

INAUGURAL – DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht - Karls - Universität
Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Ernährungswissenschaftlerin Bianca Kloos

aus Kronstadt

Tag der mündlichen Prüfung:

Mechanismen der *Pasteurella multocida* Toxin vermittelten Modulation des Osteoimmunsystems

Gutachter

Prof. Dr. Alexander Dalpke
Prof. Dr. Ralf Bartenschlager

Benito, Niels und Hanna

Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei meiner Betreuerin Frau PD Dr. Katharina Hieke-Kubatzky für die Überlassung des interessanten Themas und die Möglichkeit, diese Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe anzufertigen, bedanken. Des Weiteren möchte ich mich für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung und die zahlreichen anregenden Diskussionen rund um das Thema bedanken. Frau PD Dr. Hieke-Kubatzky ermöglichte mir die Teilnahme an zahlreichen Methodenkursen und Konferenzen, sogar an einem so weit entfernten Ort wie der griechischen Insel Korfu. Ich konnte auf ihre kontinuierliche Unterstützung in jeder Phase der Doktorarbeit zählen und sie hat mich ermutigt, die Familienplanung und die Fertigstellung der Arbeit gemeinsam zu managen. Vielen Dank dafür!

Herrn Prof. Dr. Klaus Heeg danke ich für die Aufnahme in seine Abteilung, die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre und die zahlreichen Anregungen zum Thema. Bei Prof. Dr. Alexander Dalpke und Prof. Dr. Ralf Bartenschlager bedanke ich mich für die Bereitschaft, meine Arbeit zu begutachten, sowie für die Teilnahme an meinen Doktorarbeits-Komitees.

Ein ganz großer Dank gilt auch PD Dr. Konrad Bode und seiner Arbeitsgruppe für die Hilfe bei der DIGE-Analyse. Des Weiteren möchte ich mich auch bei Prof. Kathrin Thedieck für die wertvollen Ratschläge zum mTOR-Thema und die Bereitschaft, unsere Proteinspots massenspektrometrisch zu analysieren, bedanken. Den Studentinnen Sophie Schmidt, Sonja Lindner und Lisa Rausch danke ich für ihren Einsatz und ihr Interesse an meiner Arbeit. Der DFG gilt großer Dank für die Finanzierung des Schwerpunktprogramms SPP 1468 „Immunobone“ und der Aufnahme und Verlängerung unseres Projektes. Den anderen Mitgliedern des Schwerpunktprogramms möchte ich für hilfreiche Kooperationen, die vielen schönen Treffen und die wissenschaftlichen Ideen zum Projekt danken. Ein herzliches Dankeschön geht an das gesamte Laborteam der Arbeitsgruppe dafür, dass ich jeden Tag eine freundliche Arbeitsatmosphäre verspürte, viel gelacht habe und von jedem Einzelnen viel lernen konnte! Daniela Metzdorf kann ich gar nicht genug für die vielen aufbauenden Worte, aber auch für die schöne Zeit, die wir trotz nicht ausbleibender wissenschaftlicher Rückschläge miteinander hatten, danken. Dagmar Hildebrand danke ich für die gute Vorarbeit, auf die das Projekt aufbaute und die Diskussionen rund um das *Pasteurella multocida* Toxin. Gabriele Sonnenmoser sei für all ihr technisches Wissen und ihre ausgezeichnete Beschaffungslogistik im Labor herzlichst gedankt!

Den vielen netten Kollegen am Institut, die mich auf der langen Wegstrecke der Doktorarbeit täglich begleitet haben, möchte ich auch ein großes Dankeschön aussprechen. In meiner Zeit am Institut gab es viele Gelegenheiten zum gemeinsamen Kuchen essen und daher hatte man viel Zeit für lange Diskussionsrunden in der Küche des Instituts. Das war eine schöne Zeit!

Dr. Sebastian Hagn danke ich für das gründliche Korrekturlesen.

Meinen Eltern danke ich für die vielen Stunden, in denen ich in Ruhe diese Arbeit verfassen konnte, da sie sich rührend in der Zeit um mein Baby gekümmert haben. Ohne euch wäre das Fertigstellen der Arbeit nicht möglich gewesen.

Meinem Freund Benito danke ich für IT-Support, seine Geduld und seine Liebe.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Osteoimmunologie	3
2.2	Pasteurella multocida	5
2.3	Pasteurella multocida Toxin	5
2.3.1	Aufbau von PMT	6
2.3.2	Intrazellulärer Wirkmechanismus von PMT	8
2.3.3	Der mTOR-Signalweg und PMT	12
2.3.4	PMT und das Skelettsystem	15
2.4	Osteoklastogenese	17
2.4.1	Vorläufer der Osteoklastendifferenzierung	17
2.4.2	Signaltransduktionsachsen der Osteoklastendifferenzierung	20
2.5	Hämatopoese und zelluläre Plastizität	22
2.6	Zielsetzung	25
3	Material und Methoden	26
3.1	Material	26
3.1.1	Geräte	26
3.1.2	Verbrauchsmaterial	27
3.1.3	Chemikalien	29
3.1.4	Puffer und Lösungen	30
3.1.4.1	Kommerzielle Puffer, Lösungen und Reagenzien	30
3.1.4.2	Hergestellte Puffer und Lösungen	31
3.1.5	Kommerzielle Kits	36
3.1.6	Antikörper	37
3.1.6.1	Western Blot Antikörper	37
3.1.6.2	AutoMACS Antikörper	38
3.1.6.3	Immunfluoreszenz Antikörper	39
3.1.6.4	Durchflußzytometrie Antikörper	39
3.1.7	Stimuli	39
3.1.8	Inhibitoren	40
3.1.9	Primer für die <i>real-time</i> PCR	40
3.1.10	Software	41

3.2	Methoden	42
3.2.1	Zellkultur	42
3.2.1.1	Zelllinien	42
3.2.1.1.1	L929 Zellen	42
3.2.1.1.2	RAW 264.7 Zellen	43
3.2.1.1.3	U266 und KMS12.BM Zellen	43
3.2.1.2	Murine Primärzellen	43
3.2.1.2.1	Isolierung von Knochenmarkszellen	43
3.2.1.2.2	Differenzierung von Makrophagen (BMM Φ)	44
3.2.1.2.3	Differenzierung von Osteoklasten	44
3.2.1.2.4	Differenzierung von dendritischen Zellen	44
3.2.1.2.5	Isolierung von CD45R-positiven B-Zellen	44
3.2.2	Proteinbiochemische Methoden	45
3.2.2.1	Immunoblots	45
3.2.2.1.1	Anfertigung von Totallysaten	45
3.2.2.1.2	Anfertigung von subzellulären Extrakten (Nukleus und Zytoplasma)	45
3.2.2.1.3	Proteinbestimmung (BCA Assay)	46
3.2.2.1.4	SDS PAGE	46
3.2.2.1.5	Semi-Dry Western Blot	46
3.2.2.1.6	Wet Western Blot	47
3.2.2.1.7	Immunpräzipitation	47
3.2.2.1.8	ELISA	47
3.2.2.1.9	Durchflußzytometrie	48
3.2.2.1.10	Makrophagen Phagozytose Test	48
3.2.2.2	Konfokale Mikroskopie	49
3.2.2.2.1	Analyse der Differenzierung von Osteoklasten und deren Quantifizierung	49
3.2.2.2.2	Immunfluoreszenzfärbungen	50
3.2.2.2.3	TRAP-Färbung	50
3.2.2.2.4	Kathepsin K Aktivitäts-Test	51
3.2.2.2.5	Zellulärer Viabilitätstest	51
3.2.2.2.6	Zellulärer Apoptosetest	51
3.2.2.3	Proteomik	52
3.2.2.3.1	Bestimmung des Sekretoms	52
3.2.2.3.2	Bestimmung des Proteoms mit der DIGE Technik	52
3.2.3	Molekularbiologische Methoden	53
3.2.3.1	mRNA Expressionsanalysen	53
3.2.3.1.1	RNA Isolation	53
3.2.3.1.2	cDNA Synthese aus mRNAs	53
3.2.3.1.3	quantitative Real-time-PCR zur mRNA Expressionsanalyse	54

3.2.3.2	miRNA Expressionsanalysen	54
3.2.3.2.1	Isolierung von miRNA	54
3.2.3.2.2	cDNA Synthese aus miRNA	55
3.2.3.2.3	quantitative Real-time-PCR zur miRNA Expressionsana- lyse	55
3.2.4	Statistik	56
4	Ergebnisse	57
4.1	Einfluss von B-Zellen auf die PMT-induzierte Osteoklastendifferenzierung	57
4.1.1	Visualisierung PMT-induzierter Osteoklasten	57
4.1.2	Identifikation des B-Zell Sekretoms	60
4.1.3	PMT stimulierte B-Zellen (CD45R ⁺) differenzieren zu Osteoklasten	62
4.1.4	PMT generiert eine bipotente B-Zell-Population, die B-Zell- und Osteoklasten- Marker zugleich exprimiert	64
4.2	Signalwege und Differenzierungsmechanismen, die von B-Zellen und Osteoklasten geteilt werden	68
4.2.1	PMT aktiviert die Blimp-1-Bcl-6 Achse	69
4.2.2	PMT-induzierte Aktivierung der miRNA21 als potenzieller molekularer Schal- ter	74
4.3	Aktivierung von klassischen Osteoklastogenese-bezogenen Signalwegen mit PMT	76
4.4	Analyse des Proteoms von Osteoklasten-Vorläufern und Osteoklasten	79
4.5	PMT induzierte Osteoklastogenese ist mTOR abhängig	83
4.5.1	Der mTOR-Signalweg wird in Makrophagen mit PMT aktiviert	83
4.5.2	mTOR spielt keine Rolle für die Zytokinproduktion mit PMT in RAW264.7 Makrophagen	86
4.5.3	Untersuchung der zellulären Effekte der mTOR-Aktivierung mit PMT	88
4.5.4	PMT stimuliert die Differenzierung von RAW264.7 Zellen zu Osteoklasten und die mTOR Kinase ist daran beteiligt	90
4.5.5	PMT aktiviert viele Signalwege, die als mTORc1-Aktivatoren bekannt sind	92
4.5.6	PMT-induzierte Signalwege aktivieren mTORc1 in synergistischer Weise	95
4.5.7	PMT aktiviert mTOR-abhängig die Transkription von Osteoklasten-spezifischen Genen durch den Transkriptionsfaktor AP-1	96
5	Diskussion	101
5.1	Interaktionen des B-Zell- und des Skelettsystems nach PMT Stimulation	101
5.2	PMT und die klassische Osteoklastendifferenzierung von Monozyten/Makrophagen- vorläufern	110
5.3	Ausblick	120

6	Literatur	122
7	Abkürzungsverzeichnis	141
8	Abbildungsverzeichnis	145
9	Tabellenverzeichnis	146
10	Anhang	147
10.1	Identifizierte Proteine der DIGE-Analyse	147
10.2	Vergrößerte Darstellung der Abbildung 4.5	149
10.3	Veröffentlichungen	151
10.4	Präsentationen	151
10.4.1	Vorträge	151
10.4.2	Posterpräsentationen	151
10.5	Preise	151
10.6	Stipendien	152

1 Kapitel 1

Zusammenfassung

Das *Pasteurella multocida* Toxin (PMT) ist ein Virulenzfaktor, der von *Pasteurella multocida* Bakterien sezerniert wird um Zielzellen intrazellulär modifizieren zu können. PMT wirkt auf das Skelettsystem infizierter Tiere ein und ist besonders in der Schweinezucht als Auslöser der atrophischen Rhinitis gefürchtet. PMT verschiebt das Gleichgewicht des physiologischen Knochenumbaus auf die Seite einer Netto-Negativbilanz, indem es sowohl die Funktion von Osteoblasten hemmen, als auch die Funktion von Osteoklasten fördern kann. Über die detaillierten Mechanismen, wie genau PMT die Differenzierung von Osteoklasten stimuliert, ist noch nicht so viel bekannt. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass klassische Vorläufer wie Makrophagen unter PMT Stimulation zu Osteoklasten differenzieren können. Es zeigte sich, dass PMT die sechs bislang bekannten Haupt-Schlüsselsignalwege der Osteoklastogenese NFATc1, NF- κ B, Akt, JNK, ERK und p38 aktivieren kann. Auf der Suche nach Gemeinsamkeiten und Unterschieden zwischen der klassischen M-CSF/RANKL- und der Toxin-stimulierten Osteoklastendifferenzierung, wurde das Proteom von Zellen, die auf den Toxin-vermittelten Differenzierungsweg festgelegt worden waren, mit dem von Zellen verglichen, die alternativ das klassische Osteoklasten-Differenzierungsprogramm mit M-CSF/RANKL eingeleitet hatten. Dabei konnten viele differentiell regulierte Proteine mit Bezug zum Prozess der Osteoklastendifferenzierung gefunden werden, die durch zukünftige Analysen weitere wertvolle Erkenntnisse zum Vorgang der PMT-stimulierten Osteoklastogenese liefern könnten. Die Proteom-Daten führten auch zu der Erkenntnis, dass die PMT-stimulierte Osteoklastendifferenzierung von der Aktivierung des mTOR-Signalweges abhängig ist. Als zugrundeliegender Mechanismus konnte eine mTOR-stimulierte Aktivierung der P70s6K1 gezeigt werden, die über die Inhibition eines Repressors der Osteoklastogenese, dem PDCD4, für die PMT-stimulierten Effekte verantwortlich sein könnte. Als Folge führt dies zu der mTOR-abhängigen Aktivierung von c-jun und somit zu einer AP-1 induzierten initialen Induktion von Osteoklasten-spezifischen Genen nach PMT-Stimulation. Der zweite Teil der Arbeit bezieht sich auf eine Publikation, in der zuvor gezeigt werden konnte, dass die PMT-stimulierte Osteoklastendifferenzierung B-Zell-abhängig ist. Es sollte untersucht werden, welche Rolle dabei den B-Zellen in der PMT-induzierten Osteoklastogenese zukommt. Dabei zeigte sich, dass mit dem Pan-B-Zellmarker CD45R aufgereinigte Zellen *in vitro* als direkte Vorläufer für eine PMT-stimulierte Differenzierung von Osteoklasten eingesetzt werden können. Darüber hinaus wiesen diese mit PMT terminal differenzierten Osteoklasten sowohl Merkmale von Plasmazellen, wie die Expression des Markers Syndecan-1 und die Sekretion von löslichem IgM, als auch spezifische Marker für Osteoklasten, wie die Expression des Enzymes TRAP und Multinuklearität auf. Letztlich konnte allerdings durch die Daten der vorliegenden Arbeit nicht zweifelsfrei final bewiesen werden, ob B-Zellen tatsächlich Vorläuferzellen für die PMT-stimulierte Differenzierung sind, da eine geringe Menge an kontaminierenden Zellen nicht komplett eliminiert werden konnte.

Summary

Pasteurella multocida Toxin (PMT) is a virulence factor that is secreted by *Pasteurella multocida* bacteria to modify signalling pathways of target cells intracellularly. It is known that PMT affects the skeletal system of infected animals and is particularly feared as a trigger for atrophic rhinitis in pig breeding. PMT can disrupt the physiological bone remodelling balance tipping it towards enhanced bone destruction, by simultaneously inhibiting the function of osteoblasts and stimulating the function of osteoclasts. The detailed mechanisms how PMT fosters the differentiation of osteoclasts are not completely known at this time. In this doctoral research study it could be shown, that classical progenitors like macrophages can differentiate to osteoclasts under PMT stimulation. It became apparent that PMT can activate the six currently known main key signalling pathways of osteoclastogenesis, namely NFATc1, NF- κ B, Akt, JNK, ERK and p38. To determine commonalities and differences between the classical M-CSF/RANKL- and the toxin-mediated osteoclast differentiation, the proteome of cells that were committed to the toxin-mediated differentiation path before was compared to the proteome of cells that were alternatively differentiated with the classical stimuli M-CSF/RANKL. As a result, many differentially regulated proteins were verified with respect to the process of osteoclastogenesis. Future analysis of these proteins could provide valuable insights into the process of PMT-induced osteoclast differentiation. The proteome data also initiated the idea, that the mTOR pathway might play a role in PMT-stimulated macrophages. Investigation found that the PMT-stimulated osteoclast differentiation is mTOR-dependent. The underlying mechanism was shown to be mTOR stimulated activation of P70s6K1 that can inhibit a well-known repressor of osteoclastogenesis, PDCD4, and thereby can be responsible for the PMT-stimulated effects. As a result, this leads to an mTOR-dependent activation of c-jun and thereby to an AP-1-induced initial induction of osteoclast-specific genes after PMT stimulation. The second part of the thesis refers to a previous publication, which showed that the PMT-stimulated osteoclast differentiation is B cell dependent. It was a task to unravel the role of B cells in PMT-induced osteoclastogenesis. It could be shown in the present study, that B cells that were sorted with the Pan B cell marker CD45R, can serve as direct progenitors for osteoclast differentiation with PMT, and that the differentiated osteoclasts can simultaneously show markers of plasma cells like the expression of Syndecan-1 and the secretion of soluble IgM, as well as specific markers for osteoclasts like the expression of the enzyme TRAP and multinuclearity. However, the data of this study were not able to finally prove beyond doubt that B cells indeed can be progenitors for osteoclast differentiation with PMT, because small amounts of contaminating cells could not be completely eliminated.

2 Kapitel 2

Einleitung

Auf der Erde existieren unzählbar viele unterschiedliche Lebensformen parallel. Diese können voneinander profitieren, bedrohen sich aber meistens gegenseitig in ihrem ständigen Kampf um das eigene Überleben. Höhere Organismen werden von Geburt an mit Gefahren aus ihrer belebten Umwelt konfrontiert, wobei vor allem auch kleine Lebensformen wie z.B. Bakterien und Pilze bzw. infektiöse Partikel (Viren) bedrohlich sein können. Die Evolution stattete die höheren Organismen daher mit einer sehr kompetenten Abwehrmaschinerie aus, dem Immunsystem. Die Hauptaufgabe des Immunsystems ist das Erkennen und Eliminieren von pathogenen Mikroorganismen, aber auch die Beseitigung von körpereigenen entarteten Zellen. Das Immunsystem gliedert sich in das angeborene und das adaptive Immunsystem, die im Kampf gegen Pathogene eng miteinander kooperieren. Das angeborene Immunsystem ist das ältere von beiden und gewährleistet die erste, schnelle Eindämmung der Pathogene durch mechanische Barrieren, biochemische Substanzen und spezialisierte Zellen, wie zum Beispiel die Phagozyten (Makrophagen, Neutrophile). Das erworbene Immunsystem zeichnet sich hingegen durch seine große Spezifität aus. Zentrales Element hierbei sind die Lymphozyten, also die B- und T-Zellen. Diese Zellen sind spezialisiert auf die Erkennung eines bestimmten Pathogenepitops (Antigen), da jede Zelle mit einem strukturell einzigartigen Rezeptor ausgestattet ist. Die Lymphozyten passen sich kontinuierlich den neuen Pathogen-Bedingungen an, da ihnen ein immunologisches Gedächtnis zu eigen ist, so dass mit jedem weiteren Antigenkontakt die Abwehr noch spezialisierter und ausgereifter wird. Nach Erkennung ihres Antigens erfolgt eine klonale Expansion der Lymphozyten, die ein weiteres wichtiges Merkmal der adaptiven Immunität ist. Das angeborene Immunsystem hilft dem adaptiven Immunsystem durch die Fähigkeit Antigene zu präsentieren, was bedeutend für die Aktivierung von T-Zellen ist. Darüber hinaus sekretiert das angeborene Immunsystem Zytokine und Chemokine, die für die Rekrutierung und Aktivierung anderer Immunzellen wichtig sind. B-Zellen sind für die Sekretion von Millionen von verschiedenen Antikörpern verantwortlich, die durch Aktivierung des Komplementsystemes und Markierung zur Phagozytose (Opsonisierung) bedeutend für die Eliminierung von Pathogenen sind.

2.1 Osteoimmunologie

Das Fachgebiet der Osteologie beschäftigt sich mit dem Skelettsystem, einem wichtigen Stützorgan, das aus zwei Gewebetypen besteht, dem Knorpel und dem Knochen. Das zunehmende Wissen um die Existenz einer bedeutsamen Interaktion zwischen dem Immunsystem und dem Skelettsystem bahnte den Weg für die Entstehung eines neuen, interdisziplinären Forschungsfeldes, der sogenannten

„Osteoimmunologie“. Der Begriff der Osteoimmunologie tauchte zum ersten Mal in einer Publikation von Arron und Choi im Jahr 2000 auf und beschreibt somit ein noch sehr junges Forschungsgebiet [1]. Es ist von großer Wichtigkeit, die komplexen Mechanismen aufzudecken, durch die beide Systeme miteinander verstrickt sind, da viele menschliche Krankheiten in das Fachgebiet der Osteoimmunologie fallen, wie zum Beispiel die Rheumatoide Arthritis, chronisch entzündliche Darmerkrankungen, Autoimmunerkrankungen wie Diabetes mellitus und Lupus erythematodes, chronisch virale Infektionen (HIV) und Krebserkrankungen wie zum Beispiel das Multiple Myelom [2-8]. Diesen Krankheiten ist gemein, dass sie sowohl Auswirkungen auf das Immunsystem, als auch auf das Skelettsystem haben und somit deren Interaktion auch für viele Komplikationen verantwortlich ist [9]. Auch für die Suche nach neuen Strategien für Therapieansätze ist die Erweiterung des Wissens in diesem Bereich von großer Wichtigkeit, da man kaum in ein System eingreifen kann ohne auch das andere System zu beeinflussen [9]. Das Skelettsystem und das Immunsystem teilen sich Vorläuferzellen. Es ist bekannt, dass die gleiche myeloide Vorläuferzelle sowohl zu Makrophagen und myeloiden dendritischen Zellen differenzieren kann wie auch zu Osteoklasten. Auch reife dendritische Zellen wurden als Vorläufer für Osteoklasten beschrieben [10]. Des Weiteren weiß man, dass sich das Immunsystem und das Skelettsystem viele lösliche Mediatoren teilen. Die pro-inflammatorischen Zytokine IL-6, TNF- α , IL-1, IL-11, IL-8 und IL-17 sind bekannt als Osteoklastogenese-fördernde Zytokine, während IFN- γ , IFN- β , IL-13, IL-10, IL-4 und IL-18 den gleichen Prozess hemmen [11]. Eine Fehlregulation in diesem Repertoire an Zytokinen wurde daher auch als Ursache für viele pathologische Knochenerkrankungen erkannt, wobei die Rheumatoide Arthritis am besten untersucht wurde [12]. Ebenso nimmt aber auch das wohl bekannteste Osteoklasten-Zytokin, der sRANKL (*soluble Receptor Activator of NF- κ B Ligand*) eine sehr wichtige Stellung im Immunsystem ein. RANK(L)-defiziente Mäuse zeigen neben das Skelettsystem betreffenden Symptomen wie der Osteopetrose auch Defekte im Immunsystem. Die Mäuse haben keine peripheren Lymphknoten und weniger Peyersche Plaques. Des Weiteren besitzt die Milz weniger B-Zellen [13, 14]. Spezifisch für den RANKL *Knockout* sind auch Defekte in der T-Zell-Aktivierung und eine reduzierte Größe des Thymus [14]. Dies deutet auf eine wichtige Beteiligung des RANKL/RANK-Systems in den frühen Phasen der Entwicklung von Lymphgewebe hin. Der RANKL-Signalweg spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulierung von Selbst-Toleranz und bei der Eliminierung von selbst-reaktiven T-Zellen im Thymus [9, 15].

Dem Knochen kommt eine entscheidende Rolle als Helfer des Immunsystems zu, indem er eine geschützte Nische für die Lagerung von Hämatopoetischen Stammzellen (HSC) und langlebigen Plasmazellen darstellt und der Ort der Hämatopoese ist (siehe Kapitel 2.5) [16, 17]. Die Nische liefert Faktoren, die die Zellen im Ruhezustand (Phase G₀ des Zellzyklus) halten [16]. Osteoblasten beispielsweise besitzen den Membran-gebundenen Stammzellfaktor (SCF), ein bedeutendes Zytokin für HSCs [16, 18]. Des Weiteren ist der Knochen eine wichtige Nische für die Reifung von frühen B-Zellen bis zum Stadium der Pre-Pro-B-Zelle hin, unter anderem weil Osteoblasten ein gutes Reservoir an Interleukin-7 (IL-7), einem wichtigen B-Zell-Zytokin, bereitstellen [17, 19]. Langlebige Plasmazellen kehren aus der Körperperipherie auch wieder ins Knochenmark zurück und besitzen hier ihre spezielle Überlebensnische, in der sie von residierenden Zellen Überlebenssignale erhalten [20]. Die Rolle von B-Zellen für den Knochen wiederum ist Gegenstand aktueller Forschung. Es ist bekannt,

dass in pathologischen Zuständen B-Zellen Lieferanten von sRANKL sein können [21, 22] und es wird die Möglichkeit diskutiert, dass sie als direkte Vorläufer für die Osteoklastendifferenzierung dienen könnten (siehe Kapitel 2.5). Ein bakterielles Toxin, das *Pasteurella multocida* Toxin (PMT), ist ein bekannter Aktivator der Osteoklastendifferenzierung [23]. Hildebrand *et al.* konnten zeigen, dass die PMT-induzierte Osteoklastendifferenzierung B-Zell abhängig ist [24]. PMT eignet sich daher als hervorragendes Modellsystem, mehr über die Interaktion von B-Zellen und Osteoklasten zu studieren.

2.2 *Pasteurella multocida*

Das Bakterium *Pasteurella multocida* ist ein gramnegatives, fakultativ anaerobes Stäbchenbakterium. Es ist ein unbewegliches Bakterium, das sich oft im Nasopharynx von Tieren ansiedelt. Die Isolation des Bakteriums als pathogener Auslöser von Cholera bei Geflügel gelang dem berühmten Mikrobiologen Louis Pasteur zum ersten Mal im Jahre 1880 [25]. Infektionen mit *Pasteurella multocida* (Pasteurellosen) können sowohl einen akuten (Septikämie) als auch einen chronischen Krankheitsverlauf aufweisen. Symptome einer solchen Infektion können Lungenentzündungen, dermale Nekrosen, Abszesse, Meningitiden und die atrophische Rhinitis sein und richten großen wirtschaftlichen Schaden weltweit an [26]. Durch Kontakt zu Haustieren, meist zu Hunden und Katzen, seltener wilden Tieren, kann eine Übertragung der Infektion durch Bisse oder Kratzer auf den Menschen stattfinden [27-29]. Die meisten menschlichen Infektionen verlaufen harmlos. Ernsthaftige Komplikationen wie Meningitiden, Empyeme, Pneumonien, Peritonitiden, Endokarditiden oder Septikämien haben eine geringe Inzidenz [30]. Sterbefälle durch *Pasteurella multocida* Infektionen sind bislang ein sehr seltenes Ereignis [26]. *Pasteurella multocida* Bakterien werden in fünf Serotypen (A, B, D, E und F) eingeteilt [31, 32]. Als Unterscheidungsmerkmal dient hierbei der bakterielle Kapseltyp. Es ist bekannt, dass bestimmte Tierspezies anfälliger für Infektionen mit bestimmten Serotypen sind und dabei auch Tierspezies-charakteristische Krankheitssymptome entwickeln [33]. *Pasteurella multocida* Bakterien besitzen mehrere Virulenzfaktoren, die ihnen die erfolgreiche Kolonisierung und Replikation im Wirtsorganismus erleichtern und Strategien liefern, das Immunsystem zu manipulieren. Die bekanntesten Virulenzfaktoren von *Pasteurella multocida* sind die Polysaccharidkapsel, Fimbrien, Lipopolysaccharide und die äußeren Membranproteine, wie zum Beispiel OmpH und das *Pasteurella multocida* Toxin (PMT) [27, 34-37].

2.3 *Pasteurella multocida* Toxin

PMT wird von einigen Bakterienstämmen der Serotypen A und D produziert [38]. Das Toxin wurde als verantwortlicher Virulenzfaktor für die atrophische Rhinitis (2.3.4) identifiziert [37, 39]. Eine Verabreichung von isoliertem PMT in die Bauchhöhle von Schweinen verursachte schon alleine die pathologischen, charakteristischen Veränderungen der atrophischen Rhinitis [40].

2.3.1 Aufbau von PMT

PMT ist ein im *toxA*-Gen kodiertes Proteintoxin, das 146 kDa groß ist und aus 1286 Aminosäuren besteht [41]. Strukturell gesehen gliedert sich das Toxin in zwei Domänen, die für unterschiedliche Aktivitäten verantwortlich sind: Eine Domäne, die für die Bindung an den Rezeptor und die zelluläre Translokation des Toxins verantwortlich ist (N-Terminus) und eine, die für die Manipulation der Zielzellen verantwortlich ist (C-Terminus) (siehe Abbildung 2.1 A). Aufgrund dieser Strukturmerkmale gehört das Toxin in die Gruppe der klassischen AB-Toxine. Die Kristallstruktur des C-terminalen Endes von PMT wurde von Kitadokoro *et al.* aufgeklärt und ist in Abbildung 2.1 B gezeigt [42]. Die Struktur wurde mit der eines Trojanischen Pferdes verglichen, da sie aus drei Domänen (C1, C2, C3) besteht, die wie „Beine“, „Körper“ und „Kopf“ zueinander angeordnet sind [42]. Während die C1 Domäne bedeutend für die Zielführung des Toxins zur Plasmamembran, seinem Wirkort, ist [43], wurde die Funktion der C2 Domäne noch nicht eindeutig geklärt. Die C3 Domäne ist die katalytisch aktive Domäne [44]. Durch Mutationsanalysen konnte gezeigt werden, dass die katalytische Funktion von den drei Aminosäuren, Cys¹¹⁶⁵, His¹²⁰⁵ und His¹²²³ abhängig ist, die eine sogenannte katalytische Triade darstellen, die nur gebildet werden kann, wenn das Cystein von einer Disulfidbrücke losgelöst ist (Redoxstatus-abhängig) [42, 45, 46]. Die katalytische Triade weist eine mit Transglutaminasen vergleichbare Struktur auf [47]. PMT wirkt intrazellulär auch auf ähnliche Weise wie die Transglutaminasen: Es deamidiert G α -Untereinheiten (UEs) von G-Proteinen. Dies ist in Abschnitt 2.3.2 näher erläutert [47].

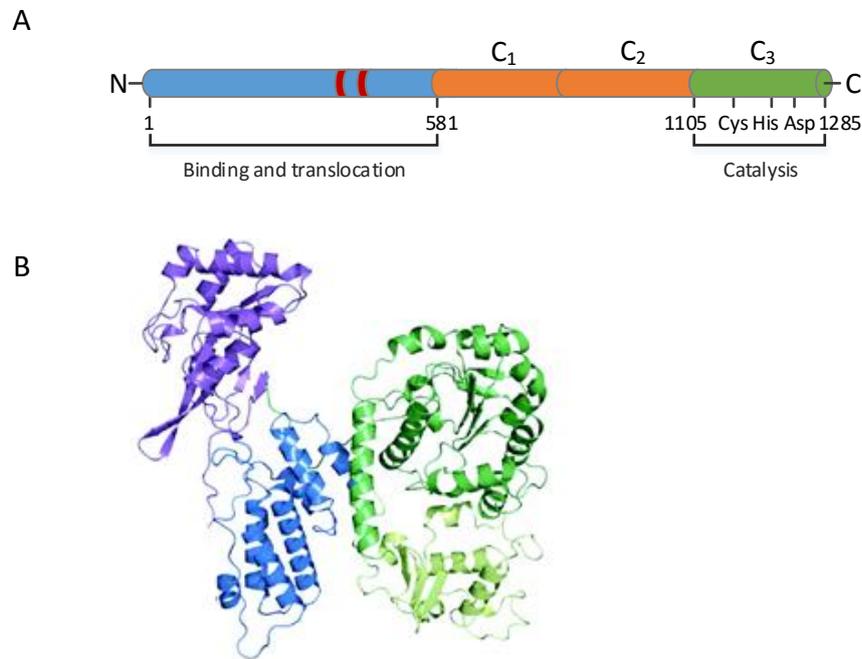


Abbildung 2.1: (A) zeigt schematisch den Aufbau von PMT. PMT ist ein klassisches AB-Toxin, mit einer B Domäne, die für die Bindung an den Rezeptor und die Translokation verantwortlich ist und einer A Domäne, die in die Signalmechanismen der eukaryotischen Wirtszellen eingreift. Die N-terminale B Domäne befindet sich zwischen den Aminosäuren an Position 1 und 581. Die rote Markierung deutet auf das Vorhandensein von zwei hydrophoben Helices, die funktionell für die Einlagerung des Toxins in die Membran und die zelluläre Translokation verantwortlich sind, hin. Die C-terminale A Domäne befindet sich zwischen den Aminosäuren 581 und 1285 und ist in drei Abschnitte C1-C3 gegliedert. C1 ist bedeutend für die intrazelluläre Lokalisierung von PMT an die Membran. Die Funktion von C2 ist noch Gegenstand derzeitiger Forschung und C3 beinhaltet die katalytische Spalte. Für die Aktivität des Toxins als Deamidase sind die drei Aminosäuren Cys¹¹⁶⁵, His¹²⁰⁵ und His¹²²³ entscheidend. (B) zeigt die Kristallstruktur des A-Teiles von PMT. Abbildung 2.1 A wurde modifiziert nach Aktories *et al.*, Nature Reviews, 2011 [48]. Abbildung 2.1 B wurde aus Kitadokoro *et al.*, PNAS, 2007 [42] übernommen.

2.3.2 Intrazellulärer Wirkmechanismus von PMT

Die Suche nach dem Rezeptor für PMT war bislang noch nicht abschließend erfolgreich. Es gab allerdings Vorschläge, in welche Kategorie der Rezeptor fallen könnte. Pettit *et al.* führten kompetitive Bindungsstudien durch und schlugen einen Gangliosidrezeptor vor [49]. Brothers *et al.* veröffentlichten Daten, die auf die Bindung von PMT an Membranphospholipide wie Sphingomyelin und Phosphatidylcholin hindeuten und die Beteiligung eines Ko-Rezeptors als wahrscheinlich erscheinen lassen [50]. Nach Bindung an seinen Rezeptor wird PMT durch Rezeptor-vermittelte Endozytose aufgenommen [51]. Die Translokation von PMT erfolgt in den späten Endosomen und ist von einer Senkung des pH-Wertes des Kompartimentes und der kleinen GTPase Arf6 (ADP-ribosylation factor 6) abhängig [52, 53]. Die Bedeutung der Azidifizierung indiziert, dass durch eine strukturelle Umlagerung des Toxins die Exposition einer Translokationsdomäne erfolgt, die die Integration von PMT in die Membran der Endosomen ermöglicht [53]. Inwiefern sich das Toxin im Zytosol der Zielzelle nach Normalisierung des pH-Wertes dann wieder automatisch zusammenfaltet oder ob die Hilfe von zellulären Chaperonen dafür nötig ist, ist derzeit noch nicht geklärt [54]. Über den intrazellulären Wirkmechanismus von PMT ist hingegen sehr viel bekannt. Eine häufig genutzte Strategie bakterieller Toxine ist die Modulation zellulärer G-Proteine, da diese eine zentrale Stellung bei der Aktivierung sehr vieler Signalwege einnehmen [55]. In diese Reihe fügt sich auch das PMT ein, da es $G\alpha$ -UEs heterotrimerer G-Proteine deamidiert [47]. In Abbildung 2.2 ist das Aktivierungsprinzip von heterotrimeren G-Proteinen schematisch dargestellt. Heterotrimere G-Proteine sind aus drei UEs aufgebaut, den α -, β - und γ -UEs ($G\alpha\beta\gamma$), wobei die β - und γ -UEs nicht voneinander dissoziieren können [56-58]. Die G-Proteine alternieren zwischen zwei Zuständen, einem GTP (Guanosintriphosphat)-gebundenen, aktivem Zustand und einem GDP (Guanosindiphosphat)-gebundenen, inaktivem Zustand [57, 59]. Nach Ligandenbindung an einen G-Protein-gekoppelten 7-Transmembran-Rezeptor fungiert dieser als GEF (*guanine nucleotide exchange factor*) und stimuliert den Austausch von GDP durch GTP und ermöglicht damit den Start in einen neuen Aktivitätszyklus [60, 61]. Die Bindung von GTP leitet die Dissoziation der UE $G\alpha$ von $G\beta\gamma$ ein und ermöglicht die Aktivierung von spezifischen Effektoren durch $G\alpha$ oder $G\beta\gamma$. Die Beendigung des Zyklus und Deaktivierung wird durch die intrinsische GTPase Aktivität der $G\alpha$ -UE erzielt [56, 57, 62]. Die GDP-gebundene $G\alpha$ -UE lagert sich erneut zu einem Komplex mit $G\beta\gamma$ zusammen und schaltet somit die Signalweiterleitung zu den Effektoren wieder aus [56, 57]. G-Proteine dienen somit als molekulare Schalter und das PMT greift in diesen Zyklus ein, indem es die intrinsische GTPase-Funktion der $G\alpha$ -UE durch die Deamidierung eines Glutaminrestes zu einer Glutaminsäure inhibiert und so die G-Proteine in einem konstitutiv aktiven Zustand arretiert [47].

