

Meike Hömme
Dr. sc. hum.

Bedeutung des „Regulators of G-Protein Signaling“ (RGS)-2 für die dynamische Regulation auf osteoblastäre Signalmechanismen

Geboren am 24. 10. 1972 in Cloppenburg
Diplom der Fachrichtung Biologie am 15.06.1998 an der Carl von Ossietzky-Universität Oldenburg

Promotionsfach: Kinderheilkunde
Doktorvater: Prof. Dr. med. F. Schaefer

In experimentellen Studien beeinflusst die zeitliche Dynamik der PTH-Exposition den Knochenstoffwechsel: während eine tonische Dauerapplikation zu Knochenabbau führt, haben intermittierende Gaben einen starken osteoanabolen Effekt. Der intrazelluläre Mechanismus, über den diese gegensätzlichen Wirkungen gesteuert werden, ist noch unbekannt. Da PTH über seinen G-Protein-gekoppelten Rezeptor sowohl PKA- als auch PKC-vermittelte Signalwege aktiviert, könnte eine unterschiedliche Induktion dieser intrazellulären Mechanismen die differentielle PTH-Wirkung auf den Knochenmetabolismus durch verschiedene PTH-Konzentrationsmuster verursachen. Kürzlich wurde gezeigt, dass PTH über den PKA-Signalweg rasch und transient die Expression von RGS-2 induziert, einem Mitglied der „Regulator of G-Protein Signaling“- (RGS)-Proteinfamilie. Diese Proteine binden an $G\alpha$ -Untereinheiten und bewirken durch Aktivierung von GTPasen die Abschwächung der G-Protein-vermittelten Signalaktivierung. Biochemische Studien deuten darauf hin, dass RGS-2 präferentiell an $Gq\text{-}\alpha$ -Untereinheiten bindet. Gq aktiviert die Phospholipase- $C_{1\beta}$ und damit Ca^{2+} -Einstrom und PKC-Induktion, nicht aber PKA-abhängige Signalwege.

In einer osteoblastären Zelllinie (UMR 106-01) untersuchten wir die Expression von RGS-2 in Monolayerkultur und unter dynamischen Bedingungen in suspendierten Microbeads nach pulsatiler und tonsicher PTH-Exposition. Außerdem beleuchteten wir die Modulation der RGS-2 Synthese durch $1,25(OH)_2D_3$ und Steroidhormone. Schließlich wurden mittels Überexpressionsstudien die Wirkung von RGS-2 auf Signaltransduktionsmechanismen und Zellfunktionen untersucht.

Wir konnten zeigen, dass PTH die Aktivierung von RGS-2 mRNA und -Protein rasch und transient ausschließlich über den PKA-Signalweg induziert. Die RGS-2 mRNA Expression war unabhängig von Proteinneusynthese. Wir konnten nachwei-

sen, dass RGS-2 eine erhöhte Bindung zu $G\alpha_q$ im Vergleich zur Bindung an $G\alpha_s$ aufweist und sowohl im Kern als auch im Zytosol lokalisiert ist.

In dynamischen Perfusionsexperimenten konnten wir beobachten, dass pulsatile PTH-Expositionen wesentlich geringere RGS-2 mRNA- und Proteinexpressionen induziert als eine tonische Applikation äquivalenter PTH-Dosen. Diese differentielle Beeinflussung der RGS-2-Expression war nicht durch eine Desensitisierung der PTH-Rezeptorantwort zu erklären, da die wiederholte PTH-Pulsapplikation jeweils zu transienten cAMP-Anstiegen führte. Die Expression anderer Zielgene mit langsamerer Expressionsdynamik, wie Matrix-Metalloproteinase 13 und IGF-Bindungsprotein-5 war bei pulsatiler PTH-Exposition ebenfalls geringer ausgeprägt. Unterschiedliche PTH-Expositionsmuster scheinen somit tatsächlich eine differentielle Induktion intrazellulärer Signaltransduktionsmechanismen zu bewirken.

Daneben konnten wir zeigen, dass $1,25(OH)_2D_3$ -Vorinkubation die PTH-induzierte RGS-2 mRNA- und Proteinexpression erhöhte, während Dexamethason einen hemmenden Effekt hatte. Diese modulatorische Wirkung war nicht durch eine Veränderung der RGS-2 mRNA-Halbwertszeit, der PTH/PTHrP Rezeptor-Aktivierung, der cAMP-Akkumulation, oder der Aktivierung des cAMP-Response Element Binding Protein (CREB) verursacht, sondern durch eine modulierende Wirkung von $1,25(OH)_2D_3$ und Dexamethason auf die RGS-2 mRNA-Syntheserate.

In Überexpressionsstudien konnten wir zeigen, dass RGS-2 die 3-34 PTH-induzierte, PKC-vermittelte p42/44 MAPK-Phosphorylierung hemmt, während die cAMP/PKA-vermittelte CREB-Phosphorylierung nicht beeinflusst wird.

Zusammenfassend konnten wir in der vorliegenden Arbeit nachweisen, dass RGS-2 ein wichtiges Regulatorprotein zellulärer Effekte von PTH an Osteoblasten darstellt. Es bindet selektiv an Gq-Untereinheiten, hemmt PKC-abhängige Signalwege und wird abhängig vom zeitlichen Muster der PTH-Exposition induziert. Somit könnte es eine wichtige Rolle in der differentiellen Beeinflussung des osteoblastären Stoffwechsels durch pulsatile und tonische PTH-Muster einnehmen.