglich Hypoxie (DeLeve et al. 2006). Der mikrovaskuläre Blutfluss wird einerseits durch die mit Kollagen verengten Sinusoide, sowie durch die in kleinen Zwischenräumen "gefangenen" oder am Endothel gebundene Leukozyten, im Rahmen der Entzündungsreaktion, behindert. Es kommt zu einer Ausschüttung von VEGF und Angiopoetin, welche auf der einen Seite die Angiogenese weiter vorantreiben, aber andererseits auch die inflammatorische Antwort durch Aussenden von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen weitere Immunzellen anlocken (Coulon et al. 2011).

1.2 Die hepatische Sternzelle

1.2.1 Rolle in der Zirrhoseentstehung

Die hepatische Sternzelle ist ein lebereigener Perizyt und befindet sich zwischen dem fenestrierten Endothelzellen und dem palisadenartig angeordneten Hepatozyten in dem sogenannten Raum von Disse. Auf Grund ihrer Lage mit gleichzeitigem Kontakt zu den Hepatozyten und dem Endothel der Sinusoide wird den Sternzellen die parakrine Regulation von verschiedenen hepatischen Funktionen, sowie die lokale Neurotransmitter-Kapazität zugeschrieben (Kawada 1997). In ihrer physiologischen Funktion ist sie vor allem für die Homöostase der Retinoide verantwortlich und speichert 80% des körpereigenen Vitamins A (Weiskirchen und Tacke 2014b). Des Weiteren ist bekannt, dass sie eine Rolle in der intrahepatischen Präsentation von Antigenen und der apoptotischen Elimination von Parenchymzellen spielt

(Winau et al. 2007; Bomble et al. 2010). Weiterhin wird ihr die Sekretion von wichtigen Apolipoproteinen und Wachstumsfaktoren zugeschrieben (Tacke und Weiskirchen 2010). Außerdem ist sie für den Metabolismus der extrazellulären Matrix verantwortlich und reguliert durch ihre kontraktilen und sekretorischen Eigenschaften den Durchmesser des fenestrierten Endothels und somit auch den sinusoidalen Blutfluss (Sato et al. 2003; Marrone et al. 2016).

Während eines akuten oder chronischen Leberschadens verändert sich die Morphologie und Physiologie der hepatischen Sternzelle grundlegend. Sie verliert ihre typisch sternförmigen Ausläufer, exprimiert typische Aktivierungsmarker (z.B. α -Smooth-muscle-Aktin) und entwickelt sich zu einer myofibroblasten-ähnlichen Zelle ohne fetthaltige Vesikel (Sato et al.

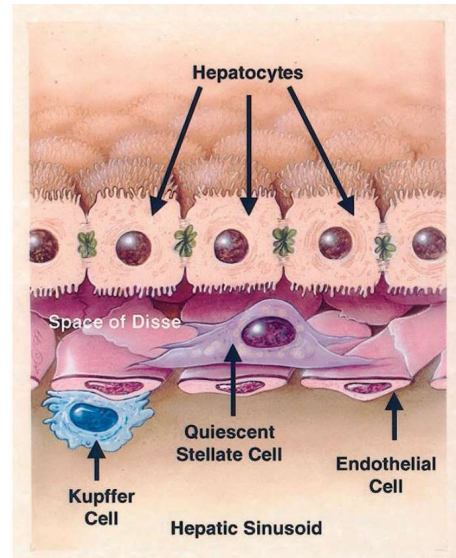


Abbildung 1.1 Mikroarchitektur im Raum von Disse einer gesunden Leber (Friedman 2000)

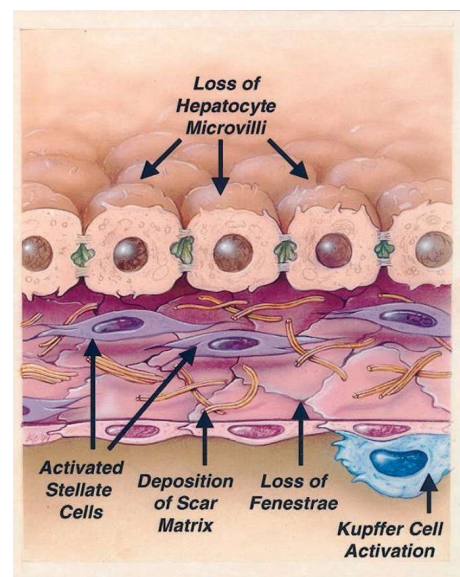


Abbildung 1.2 Mikroarchitektur im Raum von Disse einer fibrotischen Leber (Friedman 2000)

2003). Sie beginnt Kollagen I und III zu produzieren und verändert bzw. vermehrt die extrazelluläre Matrix des Lebergewebes (Brown B, Lindberg K, Reing J, et al. 2006). Außerdem sezerniert sie pro-fibrogenetische, pro-angiogentische und proinflammatorische Mediatoren, die auf der einen Seite parakrin die Endothelzellen und Immunzellen stimulieren und verändern, auf der anderen Seite die eigene Aktivität befeuert (Brandão 2006). Des Weiteren gewinnt sie kontraktile Eigenschaften und erhöht den Widerstand im portalen Gefäßbett. Die aktivierte hepatische Sternzelle gilt als die Zellart mit dem größten fibrotischem Potenzial und treibt den Prozess der Fibrose stetig voran (Lee und Friedman 2011).

1.2.2 Molekulare Pathogenese

Im Rahmen eines Leberschadens unabhängig seiner Genese wird die hepatische Sternzelle durch den Untergang von Hepatozyten und benachbarten Endothel- und Kupferzellen mit reaktiven Sauerstoffspezies, inflammatorischen Zytokinen und Wachstumsfaktoren exponiert. Als Antwort kommt es zu einer so genannten „Aktivierung“ der „stillen“ Sternzelle zu einer myofibroblasten-ähnlichen Zelle.

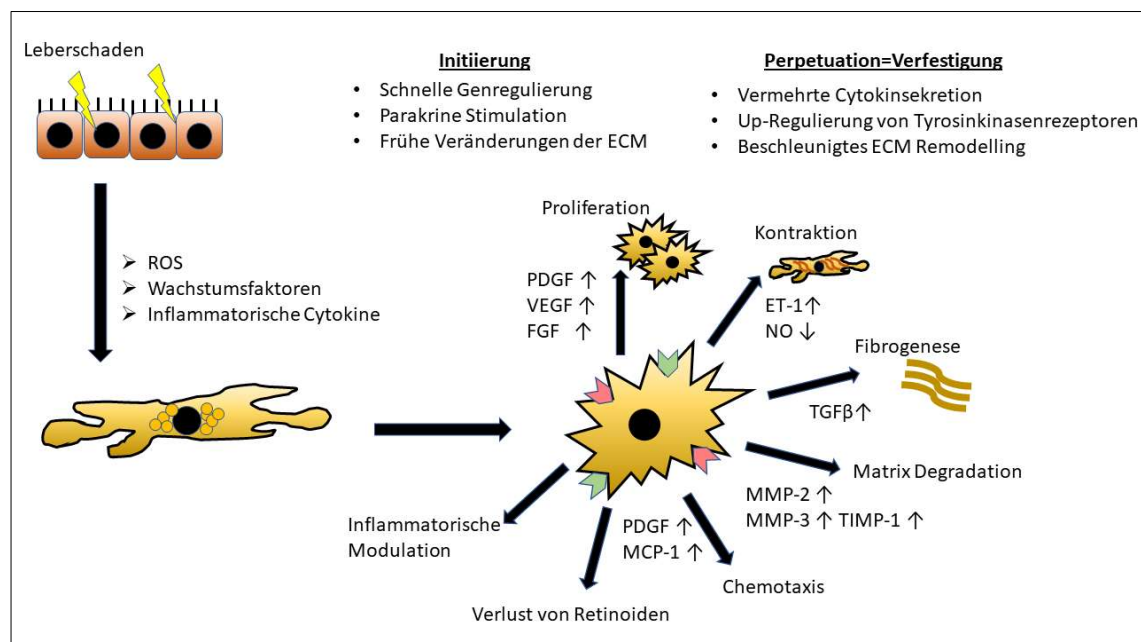


Abbildung 1.3 Signalwege der aktivierten Sternzelle (Abbildung nach Friedman 2000 und Friedman 2008)

Die zu Beginn ablaufenden Prozesse in dieser pleiotropen und programmierten Antwort werden unter der Phase der Initiierung zusammengefasst.

Es erfolgt eine schnelle Änderung der Genexpression und des Phänotyps, welche die Antwort der Zelle auf die parakrinen Zytokine und lokalen Stimuli durch die beginnend veränderte extrazelluläre Matrix umsetzen. Dazu werden Transkriptionsfaktoren aktiviert oder unterdrückt, die Regulierung der Epigenetik oder der posttranskriptionellen Kontrolle verändert (Friedman 2000).

Zu der zweiten Phase, der sogenannten Verfestigung der Aktivierung „Perpetuation“, gehört die Vermehrung der aktivierten Zellen durch eine verstärkte Expression von und Antwort auf Zytokinen durch eine parakrine und autokrine Stimulation, sowie die beschleunigte Veränderung der Beschaffenheit der extrazellulären Matrix von einer lockeren Struktur von geringer Dichte zu einer Matrix mit einem sehr hohen Anteil von Fibrillen bildenden Kollagen I (Friedman 2000). In dieser Phase kommt es zu spezifischen Veränderungen in den Eigenschaften der Sternzelle. Sie verliert einerseits ihre retionoidhaltigen Vesikel, andererseits erfolgt eine Steigerung der Proliferationsrate. Diese wird parakrin und autokrin vor allem durch PDGF stimuliert (Pinzani und Marra 2001). Neben der vermehrten Produktion der Tyrosinkinase erfolgt auch eine vermehrte Expression des Rezeptors auf der Membranoberfläche der Sternzelle (Ankoma-Sey et al. 1998). Über den aktivierten Tyrosinkinase-Rezeptor mittels PDGF kommt es über Ras zu einer Aktivierung der Mitogen-activated protein kinase (MAP-Kinase)-Signaltransduktion. Durch die vermehrte Produktion von PDGF wird die Sternzelle zu den zerstörten Gewebeanteilen geleitet. Es bildet sich eine durch Chemotaxis zur Migration befähigte Zelle, die außerdem durch das Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) (Marra et al. 1999) und CXCR-3 Liganden (Bonacchi et al. 2001) zur Fortbewegung angeregt wird. Desweiteren verändert sich die Bereitschaft zur Kontraktilität. Es werden kontraktile Filamente wie Myosin und α -Smooth-muscle-Aktin exprimiert, die kalziumabhängig wie auch unabhängig die Kontraktion der Zelle bedingen. Die erhöhte Kontraktilität ist ein wichtiger Faktor für die Entstehung der portalen Hypertension. Die intrazellulären kalziumunabhängigen Signaltransduktionswege laufen dabei entweder über die Rho-Kinase oder über einen PLC/PKC-Pathway ab. Haupttrigger für die erhöhte Kontraktilität der aktivierten Sternzelle ist Endothelin-1 (H Reynaert 2002). Innerhalb dieser Veränderungen steigert sich auch die parakrine und autokrine Expression von TGF β -1. Dieses Zytokin hat das stärkste fibrotische Potential und bedingt über SMAD-Proteine, sowie SMAD-unabhängig die vermehrte Gentranskription und folglich Bildung von Kollagen I in Sternzellen. Desweiteren ist TGF β -1 für die Regulation von Matrixmetalloproteinasen in aktivierten Sternzellen verantwortlich (Inagaki und Okazaki 2007). Unter anderem steigert sich die Bildung von der Matrixmetalloproteinase-2. Diese Protease trägt zum Abbau des

lebertypischen Kollagen IV bei, welches folglich zum Abbau der Basalmembran der Endothelzellen führt. Klassisch werden von den aktivierten Sternzellen neben MMP-2 und MMP-9, auch Stromelysin (MMP-3) und die interstitielle Kollagenase MMP-13 sezerniert (Benyon und Arthur 2001). Durch den vermehrten Abbau der lebereigenen extrazellulären Matrix und Narbenbildung kommt es mittels eines positiven Feedback-Mechanismus zur weiteren Produktion von degradierenden Matrixmetalloproteinasen und Aktivierung der Sternzelle (Théret et al. 1999). Weiterhin kommt es in diesen aktivierten Zellen zu einer vermehrten Expression von TIMPs (tissue inhibitor of metalloproteinasen), vor allem TIMP-1. Dies führt zu einer Inhibierung von interstitiellen Kollagenasen und begünstigt weiterhin die Bildung einer Fibrose (Arthur 1995). Die Eigenschaften der hepatischen Sternzelle werden von verschiedenen immunmodulatorischen Zellen wie Makrophagen, T-Zellen, Monozyten und dendritischen Zellen während eines chronischen Leberschadens beeinflusst. Umgekehrt kann sie auch ihre Effektoren mittels Ausschüttung von einer Vielzahl von Cytokinen und Chemokinen in ihrer Funktion befeuern (Weiskirchen und Tacke 2014a). Daher hat sich die aktivierte Sternzelle zu einem zentralen Modulator in der Immunität und der hepatischen Inflammation in den letzten Jahren entwickelt (Friedman 2008). Sie stellen einen essentiellen Schnittpunkt an der Kreuzung zwischen Inflammation, Angiogenese und Fibrogenese dar (Paternostro 2010).

1.3 Proteinkinase D

1.3.1 Aufbau

Die Proteinkinase D (PKD) gehört zur Gruppe der Seronin-/Threoninkinasen und wird der Kalzium-/Calmodulin-abhängigen Proteinkinasen-Familie (CaMK) zugeordnet (Franz-Josef Johannes 1994). Es werden in Säugetieren 3 Isoformen der PKD unterschieden, PKD1/PKC μ , PKD2, PKD3/PKC ν (Hayashi et al. 1999). Allen drei Isoformen ist eine ähnliche Proteinstruktur und primäre Aminosäuresequenz gemein. Sie besitzen am N-Terminus reichlich apolare Aminosäuren, vor allem Alanin und Prolin. Darauf folgen zwei Cysteinreiche-Domänen (C1a und C1b oder CYS1 und CYS2) mit Zinkfinger ähnlichen Motiven. Diese stellen eine Region mit reichlich negativ geladenen Aminosäuren dar, welche von Phorbolestern und Diacylglycerol (DAG) besetzt werden können und die katalytische Aktivität regulieren. Es folgt eine Pleckstrin-Homology Domäne zur Regulation der katalytischen Domäne für Seronin-/Threoninkinasen am C-Terminus (Valverde 1994; van Lint 2002).

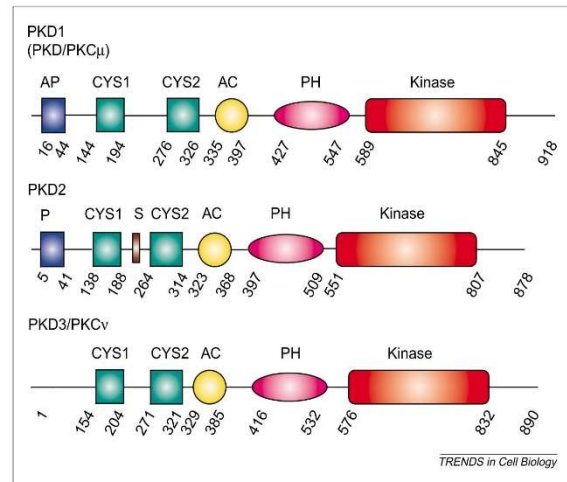


Abbildung 1.4 molekulare Architektur der Mitglieder der Proteinkinase D-Familie aus „Protein kinase D: an intracellular traffic regulator on the move“ - van Lint 2002-

Abkürzungen: AP, Alanin- and Prolinreiche Domäne; P, Prolinreiche Domäne; S, Serinreiche Domäne; CYS1 and 2, Cysteinreiche Zinkfinger Domäne 1 and 2, auch C1a and C1b genannt; AC, saure Domäne; PH, Pleckstrin-homology Domäne; Kinase: katalytische Domäne. Zahlen zeigen die Aminosäurenummer

Im Vergleich zur PKD1 besitzt die PKD2 eine rein Prolin-reiche Region am N-Terminus und enthält einen Serin-reichen Verbinder zwischen den beiden Zinkfinger-Domänen. Es wird angenommen, dass eine Phosphorylierung in dieser Region, am Ser244, die Lokalisation von PKD2 am Zellkern steuert (Blume et al. 2007). Anders stellt sich die Struktur bei der PKD3 dar. Diese besitzt keine zusätzliche oder besondere weitere strukturelle Untereinheit. Weiterhin fehlt ihr eine Autophosphorylierungsstelle, die am C-Terminus der PKD1 und 2 bekannt ist (Ser-916 oder Ser-876) (Evans und Zachary 2011; Matthews et al. 1999).

Die Proteinkinase D kann auf verschiedenen Wegen aktiviert werden. Als erstes kann eine Aktivierung über die Stimulation mit Diacylglycerol erfolgen. Des Weiteren

besteht die Möglichkeit der Aktivierung via der Zinkfinger-ähnlichen Domäne. Auch als direktes Substrat der Proteinkinase C oder auch nach der Spaltung durch Caspasen ist eine Aktivierung bekannt (Vantus et al. 2004). Außerdem ist durch β und γ Untereinheiten von G-Proteinen eine Aktivierung von PKD1 am Golgiapparat möglich (van Lint 2002). Im Rahmen der raschen Aktivierung über die Proteinkinase C kommt es zu einer Phosphorylierung im Bereich der katalytischen Domäne bei der PKD1 bei Ser738 und Ser742, in der PKD2 bei Ser706 und Ser710, und in der PKD3 Ser731 and Ser735 (Iglesias et al. 1998; Durand et al. 2016). Diese Phase wird von einer späteren Aktivierungsphase gefolgt, welche unabhängig von PKC über G-Protein gekoppelte Rezeptoragonisten eine Aktivierung der Proteinkinase ermöglicht (Sinnott-Smith et al. 2009). Außerdem ist eine Aktivierung bei oxidativem Stress durch die Tyrosinkinase Abl an der PH-Domäne Tyr463 bekannt (Storz et al. 2005).

Die Protein-Familie kommt sowohl membranständig, in Mitochondrien, dem Golgiapparat (Prestle et al 1998), im Zytoplasma als auch im Zellkern vor. Die Lokalisation ist abhängig vom Zelltyp, als auch vom Phosphorylierungszustand und unterliegt einer Steuerung, welche unter anderem auch PKC-abhängig zu sein scheint (Storz et al. 2000; van Lint 2002). Besonders entscheidend scheinen die N-terminale Domäne und speziell die Zink-Finger Motive für die Steuerung der subzellulären Lokalisation zu sein (Jaggi 2007). Im Gegensatz zu PKD1 und PKD2, welche in unstimulierten Zellen besonders im Zytoplasma nachzuweisen sind, befindet sich PKD3 in unstimulierten Zellen vor allem im Zytoplasma und Nukleus. Mittels fluorescence loss in photobleaching (FLIP) stellten Rey et al in Pankreasadenotumorzelllinien (Panc-1) die Vermutung auf, dass ein kontinuierlicher Fluss zwischen Nukleus und Zytoplasma für die PKD3 besteht. Für diesen sei ein Kernimportrezeptor und ein ausgefeilter CRM1-Kernexport-Pathway notwendig (Rey et al. 2003). Alle 3 Isoformen besitzen für sich typische Substrate. Für PKD 3 konnte Huck et al z.B. das G-Protein-coupled Rezeptor kinase-interacting Protein 1 (GIT1) identifizieren (Huck et al. 2012).

1.3.2 Funktion

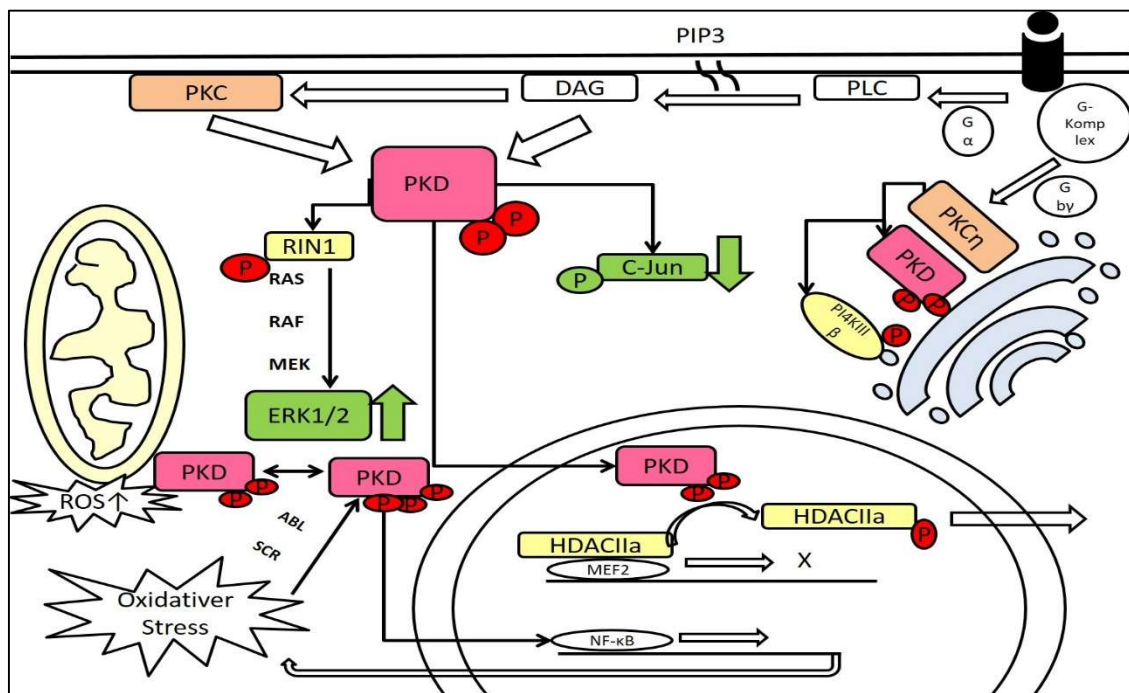


Abbildung 1.5 Hauptsignaltransduktionswege der Proteinkinase D

Abbildung angelehnt an "PKD at the crossroads of DAG and PKC signaling" -Wang 2006

Je nach gewünschter Funktion kann die PKD in unterschiedliche subzelluläre Einheiten mobilisiert werden und dort unterschiedliche Aufgaben ausüben. Durch Aktivierung von Rezeptoren (z.B. GPCR) auf der Zelloberfläche wird PKD zu dieser befördert und aktiviert. Die aktivierte PKD kehrt ins Zytosol zurück und moduliert Hauptsignaltransduktionswege: z.B. kommt es zu einer Aktivierung im RAS-RAF-MEK-ERK-Signalweg durch die Phosphorylierung von RIN1 und der folgenden Blockierung seiner Interaktion mit RAS, sowie zu einer Verminderung der JNK-Aktivität auf Grund der Phosphorylierung von c-Jun durch PKD. Die aktivierte PKD kann auch zum Nucleus wandern und phosphoryliert dort Histondeacetylasen (HDAC) der Klasse IIa. Diese sind Repressoren des MEF2 (myocyten enhancer factor 2) Transkriptionsfaktors. Die phosphorylierten HDAC Moleküle bedingen eine 14-3-3 Bindung und dessen Export aus dem Nucleus, welches die Expression von MEF2-abhängigen Genen ermöglicht. Oxidativer Stress verursacht eine Aktivierung der PKD durch die koordinierte, Src-Abl beeinflusste Tyrosinphosphorylierung und die durch PKC beeinflusste Phosphorylierung der Aktivierungsschleife der PKD. Das phosphorylierte PKD aktiviert dann über den IKK-Komplex die Transkription von NF κ B und ermöglicht die Regulation von NF κ B abhängigen Genen. Außerdem fungiert PKD auch als Signalgeber aus den Mitochondrien zum Nucleus. Als Reaktion auf erhöhte reaktive Sauerstoffspezies in den Mitochondrien wird PKD aktiviert und als Reaktion erfolgt die Expression von MnSOD (mitochondrialdetoxifying Enzym). PKD wird auch im Transgolginetzwerk (TGN) über PKC und durch den erhöhten Anteil an DAG durch die β und γ Untereinheiten des G-Proteins rekrutiert und aktiviert. Aktiviertes PKD reguliert die Aufspaltung von Transportcarriern, welche vom TGN gebildet wurden und für die Zelloberfläche bestimmt sind. PI4K IIIb ist ein direktes Substrat der PKD und einer der direkten Stellschrauben in diesem Prozess. (Wang 2006)

Wie in vielen Studien bisher gezeigt, spielt die Proteinkinase D-Familie sowohl in vivo als auch in vitro eine wichtige Rolle in Säugetieren. Sie stellt eine Schlüsselfunktion in der Zellproliferation, Zellmigration, Zelldifferenzierung, dem Vesikeltransport über den Golgiapparat, dem Zellüberleben, der Genexpression und Genregulierung, der Angiogenese, sowie der immunologischen Regulation dar (Guha et al. 2010).

