

M. Sci. Rongyu Li:

Protease-activated receptor 2 and α -crystallin: Interactions and Functional implications

Summary:

Protease-activated receptor-2 (PAR-2) is a G protein-coupled receptor activated by trypsin and other trypsin-like serine proteases. The widely expressed PAR-2 is involved in inflammation response, but the physiological/pathological roles of PAR-2 in the nervous system are still uncertain. In the present study, we report novel PAR-2 interaction proteins, α A-crystallin and α B-crystallin. These 20 kDa proteins have been implicated in neurodegenerative diseases, like Alexander's disease, Creutzfeldt-Jacob disease, Alzheimer's disease and Parkinson's disease. Results from yeast-two-hybrid assay using the cytoplasmic C-tail of PAR-2 as bait suggested that α A-crystallin interacts with PAR-2. We further demonstrate the *in vitro* and *in vivo* interaction of C-tail of PAR-2 as well as full-length PAR-2 with α A(α B)-crystallins. We use pull-down, co-immunoprecipitation and co-localization assays. Analysis of α A-crystallin deletion mutants showed that amino acids 120-130 and 136-154 of α A-crystallin are required for the interaction with PAR-2. Co-immunoprecipitation experiments ruled out an interaction of α A(α B)-crystallins with PAR-1, PAR-3 and PAR-4. This demonstrates that α A(α B)-crystallins are PAR-2-specific interaction proteins.

Moreover, we investigated the functional role of PAR-2 and α -crystallin in astrocytes. Evidence is presented to show that PAR-2 activation and increased expression of α -crystallin reduced C2-ceramide- and staurosporine-induced cell death in astrocytes. Thus, both PAR-2 and α -crystallin are involved in cytoprotection in astrocytes. We further investigate the mechanism of protection by PAR-2 and α -crystallin in astrocytes. The expression level of α A(α B)-crystallins under PAR-2 activation was measured by real-time PCR and western blot. Our data show that PAR-2 activation increases the expression of α A-crystallin at mRNA and protein level at 18 hours of stimulation. However, PAR-2 activation decreases the expression of α B-crystallin at mRNA level, but does not affect the protein level of α B-crystallin at 18 hours of stimulation. We also determined the phosphorylation of Ser59 of α B-crystallin by western blot. PAR-2 activation induces phosphorylation of Ser59 of α B-crystallin. To understand the role of phosphorylation of α A(α B)-crystallins on protection, mutants were generated for mimicking phosphorylation or unphosphorylation by mutating respective Ser

residue to Glu or Ser residue to Ala. Results obtained by overexpressing mutants in astrocytes show that highly expressed phosphorylated α A-crystallin (Ser122 and Ser148) provides powerful protection to astrocytes against staurosporine and C2-ceramide. Highly expressed unphosphorylated α A-crystallin at Ser122 and Ser148 causes a loss in protective activity. In parallel, highly expressed phosphorylated α B-crystallin (Ser45 and Ser59) is protective for astrocytes. However, highly expressed unphosphorylated α A-crystallin (Ser122 and Ser148) does not protect astrocytes. Interestingly, highly expressed phosphorylated or unphosphorylated α B-crystallin at Ser19 has similar protective activity as normal α B-crystallin. These data suggest that phosphorylation of α A-crystallin at Ser122 and Ser148 and α B-crystallin at Ser45 and Ser59 is required for protection in astrocytes. These results indicate that PAR-2 and α -crystallin are involved in astrocytes survival by regulation of the expression and the phosphorylation status. To know whether and which MAP kinases are involved in protection, specific inhibitors of p38, ERK and JNK were applied in the experiments. Activation of p38, ERK and JNK was determined in the presence of PAR-2 activating peptide (SLIGRL) by western blot. PAR-2 activation activates p38, ERK and JNK in astrocytes. Application of specific inhibitors of p38 (SB203580), ERK (PD98059) and JNK (SP600125) reduces protection by PAR-2. This suggests that all the MAP kinases mediate protection by PAR-2. Inhibitors of p38 and ERK block the protection by α -crystallin. However, the JNK inhibitor does not have any effect on the protection by α -crystallin. These findings suggest that PAR-2 and α -crystallin are functionally connected by p38 and ERK. Three possible pathways are involved in astrocytes protection by PAR-2 and α -crystallin: 1) PAR-2 activation increases expression of α A-crystallin; 2) PAR-2 activation modulates phosphorylation of α -crystallin by activation of p38 and ERK; 3) PAR-2 activation evokes JNK to release chemokine.