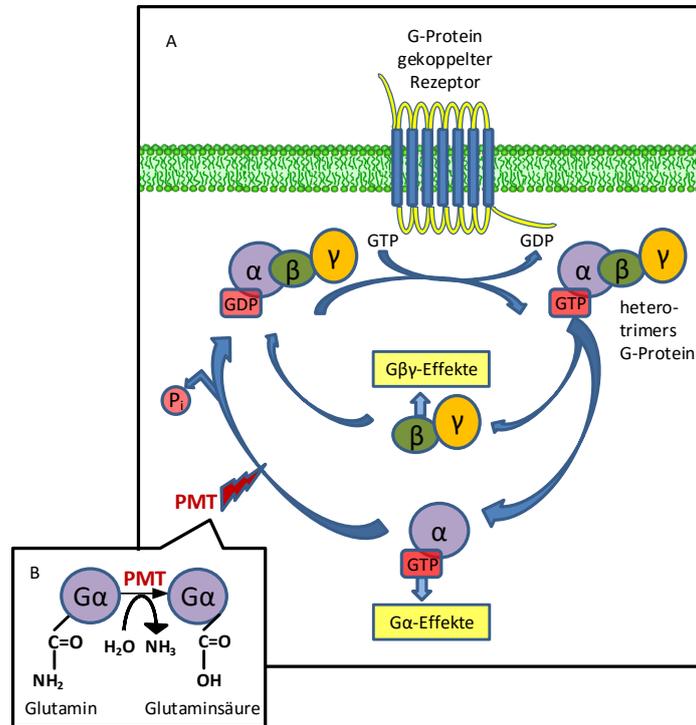


Abbildung 2.2: (A) Der GTPase-Zyklus. (B) Mechanismus, wie PMT mit dem GTPase-Zyklus interveniert: PMT deamidiert einen Glutamin-Rest in der G α -UE von heterotrimeren G-Proteinen zur Glutaminsäure und verhindert so das Abschalten des GTPase Zyklus. Die Abbildungen 2.2 A und 2.2 B wurden modifiziert nach Orth *et al.*, Current Topics in Microbiology and Immunology, 2012 [54].

PMT katalysiert die Deamidierung unterschiedlicher G-Proteine und aktiviert so in Folge mannigfaltige Signalwege intrazellulär (Abbildung 2.3). Die $G\alpha$ -UEs $G\alpha_{13}$, $G\alpha_q$ und $G\alpha_i$ wurden als Substrate von PMT beschrieben [63]. Auch wenn PMT für den befallenen Organismus schädlich ist, wirkt es auf viele Zellen anti-apoptotisch und besitzt sogar eine mitogene Wirkung [71, 68, 72, 73]. Die Aktivierung des JAK-STAT Signalweges ist einer der Mechanismen, wie PMT proliferative Prozesse auslösen kann. Über die Aktivierung von $G\alpha_q$ wird JAK (Janus Kinase) direkt aktiviert und autophosphoryliert. STAT (*Signal Transducers and Activators of Transcription*)-Faktoren binden an diese phosphorylierten Tyrosine und können so von den JAKs phosphoryliert werden. In phosphoryliertem Zustand können sich die STAT-Faktoren zu Dimeren zusammenlagern, translozieren in den Nukleus und stimulieren die Transkription von STAT-abhängigen Zielgenen, die eine Bedeutung für Proliferation, Überleben, Immunevasion und Differenzierung haben (siehe Abbildung 2.3) [74]. Ein Zielgen der STAT-abhängigen Transkription nach PMT-Stimulation ist die *Pim-1* (*provirus integration site for Moloney murine leukaemia virus 1*) Kinase [71]. Ein bedeutendes Charakteristikum der PMT-stimulierten Aktivierung des JAK-STAT Signalweges ist, dass sie sehr lange anhält [74]. Dieser lang anhaltenden STAT Aktivierung liegt ein Mechanismus zugrunde, der von Hildebrand *et al.* aufgedeckt wurde: Der JAK-STAT Signalweg besitzt normalerweise einen negativen Feedback-Mechanismus, der durch das SOCS-1 (*suppressor of cytokine signalling-1*) Protein eingeleitet wird. SOCS-1 fungiert als E3 Ubiquitin Ligase für JAK-2 und sorgt so für dessen proteasomalen Abbau und ein Abdämpfen des Signalweges [75]. Die PMT-stimulierte *Pim-1* Expression ist für eine gesteigerte Threonin-Phosphorylierung von SOCS-1 verantwortlich, das somit in seiner Funktion als E3 Ubiquitin Ligase für JAK-2 beeinträchtigt ist, was zu einer Hyperaktivierung von JAK-2 und STAT-3 führt [76]. Die Aktivierung der heterotrimeren G-Proteine resultiert auch jedes Mal in der Freisetzung von $G\beta\gamma$ -UEs, die für die Stimulation der Phosphoinositid-3-Kinase γ (PI3K γ) mit PMT verantwortlich sind [70]. Die Aktivierung dieses Signalweges vermittelt anti-apoptotische Effekte durch die Aktivierung der Akt Kinase, einer sogenannten Überlebenskinase [71]. Durch die Aktivierung von $G\alpha_i$ inhibiert PMT die Adenylylcyclasen (AC) und die Generierung des sekundären Botenstoffes cAMP (*cyclic adenosine monophosphate*) [64]. Auf das Zytoskelett wirkt PMT durch die Aktivierung von $G\alpha_{12/13}$ und $G\alpha_q$ ein. Diese $G\alpha$ -UEs aktivieren den Rho-GEF (*guanine nucleotide exchange factor*), der die Aktivierung der kleinen GTPase RhoA in die Wege leitet [65]. RhoA ist verantwortlich für die Umstrukturierung des zellulären Aktinzytoskelettes und die Bildung von Stressfasern, die nach PMT-Stimulation charakteristischerweise beobachtet wurden [66]. Ein weiterer wichtiger intrazellulärer Wirkmechanismus ist die PMT-induzierte Aktivierung der Phospholipase C- β (PLC- β) und die resultierende Freisetzung der sekundären Botenstoffe Diacylglycerol (DAG) und Inositoltrisphosphat (IP₃) durch die Spaltung von Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat (PIP₂) [67]. Die Proteinkinase C (PKC) wird daraufhin von DAG aktiviert und IP₃ ist der verantwortliche Botenstoff, der für die Erhöhung von intrazellulären Ca²⁺-Spiegeln nach PMT-Stimulation sorgt [68, 69]. Welchen Vorteil das Bakterium für sein Überleben aus der Modulation all dieser Signalwege zieht, ist noch nicht geklärt und derzeit Gegenstand zahlreicher Spekulationen.

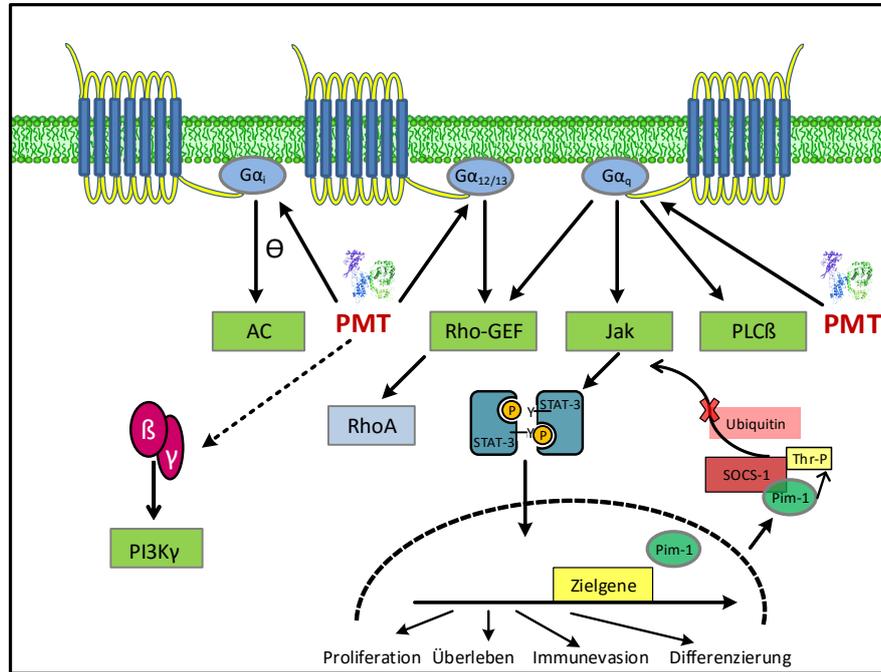


Abbildung 2.3: PMT-induzierte Signalkaskaden: Die Abbildung wurde modifiziert nach Orth *et al.*, *Toxins*, 2010 [77] und Hildebrand *et al.*, *Cellular Microbiology*, 2010 [76].

2.3.3 Der mTOR-Signalweg und PMT

Bei der mTOR Kinase handelt es sich um eine Serin/Threonin-Kinase [78], die zwischen den verschiedenen Spezies hoch konserviert ist [79]. Dies ist auf ihre zentrale Rolle bei der Integration verschiedener extra- und intrazellulärer Signale, die den Versorgungszustand der Zelle mit Nährstoffen melden, zurückzuführen [80]. Die mTOR Kinase ist eine bedeutende Schaltstelle bei der Einleitung einer an die verfügbaren Energieressourcen angepassten zellulären Antwort, wie zum Beispiel der Kontrolle über zelluläres Wachstum [81]. Die Bezeichnung mTOR steht für „*mechanistic target of rapamycin*“ und ist darauf zurückzuführen, dass seine Aktivität durch die Substanz Rapamycin inhibiert werden kann [82-84]. Rapamycin wurde im Jahre 1975 als bakterielles Stoffwechselprodukt von *Streptomyces hygroscopicus*, das fungizide Eigenschaften besitzt, in Bodenproben der Osterinsel Rapa Nui entdeckt und isoliert [85]. Heute ist Rapamycin ein bedeutendes Immunsuppressivum in der Transplantationsmedizin und ein wichtiges Medikament bei der Behandlung von Krebspatienten [86-89].

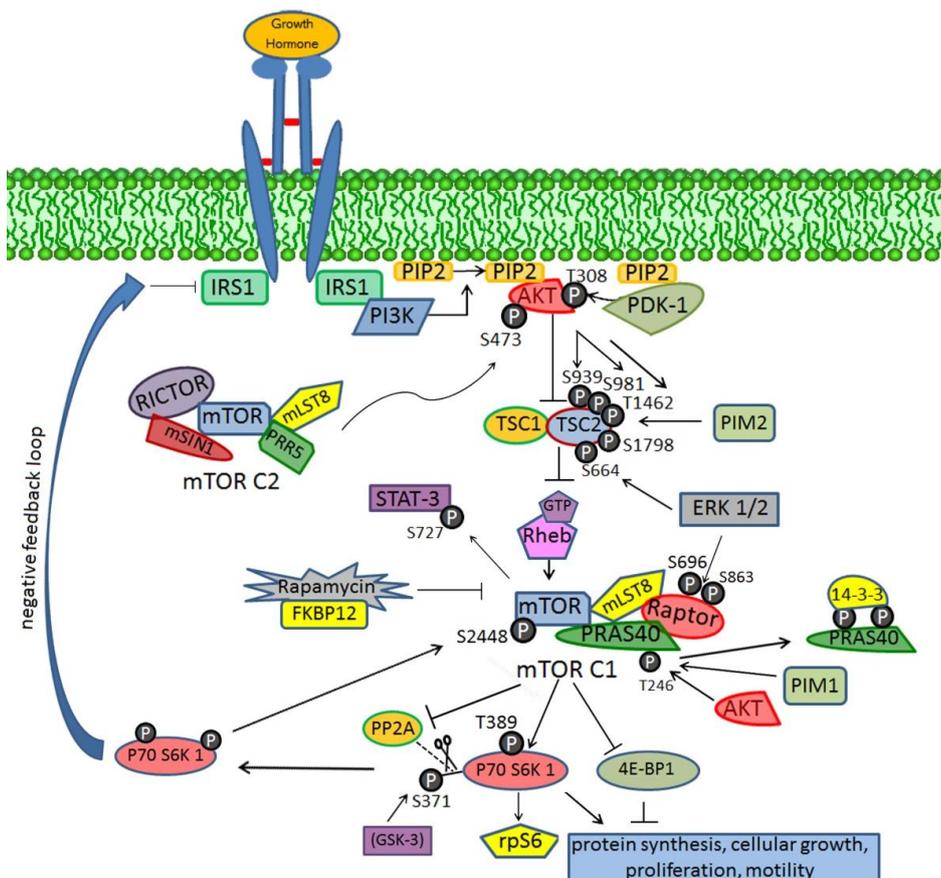


Abbildung 2.4: Der mTOR-Signalweg: Die Abbildung wurde modifiziert nach Chapuis *et al.*, Leukemia, 2010 [127].

Die Kinase mTOR befindet sich intrazellulär in zwei verschiedenen Multiproteinkomplexen, dem mTORc1 (mTOR-*complex 1*) und mTORc2, da sie sich mit verschiedenen intrazellulären Proteinen zusammenlagern kann [90]. Im mTORc2 lagert sich mTOR mit Rictor (*rapamycin-insensitive companion of mTOR*), mSIN1 (*mammalian stress-activated protein kinase-interacting protein 1*), PRR5 (*proline-rich repeat protein 5*) und mLST8 (*mammalian lethal with sec13 protein 8*) zusammen [80]. Die mTOR Kinase besitzt in jedem der beiden Multiproteinkomplexe ein charakteristisches Substrat-Phosphorylierungs-Spektrum und übt so unterschiedliche Funktionen aus. Der mTORc2 hat einen großen Einfluss auf die Form des Aktinzytoskeletts und die Organisation von diesem als Vorbereitung für die Zellteilung [91, 92]. Des Weiteren ist der mTORc2 auch an der vollständigen Aktivierung verschiedener Kinasen, die zu der AGC Familie gehören, beteiligt. Ein bedeutender Vertreter dieser ist die in Abschnitt 2.3.2 schon genannte Überlebenskinase Akt, die von mTORc2 an Ser473 im hydrophoben Motiv phosphoryliert wird [93]. Neben der Phosphorylierung von Akt an Thr308 durch die PDK-1 (*3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1*), ist diese Phosphorylierung bedeutend für die vollständige Aktivierung von Akt [94]. Rapamycin wurde ursprünglich als spezifischer Inhibitor für den mTORc1 und nicht für den mTORc2 beschrieben [91, 92]. Neuesten Erkenntnissen zufolge kann es aber in bestimmten Zelltypen nach langer Rapamycinbehandlung auch zu einer Sensitivität des mTORc2 gegenüber Rapamycin kommen [95]. Der mTORc1 teilt mit dem mTORc2 die mTOR Kinase und mLST8. Spezifische Komponenten des mTORc1 sind darüber hinaus Raptor (*regulatory associated protein of mTOR*) und PRAS40 (*proline-rich Akt/PKB substrate 40 kDa*) [80]. Die Funktion des mTORc1 ist die Regulation zellulärer Prozesse wie Protein- und Lipidsynthese, Autophagie, Lysosombiogenese und Energiemetabolismus [96]. Ein bedeutender Aktivator des mTORc1 ist die kleine GTPase Rheb (*Ras homolog enriched in brain*), die nur in GTP-gebundener Form die Kinaseaktivität von mTORc1 fördert (siehe Abbildung 2.4). Rheb besitzt eine sehr geringe intrinsische GTPase-Aktivität [97]. Als GTPase-aktivierendes Protein (GAP) für Rheb fungiert das Protein TSC2 (*Tuberous Sclerosis Complex 2*), das einen Komplex mit TSC1 bildet [98, 99]. Der TSC1/2-Komplex ist somit ein negativer Regulator der mTORc1-Signalkaskade, da er Rheb in seine GDP-gebundene, inaktive Form überführt. Die inhibitorische Aktivität des TSC1/2-Komplexes für Rheb zu reduzieren, ist ein zentraler Ansatzpunkt, den viele Kinasen aufwärts von mTOR als Mechanismus nutzen, um den mTOR-Signalweg zu aktivieren [80]. Der PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase)-Akt Signalweg, ist einer der bedeutendsten Aktivierungswege für mTORc1 nach Wachstumsfaktorstimulation. Die vollständig aktivierte Akt Kinase (Thr308 /Ser473) phosphoryliert TSC2 an drei Aminosäureresten: Ser939, Ser981 und Thr1462 [100-102]. Diese Phosphorylierungen inhibieren den TSC1/2-Komplex in seiner Funktion als GAP für Rheb [103]. Außerdem bewirkt eine Phosphorylierung von TSC2 an Ser664 durch die ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinase1/2*) Kinasen eine Dissoziation des TSC1/2 Komplexes und dessen Inhibition [104]. Die Pim-2 Kinase erzielt eine Inhibition der TSC-Repression durch Phosphorylierung von TSC2 an Ser1798 [105]. Die mTORc1 Komponente Raptor hat eine bedeutende Funktion indem sie Substrate zum Komplex rekrutiert und der mTOR Kinase präsentiert [106]. Die oben schon erwähnten Kinasen ERK1/2 stimulieren die Aktivierung des mTORc1 über einen weiteren Mechanismus: Sie phosphorylieren Raptor an Ser696 und Ser863 und fördern somit die Phosphorylierung von mTOR Kinase Substraten [107]. Bei PRAS40 handelt es sich um ein weiteres Gerüstprotein des mTORc1. PRAS40 bindet an Raptor und inhibiert die Funktion der

mTORc1 Kinase durch Konkurrenz von PRAS40 mit anderen Substraten, die über Raptor-Bindung der mTOR Kinase präsentiert werden [108-110]. Neben Raptor gibt es auf Ebene der Komplexpartner einen weiteren bekannten Mechanismus, den mTOR-Signalweg zu aktivieren. Es ist bekannt, dass eine Phosphorylierung von PRAS40 an Thr246 eine Bindungsstelle für das Protein 14-3-3 generiert. Die Bindung von 14-3-3 rekrutiert PRAS40 weg von dem mTOR-Komplex und macht damit das katalytische Areal von mTOR wieder zugänglich für andere Substrate [111]. Diese Phosphorylierung von PRAS40 an Thr246 kann sowohl von der Akt Kinase als auch von der Pim-1 Kinase erzielt werden [108, 112]. Die beiden bekanntesten Substrate des mTORc1 sind P70s6K1 (*P70 ribosomal S6 kinase 1*) und 4E-BP-1 (*eukaryotic initiation factor 4E binding protein-1*), die beide bedeutende Regulatoren der Translation sind [81, 113, 114]. P70s6K1 wird von der mTOR Kinase an Thr389 phosphoryliert [113]. Die aktivierte P70s6K1 phosphoryliert und aktiviert Proteine, die am Prozess der Translation beteiligt sind, wie das eIF4B (*eukaryotic translation initiation factor 4B*) [115]. Viele weitere Substrate der P70s6K1 wurden mittlerweile gefunden, wie beispielsweise das ribosomale Protein S6 (rpS6), SKAR (*S6K1 Aly/REF-like substrate*) oder PDCD4 (*programmed cell death 4*), die kürzlich in Ruvinsky *et al.* zusammengefasst wurden [116]. Viele dieser Faktoren sind involviert in der Regulation von Transkription, Translation, Zellzykluskontrolle, Glukosemetabolismus und der zellulären Größe [116]. 4E-BP-1 inhibiert die Initiation der „Cap“-abhängigen Translation, indem es an eIF4E (*eukaryotic translation initiation factor 4E*) bindet, einem Initiationsfaktor der Translation, und dessen Funktion inhibiert [114, 117]. Die Hyper-Phosphorylierung von 4E-BP-1 an mehreren Serin- und Threonin-Resten, macht die Inhibition wieder rückgängig und ermöglicht „Cap“-abhängige Translation [114, 118]. Eine Aktivierung des mTOR-Signalweges induziert auch negative „Feedback“-Mechanismen, ein Prinzip, das in der Biochemie häufig zu finden ist, um eine überschießende Aktivierung von Signalwegen zu verhindern. So ist bekannt, dass die P70s6K1 Kinase einen negativen „Feedback“-Mechanismus einleitet, indem sie das IRS-1 (*insulin receptor substrate 1*) durch Phosphorylierung an seiner zellulären Wirkung hindert. Nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren ist IRS-1 bedeutend für die Aktivierung des PI3K-Akt Signalweges [119-121]. Diese inhibitorische Achse erklärt die Beobachtung, dass eine Rapamycin-Behandlung zu einer Aktivierung des PI3K-Akt Signalweges führt [122].

Dass das bakterielle Toxin PMT ein sehr potenter Wachstumsfaktor für diverse Zelltypen ist, ist schon länger bekannt [123, 124]. Kürzlich wurde publiziert, dass die PMT-induzierte Proteinsynthese teilweise von der Aktivierung des mTOR-Signalweges in Swiss 3T3-Fibroblasten abhängig ist [125]. Als Mechanismus wurde die PMT-stimulierte Sekretion eines parakrinen Faktors, dem CTGF (*connective tissue growth factor*) vorgeschlagen, der in seinen Zielzellen die Aktivierung mTOR-abhängiger Effekte wie die Phosphorylierung von P70s6K1 und rpS6 stimuliert und so Einfluß auf die Proteinsynthese nimmt [126]. PMT stimuliert dabei die Sekretion von CTGF über die konstitutive Aktivierung von $G\alpha_q$ und den Effektor $PLC\beta$, der zu einer ERK-vermittelten Stimulation der CTGF-Synthese führt [126]. Der Effektor $PLC\beta$ generiert außerdem durch Spaltung von PIP_2 die Botenstoffe DAG und IP_3 , die die Aktivierung der PKC bewirken. Der sekretierte Faktor CTGF stimuliert auf parakrine/autokrine Weise PKC-abhängig die Aktivierung des mTORc1 [126]. Es wurde beschrieben, dass die mTOR-Aktivierung in den Swiss 3T3-Zellen durch PMT unabhängig von einer Aktivierung des

PI3K-Akt Signalweges abläuft und daher auch keine Reduzierung der mTORc1-Aktivierung durch Behandlung mit dem PI3K Inhibitor Wortmannin beobachtet werden konnte [125].

2.3.4 PMT und das Skelettsystem

In Schweinen ist das Leitsymptom einer Infektion mit PMT-produzierenden *Pasteurella multocida* Stämmen die atrophische Rhinitis [128]. Bei diesem Krankheitsbild kommt es zu einem Verlust der knöchernen Strukturen der Nasenmuschel, wie in Abbildung 2.5 B im Vergleich zu der normalen Anatomie in Abbildung 2.5 A zu sehen ist [129]. Hierbei kommt es zu einer Deformation der Schnauze und bei starker Ausprägung auch zu einem Minderwuchs der betroffenen Schweine, was zur Folge hat, dass die Schweine nicht wirtschaftlich sind [130]. Weitere Begleiterscheinungen einer Infektion mit toxischen *Pasteurella multocida* Stämmen sind Husten, eine gesteigerte Absonderung von Nasensekret, Nasenbluten und dunkle, sichelförmige Verfärbungen unter den Augen [131]. Als Auslöser für die Atrophie der Knochen wurde ein gesteigerter, PMT-stimulierter Knochenabbau durch die hierin spezialisierten Zellen, die Osteoklasten (siehe Abschnitt 2.4), beschrieben [132]. Als verstärkender Mechanismus wurde in den letzten Jahren zunehmend bekannt, dass PMT auch gleichzeitig die Funktion der knochenaufbauenden Zellen, der Osteoblasten (siehe Abschnitt 2.4), hemmt [133]. Im murinen System konnte gezeigt werden, dass die Kultivierung von ganzen Knochen mit PMT zu Knochenschwund führt [128] und dass PMT mononukleäre Zellen, die aus peripherem Blut isoliert wurden (PBMCs), zu Osteoklasten differenzieren kann [134]. Auch in einem porcinen System konnte eine gesteigerte Osteoklastendifferenzierung durch Kultivierung von mononukleären Zellen, die aus dem Knochenmark isoliert und aufgereinigt wurden, mit PMT nachgewiesen werden [135]. Des Weiteren konnte auch gezeigt werden, dass intra-peritoneal appliziertes, aufgereinigtes PMT zu einer Degeneration der Knochen der Nasenmuschel führt [136]. In einer kürzlich erschienenen Publikation wurde aufgedeckt, dass eine PMT-Stimulation von Osteoklastenvorläuferzellen wie RAW264.7 Zellen und murinen, CD14⁺-Monozyten direkt zu einer gesteigerten Osteoklastendifferenzierung führt [23]. Zuvor war nie eindeutig geklärt worden, ob diese Differenzierung auch ohne die Hilfe weiterer Zellen möglich ist. Als zugrundeliegender Mechanismus wurde eine PMT-stimulierte Aktivierung der PKC über den $G\alpha_{q/11}$ -PLC β -Signalweg (siehe Kapitel 2.3.2) vorgeschlagen, die die Aktivierung der ras (*rat sarcoma*)-MAPK (*mitogen activated protein kinase*)-Kaskade über Pyk2 (*proline rich tyrosine kinase 2*) und letztlich die Aktivierung von Osteoklasten-Transkriptionsfaktoren bewirkt [23]. Weiter wirkt sich die Inhibition der Osteoblastendifferenzierung durch PMT negativ auf die Knochenbilanz aus. Es ist bekannt, dass PMT die Aktivität der alkalischen Phosphatase (ALP), einem bedeutenden Marker der terminalen Osteoblastendifferenzierung, die Mineralisation von Knochen und die Aktivität von Osteoblasten-spezifischen Transkriptionsfaktoren hemmt [133, 137, 138].

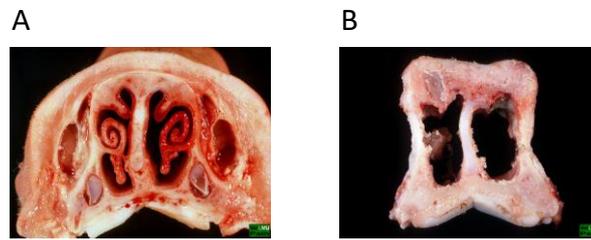


Abbildung 2.5: Osteolytische Veränderungen der Schnauze bei Schweinen mit atrophischer Rhinitis. **(A)** Schnittbild der Nasenstruktur von gesunden Schweinen. **(B)** Querschnitt durch die nasale Struktur eines Schweines, das mit dem atrophische Rhinitis auslösenden Bakterienstamm *Pasteurella multocida* infiziert wurde. Die Abbildung stammt von Prof. Dr. Hermanns (LMU München).

2.4 Osteoklastogenese

Das Skelettsystem ist ein hoch spezialisiertes Stützorgan, das hauptsächlich aus Knorpel und Knochen besteht. Der Knochen ist jedoch kein starres Gewebe, sondern ein hochdynamisches Gebilde, das sich im Laufe des Lebens ständig umlagert und an neue Anforderungen bezüglich mechanischer Beanspruchungen anpasst um die Integrität und Stärke des Knochens zu gewährleisten. Drei eng kooperierende Zelltypen sind hauptsächlich am Prozess des Knochenumbaus beteiligt: Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten [139, 140]. Bei den Osteozyten handelt es sich um terminal differenzierte Osteoblasten, die in die Knochenmatrix eingebettet wurden und ein mechano-sensorisches System des Knochens darstellen [141-143]. Sie initiieren den Knochenumbau, indem sie mechanische Belastungen wahrnehmen oder auf Hormonstimulation reagieren und daraufhin mit den Knochenumbauausführenden Zellen, den Osteoblasten und Osteoklasten, kommunizieren und deren Aktivität koordinieren [144]. Zunächst wird hierbei der alte Knochen durch die Knochen-resorbierenden Zellen, die Osteoklasten, abgetragen. Daraufhin werden Osteoblastenvorläufer an die abgetragenen Stellen mobilisiert, die zu reifen Osteoblasten differenzieren, neue Knochenmatrix generieren und diese mineralisieren [145]. Auf diese Weise werden jährlich ca. 10 % der Skelettmasse erneuert [146]. Sowohl Osteoblasten als auch Osteozyten sind Zellen mesenchymalen Ursprungs [147], während sich Osteoklasten aus hämatopoetischen Progenitorzellen entwickeln (Kapitel 2.4.1) [148].

2.4.1 Vorläufer der Osteoklastendifferenzierung

Osteoklasten differenzieren aus Vorläufern der Monozyten-/Makrophagen-Linie, besitzen also einen hämatopoetischen Ursprung [149]. Die Differenzierung von myeloiden Vorläuferzellen zu Osteoklasten wird durch Stimulation mit den beiden Zytokinen M-CSF (*macrophage colony stimulating factor*) und RANKL eingeleitet [150, 151]. Die Bindung von M-CSF an seinen Rezeptor c-Fms ist wichtig für die Bereitstellung von Überlebenssignalen sowie für die Hochregulierung von RANK, dem Rezeptor für RANKL auf frühen Progenitorzellen [152-154]. RANKL ist nach Aktivierung der in Abschnitt 2.4.2 beschriebenen Signalkaskaden für die Expression von Osteoklasten-spezifischen Genen, wie *Ctsk* (Kathepsin K), *Acp5* (TRAP) (*tartrate resistant acidic phosphatase*) und dem *CalcR* (Calcitonin Rezeptor) verantwortlich und leitet so die Differenzierung zu reifen Osteoklasten ein [155]. Membran-gebundener RANKL wird von Stromazellen bzw. von Osteoblasten durch Stimulation mit $1\alpha, 25(\text{OH})_2$ Vitamin D₃, Prostaglandin E₂ (PGE₂), Parathormon (PH) oder Glukokortikoiden wie Dexamethason exprimiert [155-158]. Eine lösliche Variante von RANKL kann von T-Zellen, B-Zellen und Osteozyten sezerniert werden [22, 159, 160]. Osteoklasten entstehen durch die Fusion mononukleärer Vorläufer und sind daher Zellen mit vielen Nuklei (zw. 3-20 Nuklei) [161]. Die Fusion wird dabei durch Moleküle in der Membran der Vorläuferzellen eingeleitet, die durch RANKL-stimulierte Regulation des Transkriptionsfaktors NFATc1 (*nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1*) (Abschnitt 2.4.2) hochreguliert werden: *Atp6v0d2* (*d2 isoform of vacuolar (H⁺) ATPase (v-ATPase) V0 domain*) und *DC-STAMP* (*dendritic cell-specific transmembrane protein*) [162-164].

Die Funktion der Osteoklasten ist der Abbau organischer und anorganischer Knochenmatrix. Zur Ausübung dieser Funktion müssen die differenzierten und fusionierten Osteoklasten noch einen weiteren Reifungsprozess durchschreiten: Sie werden eine polare Zelle. Dieser Prozess der Polarisierung, der einen starken Umbau des Zytoskelettes voraussetzt, wird durch den Kontakt von Integrinen, hauptsächlich des $\alpha_V\beta_3$ Integrins, in der Membran von Osteoklasten zu Proteinen der Knochenmatrix eingeleitet [165, 166]. Intrazellulär bindet das $\alpha_V\beta_3$ Integrin an Organisatoren des Zytoskeletts und initiiert eine Signalkaskade, in deren Folge das kleine G-Protein Rac die Generierung eines sogenannten Aktinringes, einem bedeutenden Strukturmerkmal der Osteoklasten, einleitet [165]. Dieser Aktinring bildet zusammen mit einem diesen umlagernden Doppelring aus Vinculin-Molekülen die sogenannte *Sealing Zone* des Osteoklasten [167, 168]. Diese *Sealing Zone* ermöglicht die Generierung einer abgetrennten Mikroumgebung zwischen Knochen und der apikalen Seite des polaren Osteoklasten, an dem die Resorption stattfinden kann (siehe Abbildung 2.6) [168]. An dieser Resorptionsseite entsteht auch eine weitere charakteristische Struktur der Osteoklasten, die sogenannte *Ruffled Border*, die fingerförmige Ausläufer besitzt und durch die Fusion saurer, intrazellulärer Vesikel entsteht [168-170] (siehe Abbildung 2.6). Zur Auflösung des mineralischen Bestandteiles der Knochenmatrix, der hauptsächlich aus Hydroxyapatit-Kristallen besteht, wird HCl in die Resorptionslakune sekretiert und diese angesäuert. Hierzu befinden sich Protonenpumpen (H^+ -ATPasen) und Kanäle für Chlorid-Ionen in der Membran der *Ruffled Border* (siehe Abbildung 2.6) [169-171]. Die organische Knochenmatrix wird durch proteolytische Enzyme degradiert, die in die Resorptionslakune sekretiert werden [172]. Hierbei scheint der Cystein-Protease Kathepsin K eine besonders wichtige Rolle zuzukommen [173, 174]. Die Expression des Enzymes TRAP ist ein weiterer charakteristischer Marker, der in Kombination mit der Multinuklearität genutzt wird, um Osteoklasten eindeutig zu identifizieren [175]. TRAP wird charakteristischerweise nur von Osteoklasten und dessen Vorläufern exprimiert [176]. Das Enzym befindet sich in transzytotischen Vesikeln, die Abbauprodukte von der apikalen Seite zur basolateralen Seite transportieren, und ist am weiteren Prozess der intrazellulären Degradation durch die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) beteiligt [176]. Neben den klassischen Vorläufern der Monozyten/Makrophagenlinie ist bekannt, dass auch konventionelle dendritische Zellen als Vorläufer für Osteoklasten dienen können und dass der Differenzierungsprozess durch proinflammatorische Zytokine wie IL-1 und TNF- α beschleunigt werden kann [177, 178].