Als wichtige physiologische Funktionen in Säugetieren konnte unter anderem die Koordination der Insulinsekretion in Pankreaszellen, Steigerung der Kontraktilität in Kardiomyozyten, sowie die Regulierung des angeborenen Immunsystems beschrieben werden (Durand et al. 2015). Des Weiteren werden die 3-Isoformen der Protein-Familie auch unterschiedlich in verschiedenen Zellarten exprimiert. So ist in Prostatakarzinom-Zelllinien eine erhöhte Konzentration von PKD 3 anzutreffen und die angetroffene nukleare Menge an PKD3 korreliert positiv mit der Aggressivität der Tumorerkrankung (Chen et al. 2008). In gastrointestinalen epithelialen Tumoren wird vor allem PKD2 exprimiert (Azoitei et al. 2010). Wie Hao et al zeigen konnten, ist es auch möglich, dass 2 Isoformen der PKD an einem Prozess jedoch auf unterschiedlichen Wegen teilnehmen können. So zeigte die Arbeitsgruppe, dass über den Signaltransduktionsweg VEGF→VEGFR2→PKD1 die Expression von Interleukin 6 gesteuert wird, wohingegen PKD2 an diesem Mechanismus am ehesten über die Modulation der Expression des VEGFR2 nur distinkt beteiligt ist (Hao et al. 2009b). Unter anderem können tumorfördernde Phorbolster, Diacylglycerolanaloga (van Lint 1995), Neuropeptide (Jose´ L. Zugaza et al. 1997), der platelet-derived growth factor (PDGF) (van Lint 1998), Bryostatin (Matthews et al. 1997) oder oxidativer Stress (Waldron 2000) die Proteinkinase D aktivieren. Andere Stimuli sind z.B. die Aktivierung über B-Zell Rezeptor (BCR) crosslinking, T-Zell Rezeptor (TCR) crosslinking (Sidorenko et al. 1996) und IgE Ausschüttung (Csonga 1998) von Mastzellen. PKD1 kann auch durch den Tumor necrosis factor alpha (TNF-α) und genotoxische Chemotherapeutika aktiviert werden (Endo et al. 2000). Je nach Zelltyp, Lokalisation der Proteinkinase in der Zelle und benötigter Funktion, dem sogenannten Zellkontext werden unterschiedliche Anteile der Isoformen vermehrt oder vermindert exprimiert bzw. aktiviert oder in der Zelle zu verschiedenen Organen transportiert (M.Yu. Shabelnik 2011; van Lint 2002; Marklund et al. 2003).

Im Folgenden werden einige Funktionen der Familie vorgestellt und Besonderheiten der einzelnen Mitglieder herausgearbeitet.

Die PKD-Familie gilt als Messenger zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren. Zu Ihnen gehören unter anderem NFκB und CREB, (Evans & Zachary 2011; Chen et al. 2011), wie in verschiedenen Zellarten und Tiermodellen gezeigt werden konnte. Beispielsweise wurde von Yuan & Pandol in einem Modell zur Pankreatitis die PKD abhängige Aktivierung von NFκB dargestellt. Zur Freisetzung dieser Transkriptionsfaktoren, wie unter anderem auch MEF-2, spielt die Phosphorylierung und Export von Klasse IIa Histondeacetylasen (HDAC) aus dem Nucleus eine entscheidende Rolle. So konnte z.B. in T-Zellen gezeigt werden, dass es nach Aktivierung des T-Zellrezeptors über PKD1 zu einer Phosphorylierung und zum Export der HDAC7 kommt. Damit wird der Transkriptionsfaktor MEF2 freigesetzt. Es kommt zur Expression des Orphan steroid nuclear Rezeptor nur77, welcher Mechanismen der Apoptose beeinflusst. Dies scheint unter anderem bei der Negativ-Selektierung im Thymus eine Rolle zu spielen (Parra et al. 2005; Dequiedt et al. 2005). Auch an Kardiomyozyten konnte gezeigt werden, dass PKD1 die Phosphorylierung und den Export aus dem Nucleus der HDAC5 bedingt und darüber die Hypertrophie der Zellen in Folge von zellulärem Stress steuert (Vega et al. 2004). PKD2 hingegen scheint besonders beteiligt an der Differenzierung von Muskelzellen aus Stammzellen zu sein (Kleger et al. 2011).

Song et al konnten bei intestinalen Epithelzellen zeigen, dass die PKD durch oxidativen Stress PKC-abhängig und über den Rho/ROCK Pathway aktiviert wird. Interessanterweise kam es bei der Exposition einer small-interfering RNA (siRNA) für die PKD zu einer Zunahme der durch oxidativen Stress induzierten Apoptose. Dies lässt vermuten, dass die PKD die Zelle in einen ungezielten Zelluntergang führt (Song 2006). Auch in Untersuchungen zur akuten Pankreatitis wurde beschrieben, dass eine vermehrte Expression von PKD durch Inhibierung des Caspasesystems zu einer vermehrten Nekrosebildung führt (Yuan et al. 2012; Yuan und Pandol 2016). Weiterhin wird die PKD auch durch reaktive Sauerstoffspezies von Mitochondrien aktiviert und bedingt eine Aktivierung von NFκB und folglich eine Induktion des SOD2-Gens mit einer verstärkten Expression der manganase-abhängigen Superoxiddismutase (MnSOD). Dies trägt zu einer erfolgreichen Detoxifikation und einem längeren Zellüberleben bei oxidativem Stress bei (Storz et al. 2005). In einer anderen Arbeitsgruppe konnte auch gezeigt werden, dass unter oxidativem Stress PKD auch zur Phosphorylierung von Vps34 führt und somit eine entscheidende Rolle in der Bildung von Autophagosomen spielt (Eisenberg-Lerner und Kimchi 2012).

Nach der Entdeckung der neuen Protein-Familie konnten vielfältige Substanzen gefunden werden, die die Proteinkinase D aktivieren können. Besondere Beteiligung an wichtigen intra- und interzellulären Funktionen wird der PKD-Familie über die Aktivierung von G-Protein gekoppelten transmembranständigen Rezeptoren zuteil. Dazu gehören unter anderem die Wachstumsfaktoren PDGF und VEGF (Wong und Jin 2005), sowie Angiotensin II (Abedi et al. 1998). Diese spielen vor allem in der Angiogenese eine besondere Rolle.

Azoitei et al konnten in Tumorzellen des Pankreas zeigen, dass PKD2 die Hypoxie-induzierte Expression und Sekretion von VEGF-A in den Tumorzellen, sowie die durch VEGF-A stimulierte Bildung von Blutgefäßen der tumorbegleitenden Endothelzellen reguliert. Somit spielt sie nicht nur in der Induktion durch epitheliale Zellen, sondern auch in der Angiogenese selbst durch Endothelzellen eine entscheidende Rolle (Azoitei et al. 2010). VEGF-A aktiviert über den VEGFR2 mittels der Proteinkinase C und Proteinkinase C die PKD2 (Wong und Jin 2005). Die daraus folgende Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (CREB/HDAC5/NR4A1/TR3) ist elementar für die Proliferation und Migration der Endothelzelle und der darauf induzierten Angiogenese (Hao et al. 2009a; Azoitei et al. 2010; Evans und Zachary 2011). Hao et al. konnte in Endothelzellen zeigen, dass die Expression des VEGFR2 und FGFR1 von PKD2 abhängig ist. Interessanterweise brachte im Rahmen dieser Arbeit die Verwendung einer silencing RNA nur für PKD2, jedoch nicht für PKD1, das Wachstum und die Migration der verwendeten HUVECs zum Erliegen. Außerdem belegten Zheng et al, dass unter Stimulation von VEGF die PKD2 für die Ubiquitinierung, Down-Regulierung und Degradierung des Interferon 1 Rezeptors (IFNAR1) verantwortlich ist. Der IFNAR 1 wird durch Interferon α/β aktiviert und in seinen nachgeschalteten Pathways fungiert er als Gegenspieler zur Angiogenese. Somit sorgt PKD2 für eine effiziente VEGF-stimulierte Angiogenese (Zheng et al. 2011). In Anbetracht dieser Ergebnisse ist davon auszugehen, dass PKD2 ein entscheidender Faktor in der Angiogenese und Biologie der Endothelzelle ist (Hao et al. 2009a).

PKD1 und 2 spielen eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Zellpolarität. Sie regulieren die Produktion spezieller Carrier, bevorzugt für die basolaterale Membran der Zelle des Transgolgi-Netzwerks. PKD3 scheint in diesem Prozess keinen Einfluss zu haben (Guha et al. 2010). Als direktes Substrat der PKD wurde RIN1 identifiziert. Ziegler et al konnten zeigen, dass die PKD den RIN1 an Ser-351 in vitro phosphoryliert und es zu einer Ansammlung beider Proteine an der migrierenden Seite der Zelle kommt (Ziegler et al. 2011). Des Weiteren können alle 3 Isoformen Rhotekin als

direktes Substrat phosphorylieren. In Fibroblasten führte dies zu einer Aktivierung der Rho A und der konsekutiven Änderung des Zytoskeletts mit Bildung von Stressfasern (Pusapati et al. 2012). Außerdem scheint die PKD1 eine wichtige Rolle in der Migration von intestinalen Epithelzellen zu haben. Young et al konnten in Zellreihen mittels Woundhealing-Assays zeigen, dass es an der unterbrochenen Zellschicht zu einer Anreicherung und schnellen Aktivierung von PKD1 kommt. Außerdem kam es zu einer verlangsamten Migration der Zellen, um die Zellschicht wieder zu schließen, wenn small-interfering RNA (siRNA) in die Zellkultur eingebracht wurde. Einen ähnlichen Effekt konnte die Arbeitsgruppe auch in genetisch veränderten Mäusen mit einer PKD1-Überexpression in intestinalen Epithelzellen nachweisen. Im Vergleich zu ihren unveränderten Artgenossen kam es bei den PKD1-überexprimierenden Mäusen zu einer schnelleren Wanderung der Epithelzellen aus den Krypten (Young et al. 2012).

Eine interessante Rolle nimmt die Protein-Familie im Rahmen des Prozesses der Epithelialen-Mesenchymalen Transition ein. Während PKD1 die Transformation von epithelialen Zellen zu mesenchymalen blockt, fördern PKD2 und 3 diesen (Durand et al. 2016). Ähnliches wurde auch in Bezug auf Motilität und invasives Wachstum beim duktalem Pankreaskarzinom beschrieben (Wille et al. 2014a). Während PKD1 eher eine protektive Rolle über die Regulation der actin-regulatory Cofilin-phosphatase Slingshot1L einnimmt (Peterburs et al. 2009), fördert PKD2 die Invasion und Angiogenese im duktalem Pankreaskarzinom durch Expression von Metalloproteinasen 7 und 9 (Wille et al. 2014b).

Besonders im Transgolginetzwerk (TGN) und folglich im Transport von Vesikeln zur Zellmembran konnte der PKD ein großes Aufgabenfeld zugeschrieben werden. Über die C1a-Domäne der Proteinkinase kommt es zur Bindung am TGN (Maeda et al. 2001). Pusapati et al konnten jedoch zeigen, dass auch die C1b-Domäne essenziell für diesen Prozess ist. Die Domäne wird bei der PKD2 von ADP-Ribosylations Faktor 1 (ARF-1) an das TGN rekrutiert. Nur durch beide Mechanismen kommt es zu einem gelungenen Vesikeltransport (Pusapati et al. 2010). Besonders entscheidend für die Funktion und Lokalisation in diesem Bereich ist die Höhe des DAG-Spiegels (Baron und Malhotra 2002). Die aktivierte PKD führt am TGN zur direkten Phosphorylierung von PI4KII β (Hausser et al. 2005), CERT und auch OSPB. Sie spielt damit eine wichtige Rolle in dem Transport von Cholesterol und Sphingomyelin zur Zellmembran (Fu und Rubin 2011).

Die PKD-Familie beeinflusst unter anderem auch die Sekretion von proinflammatorischen Interleukinen und spielt eine Rolle in entzündlichen Prozessen. So konnte in humanen Kolonepithelzelllinien nach Exposition von Lysophosphatidylsäure eine durch PKD2 stimulierte NFκB-abhängige Sekretion von Interleukin 8 nachgewiesen werden (Chiu et al. 2006). Außerdem konnten Song et al an Nervenzellen zeigen, dass es nach Zugabe von Lipopolysacchariden zu einer PKC-abhängigen Aktivierung der PKD kommt. Im gleichen Versuch wurde ebenfalls beschrieben, dass diese Aktivierung ebenso abhängig von Interleukin 1 ist (Song et al. 2007). Auch in einem Modell zur akuten Pankreatitis wurde die wichtige Rolle der PKD in der immunologischen Antwort erkannt. Auch hier wurde PKD als wichtiger Faktor zur Aktivierung des Schlüsseltranskriptionsfaktors für die Inflammation NFκB beschrieben (Yuan und Pandol 2016).

Ebenso in der erworbenen Immunantwort scheint die PKD in verschiedene Pathways einzugreifen. In humanen und von Mäusen stammenden T-Zellen konnte gezeigt werden, dass vor allem PKD2 exprimiert wird. Außerdem werde abhängig von der Menge des aktivierten PKD2 die Aktivität des Interleukin 2 Promotors in Jurkat-Zellen beeinflusst. Über die Aktivierung des T-Zell-Rezeptors trägt PKD2 somit zur Steuerung des Zelluntergangs bei (Irie et al. 2006).

1.4 Zielstellung

In den nachgewiesenen Signaltransduktionswegen der PKD in anderen Organgeweben besteht eine hohe Konkordanz zu molekularpathologischen Mechanismen des Lebergewebes. Daher untersucht diese Arbeit die Bedeutung der PKD-Familie bzw. ihrer einzelnen Isoformen in der Pathogenese der Leberzirrhose.

Um diese zu beantworten, wurden mehrere Teilfragestellungen bearbeitet:

- Sind die Isoformen der PKD, sowie die aktivierten Formen der PKD1 und PKD2 im gesunden und zirrhotischen Lebergewebe nachweisbar?
- Gibt es Unterschiede in der Expression bzw. in der Aktivität der PKD im zirrhotischen Lebergewebe?
- Sind Isoformen der PKD und ihre aktivierten Formen der PKD1 und PKD2 in hepatischen Sternzellen nachweisbar?
- Gibt es Unterschiede in der Expression bzw. Aktivität der PKD in zirrhotischen Sternzellen?
- Beeinflusst ein hypoxisches Milieu die Expression bzw. Aktivität der PKD in einer humanen Sternzelllinie?
- Beeinflusst ein hypoxisches Milieu die Expression bzw. Aktivität der PKD in primär gewonnenen Sternzellen aus gesunden Rattenlebern?

2 Material und Methoden

2.1 Material

Eine ausführliche Auflistung aller verwendeten Materialien, sowie eine kurze Beschreibung zur Herstellung der verwendeten Puffer, Lösungen und Antikörper befindet sich im Anhang ab Tabelle 6.1 Medien und Zusätze. Ebenso sind alle verwendeten Geräte und Chemikalien in Tabelle 6.17 bis Tabelle 6.19 aufgelistet.

2.2 Methoden

2.2.1 Induktion der Zirrhose und Organentnahme

Zur Induktion einer Leberzirrhose im Tiermodell inhalierten männliche Wistar-Ratten aus der universitären internen Zucht ab einem Gewicht von ca. 100-150g über 12-15 Wochen mit Tetrachlormethan drei Mal wöchentlich. Dem Trinkwasser wurden 0,35g/l Phenobarbital zur Enzyminduktion zugesetzt. Die Genehmigung des Antrages durch das Landesverwaltungsamt Sachsen-Anhalt, Referat Verbraucherschutz, Veterinärangelegenheiten (TV-Nr.: 3-629) lag vor. Es wurden Organentnahmen und Separationen von primären Sternzellen bei gesunden Tieren (0 Wochen), Tieren mit Fibrose (5 Wochen Inhalation), kompensierter Zirrhose (8 Wochen Inhalation) und Tieren mit dem Vollbild einer Leberzirrhose (12 Wochen Inhalation) durchgeführt. Zuvor wurde die Inhalation eine Woche vor dem geplanten Versuch gestoppt (Reichenbach et al. 2012; Moeller et al. 2015).

Der Tod der Tiere wurde nach adäquater Anästhesie mittels Isofluran und Narcoren durch Ausbluten herbeigeführt. Die Leber wurde entnommen und entweder für die weitere histologische Aufarbeitung vorbereitet oder zur Herstellung von Lebervolllysaten genutzt.

Die Gewinnung primärer Sternzellen aus der Rattenleber erfolgte wie in 2.2.3 beschrieben. Sie wurden für 24 Stunden in vier 10er Platten in IMDM mit 10% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin bei 5% CO₂ in einem separaten Brutschrank in Kultur genommen.

2.2.2 Zelllinien

Neben den primären Zellen kultivierten wir die immortalisierte humane Sternzelllinie HSC-B, die uns freundlicher Weise durch die Universität Regensburg AG Herr Prof. Hellerbrand bereitgestellt wurde (Schnabl et al. 2002). Die Zellen wurden in DMEM mit 4,5g/l Glucose, 1% Penicillin/Streptomycin und 10% FKS bei 10% CO₂ und 37°C in Kultur gehalten. Zum Versuch wurden je 250.000 Zellen auf vier 10er Platten ausplattiert.

Als Positiv-Kontrolle für die Antikörper der PKD-Familie kultivierten wir 3T3-Zellen in DMEM mit 4,5g/l Glucose, 1% Penicillin/Streptomycin und 10% FKS bei 10% CO₂ und 37°C. Um auch für die phosphorylierten Isoformen eine Kontrolle generieren zu können, wurden die 3T3 mit einem Phorbol ester versetzt.

Tabelle 2.1 PMA -Lösung

PMA Stock	0,2 mM in DMSO gelöst	Vor der Stimulation wurden die Zellen 2 Stunden ohne FKS kultiviert und danach für 30 Minuten mit einer 0,2 µM PMA Lösung, einem Phorbol ester (Zugaza et al. 1996; Azoitei et al. 2010), inkubiert.
Der Stock wurde im Verhältnis 1:1000 mit PBS verdünnt zu einer 0,2 µM PMA-Lösung.		

Die Ernte und Lagerung bis zur weiteren Verwendung erfolgte wie unter 2.2.4 beschrieben.

Die Hela-Lysate erhielten wir durch eine Kooperation mit den Arbeitsgruppen des Julius-Bernstein Instituts für Physiologie.

2.2.3 Sternzellseparation

Es wurden männliche Wistar-Ratten unterschiedlicher Zirrhosegrade einer Sternzellseparation unterzogen.

Die Zellseparation erfolgte wie bereits durch die hepatologische Arbeitsgruppe der Universität von Barcelona beschrieben (Graupera 2005).

Die Tiere wurden mit Isofloran betäubt und erhielten intraperitoneal Heparin, sowie gewichtsadaptiert Narcoren (1-2,5ml/kg Körpergewicht) zur Aufrechterhaltung der Narkose.

Nach der Anästhesie wurden der Bauchraum eröffnet und die Vena portae, sowie Vena cava inferior frei präpariert. Es erfolgte die Punktion der Vena portae mit anschließender Spülung und Verdau der Leber mit GBSS (Grey's balanced salt solution) unter Zugabe von Kollagenase (normales Tier= 30mg; Zirrhose-Tier=35mg), DNase (10mg) und Pronase (300mg). Danach wurde die Leber entfernt und zum weiteren Verdau bei 37°C in GBSS-Puffer mit Kollagenase (normales Tier= 10mg; Zirrhose-Tier=15mg), DNase (10mg) und Pronase (10mg) entnommen.

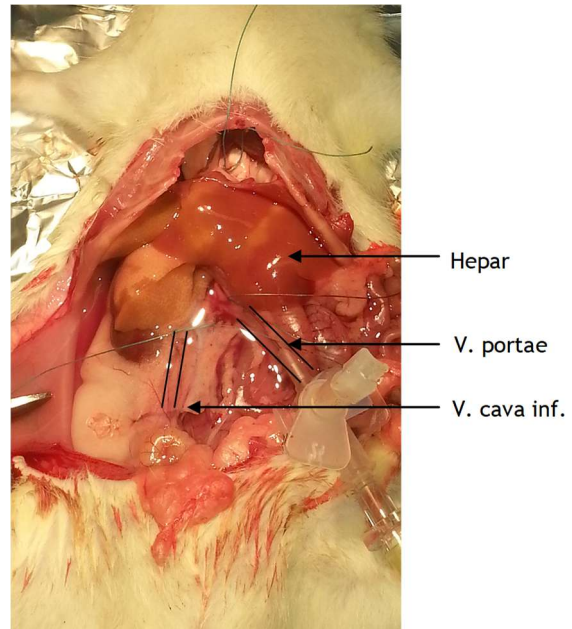


Abbildung 2.1 Wistar-Ratte während der Sternzellseparation

Thorax und Abdomen sind eröffnet. Ligaturen liegen um die V. portae und V. cava inferior. Die Pfortader ist punktiert und Puffer wird darüber perfundiert. Der einsetzende Verdau durch die im GBSS gelöste Kollagenase, Pronase und DNase zeigt sich durch die beginnende Entfärbung der Leber.

Das Zellgemisch wurde durch eine Mullkompressen und anschließend durch ein Nylonnetz (100µm) steril filtriert. Es folgte die Zentrifugation bei 50 x g für 4 Minuten bei 4°C zum Absetzen der Hepatozyten. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand erneut bei 800 x g für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das nun entstandene Pellet wurde in einem Medium aus IMD, 10% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin resuspendiert und der Überstand verworfen. Die Zellsuspension wurde auf vier 10er Petrischalen gleichmäßig verteilt und für 24 Stunden zum Anwachsen der primären Sternzellen bei 5% CO₂ kultiviert.

