

Effect of CNS injury on expression of protease- activated receptors (PARs) in brain and identification of a putative PAR-2- interacting protein in retina

Zusammenfassung

Die Degeneration oder das Überleben des Hirngewebes, nach einem Hirn-Trauma oder Verletzung des Zentralen Nervensystem (ZNS), hängen stark von der Art, Dauer und der Stärke der Verletzung ab. Eine der wichtige Substanz, die als Folge einer Verletzung des Zentralen Nervensystems nachgewiesen wurde, ist das Thrombin. Die Freisetzung bzw. Produktion von Thrombin im verletzten Gewebe geschieht entweder durch eine beeinträchtigte Blut-Hirn-Schranke oder es wird am Ort der Verletzung direkt durch Spaltung des endogenen Prothrombins produziert. So vermittelt Thrombin seine Wirkung durch Aktivierung der Protease aktivierten Rezeptoren (die so genannte PAR-Rezeptor-Familie). Zu dieser Rezeptor Familie gehören bislang PAR-1, PAR-2, PAR-3 und PAR-4. PAR-1, PAR-3 und PAR-4 gelten als Thrombin Rezeptoren, PAR-2 wird durch Trypsin oder Mastzellen Tryptase aktiviert.

PARs gehören zu der Superfamilie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren mit 7 Transmembran-Domänen. Die Aktivierung dieser Rezeptoren wird von extrazellulären Proteasen vermittelt. PARs sind sowohl an der Degeneration als auch an der Reparatur des nach einer Verletzung geschädigten Gewebes beteiligt.

Teil 1: In der vorliegenden Arbeit wurde die mRNA-Expression aller vier PAR-Subtypen im Auge postnataler Ratten und in der Retina adulter Ratten mittels Reverse Transkription Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) gezeigt. Während die PAR-1-mRNA-Expression in den Augen der Neugeborenen eine entwicklungsabhängige Expression mit einer Abnahme der mRNA-Level von P1, P9 zu P16 aufweist, bleibt bei allen untersuchten Altersstadien das Niveau von PAR-2 unverändert hoch und PAR-3 und PAR-4 weisen einen gleichbleibend niedrigen mRNA-Expressionspegel auf. In der Retina adulter Ratten zeigte die mRNA-Expression der PAR-1 im Vergleich zu PAR-2 und PAR-3 ein höheres Niveau, während PAR-4-mRNA das geringste Expressions-Niveau aufwies.

Um die mögliche Rolle der PARs bei einem Trauma des ZNS zu untersuchen, wurde mittels semi-quantitaver RT-PCR die mRNA-Expression aller vier PAR-Subtypen in der Retina der adulten Rate nach einer Quetschung des optischen Nervs [optical nerve crush (ONC)], welche ein mildes Trauma des ZNS verursacht, analysiert.

Die Expressionsstudie wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Applikation des milden Traumas, beginnend mit 6 Stunden bis zu 3 Wochen nach ONC, durchgeführt.

Die mRNA-Expressions-Analyse zeigte bereits 6 Stunden nach der unilateralen ONC eine Hochregulation aller vier PARs in der Retina der behandelten Tiere, mit Ausnahme von PAR-3, welches erst nach 12 Stunden eine Hochregulation der mRNA zeigt. Die mRNA Niveaus der PAR-1, PAR-3 und PAR-4 erreichten drei Wochen nach ONC wieder den Wert der mRNAs in der Retina unbehandelter Tiere. Im Unterschied zu PAR-1, PAR-3 und PAR-4 blieb der mRNA-Expressionsspiegel von PAR-2 zu allen untersuchten Zeitpunkten höher als der entsprechende mRNA-level in der Retina der unbehandelten Tiere.