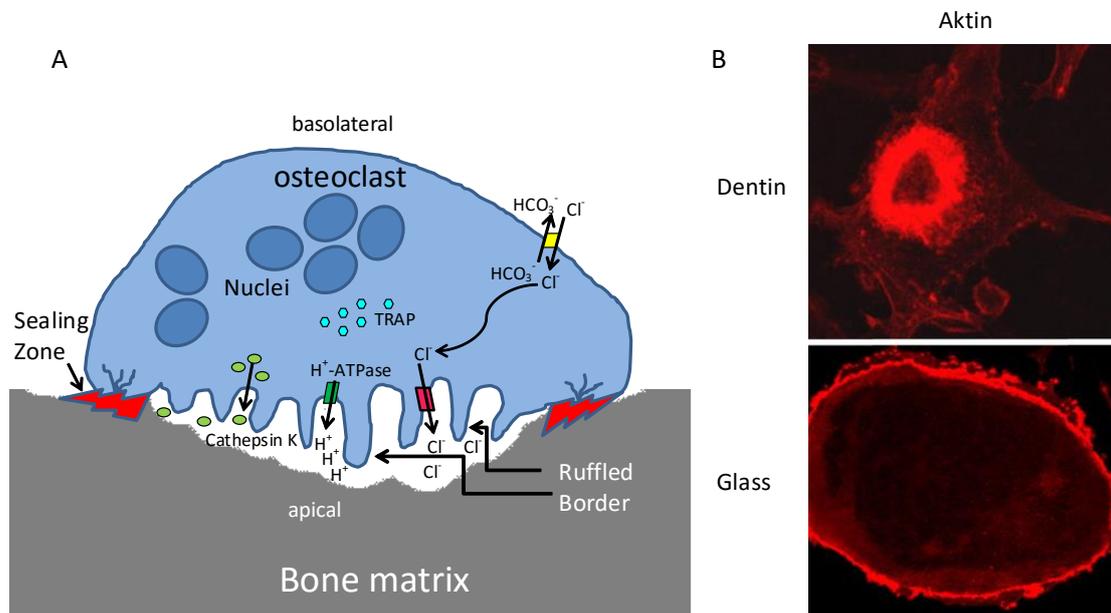


Abbildung 2.6: (A) Schematische Darstellung eines polaren Osteoklasten mit typischer *Sealing Zone* und *Ruffled Border*. Die Sekretion von osteolytischen Substanzen wie Kathepsin K und HCL erfolgt in ein abgedichtetes Mikromilieu auf der apikalen Seite des Osteoklasten. Osteoklasten sind multinukleäre, TRAP-positive Zellen. Die Abbildung stammt aus Kubatzky *et al.*, 2013, Toxins [179]. (B) Konfokale Mikroskopie des Aktinringes eines Osteoklasten, der entweder auf Dentin oder auf Glass differenziert wurde. Die Abbildung stammt aus Bruzzaniti *et al.*, 2005, Molecular Biology of the Cell [180].

2.4.2 Signaltransduktionsachsen der Osteoklastendifferenzierung

Nach der Bindung von RANKL an seinen Rezeptor RANK werden verschiedene Signalkaskaden aktiviert, die die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren bewirken. Diese leiten die Differenzierung von Osteoklasten-Vorläufern zu Osteoklasten ein oder liefern wichtige Überlebenssignale für die Osteoklasten (siehe Abbildung 2.7). Der Rezeptor RANK besitzt keine intrinsische enzymatische Aktivität und überträgt daher seine Signale durch die Rekrutierung von Adaptermolekülen [181]. Hierbei zeigte sich durch *Knockout*-Studien, dass TRAF6 (*TNF receptor associated factor 6*) allerdings das bedeutendste Adaptermolekül für die Funktion von Osteoklasten ist, da TRAF6^{-/-} zu Osteopetrose führt [182]. Die Aktivierung des PI3K-Akt Signalweges über c-Src, das an TRAF6 bindet [183], trägt zur Stimulierung der Osteoklastenresorption über eine Beteiligung bei der Entstehung der *Ruffled Border* bei und stimuliert außerdem das Überleben der Zellen [184, 185]. Über TRAF6 wird der NF- κ B Signalweg aktiviert, indem ein Adaptermolekülkomplex aus TRAF6, TAB-1 und TAB-2 entsteht, wodurch die Kinasen TAK1 (*TGF- β -activated kinase 1*) und NIK (*NF- κ B-inducing kinase*) sowie der IKK (I κ B-kinase) $\alpha\beta\gamma$ -Komplex aktiviert werden. Daraufhin wird die Transkription durch das NF- κ B Heterodimer p50/p65 reguliert [186-188]. Des Weiteren wird in Osteoklasten auch der alternative NF- κ B-Signalweg aktiviert und die Transkription durch RelB/p52 Heterodimere gesteuert [189]. Die Bedeutung des NF- κ B-Signalweges zeigt sich dadurch, dass Mäuse mit einem *Knockout* von p50 und p52 einen Defekt in der Osteoklastogenese aufweisen [190]. Auch die MAP Kinasen spielen eine wichtige Rolle bei der Osteoklastendifferenzierung, da sie die Aktivität des Transkriptionsfaktors AP-1 (*activating protein-1*) kontrollieren [191, 192]. Es sind nur wenige Details über die Aktivierung der MAP Kinasen nach RANK-Stimulation bekannt: Man weiß, dass JNK (*Jun N-terminal kinase*) über die aktivierte TAK-1 und p38 über TAB1 aktiviert werden kann [193, 194]. NFATc1 ist, wie schon erwähnt, der Masterregulator der Osteoklastogenese. Seine initiale Induktion wird durch die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1, die beide an den Promotor von *NFATc1* binden, eingeleitet [195-198]. Die nukleäre Translokation von NFATc1 wird durch eine Ca²⁺-abhängige Dephosphorylierung durch Calcineurin bewirkt [195]. NFATc1 bindet an seinen eigenen Promotor und stimuliert seine eigene Transkription durch einen Autoamplifikationsmechanismus [197]. Eine weitere Möglichkeit, die Osteoklastendifferenzierung zu beeinflussen, wurde von Miyauchi *et al.* aufgezeigt. Bcl-6 (*B cell lymphoma 6*) ist ein transkriptioneller Repressor von Osteoklasten-spezifischen Genen wie *NFATc1*, *Ctsk* (Kathepsin K) und *DC-STAMP*. Die Inhibition kann durch eine Aktivierung von Blimp-1 (*B lymphocyte-induced maturation protein-1*), einem Repressor für Bcl-6, wieder aufgehoben und dadurch die Induktion von Osteoklasten-spezifischen Genen freigegeben werden [199]. Die Blimp-1-Bcl-6 Achse wird durch Stimulation von RANK mit RANKL aktiviert [199]. Ein *Knockout* von Bcl-6 in Mäusen führt zu einer gesteigerten Osteoklastendifferenzierung und einem osteoporotischen Phänotyp [199].

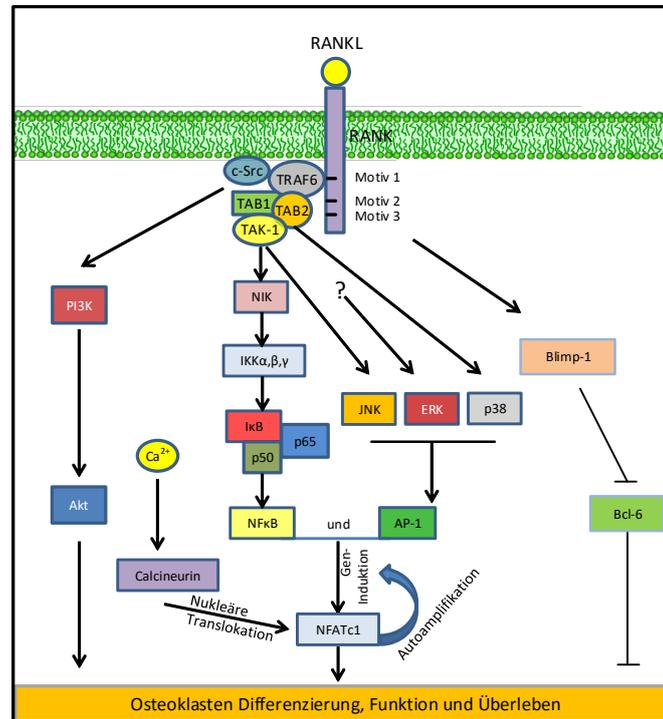


Abbildung 2.7: RANKL-stimulierte Signalkaskaden der Osteoklastogenese. Nach der Bindung von RANKL an seinen Rezeptor RANK spielt die Aktivierung der gezeigten sechs Signalachsen (Akt, NFATc1, NF-κB, JNK, ERK und p38) eine entscheidende Rolle für die Differenzierung von Osteoklasten, ihre Funktion und ihr Überleben. Die Abbildung wurde modifiziert nach Feng *et al.*, IUBMB Life, 2005, [188] und Miyauchi *et al.*, the Journal of Experimental Medicine, 2010 [199].

2.5 Hämatopoese und zelluläre Plastizität

Alle zellulären Komponenten des Blutes differenzieren aus einer gemeinsamen Vorläuferstammzelle, der hämatopoetischen Stammzelle (HSC), in einem Prozess, der Hämatopoese genannt wird [200]. Hämatopoetische Stammzellen besitzen ein hohes Selbsterneuerungspotential [201]. Aus den hämatopoetischen Stammzellen differenzieren multipotente Progenitorzellen (MPP), die ein geringeres Selbsterneuerungspotential besitzen [202]. Diese MPPs legen sich dann entweder auf ein lymphoides oder myeloides Schicksal fest, indem sie entweder zu einer lymphoiden Vorläuferzelle, der CLP (*common lymphoid progenitor*) oder einer myeloiden Vorläuferzelle, der CMP (*common myeloid progenitor*) differenzieren [203, 204]. Die Festlegung von multipotenten Vorläuferzellen auf bestimmte Differenzierungslinien wird durch Linien-spezifische Transkriptionsfaktoren bestimmt, denen komplexe Regulationsprinzipien zugrundeliegen, die z.B. von Orkin *et al.* in einem Review zusammengefasst wurden [205]. Aus den lymphoiden Vorläuferzellen (CLPs) differenzieren T- und B-Zellen, natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und dendritische Zellen [200]. Aus den myeloiden Vorläuferzellen (CMPs) gehen Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, Erythrozyten und Megakaryozyten hervor (siehe Abbildung 2.8) [203].

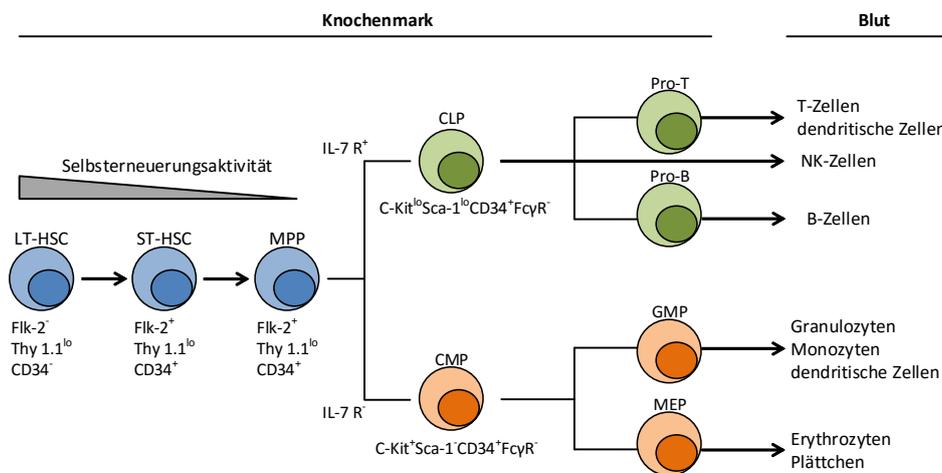


Abbildung 2.8: Die Hämatopoese. Aus HSCs differenzieren MPPs, die sich entweder zu einer lymphoiden Vorläuferzelle, der CLP, oder einer myeloiden Vorläuferzelle, der CMP, entwickeln. Aus diesen Zellen werden spezialisierte Blutzellen gebildet. Die Abbildung wurde modifiziert nach Shizuru *et al.*, Annu.Rev.Med., 2005 [206], und Kondo *et al.*, Annu.Rev.Immunol, 2003 [200].

Als Lehrsatz galt lange, dass die Festlegung auf eine bestimmte Linie ein irreversibler Prozess ist [204]. Die Sichtweise, dass Zellen sich unumkehrbar spezifizieren, wurde in den letzten Jahren zunehmend in einzelnen Publikationen in Frage gestellt und es wurde gezeigt, dass bestimmte Zellen ein gewisses Maß an Plastizität bewahren und zu Zellen anderer Linien transdifferenzieren können [207-209]. Es ist bekannt, dass die Transkriptionsfaktoren Ikaros, EBF (*early B cell factor*), E2A und Pax-5 (*paired box protein 5*) bedeutend für die Einleitung der Differenzierung der CLP entlang der B-lymphoiden Linie sind [210-212]. Die Expression des Transkriptionsfaktors Pax-5 ist von großer Wichtigkeit für die Identität von B-Zellen [213]. Die B-Zellentwicklung im Knochenmark von Mäusen mit einer Defizienz für das Gen, das Pax-5 kodiert, ist in einem sehr frühen Stadium, dem sogenannten Pro-B-Zellstadium, angehalten [214]. Der Transkriptionsfaktor Pax-5 erwies sich als bedeutend für die Festlegung von Pro-B-Zellen auf eine B-lymphoide Differenzierungslaufbahn, indem er nicht nur B-Zell-spezifische Gene aktiviert, sondern auch zugleich Gene fremder Linien unterdrückt [213, 215-217]. B-Zellen sind die einzigen hämatopoetischen Zellen, die Pax-5 exprimieren [218]. Pax-5 wird nach der Festlegung von Pro-B-Zellen auf die B-lymphoide Linie in allen Differenzierungsstadien von der Pre-B-Zelle bis hin zur reifen B-Zelle auf fast gleichbleibendem Level exprimiert [219-221]. Nur das letzte Stadium der B-Zell-Differenzierung, die terminale Plasmazell-Differenzierung, ist von einem Herunterregulieren von Pax-5 abhängig, in dessen Folge myeloide Gene, die zuvor durch Pax-5 reprimiert wurden, wieder exprimiert werden [215, 220, 221] (siehe Abbildung 2.9). Interessanterweise konnten Nutt *et al.* (1999) zeigen, dass ein *Knockout* von Pax-5 in Mäusen eine Pro-B-Zell-Population hervorbringt, die nach ihrer Isolation entweder in einer Kokultur mit Stromazellen (ST2-Zellen) und IL-7 erhalten bleibt oder durch einen Ersatz von IL-7 durch andere Linien-spezifische Wachstums- bzw. Differenzierungsfaktoren zu Zellen anderer Linien wie Granulozyten, dendritischen Zellen, Makrophagen, Osteoklasten, NK-Zellen oder T-Zellen differenziert werden können (siehe Abbildung 2.9) [216]. Diese Publikation zeigte zum einen, wie wichtig Pax-5 für das Festlegen auf die B-lymphoide Linie ist und zum anderen, dass sehr frühe B-Zell-Vorläufer ein gewisses Potential, zu myeloiden Zellen differenzieren zu können, behalten [216]. Des Weiteren konnte auch *in vivo* gezeigt werden, dass nach einer Transplantation, diese Pax-5-defizienten B-Zellen multiple hämatopoetische Zellen hervorbringen können [222]. Auch in mehreren anderen Veröffentlichungen wurde die Beobachtung gemacht, dass mit dem Pan-B-Zellmarker CD45R (B220) aufgereinigte B-Zellen als direkte Vorläufer für die Osteoklastendifferenzierung dienen können [223-226]. Einen Hinweis dafür, dass eine solche Differenzierung eventuell auch *in vivo* oder zumindest im Rahmen pathologischer Veränderungen vorkommen könnte, lieferte eine Untersuchung an Patienten mit Multiplem Myelom. Hierbei handelt es sich um eine Krebserkrankung mit unkontrollierter Expansion von Plasmazellen, bei der es als weitere Komplikation zu einer Knochenschädigung mit gesteigerter Osteoklastogenese kommt, deren Zusammenhänge noch weitestgehend unaufgeklärt sind. Anderson *et al.* konnten zeigen, dass Osteoklasten von Myeloma Patienten Chromosomen-Translokationen aufweisen, die charakteristisch für den Plasmazell-Klon sind und lieferten somit einen Hinweis, dass B-Zellen als Vorläufer an der gesteigerten Osteoklastendifferenzierung beteiligt sein könnten [227]. Die Möglichkeit von B-Zellen zu Osteoklasten zu differenzieren wird allerdings noch sehr kritisch in der Fachwelt diskutiert [228].

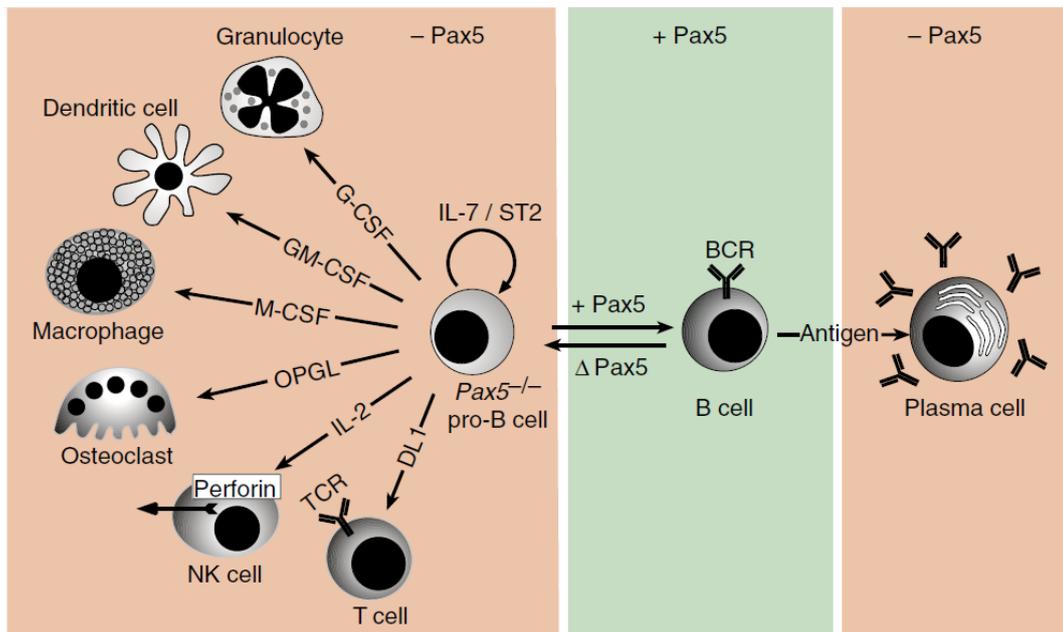


Abbildung 2.9: Die Rolle von Pax-5 in der B-Zelllinie. Pax-5 ist bedeutend für die Festlegung von Pro-B-Zellen auf die lymphoide Linie und wird bis zum Stadium der reifen B-Zelle exprimiert. Terminale Plasmazellen verlieren die Expression von Pax-5. Ein *Knockout* von Pax-5 arretiert die B-Zellentwicklung auf dem Pro-B-Zellstadium und schafft Zellen mit einem multipotenten Differenzierungspotential. Die Abbildung stammt aus Cobaleda *et al.*, Nature Immunology, 2007 [213].

2.6 Zielsetzung

Über den Prozess des physiologischen Knochenumbaus sind bereits viele Details bekannt. In den letzten Jahren wurde festgestellt, dass ein enges Zusammenspiel zwischen Immunsystem und Skelettsystem besteht. Aus dem Interesse an diesen Zusammenhängen entstand das neue Forschungsfeld der Osteoimmunologie. Es war zuvor schon bekannt, dass das bakterielle Proteintoxin PMT einen Einfluss sowohl auf Zellen des Immunsystems als auch auf Zellen des Skelettsystems hat und dabei Auslöser der atrophischen Rhinitis ist. Dabei ist noch völlig unklar, ob das bakterielle Toxin primär das Immunsystem im Zuge einer Immunevasionsstrategie moduliert und das Skelettsystem nur sekundär durch die enge Verknüpfung der beiden Systeme miteinander betroffen ist, oder ob die Modulation des Skelettsystems ebenfalls direkte Besiedlungsvorteile für das *Pasteurella multocida* Bakterium liefert. Daher erschien PMT ein interessantes Modellsystem zu sein, mehr über die Regulationen im Osteoimmunsystem zu erfahren und dabei auch ein größeres Wissen über die PMT-stimulierte Osteoklastendifferenzierung zu erlangen. In einer Publikation der Arbeitsgruppe konnte zuvor gezeigt werden, dass die PMT-stimulierte Osteoklastendifferenzierung B-Zell-abhängig ist. Dabei sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, welche Rolle dabei den B-Zellen in der PMT-induzierten Osteoklastogenese zukommt und wie PMT das sogenannte Osteoimmunsystem beeinflussen kann. Darüber hinaus sollte der Frage nachgegangen werden, wie PMT auf klassische Osteoklastenvorläuferzellen der Monozyten-/Makrophagenlinie einwirkt und Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen der PMT-stimulierten Osteoklastogenese und der klassischen, durch die Zytokine M-CSF und RANKL vermittelten Osteoklastogenese auf der Ebene einer Proteomanalyse ausgearbeitet werden. Dabei war es Ziel der Arbeit, zelluläre Signalwege der PMT-vermittelten Osteoklastendifferenzierung aufzudecken, um unser Wissen in diesem Bereich erweitern zu können.

3 Kapitel 3

Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Brutschrank	Heracell™ 240i CO ₂ , Thermo Fisher Scientific, Langenselbold®
Blot-Apparaturen (halb-trocken)	Fastblot B34 und B44, Biometra GmbH, Göttingen
Blot-Apparatur (nass)	Mini Trans-Blot® Cell, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Durchflusszytometer	BD FACS Canto, BD Biosciences, Heidelberg
Filmkassette	Hypercassette™ Amersham Biosciences, Freiburg
Fluorometer	FLUOstar OPTIMA, BMG LABTECH, Ortenberg
Geldokumentationssystem	Video-Dokumentationssystem Modell: Infinity 3000, Peqlab, Erlangen
Gelelektrophoresesystem (DIGE)	Ettan DALT II System, GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Inversmikroskop	Axiovert 25, Carl Zeiss, Jena
Isoelektrisches Fokussiersystem	Ettan IPGphor3, GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Konfokales Mikroskop	LEICA TCS SP5, Leica Microsystems, Mannheim
Kamera (Inversmikroskop)	Axio Cam MRc, Carl Zeiss, Jena
Kamera (Geldokumentationssystem)	Chemi-Smart 2000, Peqlab, Erlangen
Luminometer	LUMIstar OPTIMA, BMG LABTECH, Ortenberg
Minischüttler	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Netzgerät	Standard Power Pack P25, Biometra GmbH, Göttingen
Photometer	Sunrise™ Tecan Group Ltd., Männedorf
Plattenschüttler	Titramax 100, Heidolph, Schwabach
Real-time PCR Cycler	7900HT Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems, Darmstadt

Rehydratisierungskassette	Ettan IPGphor Manifold, complete, GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Sicherheitswerkbank	Hera safe, TypKS 18 (Klasse 2), Heraeus Instruments, Hanau
SDS-PAGE Gelkammer	EcoCell Elektrophoresezelle, Anamed Elektrophorese GmbH, Groß-Bieberau
<i>Spotpicker</i> (DIGE)	Ettan Spot Picker, GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Thermomixer	Thermomixer Compact, Eppendorf AG, Hamburg
Thermocycler	Primus 25 advanced, Peqlab, Erlangen
Ultraschallhomogenisator	SONOPLUS HD 3100, Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin
UV-Vis-Spektrophotometer (NanoDrop)	NanoDrop® ND-1000, Peqlab, Erlangen
Zentrifugen	Zentrifuge (1K15), Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode Heraeus Multifuge 3SR, Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Zellsortierer	AutoMACS™ Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach

3.1.2 Verbrauchsmaterial

Blot-Papier	Grade 3MM Chr Blotting Paper, GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Blot-Membran (Nitrocellulose)	Amersham Protran 0.45 NC, GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Blot-Membran (PVDF)	Roti®-PVDF, Porengröße 0,45 µm , CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe
ELF®spin filters	Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt
ELISA-Platten	Microplatte, 96-Well, half-area, PS, MICROLON 600, HIGH BINDING, Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Falcon-Röhrchen	Falcon-Tube, 15 ml und 50 ml, Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
FACS-Röhrchen	BD Falcon™ 5 ml Polystyrene Round Bottom tube, BD Biosciences, Heidelberg

Filterkonzentrator	Centriprep YM-3, 3 kDA NMGG, Millipore, Merck KGaA, Darmstadt
Fluoreszenzplatten	Polypropylene MicroWell™ Plate, 96 Conical Well, Black, Non-Treated, Nunc™ Thermo Scientific, Waltham, USA
Fertiggele	4-20 % Tris-Glycin-Gradientengele, Anamed Elektrophorese GmbH, Groß-Bieberau
IPG Streifen	Immobiline DryStrip pH 3-10, 24 cm, GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Kanülen	Microlance™ 3, 27G, 0,4 mm x 19 mm und 20G, 0,9 mm x 40 mm, BD Biosciences, Heidelberg
Laserscanner (DIGE)	Typhoon Trio variable Mode imager, GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Lumineszenzplatten	Polypropylene MicroWell™ Plate, 96 Conical Well, Solid white, non-treated, Nunc™ Thermo Scientific, Waltham, USA
Petrischale	Petrischale, mit Nocken, 145 X 20 mm, Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
PCR-Platten	PCR-Plate, 96-Well, Steinbrenner Laborsysteme GmbH, Wiesenbach
qPCR-Adhäsionsfolie	Adhesive PCR Film Seal, Thermo Scientific, Waltham, USA
Reaktionsgefäße	Safe-Lock Tubes, 1,5 ml, 2,0 ml, Eppendorf, Hamburg
Serologische Pipetten	5 ml, 10 ml, 25 ml; wattiert; einzeln verpackt, steril, SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht
Spritzen	Luer-Lok™ Tip, 10 ml Syringe, BD Biosciences, Heidelberg
Transwells	ThinCert™ 0,4 µm Poren, Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Zellschaber	28 cm lang, Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Zellkulturflaschen	CELLSTAR™ Filter Top Zellkultur Flaschen (50 ml, 250 ml und 550 ml), Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Zellkulturschale	Cellstar™ PS, 100x20 mm; Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Zellkulturplatten	Cellstar™ (24-, 6-well plates), Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen

Zellsiebe BD Falcon™ cell strainer, 100 µm, Nylon, BD Biosciences, Heidelberg Pre-Separation Filters, 30 µm, Miltenyi, Bergisch-Gladbach

3.1.3 Chemikalien

Acid Phenol Chloroform	ambion®, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Agarose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Albumin Fraktion V, $\geq 98\%$, aus Rinderplasma	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Albumin Lösung, steril, Endotoxin Level < 200 EU/ml, aus Rinderplasma, 10 % in DPBS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Aprotinin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<i>Aqua ad injectabilia</i>	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Bromphenolblau	AppliChem GmbH, Darmstadt
CHAPS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethanol absolute, $\geq 99,8\%$	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Formaldehyde 37 % p.a.	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Glycerol	AppliChem GmbH, Darmstadt
Glycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Jodacetamid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck, Darmstadt
Leupeptin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Levamisole hydrochloride	AppliChem GmbH, Darmstadt
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Merck, Darmstadt

2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Methanol, $\geq 99,8\%$	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
MG132	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS), $\geq 99,5\%$	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumfluorid (NaF)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Merck, Darmstadt
Natriumorthovanadat (Na_3VO_4)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumvanadat (NaVO_3)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Nonidet p-40 (NP-40)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Biochrom AG, Berlin
Pepstatin A	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Poly-D-Lysin Hydrobromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
SAHA HDAC Inhibitor	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Silikonöl DC 200	IPG Drystrip Cover Fluid, Serva, Heidelberg
Thiourea	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Tris	AppliChem GmbH, Darmstadt
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Tween-20	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Trypanblau (0,4 %)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Urea	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

3.1.4 Puffer und Lösungen

3.1.4.1 Kommerzielle Puffer, Lösungen und Reagenzien

AutoMACS™ Running Buffer	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach
--------------------------	-------------------------------------

Carboxylat-modifizierte, grünfluoreszierende Latex-Beads	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dulbecco's MEM	Biochrom AG, Berlin
Dulbecco's PBS, steril (ohne Ca^+ , Mg^+)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
ECL <i>Western Blot</i> Substrat	(Pierce), Thermo Scientific, Langenselbold
ELISA Substrat TMB	BioLegend, San Diego, USA
FACSClean™	BD Biosciences, Heidelberg
FACSFlow™	BD Biosciences, Heidelberg
Immunopräzipitations Reagenz	Protein A/G PLUS Agarose, Santa Cruz, Heidelberg
Phosphatase Inhibitor Mix	PhosSTOP, Roche, Mannheim
Protease Inhibitor Mix	Complete Mini, Roche, Mannheim
Protein Marker (<i>Western Blot</i> , DIGE)	ColorPlus Prestained Protein Ladder, New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
RPMI 1640 Medium	Biochrom AG, Berlin
Sypro Ruby Protein Gel Stain	Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Western Blot Stripping Lösung	Restore™ (Pierce), Thermo Scientific, Langenselbold

3.1.4.2 Hergestellte Puffer und Lösungen

PBS (10x, pH 6,8)

NaCl	1,38 M
Na_2HPO_4	80 mM
KCl	27 mM
KH_2PO_4	15 mM

PBST (*Wet Western Blot*)

PBS	1 x
Tween-20	0,05 %

TBS (10x)

3 Material und Methoden

Tris	100 mM
NaCl	1,5 M

TBST

TBS	1 x
Tween-20	0,1 %

TNE

NaCl	100 mM
Tris	10 mM
EDTA	1 mM

SDS Page Laufpuffer (10x)

Glycin	1,92 M
Tris	0,25 M
pH	8,25
SDS	1 %

SDS Page Probenpuffer (4x)

TRIS	200 mM
β -Mercaptoethanol	400 mM
Glycerol	40 %
SDS	8 %

Western Blot-Blockpuffer

TBST	
Tween-20	0,1 %
BSA	5 %

Western Blot Transferpuffer

Glycin	192 mM
Na ₃ VO ₃	0,5 mM

Tris 25 mM

NP-40 Lysepuffer

Tris 20 mM
NaCl 150 mM
NaF 10 mM
EDTA 1 mM
Na₃VO₄ 1 mM
MgCl₂ 1 mM
Glycerin 10 %
NP-40 1 %

Waschpuffer (ELISA)

PBS 1x
Tween-20 0,05 %

Blockpuffer (ELISA)

PBS 1x
FCS 10 %

Coating-Puffer (ELISA) (pH 6,5)

NaH₂PO₄ 134 mM
Na₂HPO₄ 83 mM

Coating-Puffer (ELISA) (pH 9,5)

Na₂CO₃ 34 mM
NaHCO₃ 100 mM

Stopplösung (ELISA)

H₂SO₄ 0,18 M

TOWBIN Puffer (Wet Western Blot) (pH 8,9)

Tris	25 mM
Glycin	192 mM
Ethanol	20 %

Block-Puffer (Immunfluoreszenz)

PBS	1x
FCS	5 %
Albumin	1 %
Triton X-100	0,2 %

ELF97 Lösung (Konfokale Mikroskopie, Differenzierungsversuch)

(*Acid Phosphatase Leukocyte Kit* (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) und *ELF97 detection kit* (life Technologies GmbH, Darmstadt)

ELF97 Phosphatase Substrat	200 µM
Acetat	110 mM
Natriumnitrit	1,1 mM
Tartrat	7,4 mM

Stopp-Lösung (Konfokale Mikroskopie, Differenzierungsversuch)

PBS	1x
EDTA	200 mM
Levamisole	50 mM

THC (Thiourea/Urea/CHAPS)-Puffer (DIGE)

Thiourea	2 M
Urea	7 M
CHAPS (w/v)	4 %
PhosphoSTOP (Roche)	1:10
SAHA	1 µM
Aprotinin	0,2 µM

Leupeptin	2 μ M
Pepstatin	1,5 μ M
MG132	10 μ M

Herstellung: Um 50 ml Puffer herzustellen, wurden 22,0 g Urea und 8,0 g Thiourea in 25 ml deionisiertem H_2O_{dd} gelöst und 0,5 g Serdolit MB-1 Ionenaustauscherharz hinzugefügt und für 10 min gerührt und die Lösung filtriert. Dann wurden 2,0 g CHAPS zugefügt und auf 50 ml mit H_2O_{dd} aufgefüllt. Phosphatase- und Proteaseinhibitoren wurden unmittelbar vor Gebrauch hinzugefügt.

Waschpuffer (DIGE)

PBS	1x
NaF	1 mM
NaVO ₃	0,1 mM

Rehydratisierungspuffer (DIGE)

Urea	8 M
CHAPS (w/v)	1 %
DTT	0,4 %
IPG-Puffer	0,5 %

(pH 3-10, GE Healthcare)

(Die Herstellung erfolgte wie bei dem THC Puffer durch Anlösen von Urea mit Serdolit)

Reduzierungspuffer (DIGE)

Urea	6 M
Tris/Hcl (pH 8,8)	50 mM
Glycerin (v/v)	30 %
SDS (w/v)	4 %
DTT (w/v)	1 %

Alkylierungspuffer (DIGE)

(wie der Reduzierungspuffer: DTT wurde durch Iodacetamid (2 %) ersetzt)

Elektrophoresepuffer (DIGE)

Tris	24 mM
Glycin	200 mM
SDS	0,1 %

Agaroselösung (DIGE)

Elektrophoresepuffer	1x
Agarose (w/v)	0,5 %
Bromphenolblau	0,08 %

3.1.5 Kommerzielle Kits

Caspase-Glo® 3/7 Assay	Madison, USA
Cathepsin K Activity Assay Kit	Abcam, Cambridge, UK
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	Madison, USA
Mouse IgM ELISA Quantitation Set	Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, USA
Mouse IgG ELISA Quantitation Set	Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, USA
Mouse IL-12 (p40) ELISA Set	BD OptEIA™ BD Biosciences, San Diego, USA
Mouse IL-10 ELISA Set	BD OptEIA™ BD Biosciences, San Diego, USA
ELF® 97 Phosphatase Detection Kit	Molecular Probes, Life Technologies GmbH, Darmstadt
ELISA MAX™ Standard Set Mouse IL-6	BioLegend, San Diego, USA
ELISA MAX™ Standard Set Mouse TNF- α	BioLegend, San Diego, USA
High Pure RNA Isolation Kit	Roche, Mannheim
Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Scientific, Langenselbold
Roti®Quant	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Amersham CyDye DIGE Fluor, minimal dye labeling kit	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
ABsolute SYBR Green Rox Mix	Thermo Scientific, Langenselbold
<i>mir</i> VANA™ miRNA Isolation Kit	ambion®, Life Technologies GmbH, Darmstadt

DNA-free™ Kit	ambion®, Life Technologies GmbH, Darmstadt
miScript Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden
miScript Primer Assay	Qiagen, Hilden
miScript SYBR® Green PCR Kit	Qiagen, Hilden
Nuclear Extract Kit	Active Motif, La Hulpe, Belgien
Acid Phosphatase Leukocyte Kit	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

3.1.6 Antikörper

(Alle aufgelisteten primären Antikörper erkennen murine Protein-Epitope)

3.1.6.1 Western Blot Antikörper

Cell Signalling Technology, Danvers, USA

Akt	Kaninchen IgG	1:1000
Anti-rabbit-IgG, HRP-gekoppelt	Ziege IgG (H&L)	1:1000
Anti-mouse-IgG, HRP-gekoppelt	Pferd IgG (H&L)	1:1000
β -Aktin	Kaninchen IgG	1:1000
c-jun	Kaninchen IgG	1:1000
ERK1/2	Kaninchen IgG	1:1000
HistonH3	Kaninchen IgG	1:1000
JAK-2	Kaninchen IgG	1:1000
P-Akt (Ser473)	Maus IgG2b	1:1000
P-Akt (Thr308)	Kaninchen IgG	1:1000
P-c-jun (Ser63)	Kaninchen IgG	1:1000
PDCD4	Kaninchen IgG	1:1000
P-ERK1/2 (Thr202/204)	Kaninchen IgG	1:1000
Pim-1	Kaninchen IgG	1:1000
P-JAK-2 (Tyr1007/1008)	Kaninchen IgG	1:1000

P-mTOR (Ser2448)	Kaninchen IgG	1:1000
P-PRAS40 (Thr246)	Kaninchen IgG	1:1000
P-p105 (Ser933)	Kaninchen IgG	1:1000
P-p38 (Thr180/Tyr182)	Kaninchen IgG	1:1000
P-p65 (Ser536)	Kaninchen IgG	1:1000
P-P70s6K1 (Thr389)	Kaninchen IgG	1:1000
P-STAT-1 (Tyr701)	Kaninchen IgG	1:1000
P-STAT-3 (Ser727)	Kaninchen IgG	1:1000
P-STAT-3 (Tyr705)	Kaninchen IgG	1:1000
P-STAT-5 (Tyr694)	Kaninchen IgG	1:1000
P38	Kaninchen IgG	1:1000
P-4E-BP-1 (Thr37/46)	Kaninchen IgG	1:1000
STAT-3	Kaninchen IgG	1:1000

Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA

Bcl-6	Kaninchen IgG	1:200
Blimp-1	Ratte IgG2a	1:200
NFATc1	Maus IgG1	1:200
Pim-2	Maus IgG1	1:200

Abcam

Anti-rat-IgG, HRP-gekoppelt	Esel IgG (H&L)	1:10000
-----------------------------	----------------	---------

3.1.6.2 AutoMACS Antikörper

Miltenyi, Bergisch-Gladbach

CD45R (B220) MicroBeads, <i>mouse</i>	Ratte IgG2a	
--	-------------	--

3.1.6.3 Immunfluoreszenz Antikörper

BioLegend, San Diego, USA

CD138 (Syndecan-1)	Ratte IgG2a, κ	1:50
CD45R/B220	Ratte IgG2a, κ	1:50
Ly-6G/Ly-6C (Gr-1)	Ratte IgG2b	1:50

Invitrogen®, Life Technologies GmbH, Darmstadt

Anti-rat-IgG, Cy®5-konjugiert	Ziege IgG	1:25
-------------------------------	-----------	------

3.1.6.4 Durchflußzytometrie Antikörper

BD Pharmingen™ BD Biosciences, Heidelberg

CD11b-FITC	Ratte IgG2b, κ	1:100
CD80-PE	Hamster, IgG2, κ	1:100
CD40-FITC	Hamster, IgM, κ	1:100
CD45R/B220-APC	Ratte IgG2a, κ	1:100

BioLegend, San Diego, USA

F4/80	Ratte IgG2a, κ	1:100
-------	-----------------------	-------

eBioscience, San Diego, USA

MHC II-PE	Ratte IgG2a, κ	1:100
-----------	-----------------------	-------

3.1.7 Stimuli

Die Stimuli wurden alle in den vom Hersteller vorgeschlagenen Stammlösungs-Konzentrationen angesetzt und bei den jeweiligen angegebenen Bedingungen gelagert.