2.2.4 Hypoxieversuch

Pro Versuchsansatz wurden vier 10er Petrischalen benötigt. Circa 250.000 Zellen der Zelllinien HSC-B wurden pro Schale ausplattiert. Bei den primären Sternzellen wurde das in Medium suspendierte Pellet gleichmäßig auf 4 Schalen verteilt.

Nach 24 Stunden unter normalen Kulturbedingungen erfolgte bei den primären Sternzellen und den HSC-B ein Mediumwechsel ohne FKS. Die Zelllinie wurde für 12 Stunden serumfrei belassen, die primären Zellen hingegen für 4 Stunden. Dann erfolgte die Ernte von zwei Kontrollplatten als 0 Stunden - Wert. Eine Platte wurde danach für 48 Stunden unter Raumsauerstoffgehalt (21% O₂) weiter kultiviert. Die andere wurde in einem Hypoxieschrank bei 0,5% O₂ für 48 Stunden weiter kultiviert (Dai et al. 2003).

Das Medium wurde abgesaugt und die Platte mit PBS gespült. Wir verwendeten zwischen 100 und 150µl IPP zum Lysieren der Zellen. Die Lagerung der Zelllysate erfolgte bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C.

2.2.5 Proteinbestimmung nach der BCA Methode (Lowry 1951)

Die Proben wurden bei 16089 x g 20 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand weiterverwendet. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration fertigten wir eine 1:10 Verdünnung an.

Als Kontrollprotein verwendeten wir Albumin zur Erstellung einer Standardreihe. Alle Werte wurden in Doppelbestimmung ermittelt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 20 Minuten. Das 96-Well Array wurde bei 560nm photometrisch ausgemessen.

2.2.6 Western Blot - Tank Blot (Mahmood und Yang 2012)

Zur Bestimmung der Proteinexpression und quantitativen Auswertung der einzelnen Subtypen der PKD-Familie in Leberlysaten, primären Sternzellen und in den durchgeführten Hypoxieexperimenten wurden Western Blots durchgeführt.

Tabelle 2.2 Herstellung SDS-Gel

Chemikalien	30 ml	10 ml
	10%iges Trenngel	7%iges Sammelgel
Polyacrylamid	10,00ml	2,33 ml
1,5 M TRIS pH 8,8	7,50 ml	-
0,5 M TRIS pH 6,8	-	2,50 ml
Aqua dest.	12,04 ml	5,02 ml
10 % SDS	300 µl	100 µl
TEMED	15 µl	5 µl
10 % APS	150 µl	50 µl

Die Glasplatten zwischen denen die Gele gegossen worden, sind mit 1% Agarose (gelöst in Aqua bidest) abgedichtet wurden. Es sind SDS-Gele mit einer Dicke von 1,5 mm und 10-15 Taschen gegossen worden.

Die Proben wurden aliquotiert (Leberlysate=50µg, primäre Sternzellen=30µg, Hypoxieexperimente=30µg) und mit 15 µl SDS Probenpuffer versetzt, bei 95°C gekocht und zentrifugiert. Zur Positivkontrolle für die genutzten Antikörper der PKD-Familie dienten Hela, 3T3 und mit PMA stimulierte 3T3 Zellysate.

Mittels SDS-Page erfolgte in einem Polyacrylamidgel die Auftrennung des Proteingemischs. Wir verwendeten 10%ige Trenngele und 7%ige Sammelgele nach dem Lämmli-System (siehe Tabelle 2.17).

Die Gele ließen wir bei 60V circa 30 Minuten sammeln und bei 110V für eine Stunde auftrennen. Die Übertragung der Proteine erfolgte auf eine in Methanol aktivierte PVDF-Membran in einem Tank-Blot-System für 3 Stunden bei 400mA.

Die Membranen wurden in 5% Milchpulver oder 5% BSA für 2 Stunden geblockt und mit dem primären Antikörper über Nacht inkubiert. Dann erfolgte die Behandlung mit dem sekundären Antikörper für 1 ½ Stunden. Nach jeder Inkubation erfolgten drei Waschschrte mit 1x Blotto à 10 Minuten.

Die Entwicklung erfolgte im Chemilumineszenz- und Fluoreszenzsystem Fusion Fx7. Zur Detektion der PKD-Isoformen nutzten wir ECL plus und ließen die Membranen 10 Minuten belichten. Die Houskeeping-Proteine (Vincullin und β-Actin) wurden mit homemade ECL innerhalb von 1 bis 2 Minuten Belichtung detektiert. Die Auswertung aller Blots erfolgte mit ImageJ.

2.2.7 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mittels Excel und SPSS. Es wurden die Mittelwerte und der zugehörige SEM ermittelt. Als statistische Tests wurde ANOVA mit dem Bonferroni PostHoc-Test bzw. mit dem Mann-Whitney und Wilcoxon-Test verwendet. Eine Aussage wurde als signifikant angenommen bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ($p \leq 0,05$).

3 Ergebnisse

3.1 Die Proteinkinase D in Gesamtleberlysaten

Als Erstes wurde auf Proteinebene mittels Western Blot die Expression der einzelnen Isoformen, sowie ihre Aktivierung während der Zirrhoseentstehung in Gesamtleberlysaten untersucht.

Als Housekeeping-Protein zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmenge wurde Vincullin bei 130 kDa genutzt. Als Kontrollgruppe wurden altersgematchte Normaltiere (n=6) verwendet. Abbildung 3.1 zeigt die Expression von PKD1 zu verschiedenen Zeitpunkten der Fibrose- und Zirrhoseentstehung.

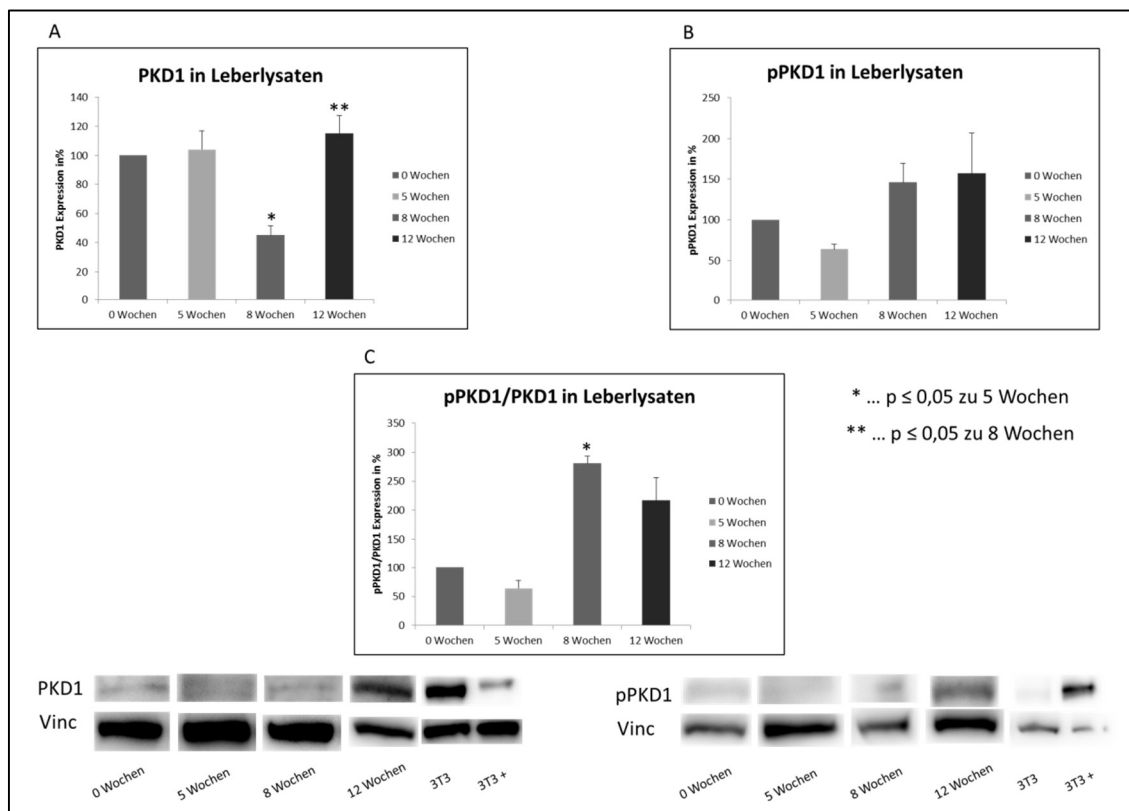


Abbildung 3.1 PKD1-Expression in Leberlysaten von Wistar-Ratten
 0 Wochen n=6, 5 Wochen n=5, 8 Wochen n=4, 12 Wochen n=4
 A absolute PKD1 Expression bezogen auf die Kontrollgruppe
 B Expression der phosphorylierten PKD1 bezogen auf die Kontrollgruppe
 C Expression der phosphorylierten PKD1 zur absoluten PKD1 bezogen auf die Kontrollgruppe

Die Expression von PKD1 in Gesamtleberlysaten zeigt keinen klaren Trend. In der statistischen Auswertung konnten ein signifikanter Abfall in der 8. Woche im Vergleich zur 5. Woche verzeichnet werden, sowie ein signifikanter Anstieg in der dekompensierten Zirrhose (Woche 12) zur Woche 8. Die Expression der phosphorylierten PKD1 zeigte eine Zunahme ohne Signifikanz während der voranschreitenden Fibrose. Es konnte eine Steigerung von $64\% \pm 5,9\%$ in Woche 5 auf $157\% \pm 49,3\%$ in Woche 12 detektiert werden. Im Verhältnis zueinander erkennt man eine steigende Aktivität mit zunehmender Fibrose zwischen PKD1 im phosphorylierten und nicht-phosphorylierten Zustand. Im Vergleich kommt es zu einer signifikanten Steigerung von $64\% \pm 13,3\%$ in Woche 5 zu $281\% \pm 12,1\%$ in Woche 8.

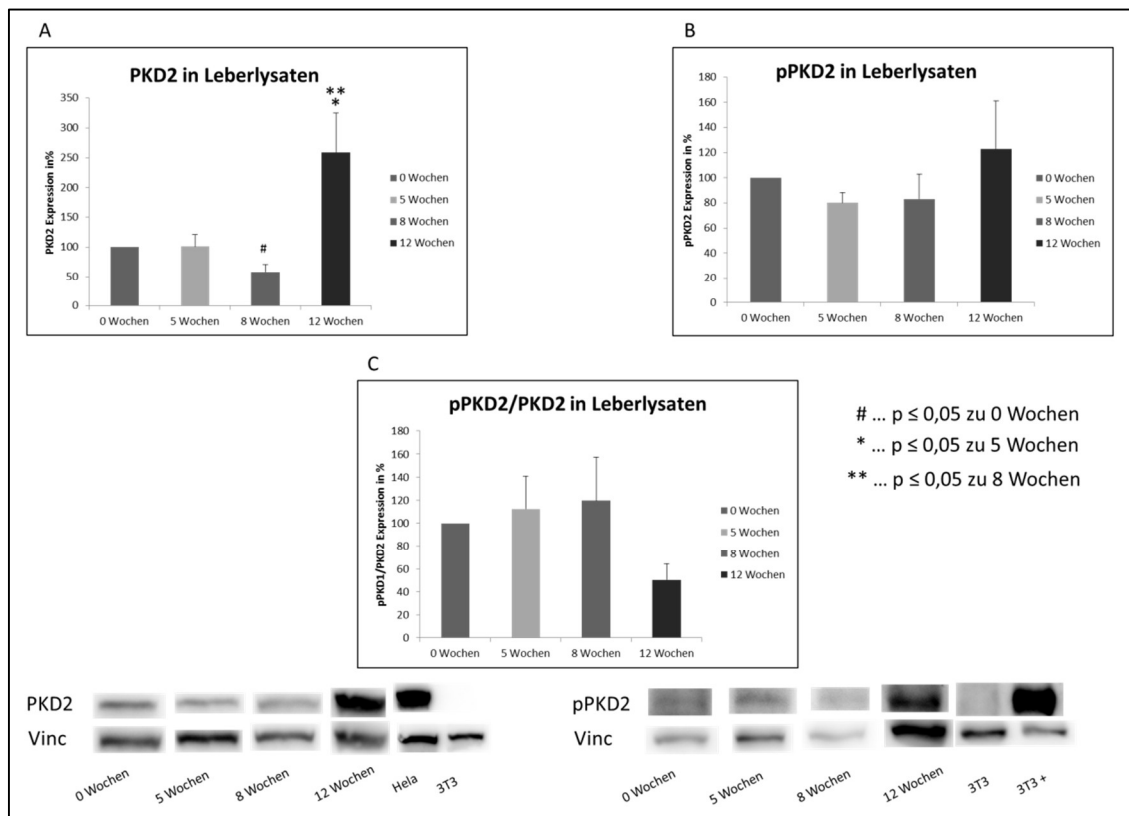


Abbildung 3.2 PKD2-Expression in Leberlysaten von Wistar-Ratten

0 Wochen n=6, 5 Wochen n=5, 8 Wochen n=4, 12 Wochen n=4

A absolute PKD2 Expression bezogen auf die Kontrollgruppe

B Expression der phosphorylierten PKD2 bezogen auf die Kontrollgruppe

C Expression der phosphorylierten PKD2 zur absoluten PKD2 bezogen auf die Kontrollgruppe

Im Gegensatz zur PKD1 zeigte sich bei der PKD2 eine deutlich erhöhte absolute Proteinexpression. Im Vergleich zur beginnenden Fibrose mit 5 Wochen kam es in der dekompensierten Zirrhose nach 12 Wochen Inhalation mit CCL₄ zu einer signifikanten

Steigerung der absoluten PKD2 Expression von $101\% \pm 20,5\%$ auf $259\% \pm 65,6\%$. In der Expression der phosphorylierten PKD2 zeigt sich keine eindeutige Tendenz. Die Werte scheinen über den Prozess der Zirrhoseentstehung beinahe identisch zu bleiben. Auch im Verhältnis der phosphorylierten PKD2 zur absoluten PKD2 lässt sich keine Veränderung nachweisen.

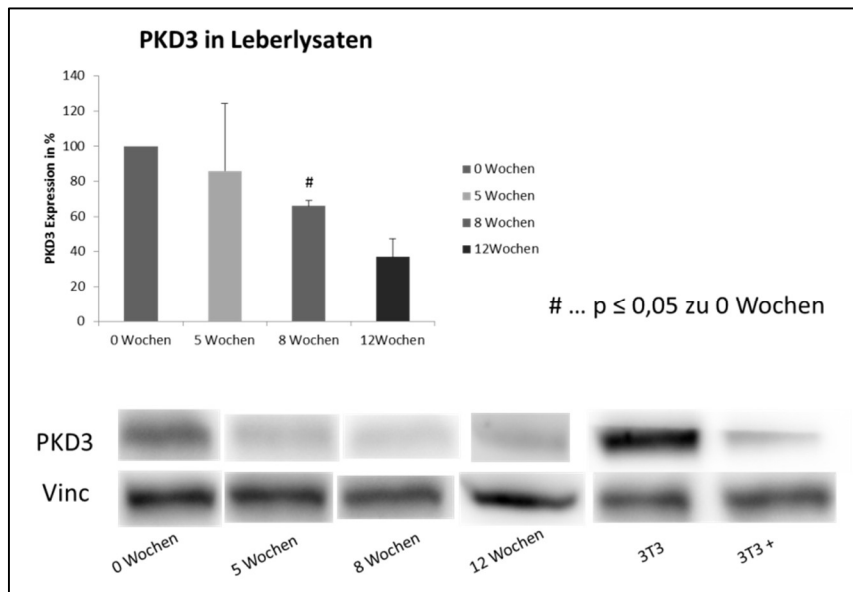


Abbildung 3.3 PKD3-Expression in Leberlysaten von Wistar-Ratten
0 Wochen n=6, 5 Wochen n=5, 8 Wochen n=4, 12 Wochen n=4
Absolute PKD3 Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe

Während der voranschreitenden Fibrose konnte ein signifikanter Abfall der Expression von PKD3 verzeichnet werden. Im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 100% kam es in der Woche 8 zu einem Abfall der PKD3 Expression auf $66\% \pm 3\%$.

3.2 PKD-Expression in primären Sternzellen

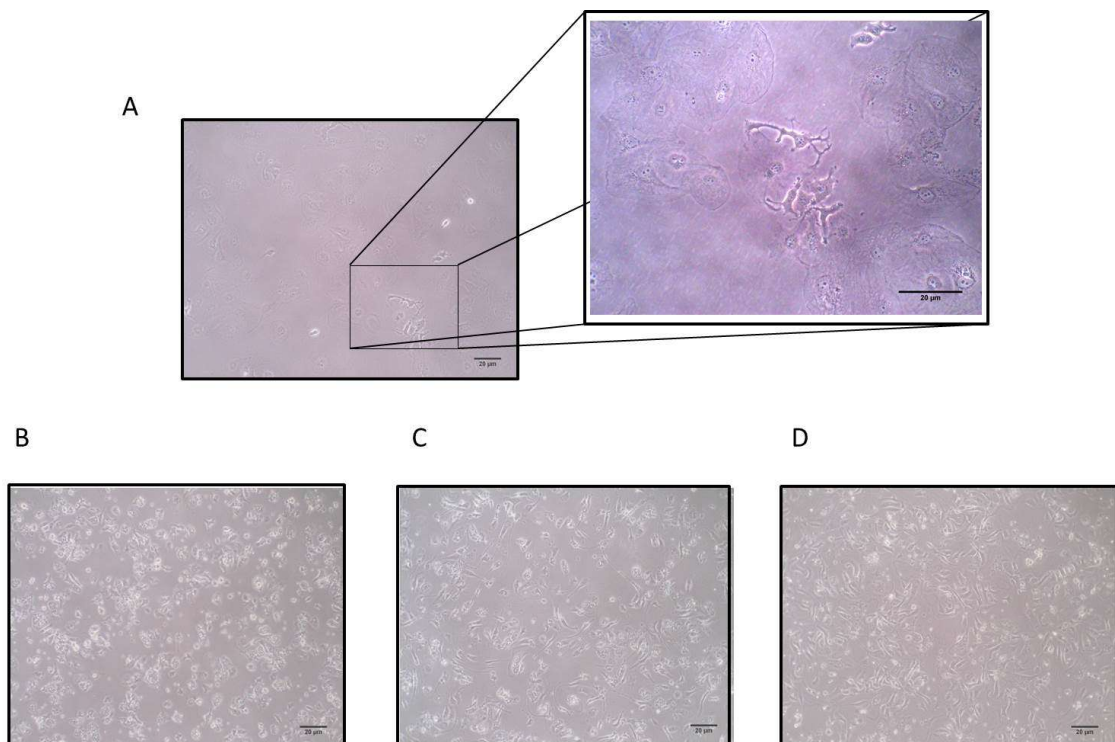


Abbildung 3.4 primäre hepatische Sternzellen

A 20fache Vergrößerung aus 10facher Vergrößerung einer primären hepatischen Sternzelle aus Kontrolltieren

B primäre hepatische Sternzellen aus Kontrolltieren, 10fach vergrößert

C primäre hepatische Sternzellen aus Wistar-Ratten im Fibrosestadium (5 Wochen CCl₄), 10fach vergrößert

D primäre hepatische Sternzellen aus Wistar-Ratten im dekompenzierten Zirrhosestadium (12 Wochen CCl₄), 10fach vergrößert

Vor der Lyse zur weiteren Proteinaufarbeitung der separierten hepatischen Sternzellen wurden Kontrollbilder angefertigt. In allen verwendeten Präparaten konnten wir vitale Sternzellen nachweisen.

Auch bei den primären Sternzellen wurden die aus gesunden Tieren ($n_{\text{PHSC}}=3$) gewonnenen primären Sternzellen als Kontrollgruppe eingesetzt. Als Housekeeping-Protein wurde Vincullin bei 130kDa verwendet.

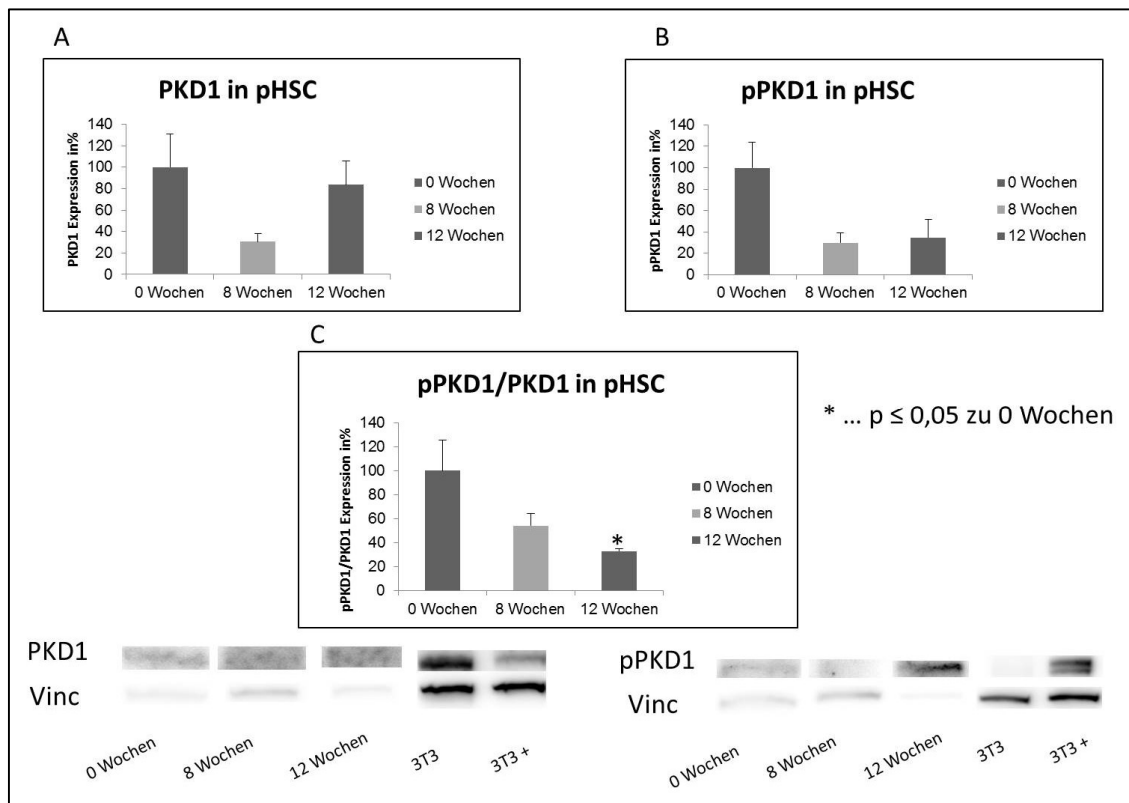


Abbildung 3.5 Expression von PKD1 in pHSC

0 Wochen n=3, 8 Wochen n=3, 12 Wochen n=3

A absolute PKD1 Expression bezogen auf die Kontrollgruppe

B Expression der phosphorilierten PKD1 bezogen auf die Kontrollgruppe

C Expression der phosphorilierten PKD1 zur absoluten PKD1 bezogen auf die Kontrollgruppe

In den primären Sternzellen kommt es unter der Entwicklung der Fibrose zunächst zu einem Abfall der absoluten PKD1-Expression. Im Vollbild der Zirrhose scheint die Expression wieder anzusteigen. Anders verhält es sich hingegen in der phosphorilierten PKD1. Dort scheint es bei beginnender Fibrose zu einer verminderten Expression der pPKD1 zu kommen, welche im Verlauf noch weiter abfällt. Im Verhältnis (PKD1/pPKD1) kommt es zu einem signifikanten Abfall der aktivierten Isoform von $100\% \pm 25,4\%$ in der Kontrollgruppe auf $33\% \pm 2,2\%$ nach 12 Wochen Inhalation mit CCl_4 und dekompensierter Leberzirrhose.

