

Master of Science, Wang, Yingfei

Protease-activated receptor (PAR)-1 and PAR-2 protect rat astrocytes from apoptotic cell death via differentially regulating JNK isoform-specific release of the chemokine GRO/CINC-1

Zusammenfassung

Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR), eine Unterfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, werden in Astrozyten aus Rattenhirn stark exprimiert. Proteasen, wie Thrombin, Trypsin und Tryptase, aktivieren PARs durch einen einzigartigen Mechanismus, nämlich irreversible Spaltung des Rezeptors und Exposition einer neuen N-terminalen Domäne, welche als intramolekularer Ligand ('tethered ligand') wirkt. Thrombin aktiviert PAR-1, PAR-3 und PAR-4, während PAR-2 durch Trypsin und Mastzell-Tryptase, aktiviert wird. Hier wurde die durch PAR-1 und PAR-2 regulierte Chemokin- und Cytokinfreisetzung untersucht, und studiert, ob diese Chemokine eine protektive Funktion bei neuronalem Zelltod haben.

Hier wird beschrieben, dass PAR-1- und PAR-2-Agonisten konzentrationsabhängig die Sekretion des Chemokins GRO/CINC-1 aus Rattenhirnastrozyten in Primärkultur hochregulieren. GRO/CINC-1 (growth-regulated oncogene/cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1) ist ein funktionelles Gegenstück zum humanen Interleukin (IL)-8. Die Behandlung sowohl mit PAR-3-aktivierendem Peptid (AP) als auch mit PAR-4-AP führt nicht zu einem Anstieg des GRO/CINC-1 mRNA-Spiegels. Da sowohl PAR-1 als auch PAR-2 die Freisetzung des Chemokins GRO/CINC-1 aus Astrozyten bewirkte, untersuchten wir im Weiteren, ob die beiden PAR-Rezeptorsubtypen ihre Signale über getrennte Transduktionswege weiterleiten. Mittels ELISA- und Immunoblot-Techniken fanden wir, dass die PAR-1-induzierte GRO/CINC-1-Freisetzung durch Proteinkinase C (PKC), Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) und Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase (MEK1/2) vermittelt wurde. Diese drei Kinasen sind nicht an der PAR-2-induzierten GRO/CINC-1-Freisetzung beteiligt. Trotz dieser klaren Unterschiede zwischen den PAR-1- und PAR-2-Signaltransduktionswegen fanden wir, dass die c-Jun N-terminale Kinase (JNK) in beiden Signaltransduktionswegen eine herausragende Rolle spielt.

JNK ist sowohl bei der PAR-1-, als auch bei der PAR-2 Signaltransduktion wichtig. Aber durch PAR-1 und PAR-2 werden unterschiedliche JNK-Isoformen aktiviert. PAR-1 induzierte die Phosphorylierung der 46 kDa und 43 kDa JNK Isoformen, während PAR-2 nur die Phosphorylierung der 43 kDa JNK bewirkte. Im Gegensatz zur PAR-1-induzierten JNK-Aktivierung, die durch PKC und PI3K vermittelt wurde, war die PAR-2-induzierte JNK-Phosphorylierung unabhängig von der PKC. Die Aktivierung von PAR-1, nicht aber von PAR-2, führte zur Phosphorylierung von c-Jun durch die JNK. Alle diese Unterschiede zeigen

deutlich, dass verschiedene JNK-Isoformen mit unterschiedlichen Eigenschaften an den PAR-1- und PAR-2-Signaltransduktionswegen beteiligt sind.

“Loss-of-function-Studien” unter Einsatz von siRNA, die die Expression der verschiedenen JNK-Isoformen unterdrückten, zeigten, dass für die PAR-1-induzierte Freisetzung von GRO/CINC-1 die PKC-vermittelte Aktivierung von JNK2 und die PI3K-vermittelte Aktivierung von JNK3 essentiell waren. Die durch PAR-1 induzierte JNK1-Aktivierung bewirkte die Phosphorylierung von c-Jun, welche aber nicht an der GRO/CINC-1-Freisetzung beteiligt war. Im Gegensatz dazu bewirkte die PAR-2-induzierte Aktivierung von JNK1, welche nicht zur Phosphorylierung von c-Jun führte, die Freisetzung von GRO/CINC-1. Diese Ergebnisse zeigen zum ersten Mal, dass die JNK-vermittelte GRO/CINC-1-Freisetzung in einer JNK-Isoform-spezifischen Weise erfolgt und PAR-Subtypen-spezifische Mechanismen beinhaltet.

Weitere Untersuchungen ergaben, dass erstens die Aktivierung von PAR-1 und PAR-2 und zweitens die Zugabe von rekombinantem GRO/CINC-1 den durch C₂-Ceramid induzierten Zelltod in Astrozyten unterdrückten. Diese Protektion ging mit einer Verhinderung der Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien einher. Die Hemmung der Cytochrom C-Freisetzung wurde durch einen Antagonisten für den Chemokinrezeptor CXCR2, (SB-332235), aufgehoben. Ein weiterer wichtiger Befund ist, dass der spezifische JNK-Inhibitor SP600125 die protektive Wirkung von PAR-1 signifikant unterdrückt. Diese Ergebnisse zeigen zum ersten Mal, dass PAR-1 eine wichtige antiapoptotische Rolle im Gehirn spielt. PAR-1 schützt über die Regulation der Freisetzung des Chemokins GRO/CINC-1, welches über den Chemokinrezeptor CXCR2 wirkt, vor toxischen Insulten. Dieser neuartige Mechanismus erklärt teilweise die seit längerem bekannte protektive Wirkung von niedrigen Thrombinkonzentrationen bei Hirnschädigungen. Über den protektiven Effekt von PAR-2 im Gehirn war bisher nichts bekannt. Daher sind unsere Ergebnisse in diesem Kontext besonders interessant, da sie zeigen, dass der PAR-2-Signaltransduktionsweg über die Regulation der Freisetzung des Chemokins GRO/CINC-1 einen weiteren protektiven Mechanismus im Gehirn darstellt.

PAR-1 und PAR-2 haben auch überlappende Funktionen, aktivieren aber unter bestimmten pathologischen Bedingungen unterschiedliche Signaltransduktionswege, um neurale Zellen vor dem Zelltod zu schützen. Bei dieser PAR-induzierten Zellprotektion über die Regulation der GRO/CINC-1-Sekretion spielen unterschiedliche JNK-Isoformen eine Rolle. Daraus ergeben sich neue funktionelle Einsichten in die PAR-JNK-Signaltransduktion und unser Verständnis der protektiven Wirkungen von PAR-Rezeptoren im Gehirn wird erweitert.