<i>Pasteurella multocida</i> Toxin (PMT) (Stammlösung: 8,5 µM)	Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie (Prof. Dr. Dr. Klaus Aktories und PD Dr. Joachim Orth), Universität Freiburg	5 nM Endkonz.
Recombinant mouse M-CSF	R&D Systems, Minneapolis, USA	25 ng/ml
Recombinant mouse RANKL	R&D Systems, Minneapolis, USA	50 ng/ml
Phorbol 12-Myristate 13-Acetate	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	100 ng/ml
Recombinant mouse IGF-1	BioLegend, San Diego, USA	100 ng/ml
Recombinant mouse IL-7	Immuno Tools, Friesoythe	60 ng/ml
Lipopolysaccharid (LPS), (Quelle: <i>Salmonella abortus equi</i> (L 5886))	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	100 ng/ml

3.1.8 Inhibitoren

(die Inhibitoren wurden 1 h vorinkubiert)		Stammlösung	Endkonzentration
Rapamycin	Calbiochem, Darmstadt	5 mM in DMSO	10 ng/ml
U0126	Calbiochem, Darmstadt	10 mM in DMSO	20 µM
JAK Inhibitor I	Calbiochem, Darmstadt	10 mM in DMSO	1000 nM
Wortmannin	Calbiochem, Darmstadt	10 mM in DMSO	500 nM

3.1.9 Primer für die *real-time* PCR

APARA-BIOSCIENCE GmbH, Denzlingen

Die Primer wurden alle in *Aqua ad injectabilia* (Braun) gelöst (100 pmol/µl) und bei –20 °C gelagert.

murines Blimp-1 (Gen: <i>Prdm1</i>)	Forward Primer: 5'-gccaaccaggaacttctgtgt-3' Reverse Primer: 5'-aggataaaccacccgagggt-3'
--------------------------------------	---

murines Bcl-6 (Gen: <i>Bcl6</i>)	Forward Primer: 5'-acaagggaacctcgccagc-3' Reverse Primer: 5'-tgggccacctgaacaaacctgg-3'
murines TRAP (Gen: <i>Acp5</i>)	Forward Primer: 5'-ttccaggagaccttgagga-3' Reverse Primer: 5'-ggtagtaagggtggggaag-3'
murines GAPDH (Gen: <i>Gapdh</i>)	Forward Primer: 5'- acgatttgct-3' Reverse Primer: 5'-ttgacggtccatggaatttg-3'
murines s29 (Gen: <i>Rps29</i>)	Forward Primer: 5'-agccgactcgttccttctc-3' Reverse Primer: 5'-cgtattgcgatcagacc-3'

3.1.10 Software

Axio Vision 3.1 software	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
Adobe Photoshop CS5	Adobe Systems Incorporated, San Jose
Chemi-Capt software	Vilber Lourmat, Deutschland GmbH, Eberhardzell
DeCyder 2D Version 7.0	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
FACS Diva 5.0.3	BD Biosciences, Heidelberg
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, Inc., La Jolla
7900 HT SDS 2.2.1	AB Applied Biosystems, Darmstadt
LAS AF software	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Magellan V 5	Tecan Group Ltd., Männedorf
Microsoft Office 2010	Microsoft Corporation, Redmond
Optima software	BMG LABTECH GmbH, Ortenberg
Primer 3	Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge
Weasel v3.1	Walter and Eliza Hall Institute, Melbourne

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

Osteoklasten differenzieren aus Vorläufern hämatopoetischen Ursprungs. Zellen, die zu der Monozyten-Makrophagen-Differenzierungslinie gehören, wurden als klassische Vorläufer für die Differenzierung von Osteoklasten beschrieben. Die Differenzierung von Osteoklasten mit PMT wurde in murinen Zellen untersucht, die sich als bewährte Osteoklasten-Differenzierungsmodelle etabliert haben. So kann die murine Makrophagen-Zelllinie RAW264.7 durch Stimulation mit dem Zytokin RANKL effektiv zu Osteoklasten differenziert werden [229]. RAW264.7 Zellen kamen als Modellsystem auch in dieser Arbeit zur Untersuchung PMT-induzierter Osteoklastendifferenzierung zum Einsatz. Als weiteres murines Differenzierungsmodell wurden nicht transformierte Makrophagen aus dem Knochenmark von C57BL/6NRj Mäusen (Janvier) generiert. Diese Osteoklastenvorläufer können ebenfalls effektiv zu Osteoklasten differenziert werden [230, 231]. Für die Differenzierung von Makrophagen wurde M-CSF benötigt, das durch die Kultivierung von L929 Zellen generiert wurde. Des Weiteren wurden primäre, murine B-Zellen aus dem Knochenmark von C57BL/6NRj Mäusen isoliert. Als Kontrolle für Plasmazell-Proteine kamen die Multiplen Myelom-Zelllinien U266 und KMS12.BM zum Einsatz.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem CO₂-Inkubator (Heraeus) bei 37 °C mit 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl der Zellsuspension mit 90 µl Trypanblau verdünnt und durch Resuspendieren gemischt. Die Trypanblaufärbung diente dazu tote Zellen auszuschließen, da durch Trypanblau ausschließlich tote Zellen angefärbt werden. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt.

3.2.1.1 Zelllinien

3.2.1.1.1 L929 Zellen Bei den L929 Zellen handelt es sich um Maus-Fibroblasten. Der Subklon 929 wurde von den elterlichen L-Zellen isoliert, die einer C3H/An Maus entnommen wurden. L929 Zellen sind Produzenten von M-CSF. Überstände von L929 Zellen können genutzt werden um Makrophagen aus Knochenmarkszellen zu differenzieren [232, 233]. Die Zellen wurden von der *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD, USA) bezogen und in DMEM, 10 % FCS, 1 % P/S mit 50 µM β-Mercaptoethanol kultiviert und alle drei Tage im Verhältnis 1:5 gesplittet. Die adhären Zellen wurden dazu mit einem Zellschaber von der Gewebekulturschale abgelöst. Zur Generierung von M-CSF-haltigen L929 Überständen wurden 3x10⁶ Zellen in 30 ml Medium in einer Zellkulturschale (100x20 mm) ausgebracht und für vier Tage kultiviert. Der Überstand der adhären Zellen wurde abgenommen und mit einem Sterilfilter (0,2 µm) aufgereinigt und bis zur Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

3.2.1.1.2 RAW 264.7 Zellen RAW264.7 Zellen sind murine Monozyten/Makrophagen. Die Zelllinie wurde aus einem Aszites aus Tumorgewebe etabliert. Der Tumor wurde zuvor in der Maus durch eine intra-peritoneale Applikation von Abelson Leukemia Virus (A-MuLV) ausgelöst [234]. Die Zellen wurden von ATCC (Rockville, MD, USA) erworben. Die Kultivierung erfolgte in DMEM, 10 % FCS, 1 % P/S und die Zellen wurden alle 2-3 Tage im Verhältnis 1:30 bis 1:60 gesplittet. Das Ablösen der adhärennten RAW264.7 Zellen erfolgte dabei mit Hilfe eines Zellschabers.

3.2.1.1.3 U266 und KMS12.BM Zellen U266 und KMS12.BM sind humane Plasmazellen von Patienten mit Multiplem Myelom. Während die KMS12.BM aus dem Knochenmark einer weiblichen Patientin isoliert wurden, wurden die U266 Zellen aus dem peripheren Blut eines männlichen Patienten isoliert. Die KMS12.BM wurden vom Leibniz Institut (DSMZ, Braunschweig) und die U266-Zellen bei ATCC (Rockville, MC, USA) erworben. Zur Erhaltung wurden sie in RPMI-1640, 15 % FCS, 1 % P/S kultiviert und alle 2-3 Tage im Verhältnis 1:10 gesplittet.

3.2.1.2 Murine Primärzellen

Immunzellen wurden aus dem Knochenmark von 6-12 Wochen alten C57BL/6NRj Mäusen (JANVIER LABS, Le Genest St. Isle, Frankreich) isoliert oder differenziert, die zuvor durch Inhalation mit CO₂ getötet wurden. Die Mäuse wurden unter SPF (*specific pathogen free*)-Status gehalten. Eine Genehmigung zur Tötung von Mäusen zur Organentnahme lag vor. Die Experimente wurden ordnungsgemäß aufgezeichnet und über den Tierschutzbeauftragten dem Regierungspräsidium Tübingen gemeldet.

3.2.1.2.1 Isolierung von Knochenmarkszellen Zur Gewinnung von Knochenmark wurden der Maus *postmortal* Humerus, Femur und Tibia operativ entfernt und in eine sterile Gewebekulturschale in eiskaltes Kulturmedium gelegt. Anschließend wurden die Knochen weiter unter einer Sterilbank bearbeitet, indem die Epiphysen im Bereich der Metaphysen mit einer sterilen Schere abgeschnitten wurden um die Knochenmarkshöhlen für eine Spülung zugänglich zu machen. Das Knochenmark wurde mit Hilfe einer sterilen Spritze mit Kulturmedium in eine sterile Gewebekulturschale gespült und anschließend in einem Falcon gesammelt. Zur Entfernung von Verunreinigungen mit gesplittetem Knochen oder Geweberesten wurde die Knochenmarks-Zellsuspension durch ein feines Zellsieb mit 100 µm Porengröße gefiltert. Die Zellsuspension wurde bei 1300 rpm für 5 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde steril abgesaugt und das Zellpellet für die Differenzierung von Makrophagen direkt in 20 ml DMEM, 10 % FCS, 1 % P/S mit 50 µM β-Mercaptoethanol aufgenommen und ausgebracht. Für die Isolierung von B-Zellen wurde das Zellpellet in 2ml PBS resuspendiert und zur Gewinnung einer Einzelzellsuspension durch ein weiteres, feiner-poriges Zellsieb mit der Porengröße 30 µm pipettiert und die so gewonnene Zellsuspension für die Isolierung CD45R-positiver B-Zellen eingesetzt (3.2.1.2.5).

3.2.1.2.2 Differenzierung von Makrophagen (BMM Φ) Die aufgereinigte Zellsuspension aus dem Knochenmark (3.2.1.2.1) wurde zur Differenzierung von Makrophagen in eine sterile Petrischale (145x20 mm) überführt und über Nacht inkubiert. Da die Petrischale nicht beschichtet war, gelang es bei dieser Inkubationszeit nur stärker adhären Zellen sich effektiv am Boden der Petrischale anzuheften. Die nicht-adhären Makrophagen-Vorläuferzellen wurden am nächsten Tag in ein Falcon überführt und bei 1300 rpm für 5 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 56 ml Medium (10 % FCS, 1 % P/S und 50 μ M β -Mercaptoethanol) resuspendiert und auf vier Petrischalen (145x20 mm) verteilt. M-CSF-haltige Überstände von L929 Zellen (3.2.1.1.1) wurden aufgetaut und jeweils 9 ml je Petrischale zur Differenzierung von Makrophagen hinzugefügt. Nach zwei Tagen wurden weitere 12 ml L929 Überstände hinzugefügt und die Zellen für weitere vier Tage zu Makrophagen ausdifferenzieren lassen. Als Vorbereitung für die Verwendung der Makrophagen für die Versuche wurden die adhären Zellen mit Trypsin/EDTA losgelöst. Dazu wurden das Medium abgesaugt und die Zellen mit 10 ml sterilem PBS gewaschen und anschließend in 2 ml Trypsin/EDTA je Petrischale für 20 min losgelöst und mit Hilfe eines Zellschabers abgeschabt. Die Zellen wurden in Medium resuspendiert und in einem Falcon zusammengeführt und für Versuche eingesetzt. Als Qualitätskontrolle für die Differenzierung der Makrophagen wurden FACS-Färbungen (3.2.2.1.9) für die Oberflächenmarker CD11b und F4/80 durchgeführt. Des Weiteren wurden Aktivitätstests (Abb. 4.6) und der Phagozytose-Test (3.2.2.1.10) durchgeführt.

3.2.1.2.3 Differenzierung von Osteoklasten Zur Differenzierung von Osteoklasten wurden BMM Φ s (3.2.1.2.2) und RAW264.7 Zellen (3.2.1.1.2) als Vorläufer eingesetzt. Dazu wurden sie in einer Zelldichte von 2×10^5 Zellen je 1 ml in Medium (DMEM, 10 % FCS, 1 % P/S (bei den BMM Φ s wurde noch 50 μ M β -Mercaptoethanol zugefügt)) ausgebracht und mit M-CSF/sRANKL bzw. PMT stimuliert (3.1.7) und für 5-10 Tage bis zur Entstehung von Riesenzellen inkubiert. Dabei wurde die Hälfte des Mediums alle drei Tage erneuert und durch neues Medium mit frischen Stimuli ersetzt.

3.2.1.2.4 Differenzierung von dendritischen Zellen Die Knochenmarkszell-Suspension aus (3.2.1.2.1) wurde für die Differenzierung von dendritischen Zellen verwendet. Hierzu wurden 8×10^6 Zellen in einer Gewebekulturplatte (145 cm²) in 25 ml Medium (RPMI, 10 % FCS, 1 % P/S, 50 μ M β -Mercaptoethanol) ausgebracht und mit GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) stimuliert. GM-CSF wurde durch Kultivierung von X-63 Zellen generiert, die Produzenten für diesen Stimulus sind. Nach fünftägiger Differenzierung wurden 25 ml frisches Differenzierungsmedium und Stimulus hinzugefügt. Nach sieben Tagen war die Differenzierung beendet und die nicht adhären Zellen im Überstand konnten geerntet werden und nach einem Zentrifugationsschritt (1300 rpm, 5 min, RT) für den miRNA21 Versuch eingesetzt werden.

3.2.1.2.5 Isolierung von CD45R-positiven B-Zellen Um die Selektion von Zellen, die positiv für den Oberflächenmarker CD45R sind, aus der Mischung aller gewonnener Knochenmarkszellen zu erreichen, wurde die AutoMACS (*Automated Magnetically Activated Cell Sorting*)-Technik

von Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach) verwendet. Bei dieser Technik werden Antikörper, die gegen Zelltyp-spezifische Oberflächenantigene gerichtet sind, an superparamagnetische Partikel, die sogenannten *MicroBeads*, gekoppelt. Nach Antikörper-vermittelter Bindung dieser Nanopartikel an die Zellen ermöglichen sie die Auftrennung der Zellen beim Durchlaufen einer magnetischen Säule, da sie dort zurückgehalten werden, während der Rest der Zellen eluiert wird. Nach Entfernen des magnetischen Feldes können die Zielzellen eluiert werden. Die automatische Auftrennung am AutoMACS Gerät beinhaltet die Möglichkeit durch die Wahl bestimmter Programme, die hauptsächlich die Durchflussrate beeinflussen, auf die Reinheit bzw. die Ausbeute Einfluss zu nehmen. Für die Isolation CD45R-positiver Zellen wurden die Programme „Possel_s“ und „Possel“ nacheinander ausgeführt. Die Wahl dieser Programme ergab sich aus vorbereitenden Optimierungsversuchen. Zur Aufreinigung der Zellen wurde die filtrierte Einzelzellsuspension aus (3.2.1.2.1) für 1300 rpm für 5 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 45 µl eiskaltem PBS (0,5 % BSA, 2 mM EDTA) je Knochenmark einer Maus resuspendiert und 33 µl der CD45R (B220) MicroBeads (Miltenyi) hinzugefügt. Die Zellsuspension wurde für 15 min bei 4 °C inkubiert und durch Zugabe von 10 ml eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen bei 1300 rpm, 5 min bei RT zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 3 ml PBS (0,5 % BSA, 2 mM EDTA) resuspendiert und mit Hilfe des AutoMACS die CD45R-positiven Zellen sortiert. Nach Elution der Zellen wurde ein weiteres Mal zentrifugiert (1300 rpm, 5 min, RT) und das Zellpellet in RPMI, 10 % FCS, 1 % P/S und 50 µM β-Mercaptoethanol resuspendiert und die Zellen für die Versuche ausgebracht. Die Reinheit der Zellen wurde nach jeder Isolation durch eine FACS Analyse mit einem spezifischen Antikörper gegen CD45R bestimmt (3.2.2.1.9).

3.2.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.2.1 Immunoblots

3.2.2.1.1 Anfertigung von Totallysaten Für die Generierung von zellulären Totallysaten wurden jeweils 1×10^6 Zellen in 2 ml Medium je *Well* einer 6-*Well*-Platte in 2 ml Medium ausgebracht und entsprechend der verschiedenen Versuchsbedingungen behandelt. Für die Lyse der Zellen wurde die Zellkulturplatte auf Eis gestellt und das Medium entfernt um die Zellen zweimal mit 1000 µl eiskaltem PBS zu waschen. Der NP-40 Lysepuffer wurde kurz vor der Benutzung mit Phosphatase- und Protease-Inhibitoren ergänzt (Inhibitor-Cocktails von Roche). Die Zellen wurden in 100 µl 1xNP40 Puffer resuspendiert und bei 4 °C für 40 min unter Schütteln inkubiert. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 15000 rpm für 20 min bei 4 °C entfernt. Die den Proteinextrakt enthaltenen Lysate wurden bei -80 °C bis zur Verwendung eingefroren.

3.2.2.1.2 Anfertigung von subzellulären Extrakten (Nukleus und Zytoplasma) Für die gezielte Auftrennung nukleärer und zytoplasmatischer Extrakte wurde das kommerziell verfügbare *Nuclear Extract Kit* (Active Motif) verwendet. Für die Erstellung der Lysate wurden 8×10^6 Zellen in 9 ml Medium in einer Zellkulturschale (100x20 mm) ausgebracht und stimuliert. Für die Lyse

wurde das Protokoll des Herstellers befolgt. Abweichend zu dem Protokoll von Active Motif wurde bei der Erstellung der nukleären Lysate nach der Anwendung des *complete lysis buffer* zusätzlich ein Behandlungsschritt eingebaut: Die Lysate wurden mit Ultraschall lysiert (Puls: 10 s an bzw. aus, Dauer: 3 min, Amplitude: 90 %) und dann weiter nach dem Protokoll gevortext. Die Lysate wurden bis zur Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

3.2.2.1.3 Proteinbestimmung (BCA Assay) Die quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte photometrisch unter Nutzung der BCA-Reaktion. Bei dieser Reaktion entsteht in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration ein violetter Farbstoff, dessen Absorption photometrisch gemessen werden kann. Hierbei wurde ein kommerzielles Kit, das *Pierce™ BCA Protein Assay Kit* (Thermo Scientific) verwendet. Die Lysate wurden 1:10 oder 1:5 in PBS verdünnt und 20 μl je *Well* der 96 *Well*-Platte pipettiert (Duplikate). Des Weiteren wurde eine Verdünnungsreihe durchgeführt, indem eine Albumin Standard-Ampulle der Konzentration 2 mg/ml verdünnt wurde. Die Reagenzien A und B aus dem Kit wurden im Verhältnis 50:1 (A:B) gemischt und mit einer Mehrkanalpipette zu den Proben bzw. Standards pipettiert (200 μl je *Well*). Die Platte wurde für 30 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Dunkeln inkubiert. Die Absorption der Proben wurde bei einer Wellenlänge von 550 nm mit dem Photometer gemessen. Durch Erstellen einer Standardkurve mit bekannten Proteinkonzentrationen wurden dann die Konzentrationen der unbekanntenen Proben ermittelt. Die Berechnung wurde mit Hilfe der Magellan V 5.0 Software durchgeführt.

3.2.2.1.4 SDS PAGE Zur Analyse von Proteinen wurden die zellulären Proteinextrakte in einem elektrischen Feld über ein Gel mit einer bestimmten Porengröße nach Molekulargewichten aufgetrennt. Hierzu wurden die Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben mit Hilfe der Ergebnisse aus dem BCA Assay (3.2.2.1.3) angeglichen und jeweils 20 μg Protein in 30 μl 1x SDS Probenpuffer verdünnt. Die Proben wurden für 3 min bei $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einem Thermomixer erhitzt und denaturiert und anschließend für 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden sie über ein kommerziell erworbenes, 4-20 %-iges Tris-Glycin-Gel (Anamed Elektrophorese GmbH, Groß-Bieberau) elektrophoretisch bei 120 V für 1,5 h aufgetrennt. Zum Größenvergleich wurde ein Referenz-Größenmarker (*Color Plus Prestained Protein Ladder*, New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main) mit aufgetragen und aufgetrennt. Zur weiteren Analyse wurden die Proteine aus dem Gel auf eine Membran überführt (siehe 3.2.2.1.5 oder 3.2.2.1.6).

3.2.2.1.5 Semi-Dry Western Blot Die Proteine aus dem SDS-PAGE-Gel (3.2.2.1.4) wurden mittels eines *Semi-Dry Western Blot* Verfahrens mit 2 mA/cm^2 für 1 h auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Vor der Zugabe spezifischer Antikörper wurden freie Bindungsstellen auf der Membran zunächst durch Inkubation mit einer Proteinlösung blockiert. Hierzu wurde die Membran für 1 h bei RT in TBST mit 5 % BSA auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Membran in primärer Antikörperlösung für 10-12 h bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ geschüttelt. Hierzu wurden die jeweiligen Antikörper in TBST mit 5 % BSA gemäß der Angaben der Hersteller verdünnt (3.1.6.1). Die Membran wurde

dreimal für 5 min in TBST bei RT gewaschen um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, bevor die Membran in entsprechender sekundärer Antikörperlösung für 1 h bei RT inkubiert wurde. Bei dem sekundären Antikörper handelte es sich um einen Antikörper, der entsprechend der Herkunft des primären Antikörpers (3.1.6.1) spezifisch entweder IgG der Maus, des Kaninchens oder der Ratte bindet und an das Meerrettichperoxidase-Enzym gekoppelt ist und somit die spezifische Detektionsreaktion katalysieren kann. Der sekundäre Antikörper wurde gemäß der Empfehlung des Herstellers in TBST, 5 % BSA verdünnt. Die Membran wurde dreimal in TBST für 5 min gewaschen. Die Meerrettichperoxidase-katalysierte Reaktion zur Entstehung von Chemilumineszenz wurde mit dem *ECL Western Blotting Substrat* (Pierce) durchgeführt. Hierzu wurde die Membran für 1 min in der ECL-Lösung inkubiert. Für die Sichtbarmachung der Proteinbanden wurde ein Geldokumentationssystem mit einer CCD-Kamera (Chemi-Smart 2000) und einer Chemi-Capt Software (Vilber Lourmat) verwendet. Zur Detektion sensibler Proteinbanden wurde die Membran alternativ in eine Filmkassette positioniert und ein Röntgenfilm für variable Zeiten (1 min bis 20 min) aufgelegt und anschließend entwickelt.

3.2.2.1.6 Wet Western Blot Große Proteine (> 200 kDa) wurden mittels *Wet-Western-Blot* transferiert. Hierzu wurde die *Trans-blot CELL* Blotkammer von BioRad und der *Towbin-Puffer* verwendet. Die Proteine wurden bei 150 mA für 2,5 h auf eine PVDF-Membran (Roth) überführt.

3.2.2.1.7 Immunpräzipitation Bei gering exprimierten Proteinen wurde zur Immundetektion zunächst eine Immunpräzipitation durchgeführt. Als Vorbereitung wurden dazu $0,7 \times 10^7$ Zellen in 9 ml Medium in einer Zellkulturschale (100x20 mm) ausgebracht und stimuliert. Anschließend wurden die Zellen auf Eis gestellt, das Medium abgesaugt und die Zellen 2x mit eiskaltem PBS gewaschen. Nach dem Abschaben der Zellen wurden diese in 500 µl 1x NP-40 Puffer, der mit Phosphatase- und Protease-Inhibitoren frisch komplettiert wurde, lysiert. Dazu wurden die Lysate für 40 min bei 4 °C geschüttelt. Danach wurde bei 15000 rpm für 20 min bei 4 °C zentrifugiert und die Überstände wurden für die eigentliche Immunpräzipitation in ein Reaktionsgefäß überführt. Hierfür wurden 25 µl Agarose-*Beads* (Protein A/G Plus Agarose) und 5 µl spezifischer Antikörper, der das zu immunpräzipitierende Protein erkennt, zu den Überständen hinzugefügt und über Nacht bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Als Nächstes wurde zweimal mit 1xNP-40 Puffer und einmal mit TNE-Puffer gewaschen (15000 rpm, 20 s, 4 °C). Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde das präzipitierte Agarose-Protein-Gemisch am Boden des Reaktionsgefäßes in 40 µl 1 xSDS Probenpuffer aufgenommen und für 2 min bei 95 °C denaturiert und auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen und nach (3.2.2.1.4) und (3.2.2.1.5) zur Immundetektion weiter behandelt.

3.2.2.1.8 ELISA Zur Durchführung eines *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) wurden je experimenteller Bedingung 5×10^4 Zellen in einer 96-Well-Platte (Triplikate) in 200 µl Medium ausgebracht und entsprechend der Versuchsbedingungen stimuliert. Nach 24 h wurden die Zellen bei 1300 rpm für 5 min bei RT zentrifugiert und die Überstände wurden abgenommen. Die Sekretion

von Zytokinen (IL-6, TNF- α , IL-10 oder IL-12p40) bzw. von Immunglobulinen (IgM und IgG) in den Überstand der Zellen wurde unter Verwendung von gewerblichen ELISA-Kits (3.1.5) bestimmt. Die detaillierte Durchführung der Versuche richtete sich dabei genau nach dem Benutzerhandbuch der verschiedenen Firmen (BD Biosciences, BioLegend und Bethyl Laboratories). Die angegebenen Volumina wurden auf die Benutzung einer *half-Well*-Platte herunterskaliert ($\frac{1}{2}$ Volumen). Es wurden sogenannte *sandwich*-ELISAs durchgeführt. Dabei wurde zuerst die 96-Well-Platte mit einem *Capture*-Antikörper beschichtet. Danach wurden die freien Bindungsstellen durch Inkubation mit Blockierlösung belegt und anschließend die verdünnten Standards bekannter Konzentration (aus dem jeweiligen Kit) und die unbekanntes Proben beladen um die spezifische Bindung der untersuchten Zytokine bzw. Immunglobuline an den *Capture*-Antikörper zu ermöglichen. Zur Detektion wurde im Fall der Zytokin-ELISAs ein an Biotin-gekoppelter spezifischer Detektionsantikörper zusammen mit an Streptavidin-gekoppelter Meerrettichperoxidase inkubiert. Als Substrat für das Enzym wurde 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin (TMB, BioLegend) verwendet. Durch die Enzym-katalysierte Reaktion entsteht ein blauer Farbstoff, der die Messung der optischen Dichte ermöglicht. Im Fall der Immunglobulin-ELISAs wurde direkt ein Meerrettichperoxidase-gekoppelter Antikörper für den Sandwich-ELISA verwendet und anschließend mit TMB inkubiert. Die Reaktion wurde in beiden Fällen mit 1 M H₂SO₄-Lösung abgestoppt. Die optische Dichte wurde mit Hilfe eines Photometers bei 450 nm (Messfilter) gegen 570 nm (Referenzfilter) gemessen. Die Konzentrationen wurden durch Erstellen einer Standardkurve durch die Magellan V 5.0 Software berechnet.

3.2.2.1.9 Durchflußzytometrie Zur Bestimmung der Reinheit von isolierten oder differenzierten Zellen wurde die Expression charakteristischer Oberflächenmarker mittels Durchflußzytometrie untersucht. Hierbei werden einzelne Zellen auf ihre Größe, Granularität und Fluoreszenz nach einer Immunfärbung der spezifischen Oberflächen-Marker untersucht. Dazu wurden 1×10^6 Zellen in 100 μ l PBS (2 % Albumin) für 20 min bei RT blockiert. Anschließend wurden die FACS-Antikörper in der vom Hersteller vorgeschlagenen Konzentration hinzugefügt und für 15 min bei RT inkubiert. Danach wurde überschüssiger Antikörper durch drei Waschschrte mit 1000 μ l PBS (13000 rpm, 1 min, RT) entfernt und die Zellen in 250 μ l PBS aufgenommen und am FACS-Gerät analysiert. Mit Hilfe der FACS Diva 5.0.3 Software wurden die gemessenen Zelldaten auf Expression des interessierenden Fluorochromes hin ausgewertet und der prozentuale Anteil der Zellen mit den gesuchten Eigenschaften von allen *gegateten* Zellen als zelluläre Reinheit angegeben. Ungefärbte Zellen und Zellen, die mit den spezifischen Isotyp-Kontrollen behandelt wurden, dienten dabei als Kontrolle für unspezifische Färbungen. Überlagerungs-Diagramme wurden mit der Weasel v3.1 Software erstellt.

3.2.2.1.10 Makrophagen Phagozytose Test Der Phagozytose *Assay* erfolgte mittels Carboxylat-modifizierten, grün fluoreszierenden *Latex-Beads* (Sigma-Aldrich). Von den differenzierten Makrophagen (3.2.1.2.2) wurden $0,5 \times 10^6$ Zellen in FACS-Röhrchen überführt. Um zwischen unspezifischen Aufnahmemechanismen und der Phagozytose unterscheiden zu können, wurden die *Latex-Beads* bei zwei verschiedenen Temperaturkonditionen zugegeben: Bei 37 °C und bei 4 °C. Die

Phagozytose ist ein Prozess, der nur bei 37 °C ablaufen kann, während unspezifische Aufnahme auch bei 4 °C erfolgen kann. Somit kann man diese beiden Prozesse voneinander unterscheiden. Zellen ohne Zugabe von *Latex-Beads*, die auch bei 37 °C inkubiert wurden, waren die Negativ-Kontrolle, die zur Definition der Hintergrund-Fluoreszenz diente. Als Vorbereitung für die Durchführung der Phagozytose wurden die Zellen für 1,5 h bei 37 °C oder bei 4 °C vorgewärmt bzw. vorgekühlt. Die Zellen wurden in entsprechend temperierten Zentrifugen pelletiert und in 100 µl DMEM-Medium mit *Latex-Beads* (37 °C bzw. 4 °C) resuspendiert. Die *Latex-Beads* waren im Verhältnis 1:100 im Medium gelöst. Die Zellen wurden für 1 h bei 37 °C bzw. 4 °C inkubiert und anschließend fünfmal mit 1000 µl PBS gewaschen und am FACS analysiert. Die Weasel v3.1 Software wurde zur Generierung der Überlagerungsdiagramme hinzugezogen.

3.2.2.2 Konfokale Mikroskopie

3.2.2.2.1 Analyse der Differenzierung von Osteoklasten und deren Quantifizierung

Um die Differenzierung von Osteoklasten aus verschiedenen Vorläuferzellen zu untersuchen und zu quantifizieren, wurden charakteristische Merkmale von Osteoklasten für die Fluoreszenzmikroskopie visualisiert. Da sich ein Osteoklast, wie in der Einleitung beschrieben, durch seine Multinuklearität, seine Zellgröße und die Expression des Enzymes TRAP auszeichnet, wurden diese drei Merkmale fluoreszenzmarkiert. Dazu wurden die zellulären Nuklei mit DAPI (*life technology*) gefärbt und die Zellgrenzen durch Färbung des Zytoskelettes mit TRITC-konjugiertem Phalloidin (Sigma Aldrich) visualisiert. Zellen, die eine enzymatische Aktivität für das Enzym TRAP besitzen, wurden mit Hilfe der von Filgueira *et al.* beschriebenen Methode mit dem ELF97 Phosphatase Substrat (Molecular Probes) fluoreszenzmarkiert [235]. Vor dem Ausbringen der Zellen wurde je *Well* der 24-*Well*-Platte ein steriles *Coverslip* mit 100 µl Poly-D-Lysin für 15 min bei RT beschichtet. Nach dem Waschen der *Coverslips* mit sterilem PBS wurden die Zellen ausgebracht. Der Knochenmarkszellmix aus Abschnitt 3.2.1.2.1 wurde in einer Konzentration von 2×10^6 Zellen je *Well* in 500 µl Medium (RPMI, 20 % FCS, 1 % P/S) ausgebracht. Die CD45R-positiven Zellen aus Abschnitt 3.2.1.2.5 wurden in einer Zelldichte von $1,25 \times 10^6$ Zellen je 500 µl Medium (RPMI, 10 % FCS, 1 % P/S, 50 µM β -Mercaptoethanol) und die Makrophagen aus den Abschnitten 3.2.1.1.2 und 3.2.1.2.2 zu 1×10^5 Zellen je 500 µl Medium (DMEM, 10 % FCS, 1 % P/S) ausgebracht. Bei dem *Transwell*-Versuch (Abschnitt 4.1.3) wurden die Zellen direkt auf der *Transwell*-Membran gefärbt. Hier wurden $0,5 \times 10^7$ CD45R-positive Zellen im *Transwell* oben in 2 ml Medium (RPMI, 10 % FCS, 1 % P/S, 50 µM β -Mercaptoethanol) ausgebracht und im *Transwell* unten $0,5 \times 10^7$ CD45R-negative Zellen in 2 ml Medium. Die Zellen wurden anschließend wie in den einzelnen Versuchen angegeben stimuliert und bis zur Osteoklasten-Differenzierung inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf dem *Coverslip* bzw. auf der herausgetrennten *Transwell*-Membran mit 3,7 % Paraformaldehyd für 15 min fixiert, mit PBS gewaschen und mit 0,2 % TritonX-100 für 20 min permeabilisiert. Nach drei Waschschritten in PBS wurden die *Coverslips* in einer 1 ng/µl TRITC-Phalloidin-Lösung (PBS; 1 % BSA) für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die *Coverslips* dreimal in PBS gewaschen, bevor sie auf 50 µl der frisch filtrierten (ELF97 *spin-filters*, Invitrogen) ELF97-Lösung für 13 min bei RT inkubiert wurden. Die en-

zymatische Reaktion wurde durch Inkubation in 50 µl Stopp-Lösung angehalten (3x 4 min). Nach dreimaligem Waschen in PBS wurden die Zellen in einer 300 nM DAPI-Lösung (PBS) für 10 min inkubiert. Für weitere dreimal wurden die *Coverslips* in PBS gewaschen und einmal in H₂O_{dd}, bevor sie auf Einbettlösung (*Pro-long-Gold Antifade*, Molbio) auf einem Objektträger platziert wurden. Die herausgetrennte *Transwell*-Membran wurde in allen Schritten genauso behandelt wie die *Coverslips*. Die Fluoreszenzaufnahmen wurden mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Leica) mit einem 1.4 NA 63x Immersionsöl-Objektiv angefertigt. Zur Anregung von DAPI und ELF97 wurde UV-Licht (405 nm) verwendet. TRITC wurde mit sichtbarem Licht der Wellenlänge 561 nm angeregt. Zur Quantifizierung wurde die Anzahl an Osteoklasten je *Well* der 24-*Well* Platte bestimmt. Die Zählungen wurden von drei unabhängigen Personen durchgeführt. Hierbei zählte jede Zelle als Osteoklast, die multinukleär und TRAP-positiv war.