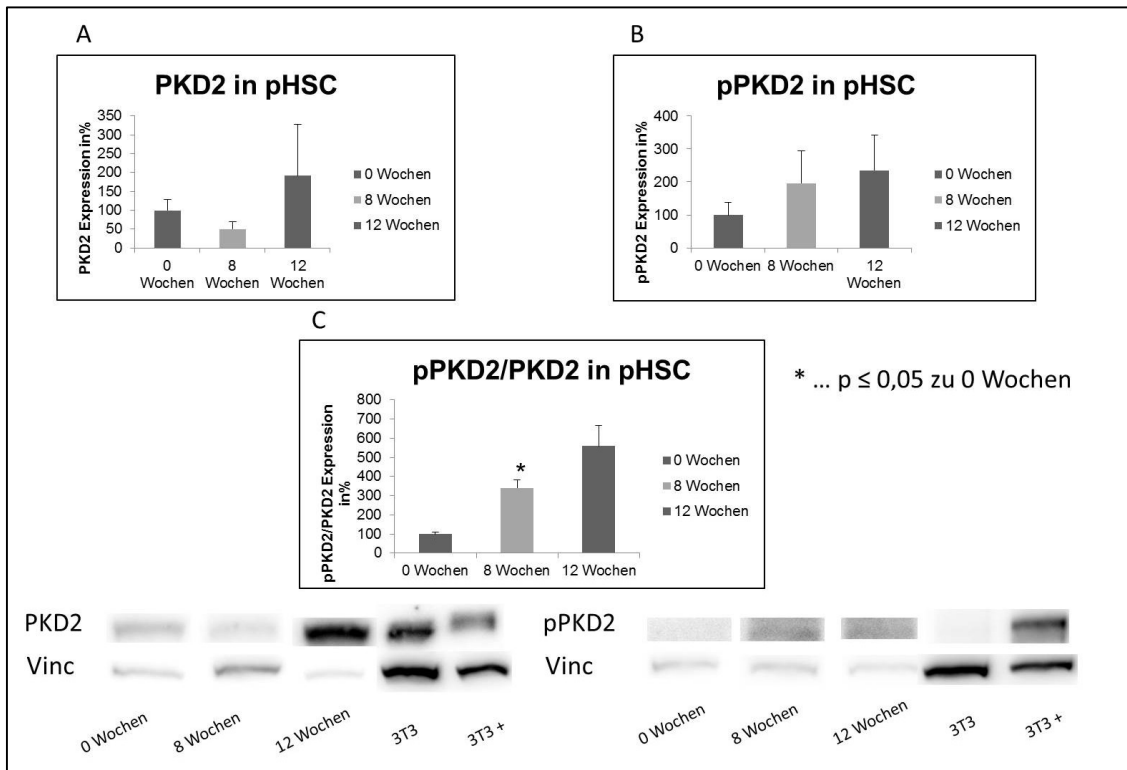


Abbildung 3.6 Expression von PKD2 in pHSC

0 Wochen n=3, 8 Wochen n=3, 12 Wochen n=3

A absolute PKD2 Expression bezogen auf die Kontrollgruppe

B Expression der phosphorylierten PKD2 bezogen auf die Kontrollgruppe

C Expression der phosphorylierten PKD2 zur absoluten PKD2 bezogen auf die Kontrollgruppe

In den Sternzelllysaten zeigt sich ähnlich zu den Leberlysaten eine vermehrte Expression von PKD2 mit zunehmender Fibrosierung. Es kommt zu einem Anstieg von $100\pm 27,7\%$ auf $191,9\pm 136,3$. Eine ähnliche Tendenz stellt sich auch bei der phosphorylierten Proteinkinase D2 dar. Diese scheint auch mit voranschreitender Zirrhose vermehrt exprimiert zu werden. So kann eine Zunahme von $100\pm 33\%$ auf $235,2\pm 104,4\%$ verzeichnet werden. Eine signifikante Steigerung der Expression der aktivierten PKD2 zeigt sich nach 8 Wochen Inhalation mit CCl_4 . Dabei kommt es im Vergleich zur Kontrollgruppe mit $100\pm 11\%$ zu einer signifikanten Steigerung der aktivierten Isoform auf $341,2\pm 41,6\%$ in der beginnenden Fibrose. Dieser Anstieg ließ sich im Weiteren bei fortschreitender Zirrhose nachweisen.

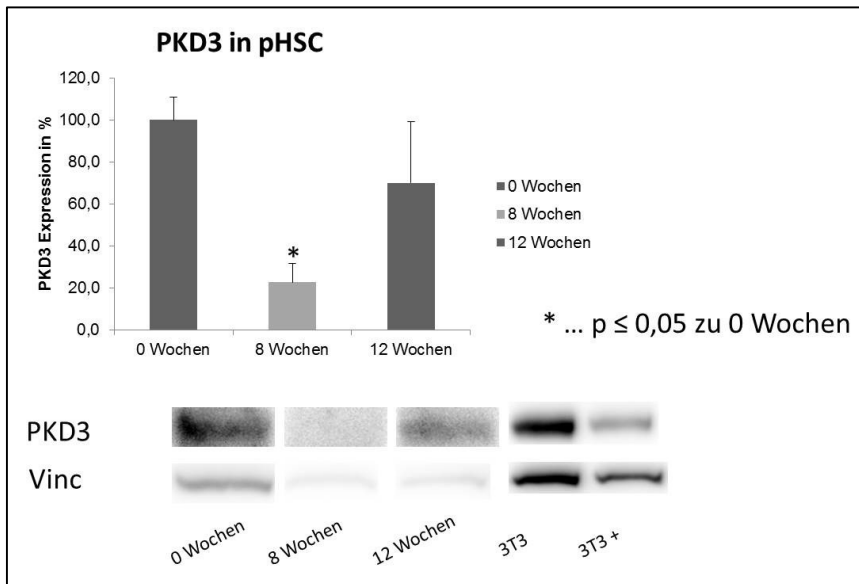


Abbildung 3.7 Expression von PKD3 in pHSC
 0 Wochen n=3, 8 Wochen n=3, 12 Wochen n=3
 Absolute PKD3 Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe

Ähnlich zu den Vollleberlysaten kommt es auch in den Zelllysaten der primären Sternzellen zu einem signifikanten Abfall der Expression von PKD3 in der beginnenden Fibrose. Die Expression verringert sich ausgehend von der Kontrollgruppe von $100\% \pm 11\%$ auf $22,6\% \pm 9\%$ nach 8 Wochen Zirrhoseinduktion signifikant. Auch bei dekompenzierter Zirrhose ließ sich ein Abfall der PKD3 Expression auf $70,1\% \pm 29,1\%$ im Vergleich zur Kontrollgruppe, allerdings ohne signifikantes Ergebnis, nachweisen.

3.3 PKD-Expression unter Hypoxie

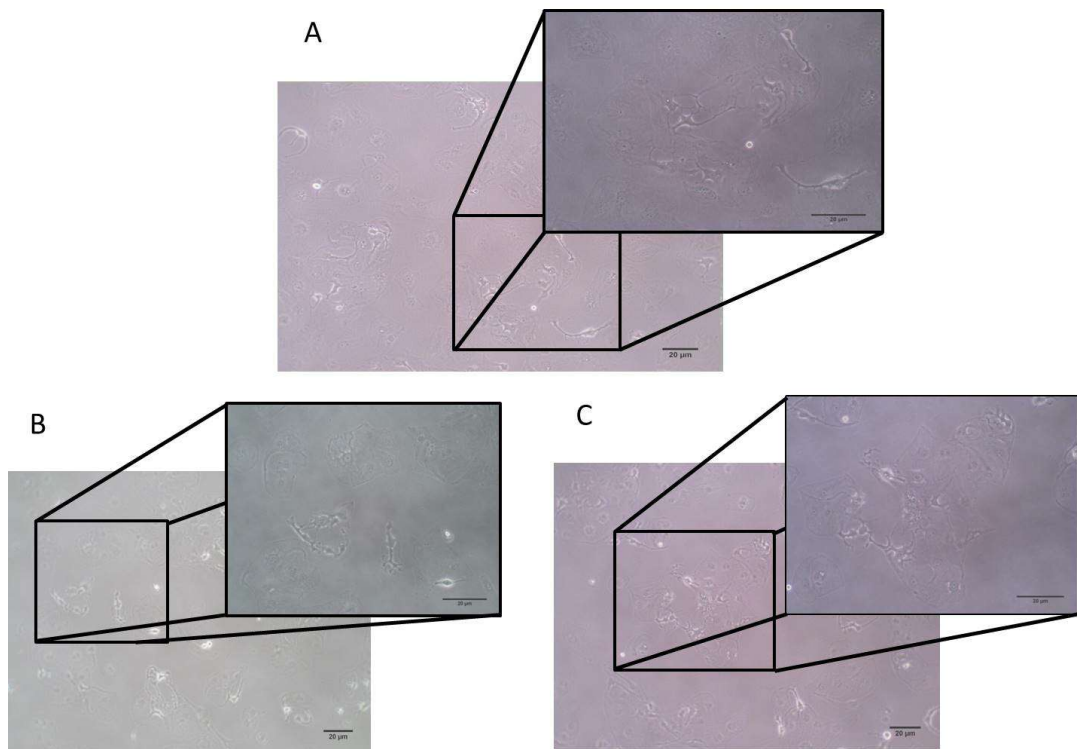


Abbildung 3.8 Zellmorphologie der humanen Zelllinie HSC-B in 10facher und 20facher Vergrößerung

A HSC-B 0h

B HSC-B 48h Normoxie

C HSC-B 48h Hypoxie

Da Hypoxie einen wichtigen Trigger in der Entstehung der Zirrhose darstellt, setzten wir die immortalisierte Zelllinie HSC-B 48 Stunden einer Umgebung mit einem normalen Sauerstoffanteil von 21% und einer Hypoxie mit 0,5% O₂ aus. Sowohl in der Normoxie als auch in der Hypoxie zeigten die HSC-B ihr reguläres Erscheinungsbild mit weitausgezogenen Zellausläufern.

Zur Kontrolle der hypoxischen Bedingungen wurde stets mittels Western Blot die Expression von Hif1 α überprüft (Coulon et al. 2011). Das hier exemplarisch gezeigte positive Ergebnis der in Hypoxie kultivierten HSC-B konnte in allen Versuchsreihen, auch in den primären Sternzellen, nachvollzogen werden.

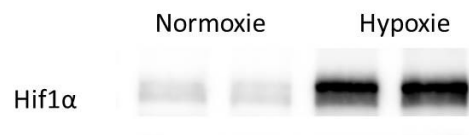


Abbildung 3.9 Hypoxienachweis in HSC-B nach 48h Kultivierung

Wie bereits in einem früheren Abschnitt (siehe Kapitel 2.2.4) erläutert, generierten wir vor jeder Inkubation für 48 Stunden unter Hypoxie oder Normoxie eine Kontrollgruppe, welche als 0h (null Stunden) benannt wurde. Als Housekeeping Protein nutzen wir β -Actin bei 42kDa.

3.3.1 PKD-Expression in HSC-B unter Hypoxie

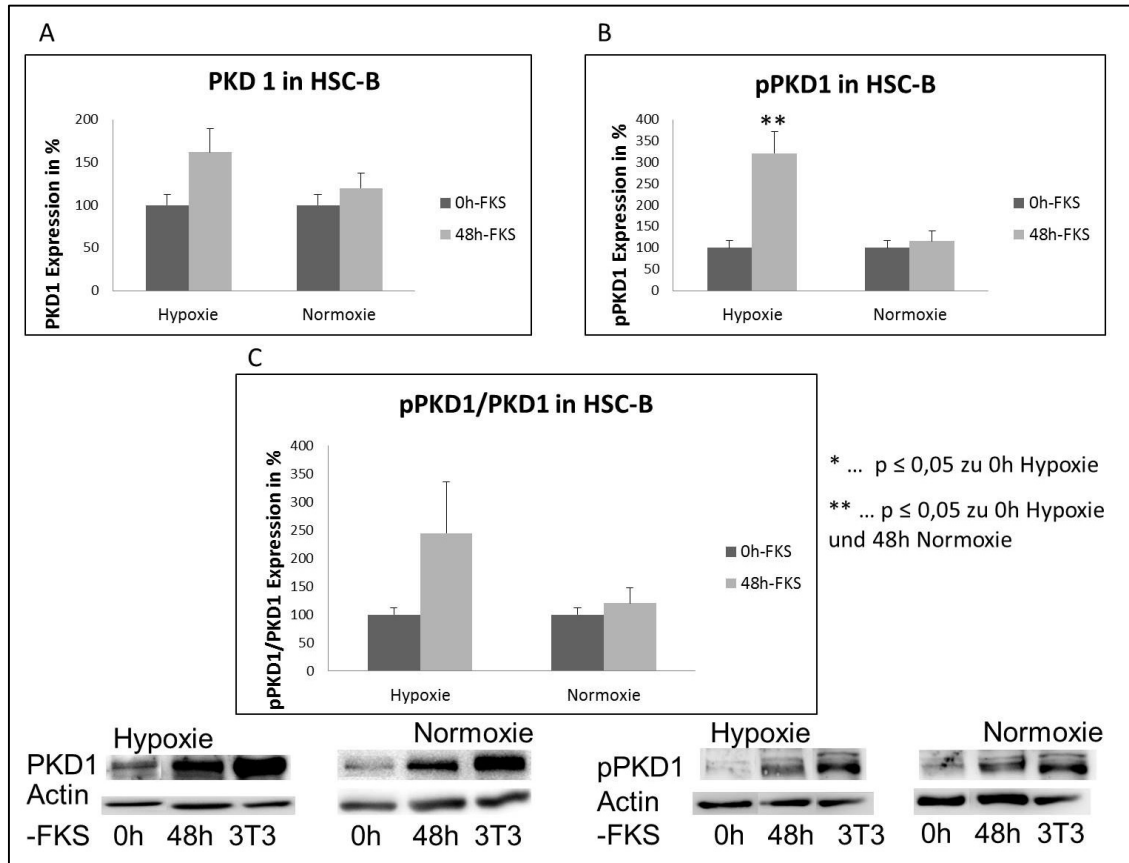


Abbildung 3.10 PKD1 in HSC-B unter Hypoxie und Normoxie

Normoxie n=6, Hypoxie n=6

A absolute Expression von PKD1 unter Normoxie und Hypoxie in HSC-B im Vergleich zur Kontrollgruppe

B Expression der phosphorylierten PKD1 unter Normoxie und Hypoxie in HSC-B im Vergleich zur Kontrollgruppe

C Expression der phosphorylierten PKD1 zur absoluten PKD1 unter Normoxie und Hypoxie in HSC-B im Vergleich zur Kontrollgruppe

Bezogen auf die absolute Expression von PKD 1 in HSC-B kommt es unter hypoxischen Inkubationsbedingungen nach 48 Stunden zu einer nicht-signifikanten Steigerung der PKD1 Expression um $62\% \pm 28\%$ bezogen auf die Kontrollgruppe ($100\% \pm 12\%$). Auch unter Normoxie mit 21% O_2 -Gehalt in der Luft konnte ein leichter, nicht-signifikanter Anstieg der PKD1-Expression um $20\% \pm 18\%$ verzeichnet werden.

Hingegen kommt es bei der aktivierten Isoform unter hypoxischen Bedingungen zu einer signifikanten Zunahme der absoluten pPKD1 Expression um das Dreifache, bezogen auf die Kontrollgruppe (100%±17% auf 321%±51%). Unter Normoxie konnte keine Änderung verzeichnet werden. Die Expression nach weiteren 48 Stunden Kultivierung unter Normbedingungen der phosphorylierten PKD1 gleicht denen der Kontrollgruppe (100%±17% zu 116±23%). Im Verhältnis der phosphorylierten Isoform und der absoluten PKD1 konnten wir zeigen, dass es zu einer nicht-signifikanten Zunahme der aktivierten PKD1 unter hypoxischen Bedingungen kommt. Unter normwertigen Inkubationsbedingungen verändert sich die Aktivität hingegen nicht.

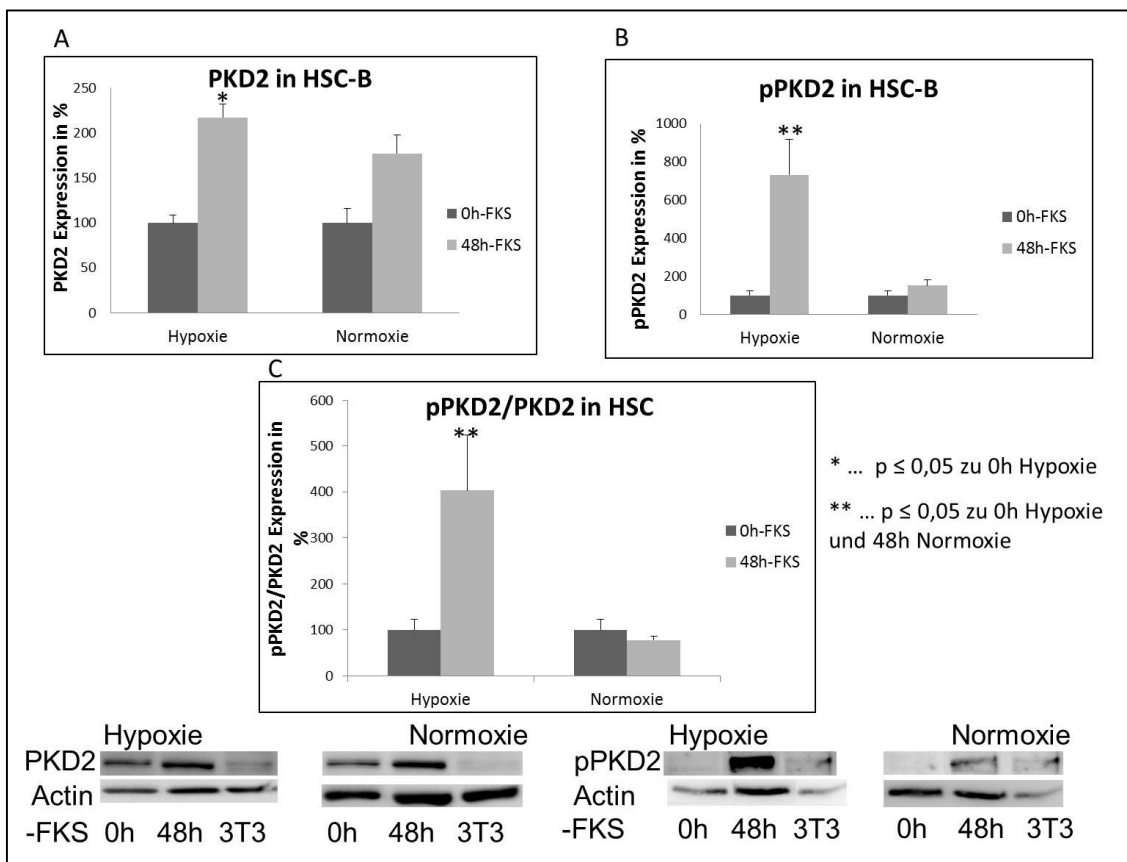


Abbildung 3.11 PKD2 in HSC-B unter Hypoxie und Normoxie

Normoxie n=6, Hypoxie n=6

A absolute Expression von PKD2 unter Normoxie und Hypoxie in HSC-B im Vergleich zur Kontrollgruppe

B Expression der phosphorylierten PKD2 unter Normoxie und Hypoxie in HSC-B im Vergleich zur Kontrollgruppe

C Expression der phosphorylierten PKD2 zur absoluten PKD2 unter Normoxie und Hypoxie in HSC-B im Vergleich zur Kontrollgruppe

Die Expression der PKD2 in HSC-B ließ sich durch die Inkubation unter Hypoxie signifikant um das Doppelte steigern (100%±16% auf 211%±14%). Auch unter Normoxie kam es zu einem nicht-signifikanten Anstieg der Expression der Isoform von 100%±16%

auf $183\% \pm 21\%$. Zwischen dem Gehalt an PKD2 nach 48 Stunden Kultivierung unter hypoxischen oder normoxischen Bedingungen gab es keinen signifikanten Unterschied. Dies stellte sich in der phosphorylierten Isoform anders dar. Unter Normoxie kam es zu keiner wesentlichen Veränderung der Expression der pPKD2. Sowohl zur Stunde null als auch nach weiteren 48 Stunden Kultivierung unter 21% O₂ stellten sich die Werte ohne signifikante Änderung dar ($100\% \pm 24\%$ zu $153\% \pm 30$). Unter hypoxischen Bedingungen kam es zu einer signifikanten Steigerung der Expression der phosphorylierten PKD2 um das 7-fache. Dies stellt sich auch dar, wenn die absoluten Werte der PKD2 und ihrer phosphorylierten Form ins Verhältnis gesetzt werden. Dabei zeigt sich eine signifikante Aktivitätszunahme der PKD2 unter hypoxischen Bedingungen um $300\% \pm 121\%$. Unter Normoxie hingegen bleibt die Aktivität identisch und nimmt bezogen auf die Kontrollgruppe sogar leicht ab. ($100\% \pm 23\%$ zu $77\% \pm 8\%$)

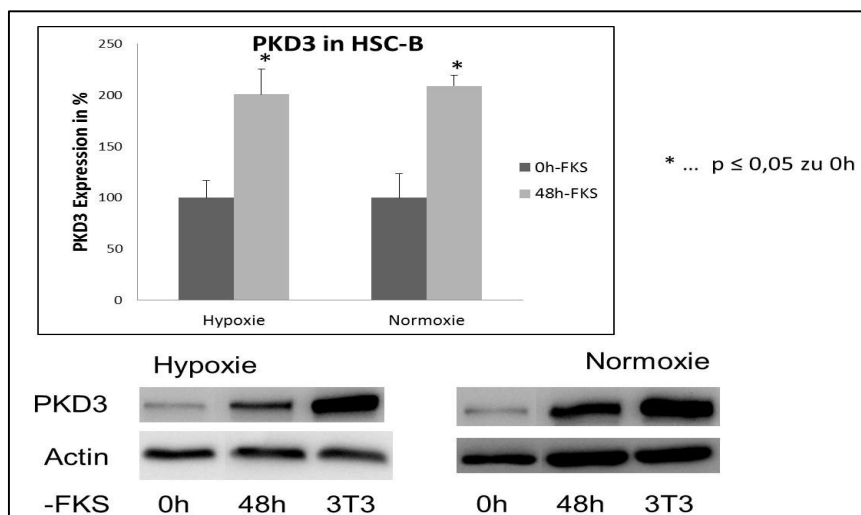


Abbildung 3.12 PKD3 in HSC-B unter Hypoxie und Normoxie
 Normoxie n=6, Hypoxie n=6
 Absolute PKD3 Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe

Sowohl unter hypoxischen Bedingungen als auch unter Normoxie kommt es zu einem signifikanten Anstieg der PKD3 Expression nach 48h Kultivierung. Zwischen beiden Versuchsbedingungen kommt es zu keinem signifikanten Unterschied im Anstieg der Expression der PKD3. Unter Hypoxie kommt es zu einem signifikanten Anstieg der PKD3 Expression um $99\% \pm 23\%$. Bei einem normalen Sauerstoffanteil von 21% steigt der Gehalt von PKD3 um $119\% \pm 11\%$.