In addition, we explored the role of α -crystallin in the extracellular medium. α -Crystallin was expressed in bacteria and purified using chitin resin. We optimized the purification conditions to generate pure α A(α B)-crystallins. Non-detergent sulfobetaine (NDSB 256) facilitates the purification of α A(α B)-crystallins. Addition of α -crystallin into the extracellular medium rescues astrocytes from staurosporine, C2-ceramide and trypsin treatment. This hints that α -crystallin could be protective in the extracellular medium in neurodegenerative disease conditions.

Zusammenfassung

Der Protease-aktivierte Rezeptor 2 (PAR2) ist ein G Protein-gekoppelter Rezeptor, der durch Trypsin und trypsinähnliche Serinproteasen aktiviert wird. Der in vielen Geweben exprimierte PAR-2 ist an Entzündungsprozessen beteiligt, jedoch ist seine physiologische /pathologische Rolle im Nervensystem unklar. In der vorliegenden Arbeit konnten wir α A-Crystallin und α B-Crystallin als neue Interaktionspartner für PAR-2 aufzeigen. Für diese 20 kDa Proteine wurde berichtet, dass sie bei neurodegenerativen Krankheiten, wie Alexanders-Krankheit, Creutzfeld-Jakob, Alzheimer und Parkinson beteiligt sind. Vorarbeiten aus einem Hefe-2-Hybrid Assay, bei denen der cytosolisch lokalisierte C-Terminus von PAR-2 als Köder verwendet wurde, gaben einen Hinweis darauf, dass α A-Crystallin mit PAR-2 interagiert. Wir konnten in dieser Studie zeigen, dass sowohl *in vitro*, wie auch *in vivo*, der C-terminale Teil von PAR-2, wie auch der vollständige PAR-2 in der Lage sind, mit α A(α B)-Crystallinen zu interagieren. Für diesen Nachweis benutzten wir Pull-Down, Co-Immunpräzipitation und Kolokalisationsexperimente. Die Analyse der Interaktion mit Hilfe von Deletionsmutanten von α -Crystallin zeigte, dass die Aminosäurereste 120-130 und 136-154 für die Interaktion mit PAR-2 notwendig sind. Die Interaktion von α A(α B)-Crystallin mit anderen PARs (PAR-1, PAR-3, PAR-4) konnte ausgeschlossen werden. Dies beweist, dass α A(α B)-Crystallin spezifisch mit PAR-2 interagiert.

Weiterhin untersuchten wir in Astrozyten die funktionelle Rolle von PAR-2 und α -Crystallin. Wir konnten beweisen, dass die Aktivierung von PAR-2 und eine erhöhte Expression von α -Crystallin, den Zelltod in Astrozyten reduzieren. Zelltod wurde durch C2-Ceramid und Staurosporin induziert. Wir untersuchten weiterhin den Mechanismus, durch den PAR-2 und α -Crystallin die Astrozyten schützen können. Das Expressionsniveau von α A(α B)-Crystallin bei Aktivierung von PAR-2 wurde mit Hilfe von Real-Time-PCR und Western Blot untersucht. Unsere Daten zeigen, dass die Aktivierung von PAR-2 die Expression von α A-Crystallin nach 18 –stündiger Stimulation erhöht.