3.2.2.2.2 Immunfluoreszenzfärbungen Um die mit PMT differenzierten Osteoklasten näher zu charakterisieren wurden Oberflächenmarker mittels Immunfluoreszenz angefärbt (Abschnitt 4.1.4) und mit den in 3.2.2.2.1 beschriebenen Osteoklastenmarkern kombiniert. Dazu wurden die Zellen genauso wie in Abschnitt 3.2.2.2.1 beschrieben fixiert und permeabilisiert. Nach dem Permeabilisierungsschritt und den Waschschritten erfolgte hier direkt die ELF97-Färbung (siehe 3.2.2.2.1). Nach den drei Waschschritten in PBS erfolgte dann die Immunfluoreszenzfärbung. Dazu wurden die *Coverslips* zunächst in Blockierlösung für 1 h bei RT in einer dunklen Feuchtkammer inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation in primärer Antikörperlösung für 1 h bei 37 °C. Hierbei wurden die Antikörper 1:50 in PBS (1 % Albumin, 0,05 % Triton X-100) verdünnt. Nach drei Waschschritten in PBS (jeweils 4 min) wurden die Proben in sekundärer Antikörperlösung für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die sekundären Antikörper wurden dazu 1:25 in PBS (1 % Albumin, 0,05 % Triton X-100) angesetzt. Als Nächstes wurden die Zellen noch weitere dreimal in PBS gewaschen und dann mit DAPI gefärbt und eingebettet, wie in 3.2.2.2.1 bereits beschrieben.

3.2.2.2.3 TRAP-Färbung Um das Ergebnis aus der TRAP-Färbung mit dem ELF97 Phosphatase Substrat (3.2.2.2.1) noch mit einer alternativen Methode zu bestätigen, wurde eine klassische TRAP-Färbung mit dem *Acid Leukocyte Kit* (Sigma Aldrich) durchgeführt. Hierbei wird als Substrat die Naphthol AS-BI Phosphorsäure verwendet. Durch Spaltung dieses Substrates durch TRAP wird ein roter Azo-Farbstoff gebildet, der mittels Lichtmikroskopie detektiert werden kann. Dazu wurden $0,5 \times 10^7$ CD45R-positive Zellen in 2 ml Medium (RPMI, 10 % FCS, 1 % P/S, 50 µM β-Mercaptoethanol) je *Well* der 6-*Well*-Platte ausgebracht und entsprechend der jeweiligen Versuchsbedingungen bis zur Osteoklasten-Differenzierung stimuliert. Zur Durchführung der TRAP-Färbung wurde das Medium abgesaugt und die Zellen für 30 s in Fixierlösung inkubiert. Die Fixierlösung wurde nach Angaben des Herstellers aus Citrat, Aceton und 37 %-iger Formaldehyd-Lösung hergestellt. Nach der Inkubation wurde die Fixierlösung abgesaugt und möglichst schnell durch 37 °C warmes, entionisiertes Wasser ersetzt. In der Zwischenzeit wurde die Tartrat-haltige Färbelösung nach Prozedur B des Herstellerprotokolls frisch angesetzt und auf 37 °C erwärmt. Nach dem Absaugen des Wassers wurden die Zellen mit 1 ml der Färbelösung für 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurden

die Wells dreimal mit entionisiertem Wasser gespült, die Zellen im Lichtmikroskop untersucht und fotografiert.

3.2.2.2.4 Kathepsin K Aktivitäts-Test Bei der Durchführung des Kathepsin K Aktivitäts-Tests wurden zunächst 1×10^5 Makrophagen (RAW264.7 Zellen) je Well der 6-Well-Platte ausgebracht. Die Zellen wurden stimuliert und nach vier Tagen der Osteoklasten-Differenzierung wurde der Test durchgeführt. Hierbei wurden die Angaben des Herstellers befolgt (Abcam). Die 6-Well Platte wurde auf Eis gestellt und das Medium abgesaugt. Die Zellen wurden mit 1 ml eiskaltem PBS gewaschen und dann in 1 ml PBS mit Hilfe eines Zellschabers von der Platte gelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt (13000 rpm, 1 min, 4 °C). Das zelluläre Pellet wurde in 50 µl Kathepsin K Zell-Lysepuffer aus dem Kit für 10 min auf Eis lysiert und die Zelltrümmer entfernt (15000 rpm, 5 min, 4 °C). Die Menge an Protein wurde mit einem BCA Assay (Pierce) ermittelt und zwischen den einzelnen Proben angeglichen (10 µg Protein in 50 µl Lysepuffer je Well einer 96-Well-Platte). Als Nächstes wurden 50 µl des Kathepsin K Reaktionspuffers und das Ac-LR-AFC Substrat (200 µM) je Well hinzugefügt. Nachdem die Platte für 1 h bei 37 °C inkubiert wurde, wurde die Fluoreszenz mit einem Fluorometer mit einer Anregungs-Wellenlänge von 355 nm und einer Emissions-Wellenlänge von 520 nm gemessen.

3.2.2.2.5 Zellulärer Viabilitätstest Als Maß für die Viabilität von Zellen wurde ihr ATP-Gehalt mit Hilfe eines kommerziell erwerblichen Kits (*CellTiter-Glo Assay*, Promega) bestimmt. Dazu wurden 4×10^3 RAW264.7 Zellen je Well einer 96-Well-Platte in Medium (DMEM, 2,5 % FCS, 1 % P/S) ausgebracht und in Triplikaten stimuliert. Nach 24 h wurde das Medium abgesaugt und die Zellen in 50 µl des Lysepuffers lysiert. Nach Überführung in eine lichtundurchlässige 96-Well-Platte, wurden 50 µl des *CellTiter-Glo* Reagenzes zugefügt, die Platte für 2 min auf einem Schüttler inkubiert und nach weiteren 10 min Inkubationszeit an einem Luminometer gemessen.

3.2.2.2.6 Zellulärer Apoptosetest Um auszuschließen, dass in der vorliegenden Arbeit mit Zellen gearbeitet wurde, die apoptotische Prozesse eingeleitet haben, wurde die Aktivität der Caspasen 3 und 7 gemessen. Caspasen sind bedeutende Effektoren der Apoptose und können so als Zeichen für die Einleitung des Prozesses analysiert werden. Hierzu wurde ein speziell für diese Anwendung ausgerichtetes Kit benutzt (*Caspase-Glo® 3/7 Assay*, Promega). RAW264.7 Zellen wurden zu 4×10^3 Zellen je Well der 96-Well-Platte ausgebracht und 24 h stimuliert. Nachdem das Medium abgesaugt wurde, wurden die Zellen in 50 µl des *Caspase-Glo* Lysepuffers lysiert. Durch Zugabe von 50 µl des *Caspase-Glo* Reagenzes, das das Substrat der Caspasen beinhaltet, konnten die Proteasen ihre Aktivität entfalten und so ein Lichtsignal generieren. Die Platten wurden nach Zugabe des Reagenzes bei 300 rpm für 30 s geschüttelt, für 1 h bei RT inkubiert und anschließend am Luminometer das Lichtsignal als Maß der Caspase 3/7 Aktivität gemessen.

3.2.2.3 Proteomik

3.2.2.3.1 Bestimmung des Sekretoms Es wurden 2×10^7 Knochenmarkszellen (3.2.1.2.1) je Well der 6-Well-Platte in 2 ml Medium (RPMI, 10 % FCS, 1 % P/S, 10 μ M β -Mercaptoethanol) ausgebracht und mit PMT stimuliert bzw. unstimuliert gelassen. Nach einer zweitägigen Differenzierung mit PMT erfolgte ein Mediumwechsel zu serumfreiem Medium. Dazu wurden die Zellen fünfmal mit 37 °C warmem PBS gewaschen und wieder in 2 ml Medium (RPMI, 1 % P/S) in die Wells der 6-Well-Platte zurückpipettiert und stimuliert. Nach 4 h wurden die Zellen erneut wie oben beschrieben gewaschen und in Hungermedium ausgebracht und stimuliert. Nach 24 h wurden die Überstände abgenommen (1000 rpm, 5 min, 4 °C), auf Eis gelagert und mit Protease-Inhibitor (Roche) versetzt und bei –80 °C eingefroren. Um sicherzustellen, dass das Hungern die Zytokinsekretion PMT-stimulierter Zellen nicht inhibierte, wurde die IL-1 Sekretion überprüft. Es ist bekannt, dass PMT-stimulierte Immunzellen Produzenten dieses Zytokines sind [236]. Nach Durchführung einer Proteinbestimmung nach Bradford wurden die Proteinkonzentrationen der Proben angeglichen. Als Nächstes wurden die Proben mit Hilfe eines Filterkonzentrators (Centriprep YM-3, 3 kDa NMGG, Millipore) mit einer Durchlässigkeit für Proteine mit einer Größe kleiner als 3 kDa ankonzentriert. Anschließend wurde das Sekretom durch Massenspektrometrie (LTQ Orbitrap XL mass, Thermo Fisher Scientific) am DKFZ (Dr. Martina Schnölzer, Heidelberg) bestimmt.

3.2.2.3.2 Bestimmung des Proteoms mit der DIGE Technik Um Unterschiede im Proteom PMT-stimulierter zu M-CSF/sRANKL und M-CSF-stimulierter Zellen zu untersuchen, wurde eine „Difference-in-gel-electrophoresis“ (DIGE)-Technik durchgeführt. Dazu wurden Osteoklasten aus primären Makrophagen, wie in (3.2.1.2.3) beschrieben, generiert (biologische Triplikate). Es wurden 3×10^7 Zellen aus einem Ansatz lysiert. Dazu wurden diese zunächst dreimal mit Waschpuffer gewaschen und nach der vollständigen Entfernung des Waschpuffers in 150 μ l THC Puffer lysiert. Anschließend wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt (Roti®Quant, Roth) und die Proteinkonzentrationen mit THC-Puffer so angeglichen, dass jede Probe insgesamt 100 μ g Protein beinhaltete. Die folgende Durchführung und Auswertung der DIGE-Analysen wurde von Dr. Konrad Bode (Medizinische Mikrobiologie, Uniklinikum Heidelberg) durchgeführt. Die Proben wurden mit Hilfe eines Färbe-Kits der Firma GE Healthcare gefärbt (Amersham CyDye DIGE Fluor minimal dye labeling kit). Dazu wurde das Protokoll nach Herstellerangaben durchgeführt. Alle Proben wurden einmal mit Cy5 und einmal mit Cy3 gefärbt während die Normalisierungskontrolle (alle Proben vereint) immer Cy2 gefärbt wurde. Anschließend wurden die zu vergleichenden Proben (Cy2 und Cy3 gefärbt) mit der Cy2-gefärbten Normalisierungskontrolle gemischt und zweidimensional nach isoelektrischem Punkt und Molekulargewicht aufgetrennt. Zunächst wurde ein kommerziell erworbener IPG-Streifen in 450 μ l eines Rehydratisierungspuffers in eine Rehydratisierungskassette gelegt und mit 2 ml Silikonöl DC 200 überschichtet und für 8 h einer Quellung unterzogen. Anschließend wurden die Proben auf den IPG-Streifen aufgetragen und in der ersten Dimension mit dem IPGphor 3 System der Firma GE Healthcare nach ihrer isoelektrischen Fokussierung aufgetrennt (20 °C, $I \leq 25 \mu$ A). Anschließend erfolgte die Äquilibrierung der IPG-Streifen durch Inkubation für

15 min in Reduzierungspuffer (Reduktion und Spaltung der Disulfidbrücken) und für 15 min in Alkylierungspuffer. Der nächste Schritt war die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht in der zweiten Dimension. Dazu wurden die IPG-Streifen in Tris-Puffer abgespült, in die Elektrophoresekammer gelegt und mit Agaroselösung überzogen. Die Proteine wurden über ein Gradientengel (8 %-15 %) in einem Ettan DALT II System (GE Healthcare) zunächst bei 15 – 20 °C für 30 min bei 100 mV und dann für ca. 4-5 h bei 350 mV aufgetrennt. Anschließend wurden die Gele mit dem Typhoon 9400 Laser Scanner (GE Healthcare) bei den verschiedenen Wellenlängen gescannt und mit Hilfe der DeCyder 2D Software (Amersham Bioscience) analysiert. Die Spots wurden auf Cy2 normalisiert und statistisch differentiell regulierte Proteinspots auffindig gemacht ($p < 0,05$ Student's t-Test; Average ratio ± 1.5). Das Gel, aus dem die Proteine ausgestanzt werden sollten, wurde mit dem Farbstoff Sypro Ruby (Invitrogen) gefärbt. Es wurden 30 Proteinspots selektiert. Die Zuordnung der Spots erfolgte mit dem BVA Modul der DeCyder Software. Die Spots wurden mit einem Gerät automatisch gepickt (Ettan Spot Picker, GE Healthcare) und in eine 96-Well-Platte überführt. Die Spots wurden mittels Massenspektrometrie (LTQ Orbitrap XL mass, Thermo Fisher Scientific) von Dr. Martina Schnölzer (DKFZ, Heidelberg) oder Prof. Kathrin Thedieck (Universität Groningen, Niederlande) analysiert. Die Ergebnisse wurden mit der aktuellen SwissProt Datenbank für *mus musculus* (Maus) mit dem Suchalgorithmus „Mascot“ und mit dem Programm „Proteome Discoverer“ verglichen.

3.2.3 Molekularbiologische Methoden

3.2.3.1 mRNA Expressionsanalysen

3.2.3.1.1 RNA Isolation Zur Quantifizierung spezifischer mRNA wurden 1×10^6 Zellen je Well der 6-Well-Platte in einem Volumen von 2 ml ausgebracht und entsprechend der Versuchsbedingungen stimuliert. Die zelluläre RNA wurde mit dem „*High Pure RNA Isolation Kit*“ (Roche) isoliert. Hierbei wurde das Protokoll des Herstellers bei der Durchführung befolgt. Die Aufreinigung mit dem Kit beinhaltete den Verdau von genomischer DNA mit dem Enzym DNaseI. Aus der isolierten RNA wurde cDNA hergestellt (3.2.3.1.2).

3.2.3.1.2 cDNA Synthese aus mRNAs Die Synthese von cDNA erfolgte mit einem kommerziellen Kit, dem „*RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit*“ (Fermentas). Dabei wurden für die cDNA-Erststrang-Synthese *Oligo-(dT)₁₈-Primer* verwendet, die im Kit bereitgestellt wurden. Die Anlagerung dieser Primer an den Poly(A)-Schwanz diente der M-MuLV reversen Transkriptase als Startsequenz. Der „*RiboLock RNase Inhibitor*“ aus dem Kit wurde verwendet um Degradation der RNA zu verhindern. Die Herstellung der cDNA erfolgte nach Anweisung des Herstellers. Als Kontrolle, ob eine Verunreinigung mit genomischer DNA vorliegt, wurde bei einer Probe keine Reverse Transkriptase (RT) hinzugefügt. Die cDNA wurde mit 40 μ l sterilem H₂O (*aqua ad injectabilia*) verdünnt und bei –20 °C bis zur Verwendung für die quantitative *Real Time-PCR* (qRT-PCR) (3.2.3.1.3) gelagert.

3.2.3.1.3 quantitative Real-time-PCR zur mRNA Expressionsanalyse Um eine spezifische cDNA aus dem in (3.2.3.1.2) synthetisierten cDNA-Mix zu quantifizieren, wurde eine qRT-PCR mit dem „*Absolute QPCR SYBR Green ROX Mix*“ (Thermo Scientific, Langenselbold) durchgeführt. Die Primer für die untersuchten Zielgene wurden mit Hilfe der „*Primer3*“ Software (*Whitehead Institute for Biomedical Research*, Cambridge, USA) entworfen und von der APARA-BIOSCIENCE GmbH (Denzlingen) hergestellt. Als Fluoreszenzfarbstoff für die Quantifizierung diente SYBR Green, welches an doppelsträngige DNA bindet und ein Fluoreszenzsignal emittiert, das von dem *Real-time Cycler* gemessen werden kann. Mit zunehmenden PCR-Zyklen nimmt daher auch die Fluoreszenzstärke in Abhängigkeit von der Menge an einem spezifischem Ausgangsprodukt zu. Dabei wird die benötigte Anzahl an Zyklen für das Erreichen eines bestimmten Fluoreszenz-Schwellenwertes aufgezeichnet, der sogenannte Ct-Wert (*threshold cycle number*). Bei der Durchführung wurde aus dem zweimal konzentrierten „*Absolute QPCR SYBR Green ROX Mix*“, sterilem H₂O (*aqua ad injectabilia*) und den entsprechenden Vorwärts- und Rückwärts-Primern ein *Master-Mix* hergestellt. Für eine PCR-Reaktion wurden 22,5 µl dieses *Master-Mixes* eingesetzt und 2,5 µl der in (3.2.3.1.2) generierten cDNA hinzugefügt. Die Konzentration der *Primer* je PCR-Ansatz war 250 nM und von jeder Probe wurden Duplikate erstellt. Als Kontrolle der Reinheit der Reagenzien wurde ein Ansatz erstellt, in dem statt der cDNA H₂O eingesetzt wurde. Nach dem Versiegeln der PCR-Platte mit einer hitzebeständigen Adhäsionsfolie, wurde die qRT-PCR in dem *Real-Time Cycler* (7900 HAT Fast *Real-Time* PCR System) durchgeführt und folgendes Programm für die Amplifikation verwendet: 95 °C, 15 min; 40x [95 °C, 15 s; 60 °C, 1 min]. Der Fluoreszenz-Schwellenwert wurde von der Programm-Software automatisch gewählt (SDS 2.2.1). Die Schmelzkurven der einzelnen Proben wurden analysiert, um die Entstehung spezifischer Produkte zu überprüfen. Des Weiteren wurden die Schmelzkurven beider Kontrollen aus Abschnitt 3.2.3.1.2 (kein RT Enzym bzw. keine Matritze) kontrolliert, um sicherzustellen, dass hier kein unspezifisches Produkt entstanden ist. Zur Ergebnisdarstellung wurde aus den Doppelbestimmungen der Mittelwert der Ct-Werte berechnet. Anschließend wurde die Expression des Zielgens mit der Expression eines Referenzgens normalisiert, das nicht von der Zelle reguliert wird, wie zum Beispiel *Rps29* (S29) oder *GAPDH*. Dies sollte verhindern, dass unterschiedliche Mengen an eingesetzter cDNA das Ergebnis verfälschen. Für diese Normalisierung wurde der Ct-Wert des Haushaltsgens von dem Ct-Wert des Zielgens subtrahiert und der sogenannte ΔCt Wert bestimmt. Für die Berechnung der relativen Expression (rE) wurde folgende Formel zu Grunde gelegt: $rE = 1/(2^{\Delta Ct})$.

3.2.3.2 miRNA Expressionsanalysen

3.2.3.2.1 Isolierung von miRNA Für die quantitative Analyse der Expression spezifischer miRNAs wurden 1×10^6 Zellen je *Well* einer 6-*Well*-Platte in 2 ml Medium ausgebracht und entsprechend behandelt. Die Zellen wurden geerntet und zwei Mal in 1000 µl PBS gewaschen und anschließend in 400 µl Lysierlösung aus dem „*mirVana™ miRNA Isolation Kit*“ (Applied Biosystems) aufgenommen und lysiert. Dieses Kit wurde für die Isolierung von kleinen RNA-Molekülen wie *small interfering* RNAs (siRNAs) und miRNAs entworfen, die sich auf Grund ihrer sehr kleinen Größe mit den gängigen RNA-Aufreinigungsmethoden schwierig in quantitativen Mengen isolieren ließen. Die

Isolation besteht aus einer organischen Extraktion und einer anschließenden Festphasenaufreinigung von RNA an Glasfasern. Die Aufreinigung wurde entsprechend des Protokolls der Firma durchgeführt. Im ersten Schritt wurde die RNA mit Säure-Phenol-Chloroform (*ambion by life technologies*) extrahiert. Im zweiten Schritt der Aufreinigung wurde das Protokoll des Herstellers für die Isolierung der gesamten RNA befolgt. Dies ermöglichte es in den gleichen Proben sowohl die Expression von mRNAs als auch von miRNAs zu analysieren. Die RNA wurde in 60 µl Eluier-Lösung am Ende des Protokolls von der Festphase gelöst und sofort auf Eis gelagert. Die RNA-Konzentrationen der einzelnen Proben wurden spektrophotometrisch mit Hilfe des Nanodrop Gerätes bei 260 nm bestimmt. Dabei wurde eine Verunreinigung mit Proteinen durch die Messung der Absorption bei 280 nm, die Wellenlänge, bei der Proteine charakteristischer Weise absorbieren, ausgeschlossen. Mit den Ergebnissen dieser Messung wurden anschließend die RNA-Konzentrationen aller Proben angeglichen. Im nächsten Schritt wurden die RNA-Präparationen von kontaminierender DNA befreit. Hierzu wurde das „DNA-free™ Kit“ (*ambion by life technologies*) nach Angaben des Herstellers verwendet: 11 µl RNA wurden mit 1,2 µl 10-fach konzentriertem Puffer und 1 µl DNase vermischt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 2 µl „DNase Inactivation Reagent“ zugegeben, gevortext und 2 min bei RT inkubiert. Es wurde bei 9000 rpm für 90 s zentrifugiert und 5 µl des Überstandes wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für die cDNA-Synthese (3.2.3.2.2) eingesetzt.

3.2.3.2.2 cDNA Synthese aus miRNA Für die Generierung von cDNA aus der isolierten miRNA bzw. der mRNA wurde das „miScript Reverse Transcription Kit“ (Qiagen) verwendet. Dazu wurde nach Herstellerangaben ein *Master-Mix* aus 5x miScript-Puffer, RNase-freiem Wasser und der reversen Transkriptase aus dem Kit hergestellt und 15 µl davon zu den 5 µl isolierter RNA aus (3.2.3.2.1) gegeben. Des Weiteren wurde eine Kontrolle erstellt, bei der keine reverse Transkriptase hinzugefügt wurde. Die Reaktionsgefäße wurden für 60 min bei 37 °C erhitzt und daraufhin für 5 min bei 95 °C, um die reverse Transkriptase zu inaktivieren. Die cDNA wurde entweder bei –20 °C eingefroren oder direkt für die *real-time* PCR eingesetzt (3.2.3.2.3).

3.2.3.2.3 quantitative Real-time-PCR zur miRNA Expressionsanalyse Die cDNAs aus 3.2.3.2.2 wurden mit 40 µl H₂O (*aqua ad injectabilia*) verdünnt. Für die quantitative *Real-time*-PCR wurden das „miScript SYBR® Green PCR Kit“ und die Ziel-spezifischen „miScript Primer Assays“ der Firma Qiagen verwendet. Für die Analyse von reifen miRNAs aus der synthetisierten cDNA wurde entsprechend der Angaben des Herstellers ein *Master-Mix* aus dem „2x QuantiTect SYBR Green Master-Mix“, den „10x miScript Universal Primers“ (Rückwärts-Primer) und dem entsprechenden spezifischen „10x miScript Primer Assay“ (Vorwärts-Primer) erstellt. Für eine PCR-Reaktion wurden 22,5 µl dieses *Master-Mixes* eingesetzt und 2,5 µl der in 3.2.3.2.2 generierten cDNA hinzugefügt. Es wurden von jeder Probe Duplikate erstellt. Als Kontrolle der Reinheit der Reagenzien wurde ein Ansatz erstellt, in dem statt der cDNA H₂O eingesetzt wurde. Nach dem Versiegeln der PCR-Platte mit einer Hitze-beständigen Adhäsionsfolie wurde die qRT-PCR in dem *Real-Time Cycler* (7900 HAT *Fast Real-Time PCR System*) durchgeführt und folgendes Programm für die Amplifikation verwendet: 95 °C, 15 min; 40x [94 °C, 15 s; 55 °C, 30 s; 70 °C, 30 s]. Zur Normalisierung wurde der „Primer

Assay“ für die kleine, nukleäre RNA RNU6b verwendet. Die Auswertung erfolgte wie in Abschnitt 3.2.3.1.3 für die mRNA Expressionsanalyse beschrieben.

3.2.4 Statistik

Die Darstellung der Replikate erfolgte als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM). Statistische Analysen wurden mit Hilfe der GraphPad Prism 5.0. Software durchgeführt. Signifikante Unterschiede zwischen zwei Datensätzen wurden mit dem *Student's t*-Test ermittelt. Die in den Abbildungen dargestellten *, ** und *** geben die ermittelten p-Werte $<0,05$, $<0,01$ und $<0,001$ an.

4

Kapitel 4

Ergebnisse

4.1 Einfluss von B-Zellen auf die PMT-induzierte Osteoklastendifferenzierung

In dieser Arbeit sollte gezeigt werden, wie PMT eine gesteigerte Differenzierung von Osteoklasten bewirken kann und welche Rolle dabei Zellen des Immunsystems zukommt. Auch wenn das Leitsymptom einer bakteriellen Infektion von Schweinen mit toxischen *Pasteurella multocida* Stämmen in der Veterinärmedizin schon lange bekannt ist, nämlich die atrophische Rhinitis [237, 238], steht die Wissenschaft erst am Anfang, die detaillierten Mechanismen der gesteigerten Osteoklastendifferenzierung mit PMT aufzuklären. Unklar ist ferner wie Bakterien von dieser Manipulation der Wirtszellen Vorteile für ihr Überleben schlagen könnten. Viele wissenschaftliche Arbeiten mit verschiedenen murinen und porcinen Modellsystemen konnten zeigen, dass PMT eine gesteigerte Osteoklastenbildung bewirkt. Diese Arbeiten untersuchten aber nicht im Detail, ob PMT direkt auf Osteoklastenvorläufer wirkt oder indirekt benachbarte Zellen dazu stimuliert Botenstoffe zu synthetisieren, die den Prozess der Osteoklastogenese auf parakrine oder juxtakrine Weise fördern, da keine isolierten Vorläuferzellen verwendet wurden [128, 134, 136]. Eine kürzlich erschienene Veröffentlichung konnte zeigen, dass aufgereinigte Osteoklastenvorläuferzellen (CD14⁺ Monozyten aus dem murinen Knochenmark) bzw. RAW264.7 Zellen direkt mit PMT zu Osteoklasten differenziert werden können [23]. Des Weiteren wurde in unserer Arbeitsgruppe publiziert, dass die PMT-stimulierte Osteoklastendifferenzierung abhängig von der Anwesenheit von B-Zellen ist [24]. Es konnte gezeigt werden, dass PMT-stimulierte Osteoklastenvorläufer (CD11b⁺ Makrophagen) in einer Ko-Kultur mit B-Zellen (CD45R⁺ Zellen) um 50 % effektiver zu Osteoklasten differenzieren als ohne [24]. Aus diesen Daten ergab sich ein Teilaspekt der vorliegenden Arbeit: Die Beantwortung der Frage, welche Rolle B-Zellen für die PMT-induzierte Osteoklastogenese spielen.

4.1.1 Visualisierung PMT-induzierter Osteoklasten

In früheren Untersuchungen wurde bereits gezeigt, dass die Stimulation der gesamten Mischung an isolierten Knochenmarkszellen bzw. aller mononukleären Zellen mit PMT effektiv zu einer Differenzierung von Osteoklasten führt [24, 135]. Dies sollte zunächst bestätigt werden. Darüber hinaus sollte die Visualisierung der PMT-generierten Osteoklasten für die konfokale Mikroskopie optimiert werden. Diese Optimierung war ein wichtiger Schritt um die Osteoklasten weiter charakterisieren zu

können, da sich Osteoklasten nach ihrer Reifung nur schwer von der Zellkulturoberfläche in quantitativer und lebensfähiger Weise loslösen lassen [239] und daher eine Analyse mittels klassischer proteom-biochemischer Methoden wie FACS oder *Western Blot* nicht möglich war. Als Osteoklasten gelten Zellen, die mehrere Nuklei besitzen und das Enzym Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP) exprimieren [175]. Das Enzym TRAP befindet sich in transzytotischen Vesikeln und ist am Abbau von Kollagen, einem wichtigen Bestandteil des Knochens, beteiligt [176]. Luis Filgueira hat eine Fluoreszenz-basierte Methode für die spezifische Färbung des Enzyms TRAP mit Hilfe von ELF97, einem Phosphatase-Substrat, entwickelt [235]. Diese Methode basiert darauf, dass in Anwesenheit von Tartrat nur das Enzym TRAP einen Phosphatrest von ELF97 abspalten kann. Diese Modifikation führt zu der Entstehung eines grünen Fluoreszenzsignales, das mit einem konfokalen Mikroskop detektiert werden kann. Diese spezifische TRAP Fluoreszenzfärbung wurde in dieser Arbeit für die Visualisierung von Osteoklasten in Kombination mit einer Färbung der Zellkerne mit DAPI angewandt. Dazu wurden murine Knochenmarkszellen, die aus Femur und Tibia isoliert wurden, mit PMT stimuliert. Innerhalb von drei bis fünf Tagen war bei den PMT-stimulierten Zellen schon eine drastische Veränderung der Morphologie der Zellen zu erkennen: Es waren zahlreiche Riesenzellen entstanden, mit typischer Osteoklastenmorphologie und einem Durchmesser, der zwischen 40-100 μm lag. Die Fluoreszenzfärbung konnte bestätigen, dass es sich dabei tatsächlich um Osteoklasten handelt: Wie in Abbildung 4.1 zu sehen ist, konnte TRAP spezifisch im Zytoplast PMT-stimulierter Zellen nachgewiesen werden (grüne Spots), jedoch nicht in Kontrollzellen. Auch ein weiteres typisches Merkmal von Osteoklasten, die Multinuklearität (≥ 3 Zellkerne) konnte bei den PMT-behandelten Zellen bestätigt werden. Die Zellen besaßen im Durchschnitt 5-10 Zellkerne. Somit konnte die Differenzierung von Osteoklasten aus einer Mischung an Knochenmarkszellen bestätigt werden und die optimalen Färbebedingungen für PMT-stimulierte Osteoklasten, wie in 3.2.2.2.1 des Methodenteils geschildert, etabliert werden.

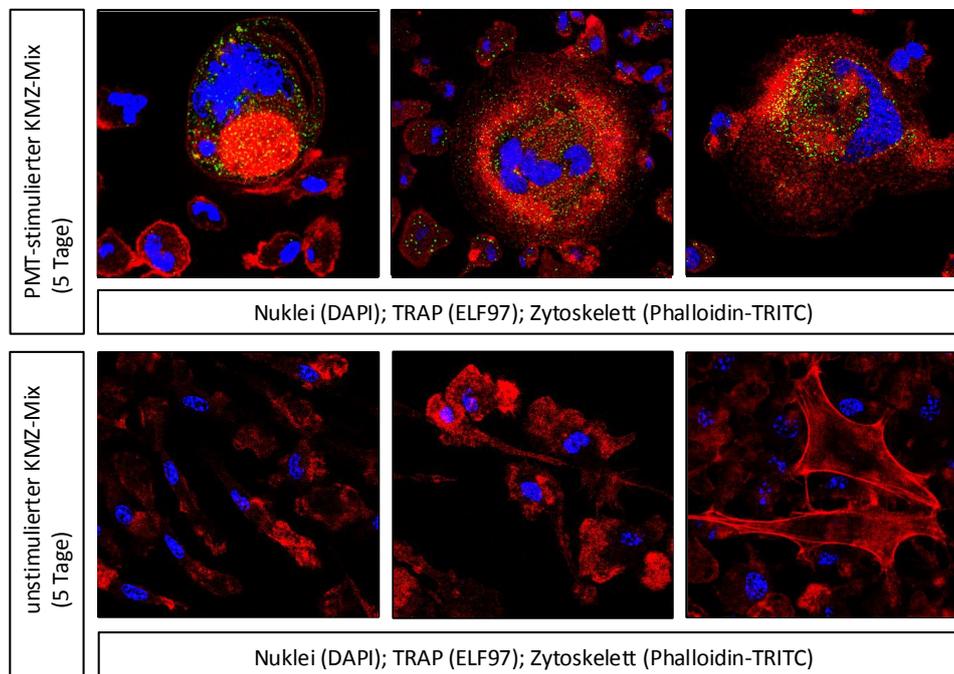


Abbildung 4.1: **PMT-stimulierte Knochenmarkszellen differenzieren zu Osteoklasten.** Knochenmarkszellen wurden für fünf Tage mit PMT (5 nM) stimuliert bzw. nicht stimuliert. Die zelluläre TRAP-Expression wurde durch eine enzymatische Fluoreszenzmarkierung mit dem ELF97 Substrat visualisiert (grün). Das Zytoskelett der Zellen wurde mit TRITC-gekoppeltem Phalloidin (rot) und die Nuklei mit DAPI (blau) Fluoreszenz-markiert. Die Bilder wurden mit einem konfokalen *Laser-Scanning*-Mikroskop mit einem vergrößerungsstarken Objektiv (63-fach) erstellt. Die Bilder zeigen repräsentativ die veränderte Morphologie PMT-stimulierter Zellen im Vergleich zu unbehandelten Knochenmarkszellen, die in drei unabhängigen Versuchen so beobachtet wurde.

