

Dagmar Hildebrand
Dr. sc. hum.

Pasteurella multocida Toxin-induzierte Modulationen von Signalkaskaden in Säugerzellen

Promotionsfach: Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
Doktorvater: Prof. Dr. med. Klaus Heeg

Die vorliegende Arbeit präsentiert Modulationen von Signalkaskaden in Säugerzellen durch das bakterielle *Pasteurella multocida* Toxin (PMT). PMT wird als ein Hauptvirulenzfaktor pathogener Stämme des gramnegativen *Pasteurella multocida* Coccobacillus sezerniert. Innerhalb der Zelle aktiviert das Einkettentoxin über seine Deamidase-Funktion die α -Untereinheit verschiedener heterotrimerer G-Proteine konstitutiv und induziert die Freisetzung der $\beta\gamma$ -Untereinheit. Dies führt zur Aktivierung verschiedener proliferativer Signalwege, wie der Janus-Kinase (JAK)-„signal transducer and activators of transcription“ (STAT)-Kaskade. Die PMT-stimulierte STAT3-Aktivierung bleibt hierbei, im Gegensatz zur kurzen Zytokinrezeptor-vermittelten Stimulierung, für mindestens 18 Stunden erhalten, womit PMT die negative Regulation der Signalkaskade durch „suppressors of cytokine signaling“ (SOCS)-Proteine umgeht. Die Untersuchungen dieser Arbeit an HEK 293 Zellen zeigen, dass sowohl überexprimiertes SOCS-1 als auch endogen-induziertes SOCS-1 die PMT-stimulierte STAT3-Aktivität nicht aufheben. PMT induziert die STAT-abhängige Serin/Threonin-Kinase Pim-1, welche die Phosphorylierung von SOCS-1 katalysiert und damit dessen E3 Ubiquitin-Ligase-Funktion unterdrückt. Phosphoryliertes SOCS-1 ist nicht nur unfähig JAK2 zum proteasomalen Abbau zu markieren, sondern übt weiterhin einen stabilisierenden Effekt aus, der zur Akkumulation von JAK2 und schließlich zur Hyperaktivierung von STAT3 führt. Die Hyperaktivierung von STAT3 wird mit unkontrolliertem Wachstum, dem erhöhten Überleben der Zellen und maligner Zelltransformation in Verbindung gebracht. Experimente dieser Arbeit zeigen, dass PMT das Adhäsionsunabhängige-Überleben von Zellen, einem Kennzeichen der Zelltransformation, induziert, wobei dieser Effekt mit dem Phosphorylierungszustand von SOCS-1 und schließlich dem Aktivierungszustand von STAT3 korreliert. Hiermit geben die ermittelten Daten Hinweise darauf, dass das bakterielle Toxin die Fähigkeit besitzt, negative Regulationsmechanismen des Wirtsorganismus zu neutralisieren und damit möglicherweise die Transformation der Zellen begünstigt. Diese transformierenden Eigenschaften unterstützen den

bestehenden Verdacht, dass PMT aufgrund der konstitutiven Aktivierung verschiedener proliferativer Signalkaskaden karzinogenes Potential besitzen könnte.

Weitere Untersuchungen dieser Arbeit, welche in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Joachim Orth am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Universität Freiburg entstanden, weisen PMT zudem als einen potenten Inhibitor Staurosporin-induzierter Apoptose aus. Neben der Akkumulation der konstitutiv aktiven Pim-1-Kinase induziert PMT die Aktivierung der Akt-Kinase, als Effektor der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K). Beide Serin/Threonin-Kinasen modulieren gemeinsam pro- und anti-apoptotische Mitglieder der „B-cell leukemia/lymphoma-2“ (Bcl-2)-Familie und unterdrücken damit den intrinsischen Weg des programmierten Zelltodes. Diese Daten bekräftigen die Hypothese, dass PMT aufgrund seines starken mitogenen Einflusses die Onkogenese fördern könnte zusätzlich.

Die Voraussetzung einer effektiven Immunantwort auf eine bakterielle Infektion ist die Hämatopoese, da sie den Organismus mit Effektorzellen ausstattet. PMT nimmt bekanntermaßen auf die Hämatopoese Einfluss, indem es in Schweinen, Mäusen und Ratten die Differenzierung von Osteoklasten aus Makrophagen stimuliert. Die Untersuchungen dieser Arbeit an Knochenmarkszellen der Maus zeigen, dass PMT neben Makrophagen und Osteoklasten die Expansion einer B Zellpopulation stimuliert, welche in erhöhtem Maße die osteoklastogenen Faktoren TNF α , IL-6, IL-1 β und „receptor activator of NF- κ B ligand“ (RANKL) sezerniert. Weitere Analysen zeigen, dass sich isolierte PMT-stimulierte Stammzellen nicht zu Osteoklasten entwickeln und dass B Zellen für die PMT-vermittelte Osteoklastendifferenzierung essentiell sind. Die Toxin-expandierten B Zellen weisen eine äußerst geringe Genexpression des Transkriptionsfaktors *Pax5* auf, welcher die Differenzierung zur reifen B Zelle festlegt. Außerdem exprimieren sie den Makrophagenkolonie-stimulierenden Faktor (M-CSF)-Rezeptor, dessen Stimulation die Osteoklastenentwicklung induziert und dessen Produktion normalerweise in der B Zellentwicklung unterdrückt ist. Hiermit zeichnen sich die PMT-stimulierten B Zellen durch eine erhöhte Plastizität und osteoklastisches Potential aus. Aufgrund dieser Beobachtungen kann spekuliert werden, dass PMT über die Modulation der B Zellentwicklung in die Immunantwort der Wirtszelle eingreift, um die Überlebenschancen des *Pasteurella multocida* Erregers zu steigern.

Ein essentieller Bestandteil der Verteidigung eines infizierten Wirtes ist die Entzündungsreaktion, welche höchst potent durch das inflammatorische Zytokin IL-1 β vermittelt wird. Die Studien dieser Arbeit zeigen, dass PMT neben B Zellen, RAW 264.7 Zellen (Maus

Makrophagen-Zelllinie) und Knochenmark-abgeleitete Makrophagen zu einer stark erhöhten Sezernierung von IL-1 β stimuliert. Hierbei präsentieren die Ergebnisse einen bisher unbeschriebenen Weg der Induktion und Aktivierung von IL-1 β in Makrophagen. PMT induziert die Transkription von *Pro-IL-1 β* über die Rho A/Rho-Kinase1 (ROCK)-vermittelte Aktivierung des Nukleären Faktors- κ B (NF- κ B) und vermittelt die Prozessierung des Vorläuferzytokins Inflammasom-unabhängig über die STAT-abhängige Protease Granzym A. Da die unkontrollierte Ausschüttung des pluripotenten Zytokins IL-1 β im Organismus schwerwiegende Folgen bis hin zur Tumorentwicklung haben kann, könnte die Entdeckung eines bakteriell-induzierten, Inflammasom-unabhängigen Aktivierungsweges von IL-1 β in Makrophagen von großer Bedeutung sein.

Zusammenfassend liefern die vorgestellten Modulationen von Signalkaskaden in Säugerzellen durch PMT neue Einblicke in die komplexe Beziehung zwischen bakteriellem Pathogen und dem höheren Organismus.