Interessanterweise wurden vergleichbare Befunde auch in der Retina des kontralateralen, nicht verletzten Auges beobachtet. In früheren Studien wurde als Folge solcher ZNS-Läsionen an Stelle der Verletzung eine Zunahme der Thrombinfreisetzung, in der Retina eine Degeneration der Ganglienzellen sowie Apoptose und Aktivierung von PARs berichtet. Die anfängliche Hochregulation der PAR-mRNA-Expression als eine der Folgen des ONC (Modell eines milden Traumas) könnte als Effektor für den frühen Zelltod wirken. Die Abnahme des mRNA-Expressions-Niveaus auf das Niveau der unbehandelten Tiere würde hingegen die Neuroprotektions-Rolle der PARs beschreiben.

Teil 2: Zur weiteren Charakterisierung der Veränderung der PAR-mRNA-Expression nach einer ZNS- Verletzung wurde die Expression der PAR mRNAs nach einer verübergewendenden fokalen Ischämie (transient focal ischemia), bei welcher der reduzierte Blutfluss zu einer Kaskade pathophysiologischer Effekte, einschließlich Entzündung, Excitotoxicität und Blutplättchenaktivierung an der Stelle der Verletzung führt, untersucht. Die fokale Ischämie wurde mittels Mikroinjektion von Endothelin in der Nähe der mittleren cerebralen Arterie induziert. RT-PCR Analysen ergaben für PAR-1 eine signifikante und für PAR-2 eine geringfügige Abnahme der mRNA Spiegel. PAR-3 wies anfänglich eine Zunahme, gefolgt von einer Abnahme der mRNA Niveaus auf, und PAR-4 zeigte die höchste Zunahme, das 2,5-fache, der mRNA- Spiegel bereits 12 Stunden nach der Ischämie. Auch bei diesem Paradigma stellen wir an der kontralateralen (unbehandelten) Seite eine Veränderung der mRNA-Expression der PARs in Form von Abnahme der mRNA Level von PAR-1, PAR-2 und PAR-3 fest. Eine Abnahme des PAR-4-mRNA Spiegels wurde erst 7 Tage nach der Ischämie festgestellt. Die hier gezeigten Befunde legen die Vermutung nahe, dass die Thrombin-

Rezeptoren PAR-1, PAR-3, PAR-4 eine wichtige Rolle bei der Pathophysiologie des ZNS nach einem Trauma und auch bei der Ischämie spielen.

Teil 3: Um die intrazellulären Signalwege von PAR-2 näher verstehen zu können, charakterisierten wir in einem weiteren Abschnitt der vorliegenden Arbeit die möglichen Interaktions-Proteine für PAR-2. Hierfür wurde die Methode des Yeast-Two-Hybrid-Systems gewählt. Die Suche nach Interaktionspartnern wurde mit der Sequenz des C-Terminalen Bereichs von PAR-2 an einer selbst erzeugten cDNA-Bibliothek aus der Retina der Ratte durchgeführt. Die cDNA- Bibliothek suche ergab einen positiven Klon, der sowohl bei der folgenden Cotransformation mit der cDNA-Bibliothek wie auch beim folgenden ‘Yeast Mating‘ eine Interaktion zeigte. Bei diesem Klon handelt es sich um γ -Crystallin A. Um den Protein Interaktionsbereich genauer zu definieren, wurden die beiden zytoplasmatischen Schleifen des PAR-2 Rezeptors mit dem γ -Crystallin A in Hefe durch ‘Yeast Mating‘ verifiziert. Diese ergab eine spezifische Interaktion nur mit dem C-terminalen Bereich des PAR-2 Rezeptors. Diese Interaktion wurde in Hefe und auch in Säugetier-Zellen verifiziert.