Während der klassischen Differenzierung von Osteoklasten mit RANKL kommt es zu einem starken Umbau der Aktinfilamente, der als Vorbereitung für deren bevorstehende Funktion als knochenresorbierende Zellen vonstatten geht. Es bildet sich ein sogenannter Aktin-Ring um die Zelle, der ein isoliertes, spezialisiertes Membranareal erschafft, die sogenannte abgedichtete Zone (*Sealing Zone*), in der die Knochenresorption abläuft, da die osteolytischen Substanzen (Kathepsin K, H^+CL^-) in diese Zone auf polare Weise sekretiert werden (siehe Abbildung 2.6) [240, 241]. Wilson *et al.* zeigen Fluoreszenzaufnahmen des Aktin-Ringes klassischer, muriner, RANKL-stimulierter Osteoklasten, der mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppeltem Phalloidin gefärbt wurde [242]. Phalloidin bindet selektiv an F-Aktin-Filamente und kann diese somit für die Fluoreszenzmikroskopie sichtbar machen. PMT kann das Aktin-Zytoskelett von Fibroblasten durch Aktivierung der kleinen GTPase RhoA via G_q und $G_{12/13}$ umorganisieren (siehe Abbildung 2.3) und die Bildung von Stressfasern bewirken [65, 66]. Da RhoA auch kritisch für die Podosomalorganisation, Beweglichkeit und Knochenresorp-

tion von Osteoklasten ist [243], sollte das Zytoskelett PMT-induzierter Osteoklasten zur Analyse von Strukturmerkmalen visualisiert werden. Abbildung 4.1 zeigt die TRITC-Phalloidin-Färbung des Aktinfilamentes (rot). Osteoklasten, die durch PMT-Stimulation differenziert sind, scheinen sich von den klassischen RANKL-Osteoklasten durch das Fehlen des charakteristischen Aktin-Ringes um den Zellsaum herum zu unterscheiden. Allerdings kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass dieser sich erst auf einem natürlicheren Substrat, der Knochenmatrix, ausbildet. Die Aktinfilamente scheinen zunächst keine geordnete Struktur aufzuweisen, sondern sich auf die ganze Zelle zu verteilen. Es wurde beschrieben, dass sich Osteoklasten mit einer flachen Morphologie ohne spezifische Aktinstruktur in einem migrierenden Zustand befinden [244]. Auch wenn sich die PMT-stimulierten Osteoklasten morphologisch von den klassischen Osteoklasten unterscheiden, besitzen sie dennoch keinen Defekt in ihrer Funktion Knochen zu resorbieren. Dies wurde in Abbildung 4.22 E anhand der Aktivität der Osteoklasten-spezifischen Protease Kathepsin K, sowie in der Veröffentlichung Kloos *et. al* durch die Entstehung von Resorptionslakunen auf knochenähnlicher Matrix gezeigt [380].

4.1.2 Identifikation des B-Zell Sekretoms

Bei der Aufklärung möglicher Mechanismen wie B-Zellen zu einer gesteigerten Osteoklastendifferenzierung mit PMT beitragen könnten, ist ein mögliches Szenario, dass PMT-stimulierte B-Zellen so manipuliert werden, dass sie lösliche Faktoren sekretieren, die die Differenzierung von klassischen hämatopoetischen Vorläuferzellen zu Osteoklasten fördern. Hildebrand *et al.* haben gezeigt, dass PMT-stimulierte B-Zellen mehr pro-inflammatorische Zytokine IL-1, IL-6 oder TNF- α freisetzen als IL-7 stimulierte Kontroll-B-Zellen [24]. Es ist bekannt, dass die pro-inflammatorischen Zytokine eine Osteoklastogenese-fördernde Wirkung besitzen [245-247]. Bei der Pathogenese der Rheumatoïden Arthritis (RA) kommt es zu einer chronischen Inflammation und dadurch zu einer gesteigerten Aktivierung von Osteoklasten was letztlich die Zerstörung von Gelenken bewirkt. In der Synovialflüssigkeit der Gelenke von Patienten mit RA finden sich viele infiltrierte B-Zellen, die als eine der größten Quellen für die Produktion von RANKL beschrieben wurden [248]. Eine erhöhte RANKL-Expression konnte auch für PMT-stimulierte B-Zellen gezeigt werden [24]. Da sich im Sekretom PMT-stimulierter B-Zellen vermutlich viele weitere Faktoren befinden, die eine Osteoklastogenese-fördernde Wirkung haben könnten und eventuell als solche sogar vorher noch nicht beschrieben worden sind, sollte in der vorliegenden Arbeit das Sekretom PMT-stimulierter B-Zellen bestimmt werden. Dazu wurden Überstände PMT-stimulierter Zellen und unstimulierter Zellen für eine Massenspektrometrieanalyse generiert. Nach einem initialen Differenzierungsschritt von zwei Tagen wurden das im Kulturmedium enthaltene fetale Kälberserum (FCS) und PMT durch wiederholtes Waschen entfernt, bis anhand einer Silberfärbung gezeigt werden konnte, dass das im FCS enthaltene Albumin und Immunglobuline komplett entfernt wurden. Nach einer Inkubation über Nacht in serumfreiem Medium wurden die Überstände entnommen und mit Hilfe eines zentrifugalen Filterkonzentrators (Durchlässigkeit für Proteine ≤ 3 kDa) ankonzentriert und mittels Massenspektrometrie (durchgeführt von Dr. M. Schnölzer (DKFZ Heidelberg)) analysiert. Bei der Analyse wurden 421 Proteine aus den Überständen PMT-stimulierter Zellen und 306 Proteine aus den Überständen unstimulierter

Zellen detektiert. Davon waren 287 Proteine in beiden Überständen präsent und nur 134 Proteine waren der Stimulation mit PMT zuzuschreiben. Die detektierten Proteine waren hauptsächlich intrazelluläre Proteine und nur ein paar wenige Treffer waren darunter sekretorische Proteine (siehe Tabelle 4.1). Folgeexperimente zeigten, dass durch das häufige Waschen der Zellen nach dem initialen Differenzierungsschritt ein Teil der Zellen apoptotisch wurde und dadurch das Sekretom durch Apoptose-bedingte Freisetzung von intrazellulären Proteinen maskiert wurde. Wie Optimierungsversuche zeigten, war es nicht möglich weniger zu waschen, da dann das Sekretom durch Proteine aus dem FCS wiederum maskiert wurde. Diese Problematik konnte in der vorliegenden Arbeit nicht gelöst werden, weshalb alternativ eine DIGE-Analyse angewandt wurde, um das Proteom PMT-stimulierter Zellen zu untersuchen (siehe Kapitel 4.4). Unter den Proteinen, die im PMT-Sekretom zu finden waren (Tabelle 4.1), war unter anderem Lipocortin I. Interessanterweise konnte für dieses Protein gezeigt werden, dass es durch die miRNA21 reguliert wird und den mTOR-P70s6K1 Signalweg aktivieren kann [249,250]. Dieser Signalweg hat sich als bedeutend für die PMT-induzierte Osteoklastogenese herausgestellt, wie in Kapitel 4.5 der vorliegenden Arbeit gezeigt wird. Auch Neuroleukin ist ein interessanter Treffer, da diesem Molekül eine Rolle bei der Knochenentwicklung und Regeneration zugeschrieben wurde [251].

Molekül	Funktion
Lipocortin I	Lipocortin I ist ein Ziel der miRNA21 und kann den mTOR-S6 Signalweg aktivieren [249, 250, 252, 253].
Neuroleukin	Neuroleukin wird von Lektin-stimulierten T-Zellen sezerniert und stimuliert die Immunglobulin-Synthese von peripheren, mononukleären Zellen. Darüber hinaus wurde Neuroleukin eine Rolle in der Knochenentwicklung und Regeneration zugeschrieben [251, 254].
<i>Neutrophil Gelatinase-associated lipocalin precursor</i> (NGAL)	NGAL wurde als bakteriostatisches Molekül beschrieben, dessen Sekretion unter anderem durch pro-inflammatorische Zytokine stimuliert werden kann [255].
S100 proteins (A8, A9, A11)	S100 Proteine können als Leukozyten Chemoattraktanzien und Makrophagenaktivatoren agieren [256].

Tabelle 4.1: Ergebnis der Sekretom-Analyse drei Tage PMT-stimulierter Knochenmarkszellen. Knochenmarkszellen wurden für zwei Tage mit PMT (5 nM) in serumhaltigem Kulturmedium stimuliert bzw. nicht stimuliert. Nach ausgiebigem Waschen wurden die Zellen für 24 h in serumfreiem Medium kultiviert. Die Überstände wurden mit einem Filterkonzentrator (Centriprep YM-3) mit einer Durchlässigkeit für Proteine ≤ 3 kDa ankonzentriert und massenspektrometrisch von Dr. M. Schnölzer (DKFZ) analysiert. In der Tabelle sind Proteine aufgelistet, die charakteristischerweise nur in den Überständen PMT-stimulierter Zellen zu finden waren, nicht aber in den Überständen unbehandelter Zellen.

4.1.3 PMT stimulierte B-Zellen (CD45R⁺) differenzieren zu Osteoklasten

Eine weitere Möglichkeit, wie B-Zellen die durch PMT eingeleitete Osteoklastendifferenzierung aus klassischen, myeloiden Vorläuferzellen steigern könnten, wäre die Ausbildung von unterstützenden direkten Zell-Zell-Kontakten. Für mesenchymale Zellen (Knochenmarksstromazellen oder Osteoblasten) konnte gezeigt werden, dass sie die *in vitro*-Differenzierung von Osteoklasten durch direkte Zell-Zell-Kontakte unterstützen [257]. Daher sollte untersucht werden, ob juxtakrine Signalübermittlung durch PMT-stimulierte B-Zellen für die Osteoklasten-Differenzierung von Knochenmarkszellen wichtig ist. Dazu wurden *Transwell*-Experimente durchgeführt. Der Versuchsaufbau ist schematisch in Abbildung 4.2 dargestellt: Es wurden in eine 6-Well-Platte kleine Einsätze mit einem Boden bestehend aus einer semipermeablen Membran eingehängt. Da die Porengröße dieser Membran 0,4 µm betrug, war es den Zellen im Kompartiment oben daher nur möglich über lösliche Faktoren mit den Zellen im unteren Kompartiment zu kommunizieren. Durch die kleine Porengröße (0,4 µm) wurde sowohl das Migrieren von ganzen Zellen durch die Membran hindurch als auch das Aufstellen von Zell-Zell-Kontakten verhindert. Um die Rolle von Zell-Zell-Kontakten zwischen myeloiden Vorläuferzellen und B-Zellen zu studieren, wurden in das obere Kompartiment B-Zellen ausgebracht, die aus murinen Knochenmarkszellen mittels der MACS-Methode mit Hilfe des Oberflächenmarkers CD45R isoliert wurden, während in das untere Kompartiment die restlichen CD45R-negativen Zellen ausgebracht wurden. Diese Zellfraktion beinhaltete daher die klassischen Vorläufer der Monozyten-Makrophagen-Linie. Es sollte untersucht werden, ob in dieser Situation nach PMT-Stimulation genauso effektiv Osteoklasten im unteren *Well* der CD45R-negativen Zellen differenzieren können, wie wenn alle Zellen zusammen stimuliert werden. Überraschenderweise konnte eine effektive Differenzierung von Osteoklasten allerdings im oberen Zellkompartiment, das die B-Zellen beinhaltet, beobachtet werden und nicht wie erwartet im unteren Zellkompartiment, das die klassischen Vorläufer beinhaltet. Hier waren weniger Osteoklasten differenziert als im *Transwell* oben. Um zu bestätigen, dass im *Transwell* oben Osteoklasten differenziert worden waren, wurde die Membran des *Transwell*-Einsatzes nach Beendigung des Versuches herausgelöst und das Zytoskelett (TRITC-Phalloidin) und die Nuklei (DAPI) visualisiert. Wie Abbildung 4.2 zeigt, waren die differenzierten Zellen Osteoklasten, was an der Multinuklearität ersichtlich wird.

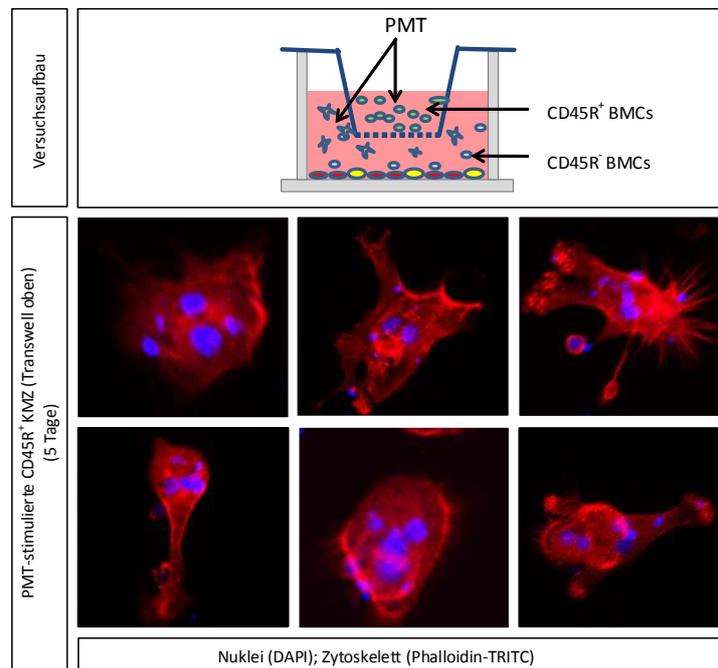


Abbildung 4.2: **CD45R-positive Zellfraktion differenziert mit PMT im *Transwell*-Versuch über der negativen Zellfraktion zu Osteoklasten.** $0,5 \times 10^7$ CD45R-positive Knochenmarkszellen (Reinheit $\geq 97\%$) wurden im *Transwell* in 2 ml Medium über der korrespondierenden negativen Knochenmarksfraktion ausgebracht und mit 5 nM PMT für fünf Tage stimuliert. Die Zellen waren durch eine Membran mit einer Porengröße von $0,4\ \mu\text{m}$ getrennt. Dadurch war ein direkter zellulärer Kontakt ausgeschlossen, während der Austausch von löslichen Faktoren zwischen den Zellen im oberen und unteren Kompartiment unbeeinträchtigt war. Zur Verifikation der Osteoklastendifferenzierung wurde die Multinuklearität durch DAPI-Färbung (blau) und Färbung des Zytoskeletts durch TRITC-Phalloidin (rot) visualisiert. Gezeigt sind repräsentative Bilder von drei unabhängigen Experimenten.

Um zu verifizieren, ob B-Zellen, die mit dem Pan-B-Zellmarker CD45R isoliert wurden, in einem *Transwell*-unabhängigen Experiment wirklich zu Osteoklasten differenzieren können, wurden diese erneut mit der MACS-Methode isoliert und in einer 6-Well Platte direkt ausgebracht und mit PMT stimuliert. Die Reinheit der Zellpopulation nach der Isolation wurde mit dem FACS bestimmt und lag zwischen 95 % und 98 %. Nach 6 bis 8 Tagen waren riesige Zellen mit flacher Osteoklastenmorphologie differenziert. Um dies zu bestätigen, wurde erneut das Enzym TRAP nachgewiesen. Um die Methoden zu variieren und damit auch die Artefakt-Wahrscheinlichkeit zu minimieren, wurden die Osteoklasten mit einer klassischen TRAP-Färbung nachgewiesen. Hierbei spaltet das Enzym TRAP von einem anderen Substrat, Naphthol AS-BI Phosphorsäure, einen Phosphatrest ab, wodurch sich in Kombination mit einem Diazoniumsalz ein roter Azo-Farbstoff bildet, der im Lichtmikroskop fotografiert werden kann. Wie in Abbildung 4.3 zu sehen ist, besitzen die Zellen die typischen Osteoklastenmarker: Sie waren TRAP-positiv und multinukleär und bestätigten somit die Möglichkeit, dass diese direkt aus B-Zell-Vorläufern entstanden sein könnten.

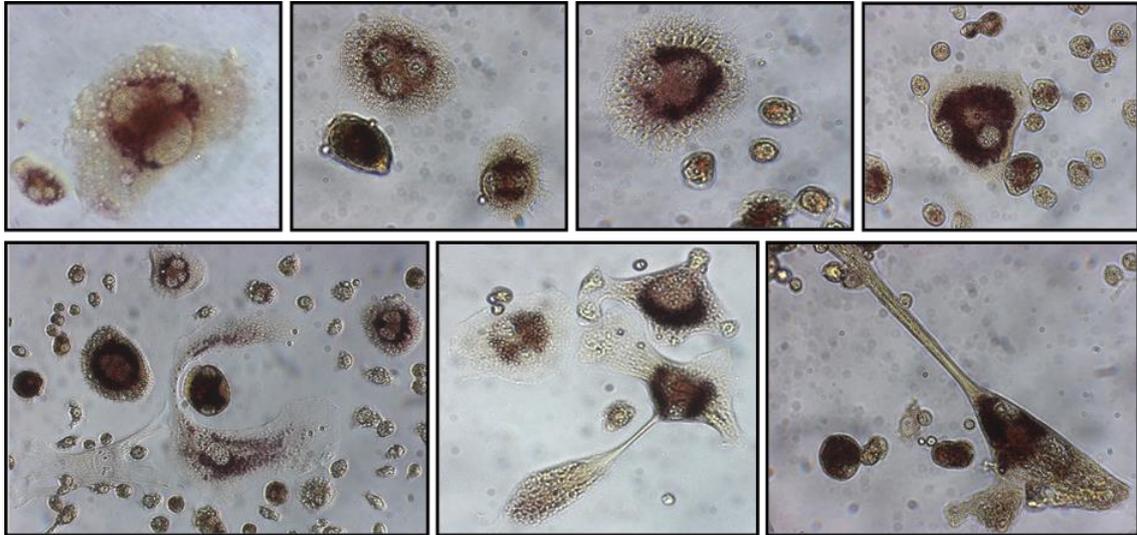


Abbildung 4.3: **CD45R-positive Zellen differenzieren zu TRAP-positiven, multinukleären Osteoklasten mit PMT.** $0,5 \times 10^7$ CD45R-positive Knochenmarkszellen (Reinheit $\geq 96\%$) wurden in 2 ml Medium in einer 6-Well-Platte ausgebracht und mit 5 nM PMT stimuliert. Nach fünf Tagen waren Riesenzellen differenziert. Durch eine klassische TRAP-Färbung (roter Farbstoff) wurde die Differenzierung zu Osteoklasten (≥ 3 Nuklei, TRAP⁺) analysiert.

4.1.4 PMT generiert eine bipotente B-Zell-Population, die B-Zell- und Osteoklasten-Marker zugleich exprimiert

Die Beobachtung, dass B-Zellen als Vorläufer für die Differenzierung von Osteoklasten dienen können, wurde bereits an einigen wenigen Stellen in der Literatur beschrieben [223-225], wird aber kontrovers diskutiert [228]. In diesem Zusammenhang waren vorhandene Daten, die in unserer Arbeitsgruppe zuvor angefertigt wurden, sehr interessant. Es wurde gezeigt, dass PMT-stimulierte B-Zellen die Expression des Transkriptionsfaktors Pax-5 reduzieren (unpublizierte Daten von Dr. D. Hildebrand). Pax-5 ist als der Wächter der B-Zelllinie bekannt, da er die Entwicklung in die B-lymphoide Linie festlegt. Zum einen schaltet der Transkriptionsfaktor Pax-5 B-Zell-spezifische Gene an und zum anderen unterdrückt er gleichzeitig myeloide Gene und Gene anderer Differenzierungslinien (siehe Kapitel 2.5) [213]. Pax-5 wird nach dem Festlegen auf die B-lymphoide Linie auf fast gleichbleibendem Level über alle Entwicklungsstadien der B-Zellen hinweg, von der Pro-B-Zelle bis zur reifen B-Zelle exprimiert. Während der terminalen Differenzierung zu Plasmazellen wird Pax-5 wieder herunterreguliert [213]. Eine Deletion von *Pax-5* in murinen, reifen B-Zellen generiert eine Zellpopulation, die ihre Festlegung auf die B-Zelllinie wieder verloren hat und ein großes Potential an Plastizität besitzt. Diese Zellen können somit zu Zellen anderer Linien durch spezifische Zytokinstimulation differenziert werden. Es zeigte sich, dass diese B-Zellen mit der Kombination der Zytokine M-CSF und sRANKL zu Osteoklasten differenziert werden können [216]. Des Weiteren konnte gezeigt wer-

den, dass Mäuse mit einem *Knockdown* von *Pax-5* eine um 60 % reduzierte Knochenmasse aufweisen [258]. Diese Beobachtungen führten unsere Arbeitsgruppe zu der Hypothese, dass PMT-stimulierte B-Zellen durch das Herunterregulieren von *Pax-5* eventuell ihre feste Angehörigkeit zur B-Zell-Linie verlieren und selbst als Osteoklastenvorläufer fungieren könnten. Wie in der Einleitung geschildert, kann ein Verlust von *Pax-5* in der B-Zell-Linie entweder dazu führen, dass sehr frühe B-Zellen entstehen, noch vor dem Pro-B-Zell-Stadium, oder sehr reife, terminal differenzierte Plasmazellen. Um zu überprüfen, ob PMT diese terminale Differenzierung zu Plasmazellen stimulieren kann und somit eher auf die späten Stadien der B-Zell-Differenzierung einwirkt, wurde die Sekretion von Antikörpern untersucht, da dies kennzeichnend für Plasmazellen ist. IgM-ELISA's mit CD45R-positiven B-Zellen, die mit PMT oder IL-7 stimuliert wurden, zeigten dass PMT die Sekretion von IgM-Antikörpern im Vergleich zu den IL-7 behandelten B-Zellen stimulieren kann (Abbildung 4.4), während IgG in beiden Konditionen kaum produziert wurde.

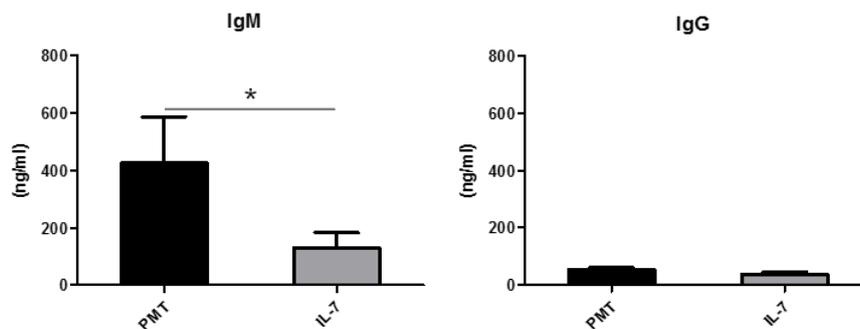


Abbildung 4.4: **PMT-stimulierte CD45R-positive Knochenmarkszellen sezernieren erhöhte Mengen an IgM Antikörpern, jedoch keine IgG Antikörper.** CD45R-positive Knochenmarkszellen wurden mit PMT (5 nM) oder IL-7 (60 ng/ml) für sieben Tage stimuliert. Die Freisetzung von Immunglobulinen (IgM und IgG) wurde mit ELISAs bestimmt. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten \pm SD. Die statistische Relevanz wurde mit dem *Student's t*-Test berechnet (*, $p < 0,05$).

Dies war der erste Hinweis, dass die Zellen, die mit PMT aus der CD45R-positiven Knochenmarksfraktion differenzieren, Charakteristika von Plasmazellen aufweisen. Da aus dieser Fraktion auch die Osteoklasten durch PMT-Stimulation differenziert waren und da sich auch beim Multiplen Myelom (Plasmazellkrebs) Osteoklasten finden lassen, die Plasmazelleigenschaften besitzen (Nuklei mit Translokation) [227], sollte getestet werden, ob durch PMT Zellen generiert werden, die sowohl Eigenschaften von Osteoklasten als auch von Plasmazellen besitzen. Dazu wurden CD45R-positive Knochenmarkszellen mit PMT bzw. mit IL-7 für sieben Tage stimuliert und anschließend eine Immunfluoreszenzfärbung für den Plasmazellmarker Syndecan-1 (CD138), als auch die enzymatische Färbung des Osteoklasten-Markers TRAP mit dem ELF97 Substrat durchgeführt. In Abbildung 4.5 ist zu sehen, dass die Zellen, die aus PMT-stimulierten B-Zellen differenziert sind, sowohl positiv für den Marker Syndecan-1 als auch multinukleär und TRAP-positiv sind. Diese Zelleigenschaf-

ten zeigten sich nicht bei IL-7 stimulierten Zellen. Innerhalb des murinen Knochenmarks wurde Syndecan-1 nur auf Zellen der B-lymphoiden Linie detektiert [259, 396]. Außerdem gilt Syndecan-1 innerhalb des Immunsystems als spezifischer Marker für Plasmazellen [260, 397]. Im humanen System hingegen exprimieren auch dendritische Zellen Syndecan-1 [398, 399]. Als Positivkontrolle für die Syndecan-1-Färbung dienten die Multiplen Myelom-Zelllinien U266 und KMS12.BM, welche eine vergleichbare Färbung mit dem spezifischen Antikörper im Vergleich zum Hintergrund erzielten (siehe Abbildung 4.5). Des Weiteren wurde eine Immunfluoreszenzfärbung dieser Zellen mit einem weiteren B-Zellmarker, dem Pan-B-Zellmarker CD45R, mit dem die Zellen an Tag 0 isoliert wurden, angefertigt. In Abbildung 4.5 ist zu sehen, dass die nach sieben Tagen differenzierten Osteoklasten die Expression dieses Markers wieder verloren haben. Nur die undifferenzierten, nicht fusionierten kleineren Zellen scheinen noch positiv für CD45R zu sein. Diese Abnahme des Markers CD45R könnte mit der beobachteten Differenzierung von Plasmazellen erklärt werden, da zuvor beschrieben wurde, dass diese mit einem Verlust an CD45R Molekülen auf der Oberfläche einhergeht [261, 262]. Um auszuschließen, dass es sich bei den differenzierten Zellen um eine Kontamination mit plasmacytoiden, dendritischen Zellen (pDCs) handelt, wurden die Zellen auch einer Immunfluoreszenzfärbung für den Marker Gr-1 unterzogen. Da die B-Zellen an Tag 0 mit dem Marker CD45R isoliert wurden, lässt sich nicht ausschließen, dass auch pDCs in der Ausgangspopulation enthalten waren, da bekannt ist, dass diese auch CD45R exprimieren [263]. Allerdings handelt es sich hierbei um eine sehr seltene Zell-Art, die nur ungefähr 1 % der Zellen des murinen Knochenmarks ausmacht [264]. Da diese Zellen charakteristischerweise auch den Marker Gr-1⁺ exprimieren und B-Zellen nicht [263], wurde dieser Marker für eine IF-Färbung gewählt, um die beiden Zelltypen diskriminieren zu können. In Abbildung 4.5 ist zu sehen, dass die differenzierten Zellen negativ für Gr-1 sind und dass es sich somit hierbei wahrscheinlich nicht um eine Kontamination mit pDCs handelt.

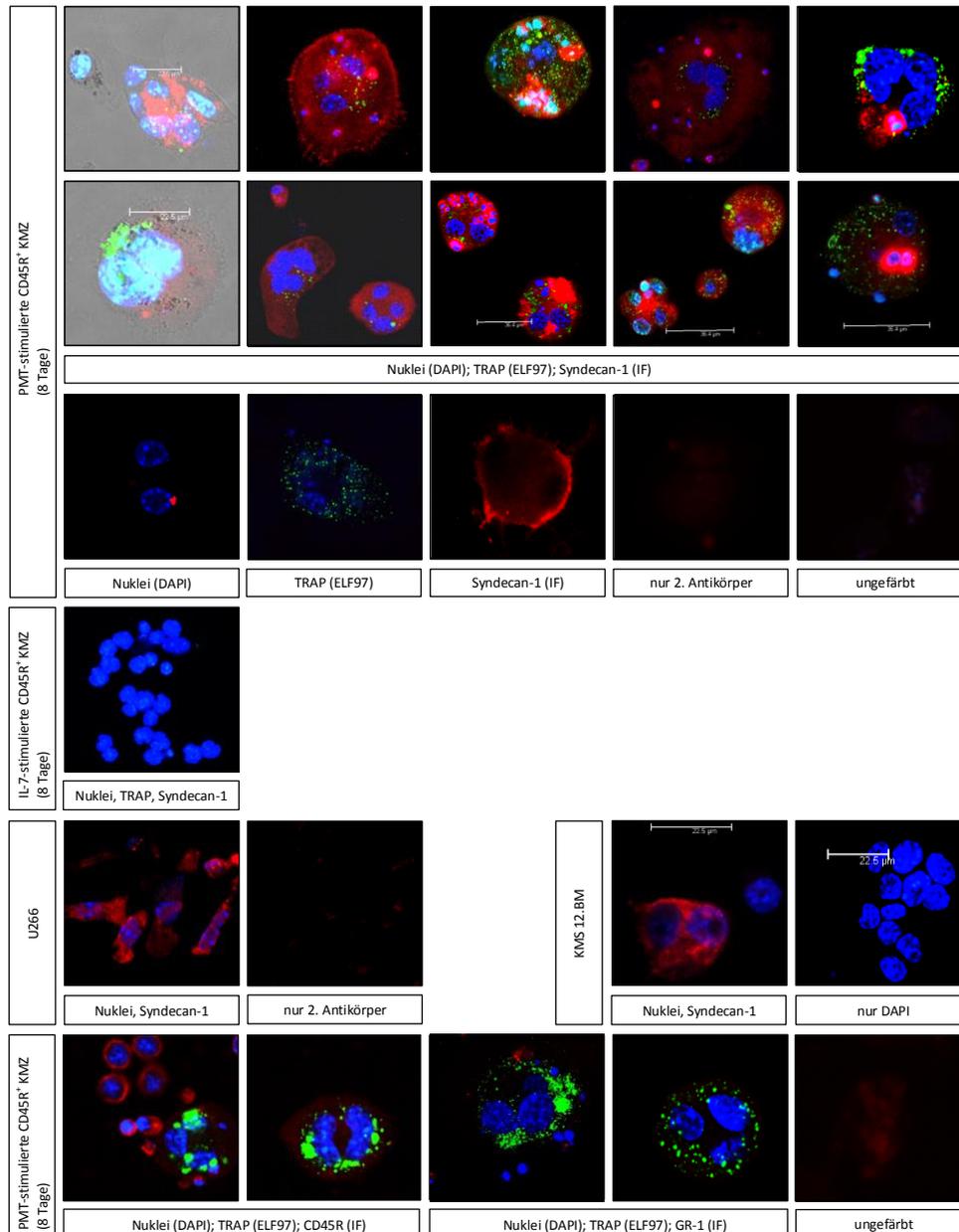


Abbildung 4.5: **Durch Stimulation von CD45R⁺ Zellen mit PMT entstehen bipotente Zellen mit Osteoklasten- und Plasmazell-Charakteristika.** $1,25 \times 10^6$ Zellen wurden in 500 μ l Medium mit PMT (5 nM) oder IL-7 (60 ng/ml) stimuliert. TRAP wurde durch eine enzymatische Fluoreszenzmarkierung (ELF97-Substrat) visualisiert (grün). Die Multinuklearität wurde durch eine DAPI-Färbung (blau) angezeigt. Die Expression von Syndecan-1 (CD138), CD45R bzw. Gr-1 wurde durch eine Immunfluoreszenzfärbung untersucht. Als Negativkontrollen dienten einzeln gefärbte oder ungefärbte Zellen bzw. Zellen, die nur mit dem 2. Antikörper inkubiert wurden. Als Positivkontrolle für die Syndecan-1 Expression, wurden die Multiplen Myelomzelllinien U266 und KMS12.BM (Plasmazellen) verwendet. Alle Mikroskopiebilder wurden mit den gleichen Einstellungen aufgenommen (63er Objektiv). Die gezeigten Bilder repräsentieren die Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen. Eine größere Ansicht dieser Abbildung findet sich im Anhang 10.2.

4.2 Signalwege und Differenzierungsmechanismen, die von B-Zellen und Osteoklasten geteilt werden

Obwohl alle Zellen eines Organismus das gleiche Erbgut tragen, reagieren sie doch unterschiedlich auf gleiche extrazelluläre Reize. Dies liegt daran, dass sie eine andere Ausstattung mit zellulären Proteinen besitzen, da sie Zellart-spezifische Gen-Expressions-Profile aufweisen. Somit besitzen sie ein charakteristisches Repertoire an Rezeptoren und intrazellulären Signalmolekülen, mit denen sie Informationen von außen verarbeiten und die zelluläre Antwort daraufhin anpassen können. Dies gewährleistet die Generierung von spezialisierten Zellen und stellt sicher, dass nicht alle Knochenmarkszellen zu Osteoklasten differenzieren, obwohl sich die Zytokinkombination von M-CSF und sRANKL im Interstitium befindet. Auf diese Signale reagieren klassischerweise Zellen der Monozyten/Makrophagen-Linie mit der Differenzierung zu Osteoklasten, da sie den Rezeptor für M-CSF bzw. sRANKL, den M-CSF-R bzw. RANK exprimieren und die nötige intrazelluläre Molekül-Maschinerie besitzen, um diese zelluläre Antwort einzuleiten. Wie oben erwähnt, unterdrückt Pax-5 die Expression myeloider Rezeptoren und Proteine in der B-Zell-Linie und kontrolliert gleichzeitig die Expression spezifischer B-lymphoider Proteine [213]. Während der terminalen Differenzierung zu Plasmazellen wird die Pax-5 Expression wieder reduziert. Dies hat zur Folge, dass die Suppression myeloider Proteine und Rezeptoren wieder rückgängig gemacht wird. Delogu *et al.* konnten zeigen, dass terminal differenzierte Plasmazellen myeloide Gene exprimieren und diese sogar von großer Bedeutung für die Funktion von Plasmazellen sind [215]. Daher spielen auch typische myeloide Transkriptionsfaktoren, wie z.B. Blimp-1 (siehe Abschnitt 4.2.1), eine wichtige Rolle in Plasmazellen [265]. Auch der Rezeptor für M-CSF (*Csf1r*) gehört zu den Genen, die von Pax-5 supprimiert werden [266]. Es wurde gezeigt, dass frühe, murine B-Zellen durch eine erzwungene Expression des M-CSF-R dazu gebracht werden können, zu Makrophagen zu differenzieren [267]. Des Weiteren führt auch die Überexpression von myeloiden Transkriptionsfaktoren dazu, dass reife B-Zellen zu Makrophagen umprogrammiert werden [266, 268]. Daraus ergab sich für uns die Hypothese, dass Plasmazellen prinzipiell eine gute Ausstattung mit myeloiden Genen besitzen, die eine Bereitschaft zur Differenzierung zu Osteoklasten nicht ausschließen. Eine solche Transdifferenzierung von Plasmazellen zu Osteoklasten ist im physiologischen Kontext sicherlich inhibiert, da sie wenig Sinn ergeben würde, doch ist denkbar, dass eine solche Differenzierung im pathophysiologischen Kontext möglich sein könnte. Ein Beispiel hierfür könnte das Multiple Myelom sein, bei dem Osteoklasten mit Plasmazellursprung gefunden werden konnten oder unserer Hypothese entsprechend mit PMT. Daher sollte untersucht werden, welche Ereignisse auf Ebene der Signalweiterleitung für die PMT-stimulierte Differenzierung von B-Zellen und Makrophagen zu Osteoklasten verantwortlich sein könnten. Dabei wurde der Fokus auf Signalwege, die von B-Zellen und Osteoklasten geteilt werden, gelegt.