Wir konnten auch durch Western Blot nachweisen, dass die Aktivierung von PAR-2 eine Phosphorylierung des Ser59 von α B-Crystallin induziert. Um die Rolle der Phosphorylierung des α A(α B)-Crystallins auf den Schutz der Zellen zu untersuchen, stellten wir Mutanten her, die eine Phosphorylierung oder eine Nicht-phosphorylierung des Crystallins nachahmen können, indem wir das entsprechende Serin zu Glutamat bzw. Alanin mutierten. Ergebnisse, die durch die Expression von pseudo-phosphoryliertem α A-Crystallin (Ser122 und 148) erhalten wurden, zeigten eine starke Protektion der Astrozyten bei Behandlung mit Staurosporin und C2-Ceramid. Hoch exprimiertes nicht-phosphoryliertes α A-

Crystallin (an Ser122 und 148) verursachte einen Verlust dieser protektiven Eigenschaft. Parallel dazu zeigt hoch exprimiertes phosphoryliertes α B-Crystallin (Ser45 und Ser59) eine protektive Wirkung auf Astrozyten. Expression von nicht-phosphoryliertem α B-Crystallin (Ser122 und Ser148) zeigt jedoch keine schützende Funktion in Astrozyten. Interessanterweise zeigt nicht-phosphoryliertes α B-Crystallin (Ser19) eine ähnliche protektive Wirkung wie normales α B-Crystallin. Diese Daten lassen vermuten, dass die Phosphorylierung von Ser122 und Ser148 bei α A-Crystallin und Ser45 und Ser59 bei α B-Crystallin für den Schutz der Astrozyten notwendig sind. Somit weisen unsere Ergebnisse darauf hin, dass PAR-2 und α -Crystallin durch die Regulation der Expression und des Phosphorylierungsstatus von α -Crystallin bei Kontrolle des Überlebens der Astrozyten beteiligt sind.

Um herauszufinden, ob MAP-Kinasen bei diesem Protektionsvorgang beteiligt sind, wurden spezifische Inhibitoren von p38, ERK und JNK angewendet. Die Aktivierung von p38 und JNK wurde bei PAR-2 Aktivierung mittels Western Blot bestimmt. Die PAR-2 Aktivierung löst die Aktivierung von p38, ERK und JNK in Astrozyten aus. Die Anwendung spezifischer Inhibitoren von p38 (SB203580), ERK (PD98059) und JNK (SP600125), reduzierte den Schutz durch PAR-2. Dies deutet darauf hin, dass alle MAP-Kinasen den Schutz durch PAR-2 vermitteln. Inhibitoren von p38 und ERK blockieren den Schutz durch α -Crystallin. Der Inhibitor von JNK hatte keinen Einfluß auf die protektive Wirkung von α -Crystallin.

Diese Ergebnisse weisen auf einen funktionellen Zusammenhang zwischen PAR-2 und α -Crystallin mit den MAP-Kinasen p38 und ERK hin. Die dabei möglichen 3 Signal- und Aktivierungswege, die bei der protektiven Wirkung von PAR-2 und α -Crystallin beteiligt sind, sind 1) PAR-2 Aktivierung erhöht die Expression von α A-Crystallin, 2) PAR-2 Aktivierung moduliert die Phosphorylierung von α -Crystallin über die Aktivierung von p38 und ERK; 3) PAR-2 Aktivierung ruft die Freisetzung von Chemokinen über JNK hervor. Letzteres wurde in früheren Arbeiten gezeigt.

Zusätzlich untersuchten wir auch die Rolle von α -Crystallin in der extrazellulären Matrix. α -Crystallin wurde in Bakterien exprimiert und aufgereinigt. Wir optimierten die Bedingungen für die Aufreinigung, um reines α A(α B)-Crystallin herzustellen. Zugabe dieser aufgereinigten α -Crystalline zum extrazellulären Medium rettete Astrozyten von Staurosporin- und C2-Ceramid und Trypsin-induziertem Zelltod. Dies weist darauf hin, dass auch extrazelluläres α -Crystallin bei neurodegenerativen Erkrankungen eine protektive Rolle haben kann.