Die Expression des γ -Crystallin A wurde mittels RT-PCR in verschiedenen Zell-Linien, wie auch Geweben untersucht. Die mRNA wurde in der Retina, dem optischen Nerv, Hirn und in Astrozyten aus dem Hippokampus in Primärkulturen spezifisch nachgewiesen. Die subzelluläre Lokalisation beider Proteine (PAR-2 und γ -Crystallin A) wurde mittels Transfektion von N2A und HEK-293 Zellen entweder mit γ -Crystallin A- oder PAR-2- GFP Fusionsprotein untersucht. PAR-2 zeigte wie erwartet eine membranständige Lokalisation, während γ -Crystallin A eine zytosolische Lokalisation aufwies. Die in der Hefe festgestellte Interaktion zwischen PAR-2 und γ -Crystallin A wurde dann mittels Coimmunopräzipitation und Immunocytochemie in Säugetierzellen verifiziert. Für Coimmunopräzipitation nutzten wir cotransfizierte HEK-293 Zellen, welche beide Proteine (PAR und γ -Crystallin A) mit verschiedenen Tags (Myc-His und HA) überexprimierten. Die Immunopräzipitation erfolgte mit einem Antikörper gegen den Tag im PAR-2- Fusionsprotein (Hämagglutinin; HA). Dieser Komplex wurde mit dem Antikörper gegen den Tag im γ -Crystallin A Fusionsprotein ebenfalls detektiert. Die Doppel-Immunocytochemischen Untersuchungen an hippokampalen Astrocyten in Primärkultur mit spezifischen Antikörpern gegen γ -Crystallin A und PAR-2 bestätigten zum einen die Ergebnisse der subzellulären Lokalisation beider Proteine in den transfizierten Zellen und zum anderen zeigten diese Ergebnisse auch die schon in der Hefe beobachtete Interaktion in

Säugetier-Zellen. Für das γ -Crystallin A wurde eine co-Lokalisation mit Aktincytoskelett und eine mögliche Rolle bei der Freisetzung von proinflammatorischen Cytokinen beschrieben. Eine weitere detaillierte Untersuchung dieser Interaktion kann die physiologische Bedeutung dieser Interaktion klären.

Zusammenfassung: Zeigen Wir in der vorliegenden Arbeit erstmalig: i) die mRNA-Expression von PAR-1-4 im sich entwickelnden Auge der neugeborenen Ratte und in der Retina der 12 Wochen alten Tiere; ii) die Veränderung der mRNA-Expression aller 4 PAR Subtypen bei zwei verschiedenen Paradigmen für ZNS-Verletzung, nämlich Quetschung des optischen Nerven [optical nerve crush (ONC)] oder vorübergehende fokale Ischämie (transient focale ischemie); und iii) die molekulare Identifizierung eines Interaktions-Proteins für PAR-2 in der Retina der Ratte mittels Yeast-Two-Hybrid- Methode.

Die anfängliche Zunahme der mRNA-spiegel der PARs im verletzten Hirngewebe weist auf eine wichtige Funktion dieser Rezeptoren in der Pathophysiologie des zentralen Nervensystems hin. Das unterschiedliche Veränderungsmuster der mRNA- spiegel zu verschiedenen Zeitpunkten nach der ZNS-Verletzung deutet auf eine differentielle mRNA Regulation dieser Gene hin.

Sowohl im ONC- Modell als auch in Modell der fokalen Ischämie konnte ein Effekt der unilateralen Läsion auf die kontralaterale Seite beobachtet werden. Wir konnten ebenfalls einen neuen Interaktionspartner für PAR-2, das γ -Crystallin A, identifizieren. Eine Interaktion konnte durch verschiedene experimentelle Ansätze bestätigt werden. γ -Crystallin A lokalisiert mit dem Aktincytoskelett in der Zelle und induziert möglicherweise die Expression proinflammatorischer Cytokine. Kenntnis über die physiologische Kontrolle der Interaktion zwischen PAR-2 und γ -Crystallin A wird zur Aufklärung der funktionellen Rolle beider Proteine führen.

Abstract

Degeneration or survival of cerebral tissue after brain injury depends on the source, intensity and duration of the insult. One serine protease that is closely associated with and produced in response to CNS injury is thrombin. Thrombin enters the injury cascade in brain either via a compromised blood-brain barrier or from endogenous prothrombin. Thrombin mediates its action through the protease-activated receptor family (subtypes PAR-1, -3 and -4), while PAR-2 is activated by trypsin or mast cell tryptase. PARs, belonging to the superfamily of G-protein coupled receptors with a 7-trans-membrane domain structure, are activated by proteolytic cleavage of their N-terminus. PARs are involved in tissue degeneration and repair upon injury.