4.2.1 PMT aktiviert die Blimp-1-Bcl-6 Achse

Bei der Betrachtung der molekularen Prozesse, die dafür bekannt sind, die terminale Differenzierung zu Plasmazellen bzw. zu Osteoklasten einzuleiten, fällt auf, dass die gleichen Proteine relevant sind. In B-Zellen vor der terminalen Differenzierung bestimmen Bcl-6 und Pax-5 das Transkriptionsprogramm und inhibieren die Transkriptionsfaktoren Blimp-1 und Xbp-1, die die Transkription von Plasmazell-typischen Genen kontrollieren. Für die terminale Plasmazell-Differenzierung muss der Masterregulator Blimp-1 aktiviert werden, der dann die Repressoren Bcl-6 und Pax-5 inhibiert [269-271]. Durch das Wegfallen der Repression wird Xbp-1 wieder aktiv, so dass das Plasmazell-Programm von Blimp-1 und Xbp-1 bestimmt wird. Interessanterweise ist in Plasmazellen auch bekannt, dass STAT-3 dieses Differenzierungsprogramm aktivieren kann [272]. Der Transkriptionsfaktor NFATc1 gilt schon lange als der Masterregulator, der die Differenzierung von Osteoklasten kontrolliert. Kürzlich wurde jedoch eine neue Regulations-Achse entdeckt, die als entscheidend für die Einleitung der terminalen Differenzierung zu Osteoklasten beschrieben wurde, die Blimp-1-Bcl-6 Achse. Hierbei fungiert Bcl-6 als Repressor von Genen, die für die Osteoklastogenese entscheidend sind, wie *NFATc1*, *DC-STAMP* und *Ctsk* (Kathepsin K). Blimp-1 wiederum dient bei diesem Prozess als Repressor von Bcl-6 und kann so die terminale Differenzierung vorantreiben [199]. Das gleiche Regulationsnetzwerk leitet somit sowohl die Plasmazell- als auch die Osteoklasten-Differenzierung ein. Da bekannt ist, dass PMT Pax-5 in B-Zellen herunterregulieren kann und ferner STAT-3 in HEK-Zellen (embryonale Nierenzellen) durch PMT konstitutiv aktiviert wird [74, 76], was die Expression von Blimp-1 hochregulieren könnte [272], wurde untersucht, ob PMT über die Aktivierung der Blimp-1-Bcl-6 Achse terminale Differenzierungsprozesse beeinflussen kann. Als Modellsystem wurden dazu murine Makrophagen verwendet, die durch M-CSF-Stimulation aus Knochenmarkszellen zuvor differenziert wurden (BMMΦs) (siehe 3.2.1.2.2). Die Qualität der Makrophagen-Differenzierung wurde dabei durch Überprüfung spezifischer Makrophagen-Marker mittels FACS-Analyse kontrolliert. Abbildung 4.6 B zeigt, dass die Zellen wie erwartet positiv für die beiden Makrophagenmarker CD11b und F4/80 waren. Auch die Fähigkeit zur Phagozytose ist ein charakteristisches Merkmal von Makrophagen. Abbildung 4.6 A zeigt, dass die generierten BMMΦs dazu befähigt waren, fluoreszierende Latex-Beads zu phagozytieren. Einen weiteren Hinweis dafür, dass die generierten Makrophagen funktionsfähig sind, lieferte der Aktivierungstest mit Lipopolysaccharid (LPS). Die Stimulierung von Immunzellen mit LPS reguliert die Oberflächenmarker CD80, CD40 und MHC-II hoch, die für die Einleitung der adaptiven Immunantwort von Bedeutung sind [273-276]. Wie in Abbildung 4.6 C zu sehen ist, wurden diese Moleküle in den LPS-stimulierten BMMΦs hochreguliert.

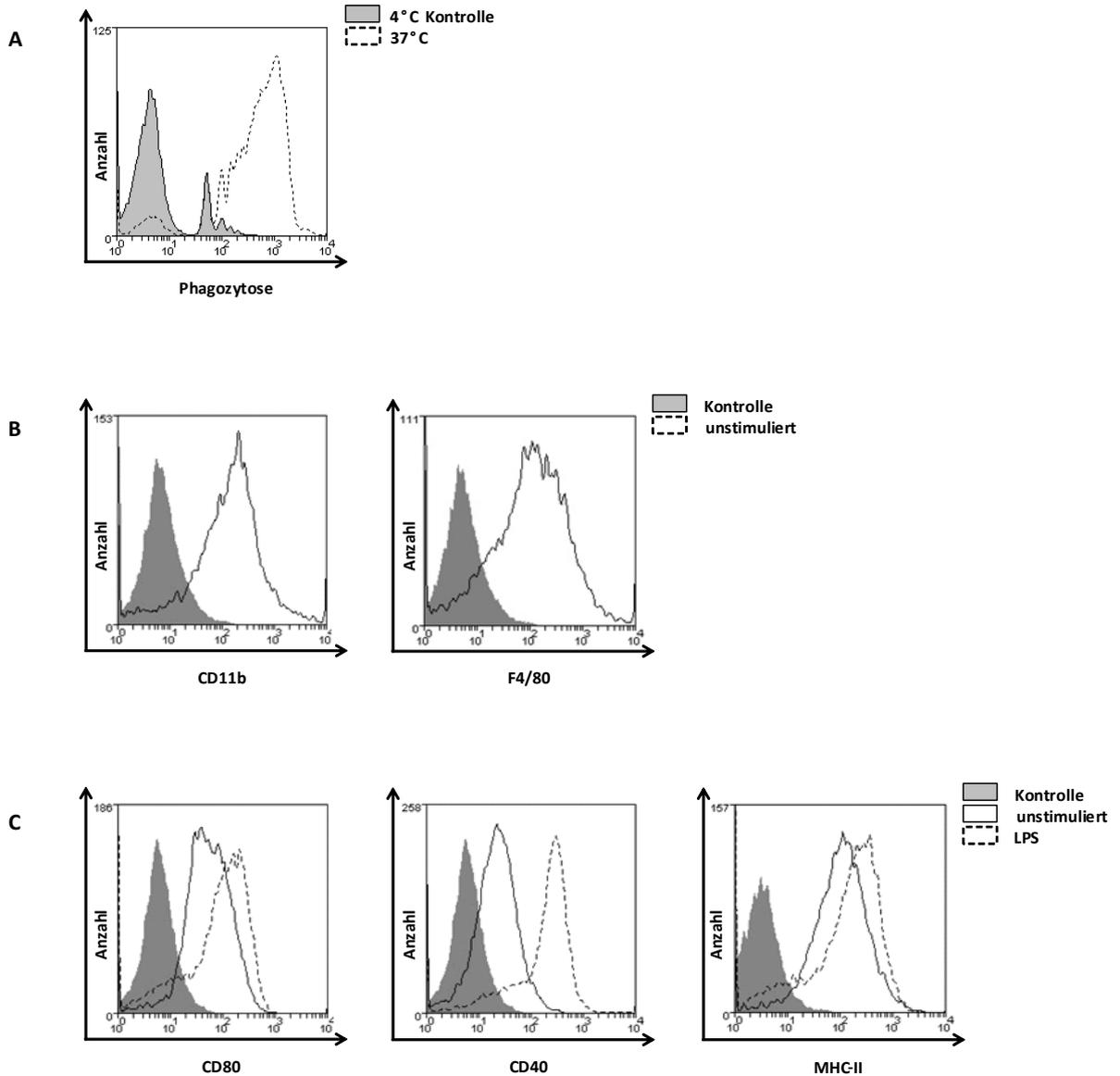


Abbildung 4.6: **Kontrolle der Makrophagendifferenzierung.** Zur Generierung von Osteoklastenvorläuferzellen wurden Makrophagen (BMMΦ) aus dem murinen Knochenmark durch M-CSF Stimulation differenziert. (A) Um die Differenzierungseffizienz zu kontrollieren, wurde eine typische Makrophagenfunktion, die Phagozytose, untersucht. Dazu wurden die Makrophagen für 1 h mit fluoreszierenden Latex-Beads bei 37 °C oder bei 4 °C (Kontrolle) inkubiert und die spezifische Aufnahme der Beads bei 37 °C mittels Durchflusszytometrie bestimmt. (B) Des Weiteren wurde die Expression von spezifischen Makrophagenmarkern, CD11b und F4/80, mit dem FACS analysiert. (C) Als weiteres Zeichen für den Erhalt von funktionellen Makrophagen wurde ihre Aktivierbarkeit durch LPS-Stimulation getestet. Dazu wurden die Makrophagen für 12 h mit LPS (10 µg/ml) stimuliert und dann die Induktion der Expression folgender Aktivierungs-Oberflächenmarker bestimmt: CD80, CD40 und MHC-II. (A)(B)(C) Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten.

Die Fähigkeit von RAW264.7 Makrophagen durch PMT-Stimulation zu Osteoklasten zu differenzieren wurde in der Literatur bereits beschrieben [23]. Um zu bestätigen, dass sich Makrophagen als Modellsystem auch in der vorliegenden Arbeit für die Untersuchung von Signalwegen, die für die Differenzierung von Osteoklasten wichtig sind, eignen, wurde dieser Sachverhalt zunächst erst bestätigt. Abbildung 4.7 zeigt, dass PMT-stimulierte Makrophagen nach sechs Tagen erfolgreich zu Osteoklasten differenziert waren, was an der Multinuklearität und der Expression von TRAP zu erkennen war.

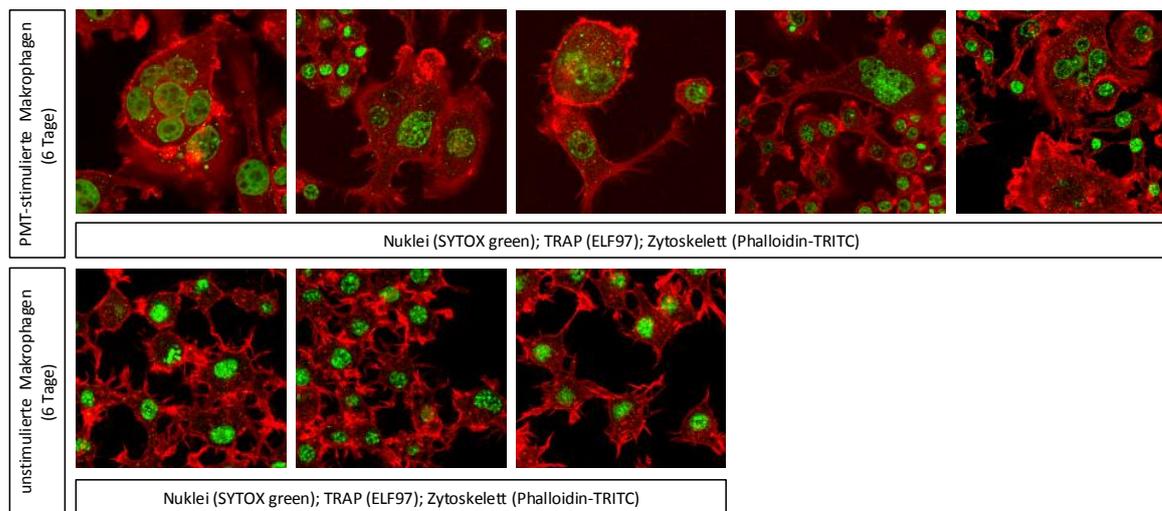


Abbildung 4.7: **PMT-stimulierte Makrophagen differenzieren zu Osteoklasten.** 1×10^5 Makrophagen wurden je Well der 24-Well-Platte in 500 μ l Medium ausgebracht und mit PMT stimuliert bzw. unstimuliert gelassen. Die Differenzierung zu Osteoklasten wurde durch eine TRAP-Färbung mit dem ELF97-Substrat (grün) evaluiert. Nuklei wurden mit DAPI (blau), das Zytoskelett mit TRITC-Phalloidin (rot) fluoreszenz-markiert. Die Bilder wurden mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Objektiv: 63er) erstellt.

Bei der Untersuchung, ob PMT in BMM Φ s die Blimp-1-Bcl-6 Achse aktiviert, ergab sich, dass in Zelllysaten unstimulierter bzw. M-CSF-stimulierter Zellen kaum Blimp-1 Protein nachgewiesen werden konnte, während in PMT-stimulierten Zellen die Proteinlevel an Blimp-1 stark hochreguliert waren. Als Positivkontrolle für die Expression von Blimp-1 wurden hier Lysate der Zelllinie U266 (Multiples Myelom) aufgetragen (siehe Abbildung 4.8 A). Auf mRNA-Ebene konnte gezeigt werden, dass *Prdm1* (Blimp-1) mit PMT zu einem frühen Zeitpunkt induziert wird (3 h), diese initiale Aktivierung nach 24 h aber unter das Niveau der Kontrolle abnimmt (Abbildung 4.8 B). M-CSF/sRANKL-stimulierte Zellen regulierten die *Prdm1* (Blimp-1) Genexpression im Vergleich zu unstimulierten Zellen sogar herunter. Wie bereits erwähnt, ist Bcl-6 ein Repressor für Osteoklasten-Gene, der von Blimp-1 reprimiert werden kann [199]. Wie erwartet, zeigten Blimp-1 und Bcl-6 nach PMT-Stimulation eine inverse Korrelation (Abbildung 4.8 C). In Zellen, die mit PMT behandelt wurden, konnten nur geringe Mengen an Bcl-6 Protein nachgewiesen werden, während unstimulierte

oder M-CSF-stimulierte Zellen *Bcl-6* vergleichsweise stark exprimierten. Bei der Untersuchung der mRNA-Spiegel von *Bcl-6* zeigte sich eine minimale Senkung nach 5 h PMT-Stimulation (siehe Abbildung 4.8 D). Die beobachteten mRNA-Level sind allerdings unzureichend um die beobachteten Effekte auf Proteinebene allein damit zu erklären. Hier könnten Unterschiede in der Stabilität der mRNA oder posttranskriptionelle Regulation eine weitere Rolle spielen.

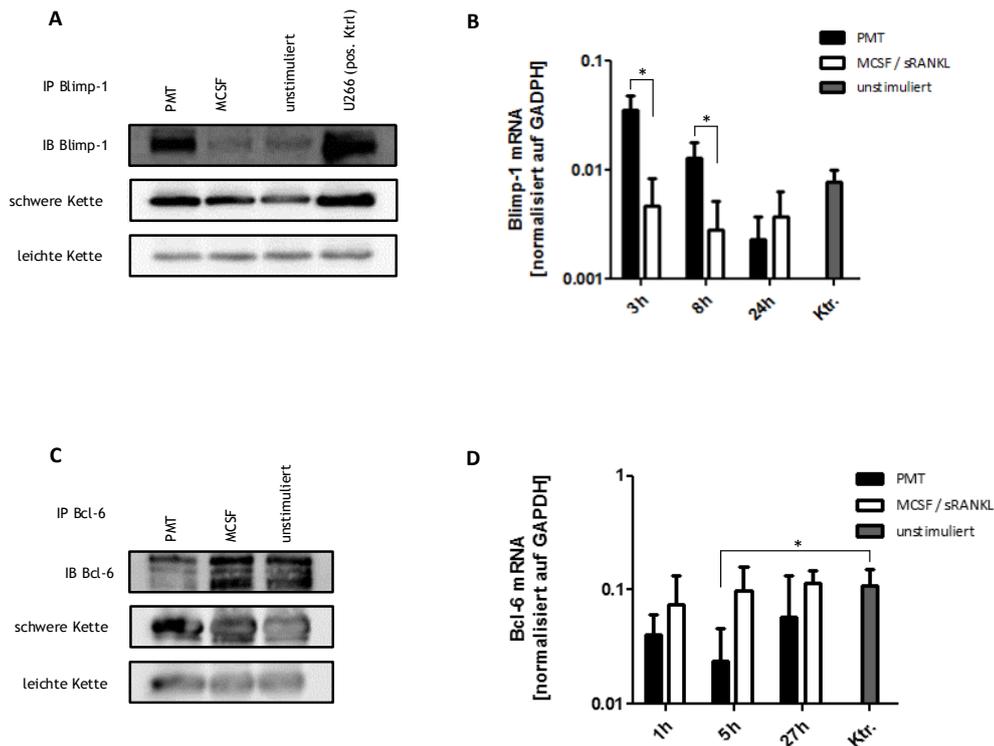


Abbildung 4.8: **PMT aktiviert die Blimp-1-Bcl-6 Achse.** BMMΦs wurden mit PMT (5 nM), der Kombination von M-CSF/sRANKL oder M-CSF alleine für die angegebenen Zeiten stimuliert oder zur Kontrolle unstimuliert gelassen. Die Proteinspiegel von (A) Blimp-1 oder (C) Bcl-6 wurden durch eine Immunpräzipitation evaluiert. Die Transkriptions-Level von (B) *Prdm1* (Blimp-1) oder (D) *Bcl-6* wurden mit Hilfe von quantitativen RT-PCRs bestimmt. (A)(B)(D) Dargestellt ist jeweils der Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten \pm SD. (C) Dargestellt ist der Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten \pm SD. Die statistische Relevanz wurde mit dem *Student's t*-Test berechnet (*, $p < 0,05$).

Bei der Aufklärung des Mechanismus, wie PMT die Blimp-1-Bcl-6 Achse aktivieren könnte, war der JAK-STAT Signalweg ein sehr wahrscheinlicher Kandidat. In T-Zellen kann Interleukin-2 (IL-2) über die Aktivierung von STAT-5 die Expression von Blimp-1 steigern [277]. Des Weiteren wurde publiziert, dass Interleukin-21 (IL-21) STAT-3-abhängig die Expression von Blimp-1 in B-Zellen triggern [272] und STAT-1 *Bcl-6* aktivieren kann [278]. Da die konstitutive Aktivierung des JAK-STAT Signalweg ein Hauptmerkmal des zellulären PMT-Effektes ist [74], wurde dessen Aktivierung in den BMMΦs untersucht. Die Ergebnisse der *Western-Blot*-Analysen ergaben, dass PMT eine starke

STAT-3-Phosphorylierung im Vergleich zu M-CSF-, M-CSF/sRANKL- oder unstimulierten BMMΦs bewirkt (Abbildung 4.9 A). Des Weiteren konnte auch eine leichte STAT-1 Phosphorylierung im Vergleich zu den Kontrollen nachgewiesen werden (Abbildung 4.9 B), während STAT-5 mit PMT nicht aktiviert wurde (Abbildung 4.9 C). Als Janus Kinase, die für die Phosphorylierung von STAT-3 verantwortlich sein könnte, stellte sich JAK-2 heraus. JAK-1 wurde nicht aktiviert (Daten nicht gezeigt). Abbildung 4.9 D zeigt, dass PMT nach 30 min eine gesteigerte Phosphorylierung von JAK-2 im Vergleich zu den unbehandelten BMMΦs bewirkte, welche nicht mit M-CSF/sRANKL bzw. M-CSF detektiert werden konnte. Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass PMT über die Aktivierung von JAK-2-STAT-3 die Blimp-1-Bcl-6 Achse aktiviert und somit Einfluss auf terminale Differenzierungsprozesse nimmt. Die Bindung von STAT-3 an den Promotor von *Prdm1* (Blimp-1) konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht bewiesen werden, da kein geeigneter kommerzieller Antikörper für den Chip-Assay zu beschaffen war.

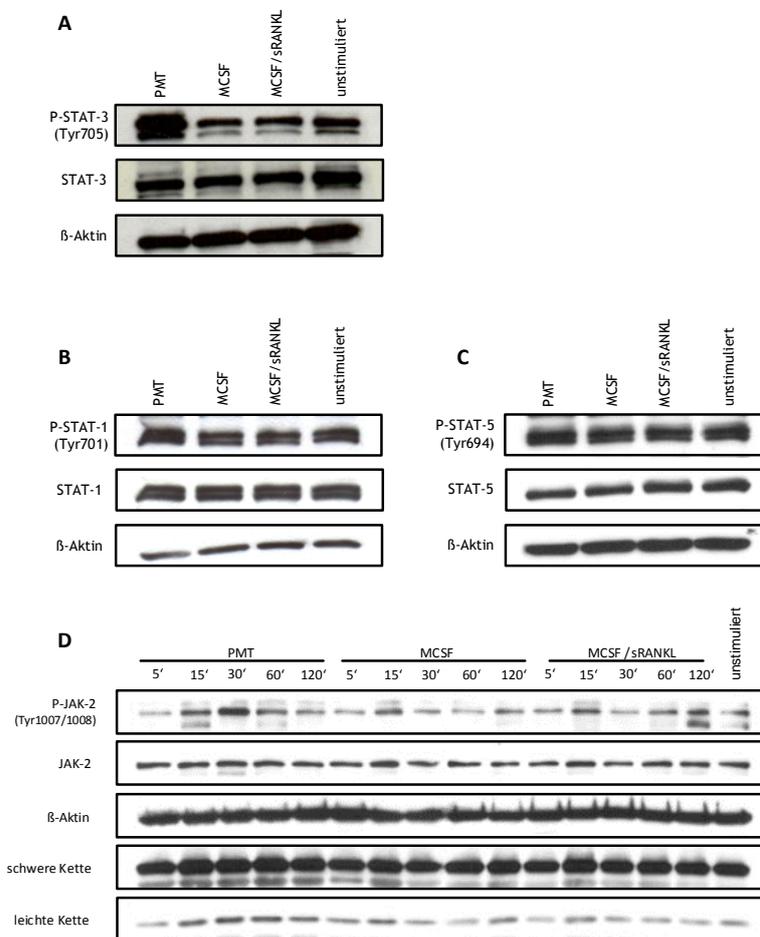


Abbildung 4.9: **PMT aktiviert den JAK-STAT Signalweg in Makrophagen.** BMM Φ wurden mit PMT (5 nM), M-CSF (25 ng/ml) und der Kombination aus M-CSF und sRANKL (50 ng/ml) für 3 h (A)(C) bzw. für 1-3 h (B) oder entsprechend der angegebenen Kinetik (D) stimuliert. Anschließend wurden die Phosphorylierungen von (A) STAT-3 an Tyr705 bzw. (B) STAT-1 an Tyr701 oder (C) STAT-5 an Tyr694 mittels *Western Blot* analysiert. Als Ladekontrollen dienten die jeweiligen gesamten STAT-Proteine und β -Aktin. Die Phosphorylierungs-Kinetik von JAK-2 an Tyr1007/1008 wurde mittels Immunpräzipitation analysiert. Dargestellt sind repräsentative Daten von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

4.2.2 PMT-induzierte Aktivierung der miRNA21 als potenzieller molekularer Schalter

Auf der Grundlage einer intensiven Literaturrecherche entstand das hypothetische Modell eines molekularen Schalters (Abbildung 4.10), der für die Differenzierung von B-Zellen zu bipotenten Zellen sowohl mit Osteoklasten- als auch mit Plasmazell-Charakteristika verantwortlich sein könnte.

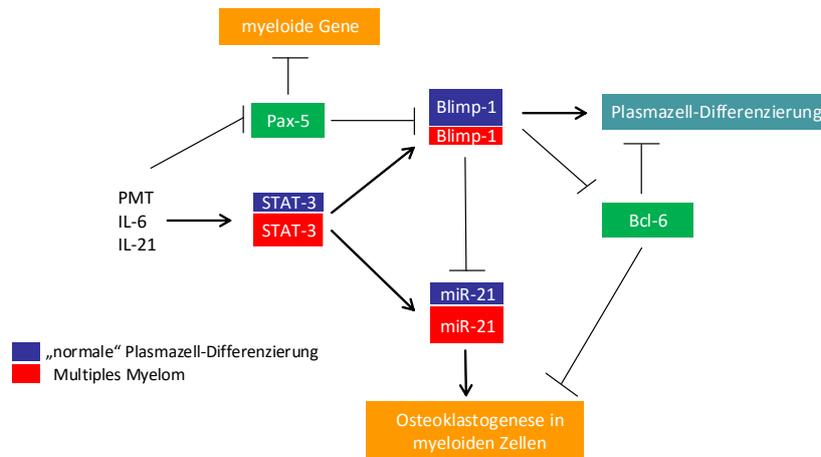


Abbildung 4.10: **Hypothetisches Modell des molekularen Schalters.** PMT könnte ähnlich wie im Multiplem Myelom über die Hyperaktivierung von STAT-3 eine gesteigerte Aktivität der miRNA21 erzielen und eventuell so terminale Differenzierungsprozesse in seinen Zielzellen modulieren. Die Inhibition von Pax-5 könnte die nötigen myeloiden Proteine liefern um die Zelle für ein Osteoklasten-Differenzierungsprogramm empfänglich zu machen. Über die Aktivierung der Blimp-1-Bcl-6 Achse kann nicht nur das Plasmazell- sondern auch das Osteoklasten-Differenzierungsprogramm beeinflusst werden.

Bei der physiologischen Plasmazell-Differenzierung, die durch IL-21 Stimulation eingeleitet werden kann, kommt es zu einer STAT-3-abhängigen Erhöhung der Expression von Blimp-1 und der Stimulierung des Plasmazell-Differenzierungsprogrammes [272]. Zudem ist bekannt, dass STAT-3 die Expression von miRNA21 hochregulieren kann [279, 280]. Dies resultiert allerdings nur in einer kurzen Stimulierung der miRNA21, da Blimp-1 wiederum ein Repressor von miRNA21 ist und diese sofort wieder inhibiert [280]. Diese Feinregulierung der miRNA21 ist wichtig, da miRNA21 auch als Schlüsselregulator von onkogenen Prozessen bekannt ist und sogar als sogenannte „Onkomir“ bezeichnet wird [281]. Im Multiplem Myelom konnte eine gesteigerte Expression von miRNA21 beobachtet werden [282, 283]. Außerdem wurde eine konstitutive Aktivierung von STAT-3 in Plasmazellen von Patienten mit Multiplem Myelom gefunden [284], die vermutlich für das IL-6 abhängige Überleben der Zellen durch die Induktion der miRNA21 verantwortlich ist [285]. Konstitutive STAT-3 Aktivierung ist auch charakteristisch für die Wirkung von PMT, da das Toxin die negativ-regulatorische Wirkung von SOCS-1 unterdrücken kann [76]. Diese Hyperaktivierung von STAT-3 könnte mit einer gesteigerten Expression der miRNA21 einhergehen, welche die Inhibition durch Blimp-1 abschwächen und somit die Balance auf die Seite der miRNA21 verschieben könnte. Da der miRNA21 eine bedeutende Funktion bei der Osteoklastogenese zugeschrieben werden konnte [286], könnte die miRNA21 ein wichtiger molekularer Schalter für die beobachteten Differenzierungsprozesse sein. Daher wurden Expressionslevel der miRNA21 analysiert. Wie in Abbildung 4.11 zu sehen ist, regulieren CD45R-positive B-Zellen nach fünf Tagen PMT-Stimulation die Expression der miRNA im Vergleich zu frisch isolierten B-Zellen hoch. Knochenmarks-Makrophagen und dendriti-

sche Zellen exprimieren die miRNA21 auf hohem Level, was gemäß der Literatur auch zu erwarten war [287].

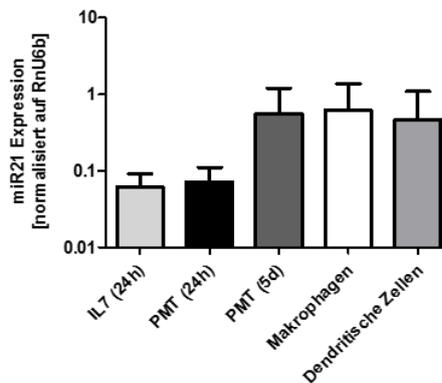


Abbildung 4.11: **PMT-stimulierte CD45R-positive Zellen exprimieren die miRNA21.** CD45R-positive Knochenmarkszellen wurden mit PMT (5 nM) für 24 h und 5 Tage bzw. mit IL-7 (60 ng/ml) für 24 h stimuliert. Die Analyse der miRNA21 erfolgte mittels RT-PCR. Zur Kontrolle wurde die miRNA21 in BMMΦs und primären dendritischen Zellen aus dem Knochenmark analysiert. Die relative Expression (rE) wurde als $rE = 1/(2^{\Delta C_t})$ berechnet. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten \pm SD.

4.3 Aktivierung von klassischen Osteoklastogenese-bezogenen Signalwegen mit PMT

Die klassische Differenzierung von Osteoklasten aus myeloiden Vorläufern wird durch die beiden Zytokine sRANKL und M-CSF eingeleitet (siehe Kapitel 2.4.1). M-CSF liefert hauptsächlich Überlebenssignale für die Osteoklastenvorläufer und reifen Osteoklasten und ist daher ein unentbehrlicher Faktor in der physiologischen Osteoklastendifferenzierung [288]. Die Bindung von RANKL an seinen Rezeptor RANK aktiviert ein großes Signalnetzwerk und führt schließlich zur Transkription vieler Osteoklasten-spezifischer Gene, die für die Differenzierung und Funktion von Osteoklasten von elementarer Bedeutung sind. Es ist bekannt, dass RANK mindestens sechs Schlüssel-Signalwege in Osteoklasten aktiviert: NFATc1, NF- κ B, Akt, JNK, ERK und p38 [289]. Daher sollte untersucht werden, ob PMT ein ähnliches Signalnetzwerk in BMMΦs aktivieren kann.

Der Transkriptionsfaktor NFATc1 ist bekannt als Masterregulator der Osteoklastogenese [290] und wird mit PMT im Vergleich zu unbehandelten BMMΦs auf Proteinebene hochreguliert, wie in Abbildung 4.12 A zu sehen ist. Die Expressionslevel sind sogar höher als in M-CSF/sRANKL stimulierten Zellen. Damit NFATc1 seine Wirkung als Transkriptionsfaktor entfalten kann, ist die Regulierung seiner nukleären Translokation von entscheidender Bedeutung. Eine Dephosphorylierung von NFATc1

durch die Ca^{2+} -abhängige Phosphatase Calcineurin ermöglicht eine gesteigerte nukleäre Translokation [195]. Eine gesteigerte nukleäre Translokation konnte auch durch PMT Stimulierung beobachtet werden (Abbildung 4.12 B).

Des Weiteren bewirkt RANKL eine erhöhte Akt-Phosphorylierung [183] und damit eine gesteigerte Osteoklastendifferenzierung durch Aktivierung der PI3K-Akt-GSK3 β -NFATc1-Signalachse [291]. Die Untersuchung der Aktivierung des PI3K-Akt Signalweges zeigte, dass durch PMT eine gesteigerte Ser473-Phosphorylierung im Vergleich zu den Kontrollen erzielt wurde (Abbildung 4.12 C). Außerdem ist der p38 Signalweg bedeutsam für die Regulierung der NFATc1 Expression [292]. Dieser spielt zusätzlich eine wichtige Rolle für die Hochregulierung von c-fos, einem weiteren bedeutenden Transkriptionsfaktor für die Osteoklasten-Induktion [292]. Eine vergleichbare Phosphorylierung von p38 an Thr180/Tyr182 wie in M-CSF/sRANKL behandelten BMM Φ s konnte auch mit PMT erreicht werden (Abbildung 4.12 D).

Auch NF- κ B-Signale spielen eine große Rolle für die Generierung von Osteoklasten [293]. Wie sich gezeigt hat, bilden p50/p52-*Knockout*-Mäuse keine Osteoklasten [190, 294]. Auch p65 wurde als wichtig für die Osteoklastendifferenzierung beschrieben [295]. Stimulierung des Rezeptors RANK durch RANKL führt unter anderem zur Aktivierung des klassischen/kanonischen NF- κ B-Signalweges über TRAF6, in dessen Folge es zu der Aktivierung des IKK Komplexes (IKK α , IKK β , IKK γ) kommt. Die anschließende Phosphorylierung des Inhibitors I κ B α führt zu dessen Degradation und zu der nukleären Translokation des Heterodimers p50/p65 und der Einleitung der Transkription von NF- κ B-Zielgenen [293]. Als Folge der Aktivierung des IKK Komplexes kommt es zu einer Phosphorylierung an Ser536 in der Transaktivierungsdomäne von p65 [296]. Wie in Abbildung 4.12 E zu sehen ist, wurde eine gesteigerte Ser536 Phosphorylierung von p65 mit PMT im Vergleich zu M-CSF-stimulierten Zellen detektiert und deutet somit auf dessen Aktivierung hin. P50 wird als inaktives Präkursor Molekül translatiert, dem p105, aus dem durch proteolytische Spaltung das kleinere, transkriptionell aktive Molekül p50 entsteht. Durch Aktivierung des NF- κ B-Signalweges phosphoryliert die aktivierte IKK Kinase p105 an Ser-Resten in einer regulatorischen Domäne zw. den Aminosäuren 922 - 933, die die Prozessierung von p105 zu aktivem p50 einleiten [297]. Um die Aktivierung von p50 zu untersuchen wurde die Phosphorylierung von p105 an Ser933 detektiert. Wie in Abbildung 4.12 F zu sehen ist, führt die PMT Stimulation auch zur Aktivierung und Prozessierung von p105 zu p50 und damit sehr wahrscheinlich zur Transkription von p50/p65 Zielgenen, die für die Osteoklastogenese von Bedeutung sind. Zusammenfassend kann man sagen, dass mit PMT ähnliche Signalnetzwerke in Vorläuferzellen stimuliert werden wie mit RANKL.

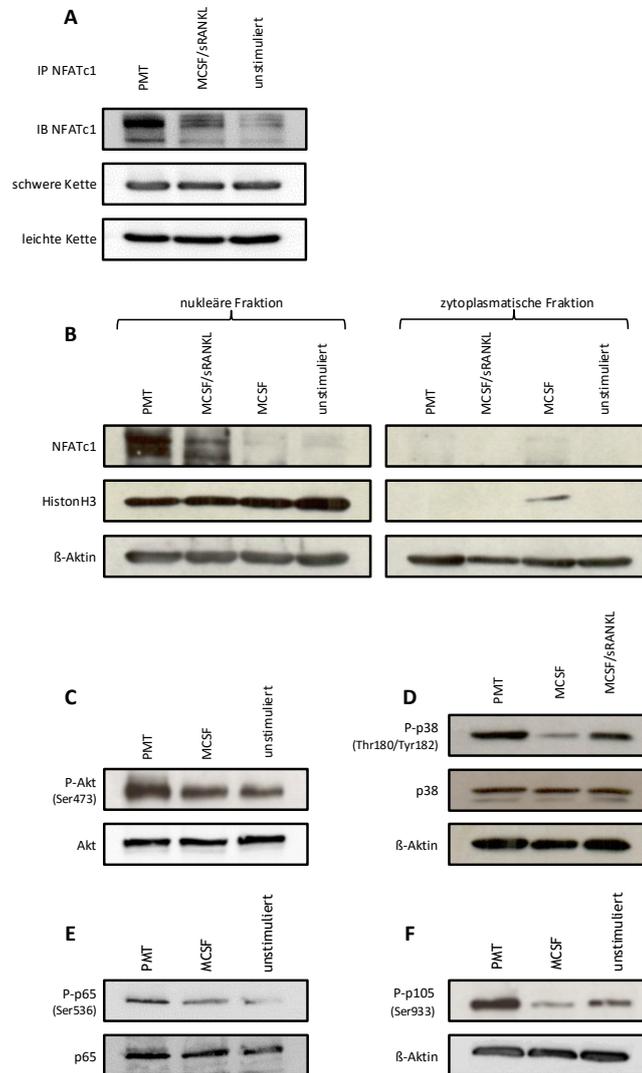


Abbildung 4.12: PMT aktiviert Signalkaskaden, die bedeutend für die klassische, RANKL-vermittelte Osteoklastogenese sind. BMMΦ wurden mit PMT (5 nM), M-CSF (25 ng/ml) und der Kombination aus M-CSF und sRANKL (50 ng/ml) stimuliert. (A) Die zellulären Protein-Level an NFATc1 nach 24-stündiger Stimulation mit PMT wurden durch Immunpräzipitation und *Western Blot* Analyse bestimmt. (B) Die nukleäre Translokation von NFATc1 (24 h) wurde durch eine Auftrennung in nukleäre und zytoplasmatische Fraktionen und anschließende *Western Blot*-Analyse untersucht. Als Kompartimentierungs-Kontrollen dienen HistonH3 und β-Aktin. (C)(D)(E)(F) Die Zellen wurden für 7 h (C)(D) oder für 4 h (E)(F) stimuliert und anschließend die Phosphorylierungen von (C) Akt an Ser473, (D) p38 an Thr180/Tyr182, (E) p65 an Ser536 und (F) p105 an Ser933 mittels *Western Blot* untersucht. (A)(B)(C)(D)(F) Die gezeigten Daten sind repräsentativ für drei bzw. (E) für zwei unabhängige Experimente.

