

### **Zusammenfassung**

Asthma ist eine chronische, entzündliche Erkrankung der Atemwege, in welcher neben den wandernden Zellen des Immunsystems auch die Zellen der glatten Muskulatur, sowie Fibroblasten und Zellen des Epithels eine wichtige Rolle spielen. Die Alveolarepithelzellen sind nicht nur ein physikalisches Hindernis für Infektionserreger, sondern spielen auch eine aktive Rolle in akuten und chronischen Entzündungsreaktionen, indem sie eine Reihe von entzündungsauslösenden und -hemmenden Mediatoren freisetzen. Die Exposition von Epithelzellen gegenüber schädlichen Faktoren, wie Allergenen, Bakterien, Schmutzstoffen und endogenen pro-inflammatorischen Stoffen lösen Abwehrmechanismen aus, wodurch Expression und Freisetzung von wichtigen bioaktiven Molekülen, wie z. B. Lipidbotenstoffen, Zytokinen, extrazellulären Matrixproteinen gesteuert werden. Es wurde gezeigt, dass die Freisetzung dieser Mediatoren oft durch Aktivierung von Protease-aktivierten Rezeptoren (PARs) vermittelt wird. PARs gehören zu der Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit 7 Transmembran-Domänen. Aktivierung der PARs wird durch die proteolytische Spaltung durch extrazelluläre Proteasen eingeleitet. Die Spiegel vieler PAR Agonisten in den Atemwegen sind während chronischer Erkrankung erhöht. Dazu gehören die Proteasen wie Thrombin, Trypsin, HAT (human airway trypsin-like protease) und viele durch die Luft übertragene Allergene. Unsere Kenntnisse bezüglich der Faktoren, welche die PAR Expression und deren Erregbarkeit modifizieren, sind noch begrenzt.

In der vorliegenden Arbeit werden folgende Ergebnisse vorgestellt:

1. Wir haben mittels RT-PCR, Immunozytochemie und  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierungsstudien gezeigt, dass PAR-1, PAR-2 und PAR-3 in Epithelzellen der Lunge (Zelllinie A549) funktionell exprimiert werden. Kurzzeitstimulierung dieser Zellen mit Thrombin, Trypsin und Peptiden, die die „tethered-ligand“-Domäne von PAR-1, PAR-2, aber nicht von PAR-3 und PAR-4, darstellen, induzieren einen transienten Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ).
2. Unsere Untersuchungen von Isoformen des Trypsins ergaben, dass kationisches und anionisches Trypsin die  $\text{Ca}^{2+}$  Mobilisierung in Lungen-Epithelzellen induzieren. Mesotrypsin führte jedoch zu keiner  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Antwort in diesen Zellen. Basierend auf Desensitierungsversuchen durch Verwendung des PAR-2 Aktivierungspeptids (PAR-2-AP), konnten wir zeigen, dass PAR-2 in der Lunge ein Substrat für kationisches und anionisches Trypsin darstellt.

3. Weitere Untersuchungen befassten sich mit den Änderungen des PAR-mRNA-Spiegels nach Exposition der A549-Zellen gegenüber Entzündungsmediatoren wie LPS, TNF- $\alpha$ , IL-8 und PGE<sub>2</sub>. Dazu wurden Real-Time PCR Experimente durchgeführt. Die Behandlung mit den oben genannten Mediatoren bewirkte unterschiedliche Effekte, wobei PAR-2 mRNA hauptsächlich beeinflusst wurde.

4. Für weitere Analysen haben wir noch andere Lungenepithelzellen eingesetzt, wie HBE Zellen und primäre Lungen Epithelzellen (HSAEC).