3.3.2 PKD-Expression in primären Sternzellen unter Hypoxie

Wie bereits in mehreren Arbeiten gezeigt werden konnte, ist die Hypoxie ein wesentlicher Trigger in dem Voranschreiten der Leberzirrhose und die primäre Sternzelle ihr Schrittmacher (Paternostro 2010).

Um erkennen zu können, ob dieser komplexe Prozess auch über die Proteinkinase D vermittelt wird, nutzen wir primäre Sternzellen aus gesunden Wistar-Ratten, welche wir nach der Anzucht in Petrischalen wie unter 2.2.3 beschrieben für weitere 48 Stunden unter Normoxie oder Hypoxie weiter kultivieren ließen.

In den Kontrollaufnahmen zeigten sich bildmorphologisch keine Unterschiede nach weiteren 48 Stunden in Kultur unter 0,5% oder 21% O₂. Es bildeten sich in beiden Gruppen vitale primäre Sternzellen aus.

Auch in diesem Hypoxieexperiment erfolgte in jeder Versuchsreihe ein Nachweis der hypoxischen Kultivierungsbedingungen mittels Western Blot und Nachweis von Hif1 α . Als Housekeeping Protein nutzten wir β -Actin.

Auch in diesem Setting generierten wir vor Inkubation der Zellproben unter hypoxischen oder normoxischen Bedingungen eine Kontrollgruppe, die als 0h (null Stunden) benannt wurde.

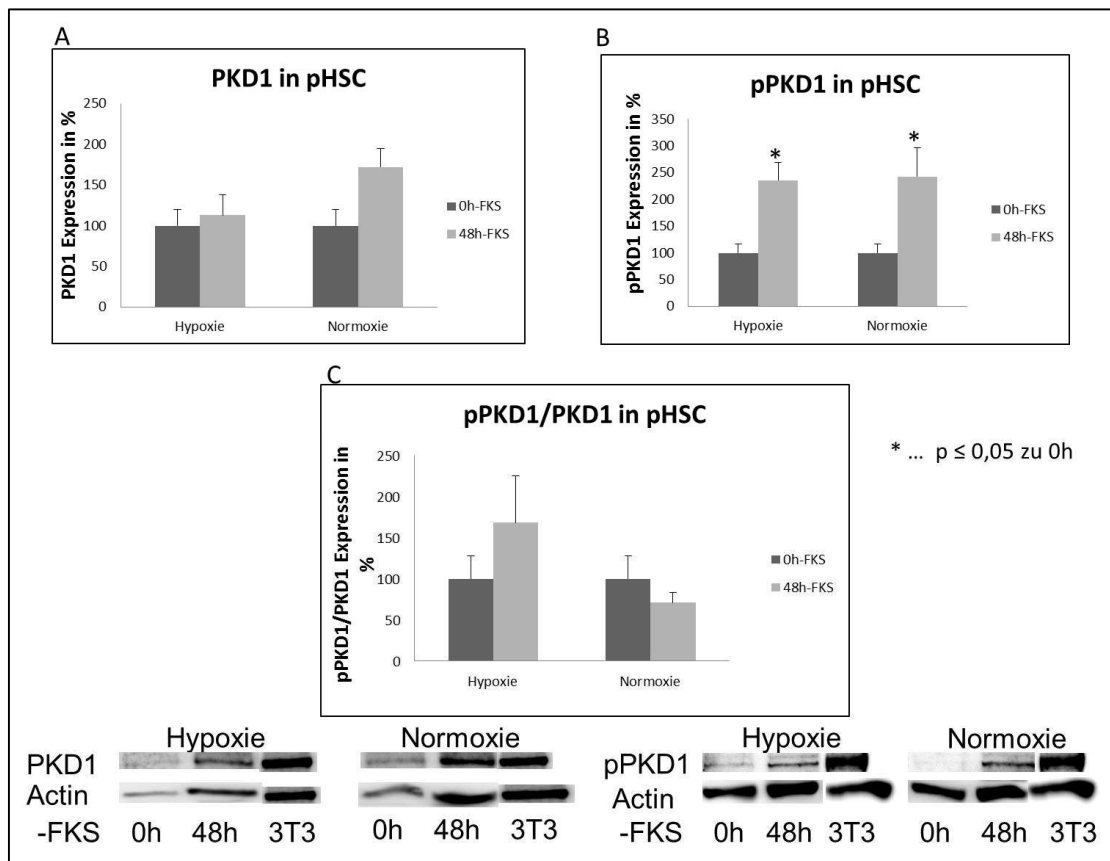


Abbildung 3.13 PKD1 in primären HSC (pHSC) unter Hypoxie und Normoxie
Normoxie n=4, Hypoxie n=4

A absolute Expression von PKD1 unter Normoxie und Hypoxie in pHSC im Vergleich zur Kontrollgruppe

B Expression der phosphorilierten PKD1 unter Normoxie und Hypoxie in pHSC im Vergleich zur Kontrollgruppe

C Expression der phosphorilierten PKD1 zur absoluten PKD1 unter Normoxie und Hypoxie in pHSC im Vergleich zur Kontrollgruppe

Unter hypoxischen Bedingungen scheint sich die Expression der PKD1 im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht zu verändern. Die Werte bleiben annähernd gleich ($100\% \pm 20\%$ zu $112\% \pm 25\%$). Im Gegensatz unter Normoxie kommt es zu einem nicht-signifikanten Anstieg der absoluten PKD1 Expression um $72\% \pm 22\%$. Diese Zunahme der Expression ist weder zur Kontrollgruppe noch zur Gruppe nach 48 Stunden Hypoxie signifikant. Anderes zeichnet sich ab, wenn man die absolute Menge an phosphorilierten PKD1 untersucht. Dabei kommt es sowohl unter hypoxischen als auch normoxischen Bedingungen zu einem signifikanten Anstieg in der Expression der pPKD1 im Vergleich zur Kontrollgruppe. In der Hypoxie als auch Normoxie kommt es zu einer Steigerung um ca. das Doppelte (100 ± 16 zu Hypoxie $263 \pm 33\%$ zu Normoxie $243 \pm 54\%$). Zwischen beiden Gruppen gibt es keinen Unterschied in der Expression der phosphorilierten PKD1. Um die Aktivität der Proteinkinase zu beschreiben setzten wir wieder die

detektierte phosphorylierte PKD1 zur absoluten PKD1 ins Verhältnis. Da unter hypoxischen Bedingungen kaum eine Änderung der Expression der absoluten PKD1 zu verzeichnen war und die aktivierte Form jedoch stark zunahm, kommt es im Verhältnis zu einer nicht-signifikanten Steigerung der Aktivität um $69\% \pm 56\%$. Unter Normoxie verändert sich die Aktivität der Proteinkinase kaum. Eher kommt es zu einem nicht-signifikanten Abfall um $29\% \pm 12\%$.

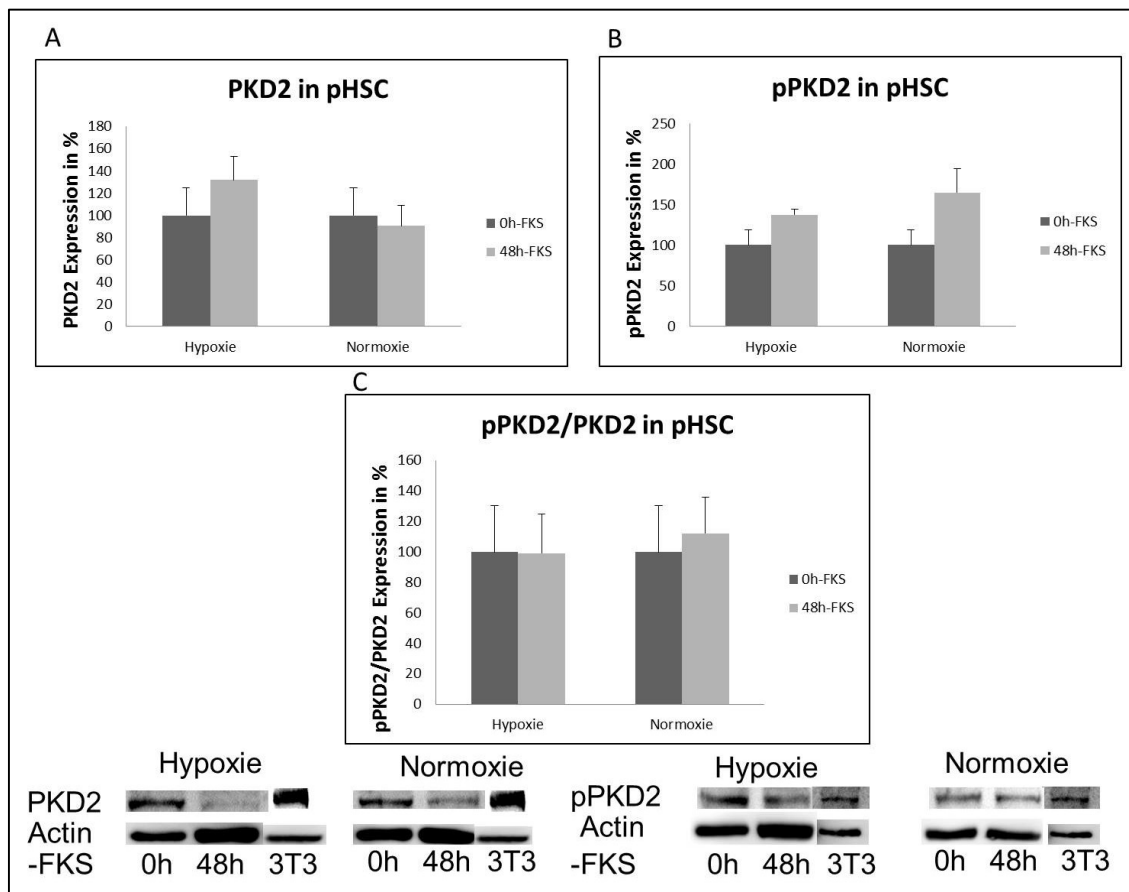


Abbildung 3.14 PKD2 in primären HSC (pHSC) unter Hypoxie und Normoxie

Normoxie n=5, Hypoxie n=5

A absolute Expression von PKD2 unter Normoxie und Hypoxie in pHSC im Vergleich zur Kontrollgruppe

B Expression der phosphorylierten PKD2 unter Normoxie und Hypoxie in pHSC im Vergleich zur Kontrollgruppe

C Expression der phosphorylierten PKD2 zur absoluten PKD2 unter Normoxie und Hypoxie in pHSC im Vergleich zur Kontrollgruppe

Anders als in der immortalisierten Zelllinie kristallisiert sich in der Expression der Proteinkinase D2 kein klarer Trend heraus. Sowohl die absolute als auch die phosphorylierte PKD2 ändert ihre Expression weder unter hypoxischen noch unter normoxischen Bedingungen. Dies stellt sich auch im Verhältnis beider Parameter dar. Weder unter Hypoxie noch Normoxie kommt es zu einer Zunahme der Aktivität der

Proteinkinase. Zu bemerken ist, dass die absolute PKD2 Expression unter Hypoxie nicht-signifikant leicht zu steigen scheint ($100\% \pm 25\%$ zu $132\% \pm 21\%$) und unter Normoxie geringfügig nicht-signifikant sinkt ($100\% \pm 25\%$ zu $91\% \pm 18\%$). Bei der phosphorylierten Isoform kommt es zu einer leichten, nicht-signifikanten Erhöhung in der Expression, sowohl unter Normoxie als auch Hypoxie. ($100\% \pm 19\%$ zu $165\% \pm 30\%$ zu $138\% \pm 7\%$). Im Verhältnis der phosphorylierten PKD2 zur absoluten PKD2 gibt es weder in der Hypoxie noch Normoxie einen Unterschied.

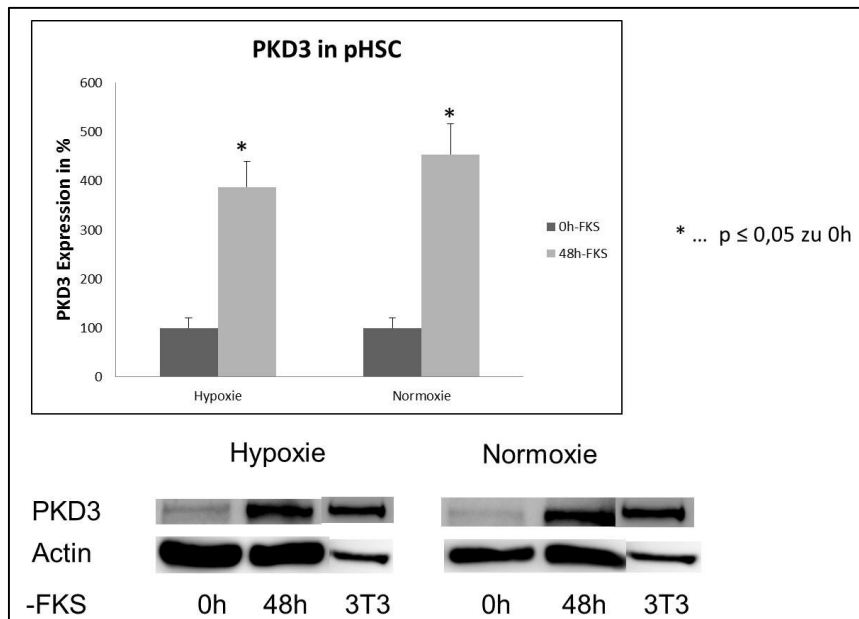


Abbildung 3.15 PKD3 in primären HSC (pHSC) unter Hypoxie und Normoxie
Normoxie n=5, Hypoxie n=5
Absolute PKD3 Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe

Das auch hier in den primären Sternzellen gefundene Ergebnis ähnelt dem in der immortalisierten Sternzelllinie HSC-B. Sowohl unter hypoxischen als auch normoxischen Bedingungen kommt es zu einer Zunahme der Expression der PKD3. Bei einer Kultivierung unter 0,5% O₂ kommt es nach 48 Stunden zu einer signifikanten Steigerung der Expression um beinahe das Vierfache ($100\% \pm 21\%$ zu $388\% \pm 52\%$). Ein ähnliches Ergebnis stellt sich auch unter Normoxie dar. Unter diesen Parametern kommt es ebenso zu einer signifikanten Steigerung um das beinahe 4,5-fache im Vergleich zur Kontrollgruppe ($100\% \pm 21\%$ zu $454\% \pm 62\%$). Zwischen beiden Gruppen nach 48 Stunden 0,5% O₂ oder 21% besteht kein Unterschied.

4 Diskussion

4.1 Rolle der PKD in der Leber

Die im Rahmen dieser Dissertation erhobenen Daten zeigen, dass im Lebergewebe alle Subgruppen der PKD-Familie exprimiert werden. Jede einzelne wird unter voranschreitender Fibrose unterschiedlich in ihrer Expression und Aktivität moduliert. Wir konnten zeigen, dass es zu einer Erhöhung der absoluten PKD1, sowie der PKD2 in der dekompensierten Zirrhose kommt im Vergleich zur kompensierten Fibrose in Woche 8. Interessanterweise kommt es zu Beginn der Fibrose zu einem Abfall der Expression von PKD1 und PKD2, jedoch zu einer deutlichen Steigerung der Aktivität. Besonders bei der PKD1 sind die meisten Proteine in diesem Stadium phosphoryliert und aktiviert. In der PKD2 sieht man zwar einen ähnlichen Trend, jedoch ohne Signifikanz. Die PKD3 fällt aus diesem Muster vollständig heraus. Ihre Expression wird mit zunehmender Fibrose immer geringer.

Ein genauer Grund warum es zu unterschiedlichen Expressionen der Subtypen kommt, lässt sich in der Literatur nicht eruieren. Wir vermuten, dass den einzelnen Isotypen unterschiedliche Aufgaben und Funktionen abhängig vom Zellkontext zugeschrieben werden. Die Expression hängt also vom jeweiligem Krankheitsstadium ab.

Die Arbeitsgruppe um Tang et al konnte ähnliche Ergebnisse in der idiopathischen Lungenfibrose nachweisen. Ähnlich zu unseren Ergebnissen wurden in der idiopathischen Lungenfibrose alle 3 Isoformen der PKD-Familie nachgewiesen. Des Weiteren zeigte sich in Analogie zu unseren Erhebungen eine Steigerung der Expression besonders von PKD1 und PKD2, sowie deren Aktivität besonders in Fibroblasten der pulmonalen Fibrose (Tang und Hua 2012). In den hier dargestellten Ergebnissen konnte unter voranschreitender Leberfibrose bis hin zur Zirrhose eine Minderung der Expression von PKD3 beschrieben werden. In den Daten von Tang et al wird lediglich der Nachweis von PKD3 in der Lungenfibrose gezeigt. Wie sich die Expression unter einer voranschreitenden Fibrosierung verhält wird nicht beschrieben.

Bereits in vorangegangenen Untersuchungen bezüglich der Relevanz der PKD-Familie konnte in immunhistologischen Färbungen von Lungenschnitten mit einer idiopathischen Fibrose gezeigt werden, dass die PKD1, 2 und 3 vermehrt und auch aktiviert in den hyperplastischen und regenerativen epithelialen Zellen an fibrotischen Septen des Lungengewebes vorliegt. Außerdem gelang es der Arbeitsgruppe um Gan et al unterschiedliche Lokalisationen der einzelnen PKDs in den alveolären Epithelzellen

zu identifizieren. Während PKD 2 und 3 vor allem im Zytoplasma und Nukleus vorzufinden waren, konnte PKD1 besonders an den Zilien nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu Tang et al konnten Gan et al keine erhöhte Expression der PKD Subtypen in Fibroblasten oder Myofibroblasten nachweisen (Gan et al. 2014). Bisher liegen keine Daten über die Verteilung der einzelnen Subtypen der PKD-Familie in histologischen Schnitten des Lebergewebes vor. Zur weiteren Klärung der Verteilung des Proteins in den verschiedenen Leberzellen, sowie der Verteilung in der Zelle an sich müssen weitere Untersuchungen vorgenommen werden.

4.2 Rolle der PKD in primären Sternzellen

Bei den innerhalb dieser Dissertation erhobenen Daten konnte erstmalig gezeigt werden, dass PKD1, 2 und 3, sowie die phosphorylierte PKD1 und 2 in primären Sternzellen aus Ratten exprimiert werden und die Expression durch eine voranschreitende Fibrose moduliert wird. Besondere Bedeutung scheint in diesen Zellen die PKD2 zu haben. So zeigt sie als Einzige eine signifikante Erhöhung Ihrer aktivierten Form im Verhältnis zur Gesamtproteinmenge bei fortschreitender Fibrose. Die beiden anderen Isoformen zeigen in Ihrer Aktivität und Gesamtexpression eher eine Abnahme. Diese ist bei der PKD3 sogar signifikant in der Fibrose. Ebenso zeigt sich eine signifikante Abnahme der Aktivität der PKD1 in der Zirrhose.

Initial schien es nahe gelegen zunächst in hepatischen Sternzellen weiter nach der Expression der PKD zusehen. Einerseits, da die Sternzelle als treibende Kraft der Fibrose beschrieben wird (Friedman 2008), andererseits aber auch da die PKD in Fibroblasten anderer Organsysteme bereits nachgewiesen wurde (Yoo et al. 2009; Tang und Hua 2012; Woods et al. 2004; Prigozhina und Waterman-Storer 2004; Pusapati et al. 2012).

In Fibroblasten konnten Pusapati et al zeigen, dass die PKD über Rhotekin die RhoA-Kinase aktiviert. Dies beeinflusst die Bildung von Stressfasern (Pusapati et al. 2012). In hepatischen Sternzellen ist die aktivierte Rho-Kinase ein bekannter Triggerfaktor für die Kontraktion der Sternzelle (Pinzani und Marra 2001). Pinzani und Gentilini postulierten, dass eine mögliche Beeinflussung der Kontraktion der Sternzelle ggf. die portale Hypertension und ihre Folgen verbessern könnte. Die Proteinkinase D könnte demzufolge ein möglicher Angriffspunkt sein.

In Endothelzellreihen konnte gezeigt werden, dass PKD die Glykogensynthase 3 hemmt. Dies beeinflusst die Kollagen I-abhängige vaskuläre Morphogenese in HUVECs (Shin et al. 2012). Die Glykogensynthasekinase 3 ist ein Zielmolekül in der Signaltransduktion der Phosphatidylinositol 3-Kinase und stellt einen wichtigen Regulator der Apoptose dar (Pap und Cooper 1998). Son et al konnten zeigen, dass die Hemmung der Phosphatidylinositol 3-Kinase in hepatischen Sternzellen das Fortschreiten der Fibrose hemmt (Son et al. 2009). In Zusammenschau dieser Ergebnisse, obwohl die Daten an unterschiedlichen Zelltypen gesammelt wurden, ist ein möglicher Zusammenhang über die Proteinkinase D denkbar. Ein weiterer Beleg, dass auf diesem Signaltransduktionsweg in lebereigenen Zellen eine Steuerung über PKD2 möglich ist, konnte auch im hepatozellulärem Karzinom nachgewiesen werden (Zhu et al. 2016).

Es gibt gemeinsame Pathways, die in hepatischen Sternzellen durch die PKD-Familie kontrolliert werden können. Uns gelang der erstmalige Nachweis in primären hepatischen Sternzellen mit einer erhöhten Aktivität der PKD2 in der Fibrose.

Nach aktuellem Wissensstand sind die HSC nicht allein verantwortlich für die Fibrose. Das Konzept der epithelialen-mesenchymalen Transition legt nahe, dass auch ortsfremde Fibroblasten (zirkulierende oder aus dem Knochenmarkstammende Zellen) eine Rolle spielen können (Lee 2014). Auch sollen mittels epithelialer-mesenchymaler Transition Hepatozyten oder Cholangiozyten zur Umdifferenzierung von profibrotischen Zellen befähigt sein (Paternostro 2010). In anderen Zelllinien und Geweben wie Brustkrebs oder Pankreaskarzinom (Durand et al. 2016) konnte bereits gezeigt werden, dass die Familie der Proteinkinase D in diesem Prozess eine tragende Rolle spielt. Ebenfalls zeigt die aktuell Datenlage, dass sowohl in der PKD vermittelten epithelialen-mesenchymalen Transition, sowie der Stimulation und Verfestigung der aktivierten Sternzelle (Friedman 2000) TGF β eine besondere Rolle spielt.

