

ZUSAMMENFASSUNG

Suche nach unbekanntem, mit PAR-2 interagierenden Proteinen

Der Protease-aktivierte Rezeptor-2 (PAR-2) ist ein 7-TMD (Siebentransmembrandomänen) G-Protein-gekoppelter Rezeptor. PAR-2 vermittelt Signale von extrazellulären Serinproteasen, wie Trypsin, Trypsinase, an intrazelluläre Ziele. PAR-2 hat in verschiedenen Systemen wichtige physiologische und pathologische Funktionen. Die Funktion von PAR-2 im zentralen Nervensystem (CNS) ist noch weitgehend unbekannt. Auch die PAR-2-vermittelten intrazellulären Signaltransduktionswege sind kaum klar. Um unser Verständnis der PAR-2 Funktionen im CNS zu erweitern, suchten wir nach Partnerproteinen. Dazu verwendeten wir die vollständige humane PAR-2 cDNA-Sequenz als Köder, um in einem Hefe Two-Hybrid System die mit PAR-2 interagierenden Proteine zu identifizieren. Unter den gefundenen Kandidaten bestätigten die Kontrolltests im Hefe Two-Hybrid-System 12 Proteine als wirklich positiv. Davon studierten wir im Detail die Proteine Jab1 und p24A.

Funktion des als PAR-2 Interaktionsprotein identifizierten Jab1: Regulation der PAR-2 abhängigen Genexpression

Wir konnten die funktionelle Wechselwirkung von PAR-2 mit Jab1 zeigen. Jab1 wurde ursprünglich als Koaktivator für c-Jun beschrieben. Später wurde gezeigt, dass Jab1 außerdem die fünfte Untereinheit des COP9-Signalosoms darstellt. Die Ergebnisse der in-vitro Glutathion-S-Transferase (GST) Pull-down Assays und der in-vivo Coimmunpräzipitationen bestätigten, dass Jab1 biochemisch mit PAR-2 in Zellen interagiert. Für die Wechselwirkung mit Jab1 sind mehrere intrazelluläre Domänen von PAR-2 notwendig. Für Jab1 konnte durch Doppelimmunfluoreszenzfärbung eine Kolo-kalisation mit PAR-2 in transfizierten HEK293-Zellen, aber auch in humanen Astrozyten-Primärkulturen nachgewiesen werden. Weiter zeigten wir, dass nach Stimulierung mit PAR-2-Agonisten (Trypsin oder das spezifische PAR-2-aktivierende Peptid) das interagierende Jab1 zeitabhängig von PAR-2 abdissoziiert. Diese Dissoziation konnte durch einen Inhibitor der Rezeptorendozytose, aber nicht durch einen Inhibitor lysosomaler Proteasen, verhindert werden. Interessanterweise fanden wir, dass die Aktivierung von PAR-2 eine Umverteilung von Jab1 von der Plasmamembran ins Cytosol induzierte, aber keinen Effekt auf die Expression von Jab1 hatte. Weiter vermittelte Jab1 die PAR-2-induzierte c-Jun-Aktivierung, welcher die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Aktivator-Protein-1 (AP-1) verstärkte. Funktionelle Hemmung durch Einsatz von kleinen, mit der Jab1-Expression interferierenden RNA (siRNA) ergab, dass die PAR-2-induzierte AP-1-

Aktivierung signifikant blockiert war. Diese Ergebnisse beweisen, dass Jab1 ein wichtiger Effektor für einen neuen Signaltransduktionsweg der PAR-2-abhängigen Genexpression ist.

Das „coated vesicle“-Membranprotein p24A reguliert als PAR-2 Interaktionsprotein die Post-Golgi-Sortierung von PAR-2 zur Plasmamembran

Als zweites charakterisierten wir p24A, ein weiteres mit PAR-2 interagierendes Protein. Auch dieses wurde von uns im Hefe-Two-Hybrid Screening als positiv identifiziert. p24A gehört zur p24-Familie der 'coated vesicle'-Membranproteine. Bindungsstudien mittels in-vitro GST Pull-down Assays ergeben, dass die extrazelluläre Schleife Nr. 2 (loop-2) von PAR-2 stark an die Aminosäuren 1 bis 125 am N-Terminus von p24A bindet. Die intrazellulären Domänen und die Transmembrandomänen von PAR-2 zeigten keine Interaktion mit p24A. Die in-vivo Wechselwirkung von PAR-2 mit p24A wurde durch Coimmunpräzipitation bestätigt. Interessanterweise ergab sich bei der Doppelimmunfluoreszenzfärbung an doppeltransfizierten HEK293-Zellen, dass p24A mit intrazellulärem PAR-2 am Golgi-Apparat und nicht mit zellmembranständigen Rezeptoren kolokalisiert war. Auch mit p23, einem weiteren Mitglied der p24-Familie fanden wir durch Coimmunpräzipitation eine in-vivo Wechselwirkung von PAR-2. Bei der Untersuchung der funktionellen Bedeutung der PAR-2-p24A Wechselwirkung entdeckten wir, dass nach Aktivierung von PAR-2 die Abdissoziation von p24A vom PAR-2 zu jenem Zeitpunkt erfolgte, wenn bei der Resensibilisierung die Sortierung der intrazellulären Rezeptoren zur Plasmamembran stattfindet. Im Gegensatz dazu dissoziierte p23 vom PAR-2-Rezeptor erst 60 min nach der Stimulation mit dem Agonisten ab. Dann PAR-2 war vollständig resensibilisiert. Die Dissoziation von p24A vom PAR-2 wurde durch Brefeldin A vollständig gehemmt. Brefeldin A ist ein Inhibitor für Guaninnukleotid-Austauschfaktoren, und Brefeldin A verhindert die Umwandlung von inaktivem ADP-Ribosylierungsfaktor 1 (ARF1)-GDP in aktives ARF1-GTP. Die Aktivierung von ARF1 führt zur Dissoziation der hetero-oligomeren Komplexe aus p24A und p23. Daher legen unsere Ergebnisse nahe, dass p23 und p24A den PAR-2 im Golgi-Apparat zurückhalten. Dies ist für die Bildung eines intrazellulären PAR-2-Pools fundamental. Nach PAR-2-Aktivierung gibt p24A PAR-2 frei, und reguliert so die Rezeptoresensibilisierung, während p23 an der Sortierung von PAR-2 zur Plasmamembran beteiligt ist. In weiteren Untersuchungen konnten wir zeigen, dass p24A auch stark mit anderen Rezeptoren, nämlich PAR-1 und P2Y₁ Rezeptor interagiert. Dies legt nahe, dass unser Modell den molekularen Mechanismus erklärt, der dem Post-Golgi-Transport von bestimmten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zur Plasmamembran zugrunde liegt. Damit identifizieren wir eine molekulare Komponente, die für einen grundlegenden Prozess der Rezeptorphysiologie verantwortlich ist, nämlich die Resensibilisierung nach Rezeptorinternalisierung.