Eine kontinuierliche Aktivierung der PARs durch Stimulierung mit PAR Agonisten führte zu einer erhöhten Expression von PAR-1 mRNA, wobei das PAR-2 Aktivierungspeptid, verglichen mit PAR-1-AP, eine höhere Wirksamkeit aufwies. Allerdings führte die kombinierte Inkubation der Zellen mit PAR Agonisten und LPS zu einer verminderten Hochregulation von PAR-1 mRNA. PAR-2 mRNA wurde ebenfalls nach der Behandlung mit PAR-1 und PAR-2 Agonisten hochreguliert, und die Änderungen waren größer als die bei der PAR-1 Expression. Im Gegensatz zu PAR-1, war immer noch eine erhöhte PAR-2 Expression nach gleichzeitiger Behandlung mit LPS und PAR-2 Agonist zu beobachten. Die PAR-3-mRNA-Expression in A549 Zellen blieb jedoch unter kontinuierlicher PAR Aktivierung unverändert. Nur die kombinierte Inkubation der Zellen mit LPS und PAR Agonisten bewirkte eine Herunterregulation der PAR-3 Expression.

5. Weiterhin konnten wir zeigen, dass die Aktivierung von PAR-2, aber nicht die von PAR-1 die Freisetzung von IL-8, einem Entzündungsmarker, induziert. Darüber hinaus wurden die Signalübertragungswege, welche nach Stimulation mit Thrombin und dem PAR-2-AP in A549 Zellen aktiviert werden, untersucht. Die beiden Agonisten führten zu einer Aktivierung des MAPK-Weges, stimulierten die Phosphorylierung von ERK1/2 (extracellular signal regulated kinase-1/2) und JNK (c-jun N-terminal kinase). Außerdem haben wir in A549 Zellen und primären Lungenepithelzellen nachgewiesen, dass die durch PAR-2-AP und LPS-vermittelte IL-8 Freisetzung synergistisch stimuliert wurde.

6. Zudem erhöhten PAR Agonisten, hauptsächlich PAR-2-AP, die Expression von TGF- $\beta$ 1, einem immunmodulatorischen Zytokin. Simultane Behandlung der Zellen mit LPS und PAR Agonisten verminderte die durch PAR Aktivierung hervorgerufene TGF- $\beta$ 1 Hochregulation.

7. Mit Hilfe von HEK-293 Zellen, die PAR-3 überexprimieren, konnten wir als erste zeigen, dass PAR-3 an der Thrombin-vermittelten ERK1/2 Aktivierung und IL-8 Freisetzung

beteiligt ist. Im Gegensatz zu ERK1/2 wurde JNK nur geringfügig aktiviert, wobei die p38 MAPK bei der durch Thombin induzierten Signalkaskade überhaupt nicht beteiligt war. Die von PAR-3 vermittelten Effekte, wie die erhöhte IL-8 Synthese, erfordern keine Koaktivierung von PAR-1. Dieses haben wir mittels Herunterregulierung der Expression von PAR-1 durch siRNA bestätigen können.

Zusammenfassend ist diese Studie die erste, die folgende Befunde über Epithelzellen der Lunge zeigt: i) Die Entzündungsmediatoren modulieren die PAR Expression in A549 Zellen unterschiedlich. ii) Kontinuierliche PAR Aktivierung führt zur Änderung der PAR-Expression, wobei PAR-2 eine besonders herausragende Rolle spielt. iii) PAR-2 Aktivierung induziert IL-8 Freisetzung, wobei es mit LPS synergistisch wirkt. iv) PAR-induzierte IL-8 Freisetzung wird über den ERK1/2- und JNK-Signalweg vermittelt. iv) PAR Aktivierung führt zur erhöhten TGF- $\beta$ 1-Expression.

Diese Studien zeigen dass PARs, insbesondere PAR-2, eine signifikante Funktion in entzündlichen Erkrankungen der Atemwege spielen. Das Wechselspiel zwischen PAR-2 und Endotoxinen wie LPS gibt wertvolle Einblicke in das Verständnis der Rolle von PARs bei Erkrankungen der Lunge, wie z. B. Asthma. Zusätzlich konnten wir zeigen, dass Aktivierung von PAR-3, des bisher am wenigsten erforschten Mitglieds der PAR-Familie, zu einer IL-8 Freisetzung führt, und dass dieser Rezeptor dadurch eine signifikante Rolle in Entzündungsprozessen spielen kann.