Des Weiteren ist die Rolle der Endothelzellen nicht zu vernachlässigen. Bereits in diversen anderen Organen und Zelllinien ist die Beteiligung an der Angiogenese und der VEGF-vermittelten Signaltransduktion der PKD nachgewiesen (Evans et al. 2008; Ren 2016; Hao et al. 2009a). Evans et al konnten bereits in Endothelzelllinien zeigen, dass die PKD eine Phosphorylierung bei Hitzeschockproteinen bewirken kann (Evans et al. 2008). Ähnliches könnte auch bei der hepatischen Endothelzelle und der Regulation der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS) möglich sein, welches einen weiteren vielversprechenden Ansatzpunkt zur Therapie der portalen Hypertension darstellen könnte (Ursula E. Lee B.S. MSTP 2011).

Andere Prozesse, die nachweislich durch die hepatische Sternzelle in der Fibrose verursacht werden, wie durch Endothelin oder PDGF, haben in ihrer Signaltransduktion gemeinsame Endstrecken mit der PKD. Beispielsweise konnten Zhao et al in hepatischen Sternzellen zeigen, dass es unter Stimulation mit PDGF über die COX-2 zu einer vermehrten Expression von VEGF kommt (Zhao et al. 2012). Ein ähnlicher Signalweg (hier Stimulation mit Bradykinin oder TNF- α) wurde bereits von Yoo et al in myofibroblasten-ähnlichen Zellen des Kolons beschrieben. Dort konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von COX-2 PKD-vermittelt ist. Inwiefern dort eine Relevanz vorliegt, müsste unter anderem über Experimente mit silencing RNA bestimmt werden. Tang et al konnten einen PDGF- und PKD-vermittelten Pathway in Fibroblasten bei der idiopathischen Lungenfibrose nachweisen (Tang und Hua 2012).

Neben den Endothelzellen stellen auch die lebereigenen Kupferzellen und Hepatozyten interessante Ziele für eine weitere Forschung dar. Die Kupferzellen als lebereigene, ortsständige Makrophagen produzieren genau wie andere immunkompetente Zellen Interleukine und Chemokine. Bereits in anderen Organsystemen konnte eine Relevanz in der Ausschüttung dieser Substanzen zur Aufrechterhaltung der Inflammation durch PKD beschrieben werden. Beispielsweise konnte in Kolonepithelzellen gezeigt werden, dass es unter Zugabe von Lipopolysacchariden zu einer PKD2-vermittelten Ausschüttung von Interleukin 8 kommt (Chiu et al. 2006).

Desweiteren konnten Guicciardi et al zeigen, dass Mechanismen der Apoptose in Hepatozyten die Entstehung der Fibrose aufrechterhalten (Guicciardi und Gores 2010). Die Apoptose ist heute bei Umbauprozessen des Lebergewebes als ein wichtiger Stimulus zur Aufrechterhaltung der Inflammation (Jaeschke H. 2002) und als profibrogenetischer Faktor bekannt (Canbay et al. 2002). Der Mechanismus der Apoptose ist ein bekannter PKD-getriggelter Pathway (Chen et al. 2008; Dequiedt et al. 2005). Bereits Friedmann et al diskutierten 2008 die Apoptose als mögliches antifibrotisches Target (Friedman 2008).

4.3 Einfluss von Hypoxie auf die PKD in Sternzellen

Hypoxie ist ein bekannter Mechanismus in der Leberfibrose und Zirrhose. In anderen Organsystemen und Zelllinien konnte die PKD als Zielenzym in den Signaltransduktionswegen nachgewiesen werden. In unseren Ergebnissen konnten wir in der humanen Sternzelllinie HSC-B zeigen, dass es zu einer signifikanten Zunahme der Expression und auch Aktivierung der PKD2 kommt. In primären Ratten-HSC konnte diese Steigerung von uns nicht gefunden werden. Diese Unterschiede könnten mit den unterschiedlichen Spezies erklärt werden. Möglicherweise ist PKD2 in humanen Sternzellen unter Hypoxie aktiviert, in Ratten über diesen relativ kurzen Zeitraum jedoch nicht. Bei der PKD1 konnten wir in der humanen Sternzelllinie nach Exposition mit Hypoxie über 48h eine Zunahme der aktivierten Form der PKD1 verzeichnen. Im Vergleich zur Normoxie war diese Aktivitätssteigerung Hypoxie-abhängig. Anders stellt sich die Situation bei den primären Zellen aus Rattenlebern dar. Bei der PKD1 konnte in Normoxie wie auch Hypoxie nach 48h Kultivierung eine vermehrte Phosphorylierung beobachtet werden. Auch bei der PKD3 konnte in der Expression kein Unterschied zwischen Normoxie und Hypoxie gefunden werden. Unabhängig vom Sauerstoffgehalt der Umgebung kam es bei der Zelllinie, wie auch bei den primären Zellen unter fortschreitender Kultivierungszeit zu einer vermehrten Expression von PKD3.

In der Leberzirrhose besteht auf Grund der vermehrt eingelagerten extrazellulären Matrix ein hypoxisches Milieu. Wie bei Tumoren ist eine Bildung von neuen Blutgefäßen erforderlich. Es ist bekannt, dass auch in der Angiogenese der Leber diese über Hif1 α und VEGF-A erfolgt (Fernandez et al. 2009; Coulon et al. 2011). In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass in der menschlichen Sternzelllinie unter Hypoxie auch die Expression von PKD, besonders PKD2 erhöht wird. Im Pankreaskarzinom ist eine PKD2-vermittelte Synthese und Ausschüttung von VEGF bekannt. Azoitei et al konnten neben dieser Ausschüttung eine PKD2-abhängige Aktivierung durch VEGF in den benachbarten Endothelzellen zeigen. Ein ähnliches Wechselspiel wie im Pankreaskarzinom könnte auch in der Fibrose zwischen Endothelzellen und der hepatischen Sternzelle erfolgen und einen neuen guten medikamentösen Angriffspunkt zur Reduktion der Leberzirrhose und ihrer Komplikationen darstellen (Azoitei et al. 2010; Hao et al. 2009a).

Unsere Daten zeigen einen Unterschied zwischen der immortalisierten Sternzelllinie und den primär gewonnen Sternzellen der Ratte. Eine mögliche Ursache könnte in den unterschiedlichen Spezies liegen, aus denen die Zellen gewonnen wurden. Bei der immortalisierten Zelllinie handelt es sich um humane Sternzellen. Nach den Daten von Minicis et al muss auch kritisch hinterfragt werden, ob solch eine in der Kultur

durchgeführte Exposition von Hypoxie als Triggerfaktor uns wirklich neue Erkenntnisse über die Abläufe bei der in vivo Fibrose bringt. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Genregulation von HSC unter Induktion von Fibrose in Kultur sich deutlich von der in vivo (z.B. CCl₄ oder Ligatur des Gallenganges) unterscheidet (Minicis et al. 2007). Wir haben uns daher nicht nur auf die Untersuchungen in der Zellkultur unter Hypoxie beschränkt, sondern zur Verifizierung auch primäre Sternzellen aus Rattenlebern zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Fibrose und Zirrhose untersucht. Tatsächlich konnten wir auch hier eine Steigerung der Aktivität von PKD2 nachweisen. PKD2 bleibt daher ein möglicher Angriffspunkt, denn wie hier gezeigt steigt die Aktivität der PKD2 in primären Sternzellen der Ratte signifikant an. Zusammenfassend legen unsere Daten nahe, dass Hypoxie ein Faktor in der Aktivierung der PKD2 in Sternzellen ist. Allerdings gehen wir davon aus, dass auf Grund der unterschiedlichen Ergebnisse zwischen humanen und murinen Sternzellen sowie in der Zirrhoseentstehung die Aktivierung ein multifaktorieller Prozess ist. Die alleinige Stimulierung durch Hypoxie über 48 Stunden spiegelt in diesem Setting sicher nur Teilaspekte des multifaktoriellen Prozesses wider.

4.4 Limitation und Ausblick

Es gibt verschiedene Tiermodelle zur Induktion der Zirrhose. Dabei zählt die Applikation von CCl₄ zu der weitverbreitetsten. Bis dato werden viele Studien mit diesem Tiermodell durchgeführt, welches eine hohe Vergleichbarkeit der hier vorliegenden Ergebnisse mit anderen Arbeiten ermöglicht. Mit dieser Methode wird eine toxische Leberschädigung induziert ohne vordringliche kanzerogene Wirkung. Die Zirrhose ist zügig mit vergleichbaren Ergebnissen reproduzierbar. Sie zeigt zudem in verschiedenen Teilaspekten vergleichbare Eigenschaften verglichen mit der humanen Zirrhose. Um erstmalig Aussagen über die Expression von PKD im Lebergewebe und in der Zirrhose treffen zu können, scheint diese Methode am geeignetsten. Aussagen über die Entwicklung von PKD in vor allem entzündlich getriebenen Lebererkrankungen, wie z.B. autoimmuner oder viraler Genese, sind daher zu diesem Zeitpunkt nicht möglich (Liedtke et al. 2013).

Wir haben uns in der vorliegenden Arbeit auf die Bedeutung der PKD in der Leberzirrhose konzentriert. Ein vielversprechendes weiteres Forschungsgebiet in diesem Zusammenhang könnte das hepatozelluläre Karzinom darstellen. Dies ist der häufigste lebereigene Tumor und stellt die zweithäufigste leber-assoziierte Todesursache weltweit dar (Pinter et al. 2016; Njei et al. 2015). In vielen Studien

konnte bereits in anderen Organsystemen gezeigt werden, dass die PKD eine wichtige Rolle in der Karzinogenese einnimmt (z.B. Pankreaskarzinom, Mammakarzinom, Prostatakarzinom) (Zou et al. 2012; Durand et al. 2015; LaValle et al. 2010). Auch im HCC gibt es erste Daten, dass besonders die PKD2 an der epithelialen-mesenchymalen Transition, sowie Invasion und Metastasierung der Zellen über TNF- α eine besondere Rolle zu spielen scheint. Als Signaltransduktionweg konnte PI3K/Akt/GSK-3 β identifiziert werden (Zhu et al. 2016).

Methodisch wäre eine Fortführung der Arbeit auf RNA-Ebene sinnvoll. Wir haben uns auf Grund der verschiedenen Zeitpunkte und der verschiedenen Zellen in der vorliegenden Arbeit auf die Expression auf Proteinniveau beschränkt. Wie oben bereits erwähnt, ist der Vergleich unterschiedlicher Spezies schwierig und führt möglicherweise zu nicht vergleichbaren Ergebnissen. Auf der anderen Seite ergibt sich daraus die Möglichkeit, Ergebnisse zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Zirrhoseentstehung zu gewinnen. Primäre humane Sternzellen aus unterschiedlichen Zirrhosezeitpunkten sind im Allgemeinen nicht verfügbar.

5 Zusammenfassung

Bei der Leberzirrhose handelt es sich um den Endzustand der Leberfibrose. Über verschiedene Mechanismen kommt es zur Ausbildung von Regeneratknoten, fibrotischen Septen und einer Umstrukturierung des Gefäßsystems. Als tragende Säulen wurden Inflammation und Hypoxie identifiziert. Die hepatische Sternzelle wurde als entscheidende lebereigene Zelle in der Fibroseentstehung identifiziert. Unter den freigesetzten Mediatoren bei einem Leberschaden wird die lipidspeichernde hepatische Sternzelle aktiviert und verändert sich in eine myofibroblasten-ähnliche Zelle mit kontraktilen Eigenschaften. Sie beginnt Wachstumsfaktoren zu sezernieren, verändert über ihre Kontraktion den sinusoidalen Blutfluss und aktiviert autokrin und parakrin über Proliferationsfaktoren, Chemo- und Zytokine das Voranschreiten der Fibrose. Auf molekularbiologischer Ebene wurden bereits mehrere Pathways beschrieben, die ein Verständnis für die molekulare Pathologie der Zirrhose geschaffen haben. Viele dieser Signaltransduktionswege beruhen auf zellulären Funktionen der Apoptose, Angiogenese, Fibrogenese und Migration. Bei diesen Mechanismen handelt es sich um Pathways, in denen in anderen Organen und Zelllinien Mitglieder der Familie der Proteinkinase D als Targets und Schlüsselpoteine identifiziert wurden. Die Proteinkinase D ist eine Seronin-/Threoninkinase mit 3 Isoformen. Bei auffällig ähnlichen Signaltransduktionswegen, in denen die PKD als Mediator in Zelllinien oder anderen Organen fungiert, welche auch in der Leberzirrhose beschrieben sind, stellte sich die Frage nach der Relevanz dieser Protein-Familie in der Leber und der Leberzirrhose.

Diese Arbeit zeigt zum ersten Mal mittels Western Blot, dass alle 3 Isoformen der Proteinkinase D in gesunden Lebern von Ratten exprimiert werden. Unter einer mittels Inhalation von CCl_4 in vivo experimentell erzeugten Leberzirrhose konnten wir darstellen, dass es bei der voranschreitenden Fibrose zu einer Modulation der einzelnen Mitglieder der Proteinkinase D kommt. Während unter anderem die Expression von PKD1 und PKD2 in der dekompenzierten Zirrhose erhöht ist, sinkt die Expression der PKD3. Des Weiteren gelang es auch nach der Separation von Sternzellen aus gesunden und zirrhatischen Rattenlebern alle 3 Isoformen in diesen nachzuweisen. Auch auf zellulärer Ebene zeigt sich unter voranschreitender Fibrose eine Modulation der Proteinkinase. Es kommt vor allem zu einer Steigerung der Aktivität der PKD2. Somit scheint die PKD2 eine entscheidende Rolle in der Signaltransduktion der Sternzelle einzunehmen.

Als möglichen Faktor zur Expression von PKD in der Zirrhose untersuchten wir die Wirkung von Hypoxie auf eine humane Sternzelllinie und auf primäre Sternzellen aus gesunden Rattenlebern. Dort konnte in der humanen Sternzelllinie gezeigt werden, dass es unter Hypoxie zu einer vermehrten Expression und Aktivität der PKD2, jedoch nicht der PKD1 kommt. In den primären Zellen konnte abhängig vom Sauerstoffgehalt kein Unterschied in der Expression und Aktivität festgestellt werden. Bei der PKD3 kommt es sowohl in der Zelllinie als auch in den primären Zellen zu einer signifikanten Erhöhung bei längerer Kultivierung unabhängig des Sauerstoffgehalts der Umgebung.

Zusammenfassend hat diese Arbeit gezeigt, dass die Proteinkinase D in der Leber exprimiert und die Expression, sowie Aktivität durch molekularpathologische Mechanismen der Zirrhose moduliert werden. Ebenso gelang es dies auch für die hepatische Sternzelle zu zeigen. Hypoxie stellt einen möglichen Faktor zur Erklärung der gesteigerten PKD2-Aktivität und Expression in Sternzellen dar. Dies konnte an einer immortalisierten humanen Zelllinie gezeigt werden.

6 Anhang

Tabelle 6.1 Medien und Zusätze

Medien und Zusätze	Firma, Land
DMEM	PAA, Cölbe, DE
IMDM	Gibco, Darmstadt, DE
Penicillin/Streptomycin	PAA, Cölbe, DE
FKS	Gibco, Darmstadt, DE
PMA	Sigma, Taufkirchen, DE

Tabelle 6.2 2x IPP für 100 ml pH 7,4

Chemikalien	Menge
EDTA	0,744 g
EGTA	0,076 g
NaCl	1,753 g
Triton-X100	2 ml
Aqua bidest	auf 100 ml auffüllen

Zur Einstellung des pH-Wertes von 7,4 eine 5M NaOH-Lösung verwenden. Um eine 1x IPP-Lösung zu erhalten 2xIPP mit Aqua bidest im Verhältnis 1:2 mischen und pro 10 ml 1x IPP eine Protease-Inhibitor Tablette hinzufügen. Die fertige Lösung zu je 1ml aliquotieren und bei -20°C lagern.

Tabelle 6.3 DNase I - Lösepuffer 500 ml pH 7,5 steril

Chemikalien	Menge
MgCl ₂	0,048 g
TRIS	1,576 g
Aqua bidest	auf 500 ml auffüllen

Die Lösung mit 5M HCL auf einen pH-Wert von 7,5 einstellen und steril filtrieren. Auf 10ml des DNase I-Lösepuffers 100 mg DNase einwiegen (c= 10 mg/ml). DNase Lösung auf 1 ml aliquotieren, Tube in flüssigem Stickstoff schockfrostern und bei -80°C lagern.

Tabelle 6.4 GBSS 1 L pH 7,4

Chemikalien	Menge
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	149 mg
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	105 mg
MgSO ₄	17,1 mg
KCl	185 mg
NaHCO ₃	1,135 g
NaCl	3,5 g
Na ₂ HPO ₄	59,8 mg
D-Glucose	0,5 g
KH ₂ PO ₄	15 mg

Die Substanzen einzeln und nacheinander in Aqua bidest auflösen, da sie ansonsten ausflocken. Den pH auf 7,4 einstellen und auf einen Liter Gesamtlösung auffüllen.

Tabelle 6.5 5x SDS-Probenpuffer 50 ml

Chemikalien	Menge
TRIS	0,379 g
SDS	1,00 g
Glycerol	5 g
Bromphenolblau NA-Salz	0,005 g
Aqua bidest	auf 50ml auffüllen

pH auf 6,8 mit 5 M HCL nach dem Lösen des TRIS einstellen. Den fertigen 5x SDS-Probenpuffer auf 950 µl aliquotieren und bei -20°C lagern. Vor Gebrauch 50 µl (entspricht 5%) 2-Mercaptoethanol hinzugeben und gut mischen.

Tabelle 6.6 10x Laufpuffer 1 L

Chemikalien	Menge
TRIS	31,0 g
Glycine	144,0 g
10% SDS	100 ml
Aqua bidest	auf 1L auffüllen

Zur Verwendung im Gelelektrophoresesystem im Verhältnis 1:10 mit Aqua bidest mischen. (entspricht 1 x Laufpuffer)

Tabelle 6.7 5x Transferpuffer 1 L

Chemikalien	Menge
TRIS	30,29 g
Glycin	35,66 g
10% SDS	2,5 ml
Aqua bidest	auf 1L auffüllen

Zur Verwendung in der Blotkammer im Verhältnis 1:10 mit Aqua bidest mischen. (entspricht 1 x Transferpuffer)

Tabelle 6.8 10x TBST 1 L pH 7,5

Chemikalien	Menge
TRIS	24,24 g
NaCl	88,13 g
Tween 20	10 ml
Aqua bidest	auf 1L auffüllen

pH von 7,5 mit 5M HCL einstellen. Im Verhältnis 1:10 mit Aqua bidest mischen zur Herstellung von 1x Blotto.

Tabelle 6.9 Homemade ECL

Chemikalien	Menge
Lösung A	201 ml
0,1 M TRIS (in Aqua bidest)	200 ml
50 mg/ml Luminol (in Aqua bidest)	1 ml
Lösung B	
para-Hydroxycumarinsäure	11 mg
DMSO	10 ml

Beide Lösungen werden dunkel gelagert, Lösung A bei 4°C, Lösung B bei Raumtemperatur. Kurz vor Gebrauch werden beide Lösungen im Verhältnis A:B 10:1 gemischt. Pro 1 ml Lösung A müssen 0,3 µl H₂O₂ hinzugefügt werden.

Tabelle 6.10 2%ige Silanlösung 200 ml

Chemikalien	Menge
C ₉ H ₂₃ NO ₃ Si	4 ml
Aceton	196 ml

Mit Aceton als Lösungsmittel eine 2% Silanlösung herstellen. Die Superfrost-Objektträger einspannen und in die Lösung für 3 Minuten eintauchen. Danach 3 mal 3 Minuten mit Aceton waschen und über Nacht bei 40°C trocknen lassen.

Tabelle 6.11 0,1%ige Sirius Red Lösung 100 ml

Chemikalien	Menge
Direct Red	0,1 g
Pikrinsäure	100 ml

Den Farbstoff in der Pikrinsäure lösen und filtrieren.

Tabelle 6.12 Citratpuffer 950 ml pH 6,0

Chemikalien	Menge
Stammlösung A = Citronensäurelösung	500 ml
$C_6H_8O_7 \times H_2O$	10,5 g
Aqua bidest	500 ml
Stammlösung B = Natriumcitratlösung	500 ml
$C_6H_5Na_3O_7 \times H_2O$	14,71 g
Aqua bidest	500 ml

Beide Stammlösungen bei 4°C lagern. Zur Herstellung des Citratpuffers 18 ml von A und 32 ml von B zusammenführen und mit 900 ml Aqua bidest auffüllen. pH von 6,0 einstellen.

Tabelle 6.13 Peroxidaseblock-Lösung 3% H₂O₂

Chemikalien	Menge
20% H ₂ O ₂	48 ml
Methanol	200 ml

Tabelle 6.14 Antikörper

Primäre Antikörper	Blocking-solution in Western Blot	Verdünnung in Western Blot	Blockingsolution in Immunhistologie	Verdünnung in Immunhistologie
PKD1/PKC μ	5%BSA in 1x Blotto	1:1000	5%BSA +0,5% Tween in 1x PBS	1:50
Anti-pPKD1 (Ser744/748)	5%BSA in 1x Blotto	1:1000	5%BSA +0,5% Tween in 1x PBS	1:50
PKD2 (S.C.)	5% MP in 1x Blotto	1:250-500	5%BSA +0,5% Tween in 1x PBS	1:50
Anti-PKD2 (Acris)	5%BSA in 1x Blotto	1:1000	5%BSA +0,5% Tween in 1x PBS	1:50
Anti-pPKD2 (S876)	5%BSA in 1x Blotto	1:1000	5%BSA +0,5% Tween in 1x PBS	1:50
Anti- PKD3/PKC ν	5%BSA in 1x Blotto	1:1000	5%BSA +0,5% Tween in 1x PBS	1:50
Anti- β -Actin	5% MP in 1x Blotto	1:5000	5%BSA +0,5% Tween in 1x PBS	1:50
Anti-Vincullin	5% MP in 1x Blotto	1:10.000	5%BSA +0,5% Tween in 1x PBS	1:50
Sekundärer Antikörper		Verdünnung in Western Blot		Verdünnung in Immunhistologie
Anti-Mouse-IgG-HRP		1:1000		1:200
Anti-Rabbit-IgG-HRP		1:1000		1:200

Eine ausführliche Übersicht über Herkunft aller Antikörper befindet sich im Anhang Tabelle 6.3 Antikörper.