Part 1: In the present study, we have demonstrated for the first time the expression of all four subtypes of PARs in the post-natal eye and in retina of the adult rat by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). PAR-1 is developmentally regulated in the eye, with a decrease from P1, P9 to P16, while levels for PAR-2, PAR-3 and PAR-4 remain unchanged throughout. In the retina of the adult rat, PAR-1 is highly expressed, whereas PAR-2, PAR-3 are moderately expressed and PAR-4 is expressed at low levels. To elucidate possible roles of PARs after trauma, we performed semi-quantitative RT-PCR analysis of expression of all 4 PAR subtypes after ONC. mRNA levels of all 4 PARs were upregulated as early as 6 h after unilateral ONC, except PAR-3, which showed a delayed upregulation. PAR-1, PAR-3 and PAR-4 mRNA levels returned back almost to basal levels at 3 weeks post-crush, while PAR-2 mRNA level was still high by the end of 3 weeks after crush. As a result of unilateral lesion, PAR mRNA expression even in the contra-lateral, uninjured side was found to be affected to almost comparable levels as in the injured side. Previous studies have already shown increase in thrombin levels at the site of injury, retinal ganglion cell degeneration by necrosis and apoptosis and PAR activation as a consequence of nerve crush. PAR upregulation as a result of nerve crush in the mild trauma model could act as an effector of early cell death. Eventual return of receptor mRNA to basal levels is consistent with neuroprotection.

Part 2: To further characterise PAR mRNA expression after CNS injury, we studied the model of transient focal ischemia. In the present study we examined the change in mRNA expression levels of PAR-1-4 as a result of transient focal ischemia in rat brain, induced by microinjection of endothelin near the middle cerebral artery. Using semi-quantitative RT-PCR analysis, PAR-1 was found to be significantly down-

regulated, while PAR-2 mRNA levels decreased only moderately after the ischemic insult on the ipsilesional side. PAR-3 was transiently up-regulated, followed by downregulation, and PAR-4 mRNA levels showed the most striking (2.5 fold) increase at 12 h after ischemia in the injured side. In the contra-lateral hemisphere, mRNA expression was also affected. There, decreased mRNA levels were observed for PAR-1, -2 and -3, while PAR-4 levels were reduced only after 7 days. Taken together, these data suggest the involvement of the thrombin receptors PAR-1, PAR-3 and PAR-4 in the pathophysiology of brain ischemia.

Part 3: In order to gain more insight into PAR-2 signalling pathway and the proteins involved downstream of the receptor, we performed a yeast-two hybrid screening to fish out putative interacting partners for PAR-2 (rat). Screening for positive clones both after the initial library transformation (sequential) and subsequently by yeast mating resulted in identification of α -crystallin A as the interacting protein for PAR-2. Lack of interaction between cytoplasmic loop 2 and 3 of PAR-2 and α -crystallin A by yeast mating confirmed the specificity of the interaction between C-tail of PAR-2 and α -crystallin A.

RT-PCR analysis of several tissues and cell lines exhibited a selective expression of α -crystallin A in retina, optic nerve, brain and primary cultures of rat hippocampal astrocytes and whole brain astrocytes. However, presence of α -crystallin A at the protein level in primary cultures of hippocampal neurons indicated high expression of α -crystallin A in hippocampal astrocytes compared with low levels in neurons.

Subcellular localisation of α -crystallin A and PAR-2 as GFP fusion protein in N2A cells showed cytosolic expression for α -crystallin A, while PAR-2 was expressed on plasma membrane with little cytosolic fluorescence. HEK cells transfected with both bait and prey protein on precipitation with antibody against bait protein tag gave positive signal on detection with prey protein tag antibody. Co-immunoprecipitation of C-tail of PAR-2 and α -crystallin A verified the results from the yeast-two hybrid screening. Further, double labelling of hippocampal astrocyte primary cultures confirmed the subcellular localisation of both proteins observed in mammalian expression system, and the overlapping of staining pattern proved that an interaction between α -crystallin A and PAR-2 exist in native biological systems. The physiological control of this interaction will clarify the functional role of both, PAR-2 and α -crystallin A signalling.