Tabelle 6.15 Kits

Name	Hersteller, Ort, Land
BCA-Kit	
Bicinchoninic Acid solution	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Copper(II)sulfate solution	
WesternBright Chemilumineszenz Substrat Quantum	
Western Bright Quantum	Advansta, Menlo Park, CA, USA
Western Bright Peroxidase	
DAB Peroxidase Substrat Kit	
Buffer Stock Solution	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
DAB Stock Solution	
H ₂ O ₂ Solution	

Tabelle 6.16 Hilfsstoffe

Name	Hersteller, Ort, Land
Albumin Standard	Thermo Scientific, Bonn, Deutschland
Precision Plus Protein Standards Kaleidoscope	BioRad, München, Deutschland
SpectraMulticolorBroad Range Protein Ladder	Thermo Scientific, Bonn, Deutschland
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, Bonn, Deutschland
Restore Western Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific, Bonn, Deutschland

Tabelle 6.17 Geräte

Gerät	Fabrikat	Firma	Ort
Blot-Kammer	TE22 Mighty Small Transphor	Hoefer	Holliston, USA
Brutschrank	Hera Cell 150	Thermo	Bonn, DE
Chemilumineszenzsystem	Fusion FX	VILBER	Eberhardzell, DE
Cryostat	MEV	SLEE	Mainz, DE

Gerät	Fabrikat	Firma	Ort
Elektrophorese-kammer	Mini Protean Tetra Cell	BioRad	München, DE
Entwässerungs-automaten	STP 120 Spin Tissue Processor	Thermo	Bonn, DE
Feinwaage	CPA 224S	sartorius	Göttingen, DE
Hypoxieschrank	CO2/O2 Inkubator	Binder	Tuttlingen, DE
Kältethermostat	ecoline RE 104	LAUDA DR. R. WOBSER GMBH & CO. KG	Lauda-Königshofen, DE
Magnetrührgerät	MR 3001 K	Heidolph Instruments	Schwabach, DE
Mikroskop	OLYMPUS CK40-F200	OLYMPUS OPTICAL CO. LTD.	Hamburg, DE
Mikroskop-kamera	CAMEDIA Digital Camera C4040-ZOOM	OLYMPUS OPTICAL CO. LTD.	Hamburg, DE
Mini-Zentrifuge	MC6-Centrifuge	SARSTEDT	Nümbrecht, DE
Modulare Paraffin-Ausgießstation	Microm EC 350	Thermo	Bonn, DE
Peristaltik-pumpe	MCP	IKA-Labortechnik	Staufen, DE
pH-Meter	inoLab pH Level 2	WTW	Weilheim, DE
Plattenreader	iMARK Microplate Reader	BioRad	München, DE
Sterilwerkbank	Hera Safe	Hereaus	Hanau, DE
Thermoschüttler	ThermoCell Mixing Block	BIOER Technology	Hangzhou, CN
Tierwaage	KERN 440-51	KERN & Sohn GmbH	Balingen-Frommern, DE
Waage	CPA 2202S	sartorius	Göttingen, DE
Zentrifuge	Biofuge fresco	Hereaus	Hanau, DE
Zentrifuge	Rotina 380R	Hettich	Bech, CH

Tabelle 6.18 Chemikalien

Chemikalien	Firma	Ort
(3-Aminopropyl)triethoxysilan	Sigma	Taufkirchen, DE
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	MERCK	Darmstadt, DE
CaCl ₄	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, DE
H ₂ O ₂	Uniapotheke	Halle, DE
KH ₂ PO ₄	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, DE
MgCl ₂	MERCK	Darmstadt, DE
MgCl ₂ x 6H ₂ O	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, DE
MgSO ₄	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, DE
Na ₂ HPO ₄	MERCK	Darmstadt, DE
NaHCO ₃	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, DE
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, DE
Aceton	Sigma	Taufkirchen, DE
Agarose	peqlab	Erlangen, DE
Ammoniumperoxodisulfat	Carl Roth	Karlsruhe, DE
Bromphenolblau-NaSalz	MERCK	Darmstadt, DE
Citronensäure	Carl Roth	Darmstadt, DE
D-Glucose	MERCK	Darmstadt, DE
DNase I	Roche	Grenzach-Wyhlen, DE
EDTA	Carl Roth	Karlsruhe, DE
EGTA	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, DE
Eisessig	MERCK	Darmstadt, DE
Entellan	Merck	Darmstadt, DE

Chemikalien	Firma	Ort
Essigsäure 100%	Carl Roth	Karlsruhe, DE
Ethanol absolute	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, DE
Glycerol	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, DE
Glycin	SERVA	Heidelberg, DE
Heparin	ROTEX MEDICA	Trittau, DE
Isofluran	Abbott	Wiesbaden, DE
KCl	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, DE
Kollagenase A	Roche	Grenzach-Wyhlen, DE
Luminol	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, DE
Mayers Hämalalaun Färbung	Merck	Darmstadt, DE
Methanol	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, DE
Milchpulver	TSI GmbH	Zeven, DE
NaCl	Carl Roth	Karlsruhe, DE
Narcofen	MERIAL GmbH	Hallbergmoos, DE
Natriumcitrat	Carl Roth	Darmstadt, DE
Paraffin (50-70° C)	Carl Roth	Karlsruhe, DE
Parahydroxycumarinsäure	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, DE
PBS	Biochrom AG	Berlin, DE
Phenobarbital	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, DE
Phosstop	Sigma	Taufkirchen, DE
Pikrinsäure	Appllichem	St.Louis, MO, USA
PMA	Sigma	Taufkirchen, DE
Polyacrylamid	SERVA Elektrophoresis GmbH	Heidelberg, DE

Chemikalien	Firma	Ort
Ponceaus Rot	MERCK	Darmstadt, DE
Pronase	Roche	Grenzach-Wyhlen, DE
Protease Inhibitor Cocktail Tablette	Roche	Grenzach-Wyhlen, DE
Red Direct	Alfa Aesar	Ward Hill, MA, USA
Roti Histofix 4%	Carl Roth	Karlsruhe, DE
SDS	Carl Roth	Karlsruhe, DE
TEMED	Carl Roth	Karlsruhe, DE
Tetrachlormethan	Sigma	Taufkirchen, DE
TRIS	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, DE
Triton X-100	Alfa Aesar	Karlsruhe, DE
Tween 20	Carl Roth	Karlsruhe, DE
Xylol	Carl Roth	Karlsruhe, DE

Tabelle 6.19 Antikörper

Primäre Antikörper		Hersteller, Ort, Land
PKD/PKC μ		Cellsignaling, Danvers, MA, USA
Phospho- PKD/PKC μ (Ser744/748)		Cellsignaling, Danvers, MA, USA
PKD2		Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA
Polyclonal Antibody to PRKD2/PKD2-Aff-Putified		Acris Antibody Inc., San Diego, CA, USA
Proteinkinase D2 Antibody		Novus, Littleton, CO, USA
Anti-Proteinkinase D2 (phospho S876) antibody-C-terminal		Abcam, Cambridge, UK
PKD3/PKC ν (D57E6) Rabbit mAB		Cellsignaling, Danvers, MA, USA
B-Actin		Millipore, Darmstadt, DE
Vincullin		Chemicon, Darmstadt, DE
Sekundärer Antikörper		Hersteller, Ort, Land
Western Blot	Anti-Mouse-IgG-HRP	Cellsignaling, Danvers, MA, USA
	Anti-Rabbit-IgG-HRP	Cellsignaling, Danvers, MA, USA
Immun-histochemie	Goat-Anti-Mouse-IgG-HRP	Dionova, Hamburg, DE
	Goat-Anti-Rabbit-IgG-HRP	Dionova, Hamburg, DE

7 Literatur

Abedi H, Rozengurt E, Zachary I (1998) Rapid activation of the novel serine/threonine protein kinase, protein kinase D by phorbol esters, angiotensin II and PDGF-BB in vascular smooth muscle cells. *FEBS Letters* 427:209-212. doi:10.1016/S0014-5793(98)00427-X

Ankoma-Sey V, Matli M, Chang KB, Lalazar A, Donner DB, Wong L, Warren RS, Friedman SL (1998) Coordinated induction of VEGF receptors in mesenchymal cell types during rat hepatic wound healing. *Oncogene* 17:115-121. doi:10.1038/sj.onc.1201912

ARTHUR MJP (1995) Role of Ito cells in the degradation of matrix in liver. *J Gastroenterol Hepatol* 10:S57-S62. doi:10.1111/j.1440-1746.1995.tb01800.x

Azoitei N, Pusapati GV, Kleger A, Moller P, Kufer R, Genze F, Wagner M, van Lint J, Carmeliet P, Adler G, Seufferlein T (2010) Protein kinase D2 is a crucial regulator of tumour cell-endothelial cell communication in gastrointestinal tumours. *Gut* 59:1316-1330. doi:10.1136/gut.2009.206813

Baron CL, Malhotra V (2002) Role of diacylglycerol in PKD recruitment to the TGN and protein transport to the plasma membrane. *Science (New York, N.Y.)* 295:325-328. doi:10.1126/science.1066759

Bataller R, Brenner DA (2005) Liver fibrosis. *The Journal of clinical investigation* 115:209-218. doi:10.1172/JCI24282

Benyon RC, Arthur MJ (2001) Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. *Seminars in Liver Disease* 21:373-384. doi:10.1055/s-2001-17552

Blume J von, Knippschild U, Dequiedt F, Giamas G, Beck A, Auer A, van Lint J, Adler G, Seufferlein T (2007) Phosphorylation at Ser244 by CK1 determines nuclear localization and substrate targeting of PKD2. *EMBO J* 26:4619-4633. doi:10.1038/sj.emboj.7601891

Bomble M, Tacke F, Rink L, Kovalenko E, Weiskirchen R (2010) Analysis of antigen-presenting functionality of cultured rat hepatic stellate cells and transdifferentiated myofibroblasts. *Biochemical and biophysical research communications* 396:342-347. doi:10.1016/j.bbrc.2010.04.094

Bonacchi A, Romagnani P, Romanelli RG, Efsen E, Annunziato F, Lasagni L, Francalanci M, Serio M, Laffi G, Pinzani M, Gentilini P, Marra F (2001) Signal transduction by the chemokine receptor CXCR3: activation of Ras/ERK, Src, and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt controls cell migration and proliferation in human vascular pericytes. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 276:9945-9954. doi:10.1074/jbc.M010303200

Brandão DF (2006) Liver cirrhosis and hepatic stellate cells. *Acta Cir Bras.* [serial on the Internet] 2006;21 Suppl 1.:54-57

Brown B, Lindberg K, Reing J, et al. (2006) The basement membrane component of biologic scaffolds derived from extracellular matrix. *Tissue Eng*:519-526

Canbay A, Higuchi H, Bronk SF, Taniai M, Sebo TJ, Gores GJ (2002) Fas enhances fibrogenesis in the bile duct ligated mouse; A link between apoptosis and fibrosis. *Gastroenterology* 123:1323-1330. doi:10.1053/gast.2002.35953

Carmeliet P, Moons L, Luttun A, Vincenti V, Compernelle V, Mol M de, Wu Y, Bono F, Devy L, Beck H, Scholz D, Acker T, DiPalma T, Dewerchin M, Noel A, Stalmans I, Barra A, Blacher S, VandenDriessche T, Ponten A, Eriksson U, Plate KH, Foidart JM, Schaper W, Charnock-Jones DS, Hicklin DJ, Herbert JM, Collen D, Persico MG (2001) Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nature medicine* 7:575-583. doi:10.1038/87904

Chen J, Deng F, Singh SV, Wang QJ (2008) Protein kinase D3 (PKD3) contributes to prostate cancer cell growth and survival through a PKCepsilon/PKD3 pathway downstream of Akt and ERK 1/2. *Cancer research* 68:3844-3853. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-5156

Chen J, Giridhar KV, Zhang L, Xu S, Wang QJ (2011) A protein kinase C/protein kinase D pathway protects LNCaP prostate cancer cells from phorbol ester-induced apoptosis by promoting ERK1/2 and NF- B activities. *Carcinogenesis* 32:1198-1206. doi:10.1093/carcin/bgr113

Chiu TT, Leung WY, Moyer MP, Strieter RM, Rozengurt E (2006) Protein kinase D2 mediates lysophosphatidic acid-induced interleukin 8 production in nontransformed human colonic epithelial cells through NF- B. *AJP: Cell Physiology* 292:C767-C777. doi:10.1152/ajpcell.00308.2006

Coulon S, Heindryckx F, Geerts A, van Steenkiste C, Colle I, van Vlierberghe H (2011) Angiogenesis in chronic liver disease and its complications. *Liver International* 31:146-162. doi:10.1111/j.1478-3231.2010.02369.x

Csonga Rea (1998) Common and distinct signaling pathways mediate the induction of TNF- α and IL-5 in IgE plus antigen-stimulated mast cells:273-283

Dai S, Huang ML, Hsu CY, Chao, K S Clifford (2003) Inhibition of hypoxia inducible factor 1 α causes oxygen-independent cytotoxicity and induces p53 independent apoptosis in glioblastoma cells. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 55:1027-1036

D'Amico G, Garcia-Tsao G, Pagliaro L (2006) Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: a systematic review of 118 studies. *Journal of hepatology* 44:217-231. doi:10.1016/j.jhep.2005.10.013

DeLeve LD, Wang X, McCuskey MK, McCuskey RS (2006) Rat liver endothelial cells isolated by anti-CD31 immunomagnetic separation lack fenestrae and sieve plates. *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology* 291:G1187-9. doi:10.1152/ajpgi.00229.2006

Dequiedt F, van Lint J, Lecomte E, van Duppen V, Seufferlein T, Vandenheede JR, Wattiez R, Kettmann R (2005) Phosphorylation of histone deacetylase 7 by protein kinase D mediates T cell receptor-induced Nur77 expression and apoptosis. *The Journal of experimental medicine* 201:793-804. doi:10.1084/jem.20042034

- Durand N, Borges S, Storz P (2015) Functional and therapeutic significance of protein kinase D enzymes in invasive breast cancer. *Cellular and molecular life sciences* : CMLS 72:4369-4382. doi:10.1007/s00018-015-2011-2
- Durand N, Borges S, Storz P (2016) Protein Kinase D Enzymes as Regulators of EMT and Cancer Cell Invasion. *Journal of clinical medicine* 5. doi:10.3390/jcm5020020
- Eisenberg-Lerner A, Kimchi A (2012) PKD is a kinase of Vps34 that mediates ROS-induced autophagy downstream of DAPk. *Cell death and differentiation* 19:788-797. doi:10.1038/cdd.2011.149
- Endo K, Oki E, Biedermann V, Kojima H, Yoshida K, Johannes FJ, Kufe D, Datta R (2000) Proteolytic cleavage and activation of protein kinase C μ by caspase-3 in the apoptotic response of cells to 1- β -D-arabinofuranosylcytosine and other genotoxic agents. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 275:18476-18481. doi:10.1074/jbc.M002266200
- Evans IM, Zachary IC (2011) Protein kinase D in vascular biology and angiogenesis. *IUBMB Life* 63:258-263. doi:10.1002/iub.456
- Evans IM, Britton G, Zachary IC (2008) Vascular endothelial growth factor induces heat shock protein (HSP) 27 serine 82 phosphorylation and endothelial tubulogenesis via protein kinase D and independent of p38 kinase. *Cellular signalling* 20:1375-1384. doi:10.1016/j.cellsig.2008.03.002
- Fernandez M, Semela D, Bruix J, Colle I, Pinzani M, Bosch J (2009) Angiogenesis in liver disease. *Journal of hepatology* 50:604-620. doi:10.1016/j.jhep.2008.12.011
- Franz-Josef Johannes (1994) PKC μ Is a Novel, Atypical Member of the Protein Kinase C Family. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*:pp. 6140-6148
- Friedman SL (2000) Molecular Regulation of Hepatic Fibrosis, an Integrated Cellular Response to Tissue Injury. *Journal of Biological Chemistry* 275:2247-2250. doi:10.1074/jbc.275.4.2247
- Friedman SL (2008) Mechanisms of Hepatic Fibrogenesis. *Gastroenterology* 134:1655-1669. doi:10.1053/j.gastro.2008.03.003
- Fu Y, Rubin CS (2011) Protein kinase D: coupling extracellular stimuli to the regulation of cell physiology. *EMBO Rep* 12:785-796. doi:10.1038/embor.2011.139
- Gan H, McKenzie R, Hao Q, Idell S, Tang H (2014) Protein kinase D is increased and activated in lung epithelial cells and macrophages in idiopathic pulmonary fibrosis. *PloS one* 9:e101983. doi:10.1371/journal.pone.0101983
- George J, Tsutsumi M, Takase S (2004) Expression of hyaluronic acid in N-nitrosodimethylamine induced hepatic fibrosis in rats. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36:307-319. doi:10.1016/S1357-2725(03)00253-X
- Gesundheitsberichterstattung des Bundes 25.03.2015 (26.11.2014) Sterbefälle (absolut, Sterbeziffer, Ränge, Anteile) für die 10/20/50/100 häufigsten Todesursachen (ab 1998). www.gbe-bund.de. Zugegriffen: 25.03.15
- Graupera M (2005) Sinusoidal endothelial COX-1-derived prostanoids modulate the hepatic vascular tone of cirrhotic rat livers. *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology* 288:G763-G770. doi:10.1152/ajpgi.00300.2004

- Guha S, Tanasanvimon S, Sinnett-Smith J, Rozengurt E (2010) PKD_pancreatic_cancer // Role of protein kinase D signaling in pancreatic cancer. *Biochemical Pharmacology* 80:1946-1954. doi:10.1016/j.bcp.2010.07.002
- Guicciardi ME, Gores GJ (2010) Apoptosis as a Mechanism for Liver Disease Progression. *Semin Liver Dis.*:402-410. doi:10.1055/s-0030-1267540.
- H Reynaert (2002) Hepatic stellate cells: role in microcirculation and pathophysiology of portal hypertension. *Gut*:571-581
- Hao Q, Wang L, Zhao ZJ, Tang H (2009a) Identification of protein kinase D2 as a pivotal regulator of endothelial cell proliferation, migration, and angiogenesis. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 284:799-806. doi:10.1074/jbc.M807546200
- Hao Q, Wang L, Tang H (2009b) Vascular endothelial growth factor induces protein kinase D-dependent production of proinflammatory cytokines in endothelial cells. *AJP: Cell Physiology* 296:C821-C827. doi:10.1152/ajpcell.00504.2008
- Hausser A, Märtens S, Link G, Pfizenmaier K, Storz P, Toker A (2005) Protein kinase D regulates vesicular transport by phosphorylation and activation of phosphatidylinositol-4 kinase III B at the Golgi complex. *Nature cell biology* 7:880-886. doi:10.1038/ncb1289
- Hayashi A, Seki N, Hattori A, Kozuma S, Saito T (1999) PKC γ , a new member of the protein kinase C family, composes a fourth subfamily with PKC μ 1 The nucleotide sequence data reported in this paper have been deposited in the DDBJ, EMBL and GenBank databases under the accession number AB015982.1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1450:99-106. doi:10.1016/S0167-4889(99)00040-3
- Heymann F, Christian Trautwein and Frank Tacke Monocytes and Macrophages as Cellular Targets in Liver Fibrosis. <http://www.eurekaselect.com/85076/article#>. Zugegriffen: 19. März 2017
- Huck B, Kemkemer R, Franz-Wachtel M, Macek B, Hausser A, Olayioye MA (2012) GIT1 phosphorylation on serine 46 by PKD3 regulates paxillin trafficking and cellular protrusive activity. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 287:34604-34613. doi:10.1074/jbc.M112.374652
- Iglesias T, Waldron RT, Rozengurt E (1998) Identification of in Vivo Phosphorylation Sites Required for Protein Kinase D Activation. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 273:27662-27667
- Inagaki Y, Okazaki I (2007) Emerging insights into Transforming growth factor beta Smad signal in hepatic fibrogenesis. *Gut* 56:284-292. doi:10.1136/gut.2005.088690
- Irie A, Harada K, Tsukamoto H, Kim J-R, Araki N, Nishimura Y (2006) Protein kinase D2 contributes to either IL-2 promoter regulation or induction of cell death upon TCR stimulation depending on its activity in Jurkat cells. *International Immunology* 18:1737-1747. doi:10.1093/intimm/dxl108
- Jaeschke H. (2002) Inflammation in response to hepatocellular apoptosis. *Hepatology*:964-966

- Jaggi M (2007) Protein kinase D1; A protein of emerging translational interest. *Front Biosci* 12:3757. doi:10.2741/2349
- Jose´ L. Zugaza† RWT, Sinnett-Smith J, Rozengurt E (1997) Activation Protein kinase D bambesin. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* Vol. 272:23952-23960
- Kawada N (1997) The hepatic perisinusoidal stellate cell. *Histology and histopathology* 12:1069-1080
- Kleger A, Loebnitz C, Pusapati GV, Armacki M, Müller M, Tümpel S, Illing A, Hartmann D, Brunner C, Liebau S, Rudolph KL, Adler G, Seufferlein T, Agarwal S (2011) Protein Kinase D2 Is an Essential Regulator of Murine Myoblast Differentiation. *PLoS ONE* 6:e14599. doi:10.1371/journal.pone.0014599
- Kroll J, Waltenberger J (2000) Regulation der Endothelfunktion und der Angiogenese durch den Vaskulären Endothelialen Wachstumsfaktor-A (VEGF-A). *Zeitschrift für Kardiologie* 89:206-218
- LaValle CR, George KM, Sharlow ER, Lazo JS, Wipf P, Wang QJ (2010) Protein kinase D as a potential new target for cancer therapy. *Biochimica et biophysica acta* 1806:183-192. doi:10.1016/j.bbcan.2010.05.003
- Le Couteur DG, Hickey H, Harvey PJ, Gready J, McLean AJ (1999) Hepatic artery flow and propranolol metabolism in perfused cirrhotic rat liver. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 289:1553-1558
- Lee S-J (2014) Mechanisms of fibrogenesis in liver cirrhosis: The molecular aspects of epithelial-mesenchymal transition. *WJH* 6:207. doi:10.4254/wjh.v6.i4.207
- Lee UE, Friedman SL (2011) Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 25:195-206. doi:10.1016/j.bpg.2011.02.005
- Liedtke C, Luedde T, Sauerbruch T, Scholten D, Streetz K, Tacke F, Tolba R, Trautwein C, Trebicka J, Weiskirchen R (2013) Experimental liver fibrosis research: update on animal models, legal issues and translational aspects. *Fibrogenesis & tissue repair* 6:19. doi:10.1186/1755-1536-6-19
- Lowry (1951) Protein Measurement with the Folin Phenol Reagents. *Journal of Biological Chemistry*:265-275
- M.Yu. Shabelnik (2011) DIFFERENTIAL EXPRESSION OF PKD1 AND PKD2 IN GASTRIC CANCER AND ANALYSIS OF PKD1 AND PKD2 FUNCTION IN THE MODEL SYSTEM. *Experimental Oncology*:206-211
- Maeda Y, Beznoussenko GV, van Lint J, Mironov AA, Malhotra V (2001) Recruitment of protein kinase D to the trans-Golgi network via the first cysteine-rich domain. *The EMBO journal* 20:5982-5990. doi:10.1093/emboj/20.21.5982
- Mahmood T, Yang P-C (2012) Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American journal of medical sciences* 4:429-434. doi:10.4103/1947-2714.100998
- Marklund U, Lightfoot K, Cantrell D (2003) Intracellular Location and Cell Context-Dependent Function of Protein Kinase D. *Immunity* 19:491-501. doi:10.1016/S1074-7613(03)00260-7

- Marra F, Romanelli RG, Giannini C, Failli P, Pastacaldi S, Arrighi MC, Pinzani M, Laffi G, Montalto P, Gentilini P (1999) Monocyte chemotactic protein-1 as a chemoattractant for human hepatic stellate cells. *Hepatology* 29:140-148. doi:10.1002/hep.510290107
- Marrone G, Shah VH, Gracia-Sancho J (2016) Sinusoidal communication in liver fibrosis and regeneration. *Journal of hepatology* 65:608-617. doi:10.1016/j.jhep.2016.04.018
- Matthews SA, Pettit GR, Rozengurt E (1997) Bryostatins 1 Induces Biphasic Activation of Protein Kinase D in Intact Cells. *Journal of Biological Chemistry* 272:20245-20250. doi:10.1074/jbc.272.32.20245
- Matthews SA, Rozengurt E, Cantrell D (1999) Characterization of Serine 916 as an in Vivo Autophosphorylation Site for Protein Kinase D/Protein Kinase C. *Journal of Biological Chemistry* 274:26543-26549. doi:10.1074/jbc.274.37.26543
- Merion RM, Schaubel DE, Dykstra DM, Freeman RB, Port FK, Wolfe RA (2005) The survival benefit of liver transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 5:307-313. doi:10.1111/j.1600-6143.2004.00703.x
- Minicis S de, Seki E, Uchinami H, Kluwe J, Zhang Y, Brenner DA, Schwabe RF (2007) Gene expression profiles during hepatic stellate cell activation in culture and in vivo. *Gastroenterology* 132:1937-1946. doi:10.1053/j.gastro.2007.02.033
- Moeller M, Thonig A, Pohl S, Ripoll C, Zipprich A (2015) Hepatic arterial vasodilation is independent of portal hypertension in early stages of cirrhosis. *PloS one* 10:e0121229. doi:10.1371/journal.pone.0121229
- Mormone E, George J, Nieto N (2011) Molecular pathogenesis of hepatic fibrosis and current therapeutic approaches. *Chemico-biological interactions* 193:225-231. doi:10.1016/j.cbi.2011.07.001
- Njei B, Rotman Y, Ditah I, Lim JK (2015) Emerging trends in hepatocellular carcinoma incidence and mortality. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 61:191-199. doi:10.1002/hep.27388
- Novo E, Cannito S, Paternostro C, Bocca C, Miglietta A, Parola M (2014) Cellular and molecular mechanisms in liver fibrogenesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 548:20-37. doi:10.1016/j.abb.2014.02.015
- Pap M, Cooper GM (1998) Role of Glycogen Synthase Kinase-3 in the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Cell Survival Pathway. *J. Biol. Chem.* 273:19929-19932. doi:10.1074/jbc.273.32.19929
- Parra M, Kasler H, McKinsey TA, Olson EN, Verdin E (2005) Protein kinase D1 phosphorylates HDAC7 and induces its nuclear export after T-cell receptor activation. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 280:13762-13770. doi:10.1074/jbc.M413396200
- Paternostro C (2010) Hypoxia, angiogenesis and liver fibrogenesis in the progression of chronic liver diseases. *WJG* 16:281. doi:10.3748/wjg.v16.i3.281

- Peterburs P, Heering J, Link G, Pfizenmaier K, Olayioye MA, Hausser A (2009) Protein Kinase D Regulates Cell Migration by Direct Phosphorylation of the Cofilin Phosphatase Slingshot 1 Like. *Cancer Research* 69:5634-5638. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-0718
- Pinter M, Trauner M, Peck-Radosavljevic M, Sieghart W (2016) Cancer and liver cirrhosis: implications on prognosis and management. *ESMO open* 1:e000042. doi:10.1136/esmoopen-2016-000042
- Pinzani M, Marra F (2001) Cytokine receptors and signaling in hepatic stellate cells. *Seminars in Liver Disease* 21:397-416. doi:10.1055/s-2001-17554
- Prestle et al (1998) Protein Kinase C α Is Located at the Golgi Compartment. *The Journal of Cell Biology* 134:1401-1410
- Prigozhina NL, Waterman-Storer CM (2004) Protein Kinase D-Mediated Anterograde Membrane Trafficking Is Required for Fibroblast Motility. *Current Biology* 14:88-98. doi:10.1016/j.cub.2004.01.003
- Pusapati GV, Eiseler T, Rykx A, Vandoninck S, Derua R, Waelkens E, van Lint J, Wichert G von, Seufferlein T (2012) Protein Kinase D Regulates RhoA Activity via Rhotekin Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 287:9473-9483. doi:10.1074/jbc.M112.339564
- Pusapati GV, Krndija D, Armacki M, Wichert G von, Blume J von, Malhotra V, Adler G, Seufferlein T (2010) Role of the second cysteine-rich domain and Pro275 in protein kinase D2 interaction with ADP-ribosylation factor 1, trans-Golgi network recruitment, and protein transport. *Molecular Biology of the cell* 21:1011-1022. doi:10.1091/mbc.E09-09-0814
- Reichenbach V, Ros J, Fernandez-Varo G, Casals G, Melgar-Lesmes P, Campos T, Makriyannis A, Morales-Ruiz M, Jimenez W (2012) Prevention of Fibrosis Progression in CCl₄-Treated Rats: Role of the Hepatic Endocannabinoid and Apelin Systems. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 340:629-637. doi:10.1124/jpet.111.188078
- Ren B (2016) Protein Kinase D1 Signaling in Angiogenic Gene Expression and VEGF-Mediated Angiogenesis. *Frontiers in cell and developmental biology* 4:37. doi:10.3389/fcell.2016.00037
- Rey O, Yuan J, Young SH, Rozengurt E (2003) Protein kinase C α /protein kinase D3 nuclear localization, catalytic activation, and intracellular redistribution in response to G protein-coupled receptor agonists. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 278:23773-23785. doi:10.1074/jbc.M300226200
- Sato M, Suzuki S, Senoo H (2003) Hepatic Stellate Cells; Unique Characteristics in Cell Biology and Phenotype. *Cell Struct. Funct.* 28:105-112. doi:10.1247/csf.28.105
- Schnabl B, Choi YH, Olsen JC, Hagedorn CH, Brenner DA (2002) Immortal activated human hepatic stellate cells generated by ectopic telomerase expression. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 82:323-333

Shackel NA, McGuinness PH, Abbott CA, Gorrell MD, McCaughan GW (2002) Insights into the Pathobiology of Hepatitis C Virus-Associated Cirrhosis. *The American Journal of Pathology* 160:641-654. doi:10.1016/S0002-9440(10)64884-5

Shin S, Wolgamott L, Yoon S-O (2012) Regulation of endothelial cell morphogenesis by the protein kinase D (PKD)/glycogen synthase kinase 3 (GSK3)beta pathway. *American journal of physiology. Cell physiology* 303:C743-56. doi:10.1152/ajpcell.00442.2011

Sidorenko SP, Law C-L, Klaus SJ, Chandran KA, Takata M, Kurosaki T, Clark EA (1996) Protein Kinase C μ (PKC μ) Associates with the B Cell Antigen Receptor Complex and Regulates Lymphocyte Signaling. *Immunity* 5:353-363. doi:10.1016/S1074-7613(00)80261-7

Sinnett-Smith J, Jacamo R, Kui R, Wang YM, Young SH, Rey O, Waldron RT, Rozengurt E (2009) Protein kinase D mediates mitogenic signaling by Gq-coupled receptors through protein kinase C-independent regulation of activation loop Ser744 and Ser748 phosphorylation. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 284:13434-13445. doi:10.1074/jbc.M806554200

Son G, Hines IN, Lindquist J, Schrum LW, Rippe RA (2009) Inhibition of phosphatidylinositol 3kinase signaling in hepatic stellate cells blocks the progression of hepatic fibrosis // Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase signaling in hepatic stellate cells blocks the progression of hepatic fibrosis. *Hepatology* 50:1512-1523. doi:10.1002/hep.23186

Song J (2006) Protein kinase D protects against oxidative stress-induced intestinal epithelial cell injury via Rho/ROK/PKC- pathway activation. *AJP: Cell Physiology* 290:C1469-C1476. doi:10.1152/ajpcell.00486.2005

Song M-J, Wang Y-Q, Wu G-C (2007) Lipopolysaccharide-induced protein kinase D activation mediated by interleukin-1 β and protein kinase C. *Brain Research* 1145:19-27. doi:10.1016/j.brainres.2007.01.128

Storz P, Hausser A, Link G, Dedio J, Ghebrehiwet B, Pfizenmaier K, Johannes FJ (2000) Protein kinase C micro is regulated by the multifunctional chaperon protein p32. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 275:24601-24607. doi:10.1074/jbc.M002964200

Storz P, Doppler H, Toker A (2005) Protein kinase D mediates mitochondrion-to-nucleus signaling and detoxification from mitochondrial reactive oxygen species. *Molecular and cellular biology* 25:8520-8530. doi:10.1128/MCB.25.19.8520-8530.2005

Tacke F, Weiskirchen R (2010) Pathophysiologie der Leberfibrose; Aktuelle Aspekte und neue Ansätze für antifibrotische Therapien. *Der Internist* 51:21-29. doi:10.1007/s00108-009-2419-6

Tang, Hua (2012) PKD Family Kinase Function and Signaling in Lung Fibroblasts. <http://grantome.com/grant/NIH/R21-HL097216-02>. Zugegriffen: 28. November 2018

Théret N, Lehti K, Musso O, Clément B (1999) MMP2 activation by collagen I and concanavalin A in cultured human hepatic stellate cells. *Hepatology* 30:462-468. doi:10.1002/hep.510300236

- Ursula E. Lee B.S. MSTP (2011) Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 25:195-206. doi:10.1016/j.bpg.2011.02.005
- Valverde AM (1994) Molecular cloning and characterization of protein kinase D: A target for diacylglycerol and phorbol esters with a distinctive catalytic domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*:8572-8576
- van Lint J (1995) Expression and Characterization of PKD, a Phorbol Ester and Diacylglycerol-stimulated Serine Protein Kinase. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*:1455-1461
- van Lint J (1998) Platelet-derived Growth Factor Stimulates Protein Kinase D through the Activation of Phospholipase Cgamma and Protein Kinase C. *Journal of Biological Chemistry* 273:7038-7043. doi:10.1074/jbc.273.12.7038
- van Lint J (2002) Protein kinase D: an intracellular traffic regulator on the move. *TRENDS in Cell Biology* 12:193-200
- van Steenkiste C, Geerts A, Vanheule E, van Vlierberghe H, Vos F de, Olievier K, Casteleyn C, Laukens D, Vos M de, Stassen J-M, Carmeliet P, Colle I (2009) Role of placental growth factor in mesenteric neoangiogenesis in a mouse model of portal hypertension. *Gastroenterology* 137:2112-24.e1-6. doi:10.1053/j.gastro.2009.08.068
- Vantus T, Vertommen D, Saelens X, Rykx A, Kimpe L de, Vancauwenbergh S, Mikhalap S, Waelkens E, Keri G, Seufferlein T, Vandenabeele P, Rider MH, Vandenheede JR, van Lint J (2004) Doxorubicin-induced activation of protein kinase D1 through caspase-mediated proteolytic cleavage: identification of two cleavage sites by microsequencing. *Cellular signalling* 16:703-709. doi:10.1016/j.cellsig.2003.11.009
- Vega RB, Harrison BC, Meadows E, Roberts CR, Papst PJ, Olson EN, McKinsey TA (2004) Protein kinases C and D mediate agonist-dependent cardiac hypertrophy through nuclear export of histone deacetylase 5. *Molecular and cellular biology* 24:8374-8385. doi:10.1128/MCB.24.19.8374-8385.2004
- Waldron RT (2000) Oxidative Stress Induces Protein Kinase D Activation in Intact Cells. INVOLVEMENT OF Src AND DEPENDENCE ON PROTEIN KINASE C. *Journal of Biological Chemistry* 275:17114-17121. doi:10.1074/jbc.M908959199
- Weiskirchen R, Tacke F (2014a) Cellular and molecular functions of hepatic stellate cells in inflammatory responses and liver immunology. *Hepatobiliary surgery and nutrition* 3:344-363. doi:10.3978/j.issn.2304-3881.2014.11.03
- Weiskirchen R, Tacke F (2014b) Cellular and molecular functions of hepatic stellate cells in inflammatory responses and liver immunology. *Hepatobiliary surgery and nutrition* 3:344-363
- Wille C, Seufferlein T, Eiseler T (2014a) Protein Kinase D family kinases; Roads start to segregate. *BioArchitecture* 4:111-115. doi:10.4161/bioa.29273
- Wille C, Köhler C, Armacki M, Jamali A, Gössele U, Pfizenmaier K, Seufferlein T, Eiseler T (2014b) Protein kinase D2 induces invasion of pancreatic cancer cells by regulating matrix metalloproteinases. *Molecular Biology of the cell* 25:324-336. doi:10.1091/mbc.E13-06-0334

- Winau F, Hegasy G, Weiskirchen R, Weber S, Cassan C, Sieling PA, Modlin RL, Liblau RS, Gressner AM, Kaufmann SHE (2007) Ito cells are liver-resident antigen-presenting cells for activating T cell responses. *Immunity* 26:117-129. doi:10.1016/j.immuni.2006.11.011
- Wong C, Jin Z-G (2005) Protein kinase C-dependent protein kinase D activation modulates ERK signal pathway and endothelial cell proliferation by vascular endothelial growth factor. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 280:33262-33269. doi:10.1074/jbc.M503198200
- Woods AJ, White DP, Caswell PT, Norman JC (2004) PKD1/PKCmu promotes alphavbeta3 integrin recycling and delivery to nascent focal adhesions. *EMBO J* 23:2531-2543. doi:10.1038/sj.emboj.7600267
- Yoo J, Chung C, Slice L, Sinnett-Smith J, Rozengurt E (2009) Protein kinase D mediates synergistic expression of COX-2 induced by TNF- and bradykinin in human colonic myofibroblasts. *AJP: Cell Physiology* 297:C1576-C1587. doi:10.1152/ajpcell.00184.2009
- Young SH, Rozengurt N, Sinnett-Smith J, Rozengurt E (2012) Rapid protein kinase D1 signaling promotes migration of intestinal epithelial cells. *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology* 303:G356-G366. doi:10.1152/ajpgi.00025.2012
- Yuan J, Pandol SJ (2016) PKD signaling and pancreatitis. *Journal of gastroenterology* 51:651-659. doi:10.1007/s00535-016-1175-3
- Yuan J, Liu Y, Tan T, Guha S, Gukovsky I, Gukovskaya A, Pandol SJ (2012) Protein Kinase D Regulates Cell Death Pathways in Experimental Pancreatitis. *Front. Physio.* 3. doi:10.3389/fphys.2012.00060
- Zeisberg M, Yang C, Martino M, Duncan MB, Rieder F, Tanjore H, Kalluri R (2007) Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. *Journal of Biological Chemistry* 282:23337-23347. doi:10.1074/jbc.M700194200
- Zhao Y, Wang Y, Wang Q, Liu Z, Liu Q, Deng X (2012) Hepatic stellate cells produce vascular endothelial growth factor via phospho-p44/42 mitogen-activated protein kinase/cyclooxygenase-2 pathway. *Mol Cell Biochem* 359:217-223. doi:10.1007/s11010-011-1016-x
- Zheng H, Qian J, Carbone CJ, Leu NA, Baker DP, Fuchs SY (2011) Vascular endothelial growth factor-induced elimination of the type 1 interferon receptor is required for efficient angiogenesis. *Blood* 118:4003-4006. doi:10.1182/blood-2011-06-359745
- Zhu Y, Cheng Y, Guo Y, Chen J, Chen F, Luo R, Li A (2016) Protein kinase D2 contributes to TNF- α -induced epithelial mesenchymal transition and invasion via the PI3K/GSK-3 β /B-catenin pathway in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 7:5327-5341. doi:10.18632/oncotarget.6633
- Ziegler S, Eiseler T, Scholza R-P, Beckb A, Linka G, Hausser A (2011) A novel protein kinase D phosphorylation site in the tumor suppressor Rab interactor 1 is critical for coordination of cell migration. *Molecular Biology of the cell* 22:570-580

Zou Z, Zeng F, Xu W, Wang C, Ke Z, Wang QJ, Deng F (2012) PKD2 and PKD3 promote prostate cancer cell invasion by modulating NF- κ B- and HDAC1-mediated expression and activation of uPA. *Journal of cell science* 125:4800-4811. doi:10.1242/jcs.106542

Zugaza JL, Sinnott-Smith J, van Lint J, Rozengurt E (1996) Protein kinase D (PKD) activation in intact cells through a protein kinase C-dependent signal transduction pathway. *The EMBO journal* 15:6220-6230

8 Thesen

1. Die Proteinkinase D ist eine Seronin-/Threoninkinase. Sie spielt eine wesentliche Rolle in Signaltransduktionswegen der Apoptose, Angiogenese, Fibrogenese und Migration.
2. Die Proteinkinase D wird in all ihren Isoformen im gesunden Lebergewebe und primären Sternzellen von Ratten exprimiert.
3. Unter voranschreitender Fibrose kommt es zu einer Modulierung der Expression der Isoformen der PKD und ihrer Aktivität im Lebergewebe und primären Sternzellen von Ratten.
4. PKD1 und PKD2 wird in der dekompensierten Leberzirrhose in Rattenlebern vermehrt exprimiert.
5. PKD3 wird in der dekompensierten Leberzirrhose in Rattenlebern verringert exprimiert.
6. In primären Sternzellen aus Rattenlebern kommt es unter Voranschreiten der Fibrose zu einer Erhöhung der Aktivität von PKD2.
7. Hypoxie bedingt in der humanen Sternzelllinie HSC-B eine deutliche Steigerung der Expression und Aktivität von PKD2.
8. PKD3 wird bei längerer Kultivierung unabhängig vom Sauerstoffgehalt vermehrt in HSC-B und primären Sternzellen der Ratte exprimiert.

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Mikorarchitektur im Raum von Disse einer gesunden Leber.....	- 4 -
Abbildung 1.2 Mikroarchitektur im Raum von Disse einer fibrotischen Leber	- 4 -
Abbildung 1.3 Signalwege der aktivierten Sternzelle.....	- 5 -
Abbildung 1.4 molekulare Architektur der Mitglieder der Proteinkinase D-Familie. -	8 -
Abbildung 1.5 Hauptsignaltransduktionswege der Proteinkinase D.....	- 10 -
Abbildung 2.1 Wistar-Ratte während der Sternzellseparation	- 19 -
Abbildung 3.1 PKD1-Expression in Leberlysaten von Wistar-Ratten	- 23 -
Abbildung 3.2 PKD2-Expression in Leberlysaten von Wistar-Ratten	- 24 -
Abbildung 3.3 PKD3-Expression in Leberlysaten von Wistar-Ratten	- 25 -
Abbildung 3.4 primäre hepatische Sternzellen	- 26 -
Abbildung 3.5 Expression von PKD1 in pHSC	- 27 -
Abbildung 3.6 Expression von PKD2 in pHSC	- 28 -
Abbildung 3.7 Expression von PKD3 in pHSC	- 29 -
Abbildung 3.8 Zellmorphologie der humanen Zelllinie HSC-B.....	- 30 -
Abbildung 3.9 Hypoxienachweis in HSC-B nach 48h Kultivierung	- 30 -
Abbildung 3.10 PKD1 in HSC-B unter Hypoxie und Normoxie	- 31 -
Abbildung 3.11 PKD2 in HSC-B unter Hypoxie und Normoxie	- 32 -
Abbildung 3.12 PKD3 in HSC-B unter Hypoxie und Normoxie	- 33 -
Abbildung 3.13 PKD1 in primären HSC (pHSC) unter Hypoxie und Normoxie.....	- 35 -
Abbildung 3.14 PKD2 in primären HSC (pHSC) unter Hypoxie und Normoxie.....	- 36 -
Abbildung 3.15 PKD3 in primären HSC (pHSC) unter Hypoxie und Normoxie.....	- 37 -

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.17 PMA -Lösung	- 18 -
Tabelle 2.18 Herstellung SDS-Gel	- 21 -
Tabelle 6.1 Medien und Zusätze.....	- 47 -
Tabelle 6.3 2x IPP für 100 ml pH 7,4	- 47 -
Tabelle 6.4 DNase I - Lösepuffer 500 ml pH 7,5 steril.....	- 47 -
Tabelle 6.5 GBSS 1 L pH 7,4.....	- 48 -
Tabelle 6.6 5x SDS-Probenpuffer 50 ml.....	- 48 -
Tabelle 6.7 10x Laufpuffer 1 L.....	- 49 -
Tabelle 6.8 5x Transferpuffer 1 L	- 49 -
Tabelle 6.9 10x TBST 1 L pH 7,5.....	- 49 -
Tabelle 6.10 Homemade ECL.....	- 50 -
Tabelle 6.11 2%ige Silanlösung 200 ml.....	- 50 -
Tabelle 6.12 0,1%ige Sirius Red Lösung 100 ml.....	- 50 -
Tabelle 6.13 Citratpuffer 950 ml pH 6,0	- 51 -
Tabelle 6.14 Peroxidaseblock-Lösung 3% H ₂ O ₂	- 51 -
Tabelle 6.15 Antikörper.....	- 52 -
Tabelle 6.16 Kits	- 53 -
Tabelle 6.17 Hilfsstoffe	- 53 -
Tabelle 6.18 Geräte	- 53 -
Tabelle 6.19 Chemikalien	- 55 -
Tabelle 6.20 Antikörper.....	- 58 -

Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Franziska Brunner geb. Schmeil
Geburtsdatum/-ort: 04.04.1989 in Halle/Saale
Nationalität: Deutsch
Familienstand: verheiratet

Berufliche Praxis

04/2015-heute Assistenzärztin der Inneren Medizin an dem Universitätsklinikum Halle/Saale, Klinik für Innere Medizin IV

Studium

10/2008 - 10/2014 Studium der Humanmedizin, Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg

Schulischer Werdegang

08/2001 - 07/2008 Giebichenstein-Gymnasium
„Thomas Müntzer“ Halle/Saale;
Erwerb der Hochschulreife, Gesamtnote 1,0

09/2005 - 07/2006 Baldwin-Woodville High School Baldwin, Wisconsin, USA
High-School Abschluss in den USA

Halle, den 06.03.2020

Franziska Brunner

Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Es ist mir bekannt, dass ich den Dokortitel nicht führen kann, bevor mir die Promotionsurkunde bzw. eine vorläufige Bescheinigung gemäß § 15 der Promotionsordnung ausgehändigt wurde.

Franziska Brunner

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Die Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Franziska Brunner

Danksagung

Mein Dank gilt als erstes Herrn Prof. Zipprich und Herrn Prof. Michl für die Vergabe dieses Themas und die Möglichkeit diese Arbeit in den Forschungsräumen der Universitäts- und Poliklinik für Innere Medizin I der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg erarbeiten zu können.

Neben Herrn Prof. Zipprich, bei dem ich mich für seine Geduld und andauernde, sowie unkomplizierte Unterstützung ausdrücklich bedanken möchte, gilt mein besonderer Dank Frau Sabine Pohl, Frau Antje Thonig, Frau Dr. Anja Wolf und Frau Dr. Stefanie Hammer, ohne die diese Arbeit nicht gelungen wäre. Ich danke ihnen für ihre tatkräftige tägliche Unterstützung im Labor, ihren Rat in jeder Situation und ihre anhaltende Motivation an dunklen Tagen an der Laborbank.

Neben meiner Familie, die mich ausdauernd in diesem Projekt unterstützt hat und „kindlose“ Tage ermöglichte, möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Lutz Müller für seine stetige Motivation und die Bereitstellung von Freiräumen im Arbeitsleben danken.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, meinem Mann Albrecht und meinem Sohn. Vielen Dank für eure unermüdliche Unterstützung und Motivation. In Gedenken an meine verstorbene Tante widme ich ihr diese Arbeit.