4.4 Analyse des Proteoms von Osteoklasten-Vorläufern und Osteoklasten

In Kapitel 4.3 wurden Mechanismen untersucht, die zuvor schon mit dem Prozess der Osteoklastogenese in Zusammenhang gebracht wurden. Es ist aber sehr wahrscheinlich, dass am Vorgang der PMT-induzierten Osteoklasten-Differenzierung weitere, bislang unbeschriebene Mechanismen beteiligt sind. Um diese unbekannt Faktoren zu finden, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine differentielle Proteom-Analyse mittels der DIGE-Technik durchgeführt. Das Ziel hierbei war es, Proteine zu identifizieren, die unterschiedlich im Proteom PMT-stimulierter Osteoklasten im Vergleich zu M-CSF/sRANKL-stimulierten, konventionellen Osteoklasten und M-CSF-stimulierten Vorläuferzellen reguliert sind. Die Erkenntnisse hieraus sollten neue Hinweise dafür liefern, wie das bakterielle Toxin seine Zielzellen modifiziert und schließlich auf Differenzierungsprozesse einwirkt. Eine ausführliche Beschreibung der Grundlagen der DIGE-Technik wurde in verschiedenen Publikationen dargelegt [298, 299]. Zusammengefasst handelt es sich hierbei um eine Erweiterung der 2-D-Gelelektrophorese, also die Auftrennung von Proteingemischen durch Unterschiede in Ladung und Größe. Die Erweiterung bezieht sich dabei auf die Möglichkeit der Quantifizierung, die durch eine gemeinsame Auftragung verschiedener Proteinextrakte auf ein Gel erreicht wird. Dabei werden die Proteinextrakte durch unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe vorher markiert und können so hinterher voneinander differenziert und somit quantifiziert werden. Ein Fluoreszenzscanner erfasst die Signale und ordnet diesen Positionen in x/y-Richtung zu. Durch Überlagerung der unterschiedlich gefärbten Proben ergeben sich somit unterschiedlich regulierte Proteinspots, die aus dem Gel geschnitten und mittels Massenspektrometrie identifiziert werden können. BMMΦs wurden wie in Abschnitt 3.2.1.2.2 beschrieben generiert und anschließend mit M-CSF, PMT oder M-CSF/sRANKL für sieben Tage kultiviert um Makrophagen, konventionelle Osteoklasten und PMT-Osteoklasten zu erhalten. Es wurden Lysate von drei biologischen Replikaten hergestellt und mit den Cyaninfarbstoffen Cy3 und Cy5 gefärbt und durch 2-D Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Gele wurden mit dem Typhoon 9400 Laser Scanner gescannt und anschließend mit der DeCyder 2D Software analysiert. Dabei wurde jedes Zelllysate mit beiden Farbstoffen (Cy3 und Cy5) einmal gefärbt um Farbstoff-Effekte ausschließen zu können. Zur Normalisierung diente eine gleich anteilige Mischung aller Replikat-Lysate, die mit Cy2 gefärbt wurde und ebenfalls auf den Gelen zusammen mit den Proben mit aufgetrennt wurde. Abbildung 4.13 zeigt exemplarisch eine Überlagerung der gescannten Kanäle Cy2/Cy3/Cy5 eines der DIGE-Gele. In diesem Gel wurde die mit M-CSF/sRANKL-behandelte Probe mit Cy3 und die PMT-behandelte Probe mit Cy5 gefärbt, während die Cy2 Probe wie schon erwähnt die Normalisierungsprobe war. In der horizontalen Dimension wurden die Proteine nach dem Isoelektrischen Punkt (pH 3-10) und in der vertikalen Dimension nach molekularem Gewicht (10 kDa - 150 kDa) aufgetrennt. Wie in Abbildung 4.13 an der Heterogenität des Farbmusters schon klar zu erkennen ist, besitzen die Osteoklasten verschiedener Herkunft (PMT vs. M-CSF/sRANKL) ein deutlich unterschiedliches Proteinexpressions-Muster.

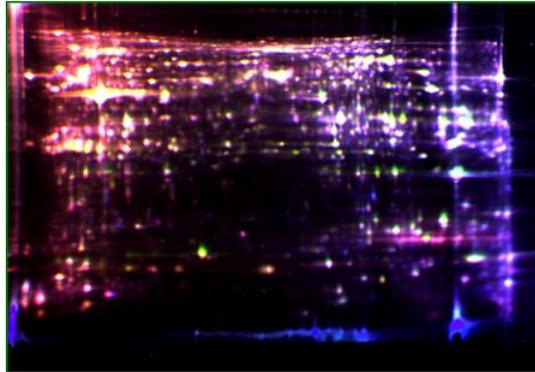


Abbildung 4.13: **Exemplarisches DIGE Gel.** BMM Φ wurden für sieben Tage mit PMT (5 nM), M-CSF (25 ng/ml) oder der Kombination von M-CSF und sRANKL (50 ng/ml) stimuliert und anschließend lysiert. Zur Generierung des gezeigten, exemplarischen DIGE Gels, wurde das Lysat PMT-stimulierter Zellen mit dem Farbstoff Cy5 und das Lysat M-CSF/sRANKL-behandelter Zellen mit dem Farbstoff Cy3 gefärbt. Als Normalisierungskontrolle wurden alle Proben aller Replikate vereint und mit dem Farbstoff Cy2 gefärbt. Die Proben wurden durch 2-D-Gelelektrophorese aufgetrennt. In der horizontalen Dimension wurden die Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt (pH 3-10 von links nach rechts). In der vertikalen Dimension wurden die Proteine entsprechend ihres molekularen Gewichtes aufgetrennt (10 kDa-150 kDa). Anschließend wurden die Farbstoffe mit einem Laser angeregt und ihre Fluoreszenzemissionen mit einem Laser Scanner detektiert und eine 2-dimensionale Überlagerung der Cy2/Cy3/Cy5 Signale erstellt. Eine solche Überlagerung ist hier exemplarisch gezeigt. Die DIGE-Technik wurde von Dr. K. A. Bode durchgeführt.

Die Spotvolumina (Fluoreszenzintensitäten) wurden mit der DeCyder Software normalisiert, miteinander verglichen und signifikant regulierte Spots wurden bestimmt. Zur Visualisierung der quantitativen Unterschiede in den Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Spots wurden 3-D-Darstellungen der Spotvolumina von der DeCyder Software generiert. Repräsentative 3-D-Darstellungen einiger interessanter, signifikant differentiell exprimierter Proteine sind in Abbildung 4.14 gezeigt. Die jeweiligen Punktediagramme zeigen die Häufigkeit der Proteine im jeweiligen Proteinspot im Vergleich zum Gel-Standard für die verschiedenen biologischen Replikate. Es ergaben sich insgesamt 4210 Proteinspots, von denen sich 800 als differentiell reguliert herausstellten (*, $p < 0,05$ *Student's t*-Test; Average ratio ± 1.5). Von diesen differentiell regulierten Proteinspots wurden die 30 Proteinspots ausgewählt, die am markantesten reguliert waren bezüglich ihrer Volumengröße und *Peak*-Höhe. Die ausgewählten Proteinspots wurden mit Hilfe eines *Spot-Pickers* ausgestanzt und per Massenspektrometrie-Analyse identifiziert. Eine Tabelle aller identifizierten Proteine findet sich im Anhang (10.1). In Tabelle 4.2 sind einige mit PMT signifikant erhöhte bzw. signifikant erniedrigte Proteine aufgelistet, die im Zusammenhang dieser Dissertation als interessant erschienen.

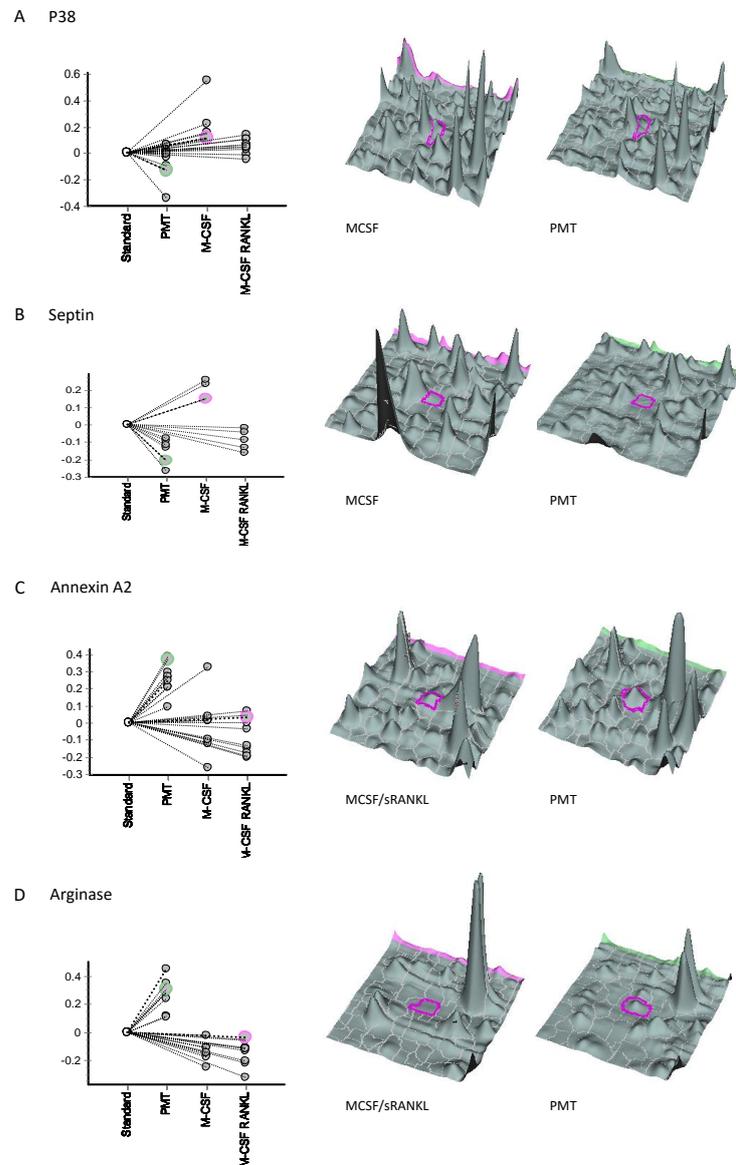


Abbildung 4.14: **Exemplarische Beispiele für signifikant regulierte Proteinspots.** Die Unterschiede in den Fluoreszenzintensitäten einzelner Spots zwischen den verschiedenen Proben wurden von der DeCyder Software als 3-D-Darstellung präsentiert. Des Weiteren wurden Punktediagramme generiert, die die Häufigkeit der Proteine im jeweiligen Proteinspot im Vergleich zum Gel-Standard für die verschiedenen biologischen Replikate (n=3) zeigen. Alle für die massenspektrometrische Analyse selektierten Proteinspots waren statistisch signifikant (*, $p < 0,05$ Student's t-Test; $Average\ ratio \pm 1.5$). Die gezeigten exemplarischen Proteinspots konnten als **(A)** p38, **(B)** Septin, **(C)** Annexin A2 und **(D)** Arginase identifiziert werden.

Signifikant erhöht mit PMT	Signifikant erniedrigt mit PMT
Arginase-1	Prelamin-A/C
Annexin A2	<i>Serine/Threonine-protein kinase 38</i>
<i>Unnamed protein product</i> (phosphoglycerate mutase 1)	Septin-11
<i>Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD</i>	<i>Mitogen-activated protein kinase 1</i>

Tabelle 4.2: **Selektion einiger Ergebnisse der Massenspektrometrie mit Relevanz für den Prozess der Osteoklastogenese.** Gezeigt sind signifikant durch PMT-Stimulation erhöhte bzw. erniedrigte Proteine. Die Massenspektrometrie wurde von Dr. M. Schnölzer (DKFZ) bzw. Prof. Kathrin Thedieck (Universität Groningen, Niederlande) durchgeführt.

Ein Beispiel hierfür ist Arginase-1. Es ist bekannt, dass Arginase-1 mit der NO-Synthase um ihr gemeinsames Substrat Arginin konkurriert und demzufolge eine gesteigerte Arginase-1 Expression in Makrophagen zu einer verringerten Synthese von NO führt [300]. NO wurde als Inhibitor der Osteoklasten-Funktion beschrieben [301]. Da die DIGE Ergebnisse darauf hindeuten, dass PMT die Arginase-1 hochreguliert, könnte über diesen Mechanismus die Aktivität von Osteoklasten beeinflusst werden. Des Weiteren findet sich Annexin A2 in der Liste identifizierter Proteine, die mit PMT signifikant hochreguliert wurden. Diesem Protein wurde eine Osteoklasten-fördernde Wirkung zugeschrieben [302, 303]. *Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD* (ASC) spielt eine bislang nicht ganz aufgeklärte Rolle bei der Kollagen-induzierten Arthritis. *ASC-Knockout*-Mäuse sind vor der Entwicklung von Kollagen-induzierter Arthritis geschützt, aber die detaillierten Mechanismen hierbei sind noch nicht vollständig aufgedeckt [304]. PMT könnte hierbei ein wertvolles Modellsystem sein, da die DIGE Ergebnisse suggerieren, dass PMT ein Regulator von ASC ist. Ein Mangel an Lamin-A/C begünstigt ein Osteoklastogenese-förderndes Milieu und trägt so zu einer gesteigerten Osteoklastogenese bei [305]. Der Vorläufer von Lamin A/C ist einer der Proteinspots, die von PMT signifikant herunterreguliert wurden. Ein weiterer Treffer, der mit PMT runterreguliert wurde, war die p38 MAP Kinase. Es ist bekannt, dass diese MAP Kinase eine bedeutende Rolle bei der Einleitung der Osteoklasten-Differenzierung aus Knochenmarks-Vorläuferzellen nach RANKL Stimulation spielt [306, 307]. Kinasen werden allerdings hauptsächlich durch Phosphorylierung reguliert. Die Verringerung der Proteinmenge mit PMT oder M-CSF/sRANKL könnte daher auch mit einer gesteigerten Phosphorylierung und mit dem daraus resultierenden Verschieben des *Peaks* zu einem niedrigeren pH-Wert zusammenhängen. Das 3-D-Modell für p38 zeigt in horizontaler Linie mehrere kleine aneinandergereihte *Peaks* mit PMT (Abbildung 4.14). In Abbildung 4.12 wurde die p38 Aktivierung schon untersucht und mit PMT und M-CSF/sRANKL eine gesteigerte Phosphorylierung beobachtet. Dies steht im Einklang mit den DIGE-Ergebnissen und erklärt die Proteinspot-Abnahme für die unphosphorylierte Variante von p38. Septin11 ist ein GTP-bindendes Protein, das heterooligomere Komplexe bilden kann. Septin11 kann mit zellulären Membranen und Aktin-Filamenten

assoziiieren und so die Aktin-Dynamik, Zellform, Zytokinese und Starrheit der Membran beeinflussen [308]. PMT besitzt einen starken Einfluß auf die Organisation des Zytoskeletts in seinen Zielzellen [309]. Das Regulieren von Septinen könnte daher ein weiterer möglicher Mechanismus sein, durch den PMT Einfluß auf die Zell-Struktur seiner Zielzellen nehmen könnte. Auch für die MAPK1 (ERK2) ergab sich eine signifikant unterschiedliche Regulation mit PMT. Die ERK Kinasen sind als Überlebens-Kinasen für Osteoklasten bekannt [310]. Ähnlich wie bei p38 wurde auch hier eine signifikante Abnahme mit PMT mittels DIGE detektiert, allerdings deutete auch hier das 3-D-Profil dieses Proteinspots auf eine posttranslationale Modifikation hin. Auch dies konnte im nächsten Abschnitt bestätigt werden, da in Abbildung 4.20 C gezeigt wurde, dass PMT eine gesteigerte ERK1/2 Phosphorylierung in Makrophagen stimuliert. Auffallend war, dass viele der unterschiedlich regulierten Proteine an der Steuerung des zellulären Metabolismus involviert sind (siehe Anhang 10.1). Dieses Regulationsmuster suggerierte eine Beteiligung der mTOR Kinase, die einen großen Einfluss auf die transkriptionelle Kontrolle des zellulären Metabolismus ausübt [311]. Daraufhin wurde untersucht, ob die mTOR Kinase an dem Prozess der PMT-induzierten Osteoklastogenese beteiligt ist (siehe Kapitel 4.5).

4.5 PMT induzierte Osteoklastogenese ist mTOR abhängig

Der mTOR-Signalweg spielt eine bedeutende Rolle bei der Integration von Signalen, die der Zelle den Versorgungszustand mit essentiellen Nährstoffen melden sowie bei der Anpassung der metabolischen Prozesse. Auch die Differenzierung von Osteoklasten hängt von einer starken metabolischen Anpassung ab: Es ist bekannt, dass Enzyme des Citratzyklus und der oxidativen Phosphorylierung hochreguliert sind, um dem großen Verbrauch an ATP gerecht zu werden, die ein Osteoklast benötigt [312]. Daher erschien eine Beteiligung der mTOR Kinase am Prozess der Osteoklastogenese möglich. Die Rolle der mTOR Kinase für das Überleben von reifen, differenzierten Osteoklasten konnte bereits zuvor gezeigt werden: Die Signalwege der drei Osteoklasten-Überlebensfaktoren M-CSF, TNF- α und RANKL münden in der Aktivierung des mTOR-Signalweges [313]. Die prinzipielle Fähigkeit von PMT, den mTOR-Signalweg zu aktivieren, wurde kürzlich in Fibroblasten demonstriert [125]. In diesem Modellsystem erfolgte die Aktivierung von mTOR allerdings indirekt durch eine ERK-abhängige Stimulierung der Sekretion eines löslichen Faktors, dem CTGF, der auf parakrine Weise den mTOR-Signalweg aktiviert [126]. Daher sollte untersucht werden, ob mTOR durch PMT auch in Osteoklasten-Vorläuferzellen aktiviert wird und ob der Signalweg bedeutsam für die Differenzierung von Osteoklasten mit PMT ist.

4.5.1 Der mTOR-Signalweg wird in Makrophagen mit PMT aktiviert

Die folgenden Experimente wurden mit der Makrophagen-Zelllinie RAW264.7 durchgeführt, die zu Osteoklasten differenziert werden kann und ein etabliertes und anerkanntes Modellsystem für die Studien der Osteoklastogenese darstellt [314]. Die Regulierung der mTOR-Aktivität im mTORc1 ist

sehr komplex und setzt die Anwesenheit von Nährstoffen, Aminosäuren und Wachstumsfaktoren voraus (2.3.3). Die Aktivität wird hauptsächlich durch die vielen verschiedenen Bindungspartner, die am mTORc1 beteiligt sind, reguliert. Diese ermöglichen nach Aktivierung des mTOR-Signalweges die Dissoziation sterischer Inhibitoren und damit die Zugänglichkeit des aktiven mTOR Kinase Zentrums für die spezifischen Substrate [80, 315]. Da die Aktivierung von mTOR daher nicht so einfach wie bei vielen anderen Kinasen nur anhand einer Phosphorylierung gezeigt werden kann, wird als Indikator für die Aktivität des mTORc1 gewöhnlich die Phosphorylierung seiner beiden bestcharakterisierten Ziel-Substrate 4E-BP-1 und P70s6K1 untersucht. P70s6K1 und 4E-BP-1 sind beide in den Prozess der Synthese von Proteinen involviert. P70s6K1 phosphoryliert und aktiviert rpS6 (*ribosomal protein S6*). Hierbei handelt es sich um ein Protein, das für die Translation von mRNAs gebraucht wird, die ribosomale Proteine und Elongationsfaktoren kodieren. Darüber hinaus sind noch mindestens sechs weitere Zielproteine der P70s6K1 bekannt, die alle mit Cap-abhängiger Translation, Elongation oder Ribosom-Biogenese zu tun haben [96]. P70s6K1 wird von mTORc1 an Thr389 phosphoryliert und aktiviert. Eine gesteigerte Thr389 Phosphorylierung konnte in RAW264.7 Zellen nach 3 h PMT-Stimulierung nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4.15 A). Nach 5 h Inkubation mit PMT schwächte sich die Phosphorylierung ein wenig ab, da wahrscheinlich negative *Feedback*-Mechanismen zum Greifen kommen, die für den mTOR-Signalweg bekannt sind. Inkubation mit dem mTORc1 Inhibitor Rapamycin inhibierte diese Phosphorylierung komplett bis auf das Niveau der Kontrolle herunter. Dies zeigt, dass tatsächlich die Aktivierung des mTORc1 für die Phosphorylierung mit PMT verantwortlich war. Als weiterer Beweis für die mTORc1-Aktivität konnte die Phosphorylierung von 4E-BP-1 nachgewiesen werden. 4E-BP-1 inhibiert den Prozess der Translation durch Bindung an den Initiationsfaktor 4E (eIF-4E). 4E-BP-1 kann von mTORc1 an mehreren Aminosäure-Resten phosphoryliert werden: Thr37, Thr46, Ser65, Thr70 und Ser83 [80]. Die Phosphorylierung von 4E-BP-1 an Thr37 und Thr46 wird allerdings als initialer Schritt angesehen, der die weiteren Phosphorylierungen von 4E-BP-1 in die Wege leitet, die letztendlich dafür sorgen, dass der Repressor von eIF-4E dissoziiert [118]. In RAW264.7 Zellen, die für 1 h bzw. 3 h mit PMT stimuliert wurden, konnte eine gesteigerte Phosphorylierung an Thr37 und Thr46 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gezeigt werden (Abbildung 4.15 B). Es sind insgesamt drei Banden zu sehen: Bei der am schnellsten migrierenden, unteren Bande handelt es sich vermutlich um frisch Thr37/Thr46 phosphoryliertes 4E-BP-1. Durch die konsekutive weitere Phosphorylierung an den anderen Aminosäureresten entstehen poly-phosphorylierte, langsamer migrierende 4E-BP-1 Moleküle, die in den oberen beiden Banden zu sehen sind [118]. Als Positivkontrolle für die 4E-BP-1 Phosphorylierung wurden die Zellen auch mit PMA (*phorbol-12-myristate-13-acetate*) und IGF-1 (*insulin-like growth factor 1*) stimuliert, da diese bekannte Aktivatoren von mTORc1 sind [316, 317]. Wie in Abbildung 4.15 B zu sehen ist, war die Phosphorylierungs-Effizienz mit PMT vergleichbar mit diesen beiden Stimulantien. Auch hier inhibierte die Inkubation mit Rapamycin wie erwartet einen großen Anteil der Thr37/46 Phosphorylierung. Als Kontrolle für die Wirksamkeit des Inhibitors wurde zusätzlich die Inhibition der P70s6K1 Phosphorylierung durch Rapamycin überprüft und konnte diese bestätigen. Als weiterer Indikator für die Aktivität von mTORc1 in RAW264.7 Zellen nach PMT Stimulation wurde die Phosphorylierung von mTOR an Ser2448 untersucht. Diese Phosphorylierung wird durch die aktivierte P70s6K1 stimuliert und wirkt vermutlich als *Feedback*-Mechanismus abwärts von mTOR

[318]. Wie in Abbildung 4.15 D zu sehen ist, stimulierte PMT diese Phosphorylierung im Vergleich zu den unbehandelten RAW264.7 Zellen. Die Phosphorylierung von mTOR war langanhaltend und sogar noch nach 24 h vorhanden, wenn auch leicht abgeschwächt im Vergleich zum Wert nach 1 h. Diese langanhaltenden Effekte mit PMT könnten darauf zurückgeführt werden, dass PMT in seinen Zielzellen bekanntermaßen eine konstitutive G-Protein-Aktivierung bewirkt, wie im Einleitungskapitel 2.3.2 beschrieben. Die leichte Abnahme der Phosphorylierung könnte daran liegen, dass P70s6K1 negative *Feedback*-Mechanismen einleiten kann [119, 319]. Als nächstes wurde auch auf Ebene der Komplexpartner von mTOR untersucht, ob Modifikationen dessen Aktivität ermöglichen. Für das Protein PRAS40 ist bekannt, dass es an mTORc1 bindet und so seine Aktivität auf sterische Weise inhibiert. PRAS40 wird durch die Akt Kinase an Thr246 phosphoryliert, was Bindungsstellen für das Protein 14-3-3 generiert, an das PRAS40 bevorzugt bindet und so von dem mTORc1 verdrängt wird. Durch diesen Mechanismus kann die mTORc1-Inhibition durch PRAS40 aufgehoben werden [108, 109]. Die *Western-Blot*-Analysen ergaben, dass PMT nach 3 h Inkubation eine starke Thr246 Phosphorylierung bewirkt (Abbildung 4.15 C). Diese Phosphorylierung mit PMT blieb auch nach Rapamycin-Behandlung unverändert, was im Einklang damit steht, dass diese Phosphorylierung Akt-abhängig oberhalb der mTOR Kinase geschehen ist. Zusammengefasst zeigt Abbildung 4.15, dass PMT den mTORc1-Signalweg in Osteoklasten-Vorläufern (RAW264.7 Zellen) aktivieren kann.

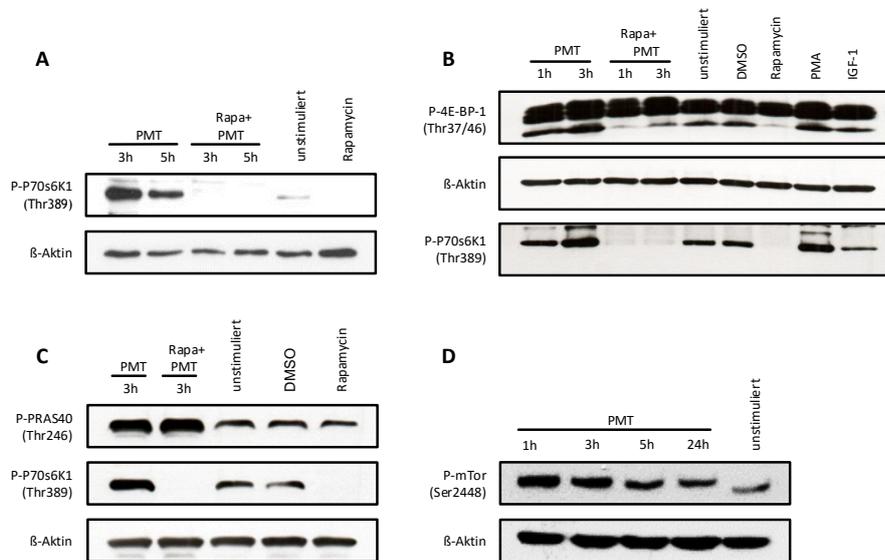


Abbildung 4.15: **PMT aktiviert den mTOR-Signalweg in Makrophagen.** RAW264.7 Zellen wurden mit PMT (5 nM) für die angegebenen Zeiten stimuliert. Um die Rolle des mTOR-Signalweges zu eruieren, wurden die Zellen mit dem Inhibitor Rapamycin (10 ng/ml) behandelt. Als Negativkontrolle dienten die unstimulierten Zellen, sowie Zellen, die nur mit Rapamycin bzw. der Lösungsmittelkontrolle für den Inhibitor (DMSO) behandelt wurden. Die Phosphorylierungen von (A) P70s6K1 an Thr389, von (B) 4E-BP-1 an Thr37/46, (C) mTOR an Ser2448 bzw. (D) PRAS40 an Thr246 wurden mittels *Western Blot* analysiert. Als Ladekontrolle wurde β -Aktin detektiert. Als Kontrolle für die Wirksamkeit des Inhibitors Rapamycin wurde die Phosphorylierung von P70s6K1 in den einzelnen Versuchen überwacht. Als Positivkontrolle für die 4E-BP-1 Phosphorylierung wurden die Zellen mit IGF-1 (100 ng/ml) und PMA (100 ng/ml) stimuliert. (B)(C)(D) Die gezeigten Daten sind repräsentativ für drei bzw. (A) für sieben unabhängige Experimente.

4.5.2 mTOR spielt keine Rolle für die Zytokinproduktion mit PMT in RAW264.7 Makrophagen

Zellen der Monozyten/Makrophagen-Linie sind zwar klassische Vorläuferzellen für die Differenzierung von Osteoklasten, doch ihre Hauptaufgabe im angeborenen Immunsystem ist die Phagozytose und Sekretion inflammatorischer Zytokine zur Bekämpfung von Pathogenen. Hierbei wurde der Aktivierung des mTORc1-Signalweges nach bakterieller Stimulation eine bedeutende Rolle für die Balancierung von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen zugeschrieben [320]. Die Aktivierung von mTORc1 spielt dabei eine wichtige Rolle bei der Limitierung von exzessiver Inflammation durch Inhibierung der Sekretion von pro-inflammatorischen Mediatoren (TNF- α , IL12p40 und IL-6) und gleichzeitige Stimulierung des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 [320]. Diesen Zytokinen wurde auch eine Rolle bei der Regulierung der Osteoklasten-Differenzierung zugeschrieben. So besitzen TNF- α und IL-6 eine stimulierende und IL-12 und IL-10 eine eher inhibierende Wirkung [321-324]. PMT

ist ein bekannter Modulator der Zytokinsekretion in Immunzellen: Es bewirkt eine gesteigerte Sekretion von $\text{TNF-}\alpha$ und IL-6 in B-Zellen [24] und inhibiert die LPS-induzierte Sekretion von IL-12p40 in Monozyten [325]. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob der PMT-induzierten mTOR-Aktivierung in Makrophagen eine ähnliche Bedeutung bei der Limitierung einer überschießenden Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen zukommt wie nach LPS-Stimulation von Makrophagen [320]. Dazu wurden die Überstände 24 h PMT-stimulierter RAW264.7 Zellen, die mit oder ohne Rapamycin behandelt wurden, mittels ELISA auf die Produktion von $\text{TNF-}\alpha$, IL-12p40, IL-6 und IL-10 hin untersucht. Als Positivkontrolle für die Freisetzung der Zytokine wurden die Zellen mit LPS stimuliert. Wie in Abbildung 4.16 zu sehen ist, induzierte PMT auch in Makrophagen die Sekretion von IL-6 und $\text{TNF-}\alpha$. Eine Behandlung mit Rapamycin zeigte allerdings keinen steigenden Effekt auf die Produktion dieser Zytokine. PMT induzierte keine Sekretion von IL-12p40 und die mTORc1-Inhibition durch Rapamycin konnte in diesem Fall auch keine Produktion induzieren (Abbildung 4.16). Auch das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 wurde mit PMT erst gar nicht freigesetzt und demzufolge konnte auch keine inhibierende Wirkung durch Rapamycin beobachtet werden. Diese Daten deuten darauf hin, dass die PMT-induzierte mTOR-Aktivierung die Balance der untersuchten pro- und anti-inflammatorischen Zytokine nicht beeinflusst.

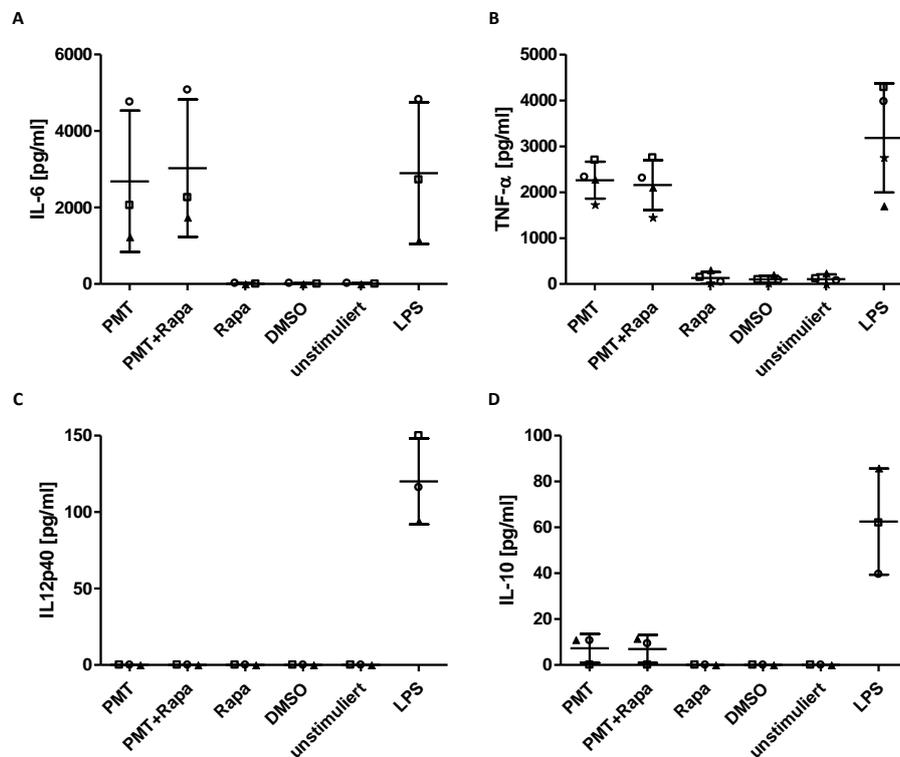


Abbildung 4.16: Die Aktivierung des mTOR-Signalweges mit PMT hat keinen Einfluss auf die Produktion von IL-6, TNF- α , IL12p40 oder IL-10. RAW264.7 Zellen wurden mit PMT (5 nM) stimuliert und mit Rapamycin (10 ng/ml) behandelt bzw. nicht behandelt. Als Negativkontrollen wurden die Zellen nicht stimuliert, bzw. mit Rapamycin alleine oder der Lösungsmittelkontrolle DMSO behandelt. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit LPS (100 ng/ml) stimuliert. Nach 24 h wurden die Überstände abgenommen und mit Hilfe von ELISAs die Sekretion von (A) IL-6, (B) TNF- α , (C) IL12p40 und (D) IL-10 bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten \pm SD.

4.5.3 Untersuchung der zellulären Effekte der mTOR-Aktivierung mit PMT

In T-Zellen konnte gezeigt werden, dass die Regulierung des Metabolismus sehr eng mit der Zell-Schicksals-Entscheidung zu Überleben oder zu den verschiedenen Zell-Subtypen zu differenzieren verknüpft ist [326]. Die Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und die Art der Verstoffwechslung ist eng an die zelluläre Funktion geknüpft und der mTOR-Signalweg spielt bei diesen Anpassungsmechanismen eine zentrale Rolle [326]. Daher wurde untersucht, welche zellulären Effekte die mTOR-Aktivierung durch PMT in Makrophagen bewirkt. Dazu wurde zunächst der Einfluß der mTOR-Inhibition durch Rapamycin auf die Zellviabilität untersucht (Abbildung 4.17 A). Als Maßstab für die Viabilität wurde der ATP-Gehalt gehungerter (2,5 % FCS) RAW264.7 Zellen nach 48 h PMT Inkubation mit oder ohne Rapamycin-Behandlung bestimmt. Unbehandelte und DMSO-behandelte Kontrollzellen proliferierten gut und wiesen eine hohe Zellviabilität auf, während die Behandlung mit

Rapamycin die ATP-Spiegel reduzierte. Dies war auch zu erwarten, da die Aktivierung des mTOR-Signalweges eine Regulierung des zellulären Wachstums als Vorbereitung auf eine Zellteilung bewirkt [114] und die Expression von mitochondrialen Genen stimuliert [327]. RAW264.7 Zellen, die mit PMT stimuliert wurden, wiesen deutlich verringerte Spiegel an ATP auf, was aufgrund der charakteristischen Rolle von PMT als stark mitogen wirkende Substanz in anderen Zelltypen zunächst verwunderlich erschien [72]. Die lichtmikroskopische Betrachtung der Zellmorphologie deutete nicht auf die Einleitung von apoptotischen oder nekrotischen Prozessen hin. Auch die Tatsache, dass die Zellen nach Durchführung des Versuches für weitere zehn Tage in der Zellkultur in relativ gleichbleibender Anzahl vorhanden blieben, ohne sich in Zelltrümmern aufzulösen, deutete eher auf ein Einstellen der Zellteilung hin als auf ein gesteigertes Zellsterben. Um jedoch sicherzustellen, dass PMT-stimulierte Zellen nicht aufgrund der Einleitung von apoptotischen Prozessen geringere ATP-Level besaßen, wurde ein Caspase3/7-Apoptose Assay durchgeführt (Abbildung 4.17 B). Doxorubicin diente in diesem Versuch als Positivkontrolle, da es sich um eine DNA-interkalierende Substanz handelt, die Apoptose einleitet. Der Versuch bestätigte, dass nur Doxorubicin die Apoptose einleiten konnte, während PMT-stimulierte Zellen keine Apoptose induzierten.

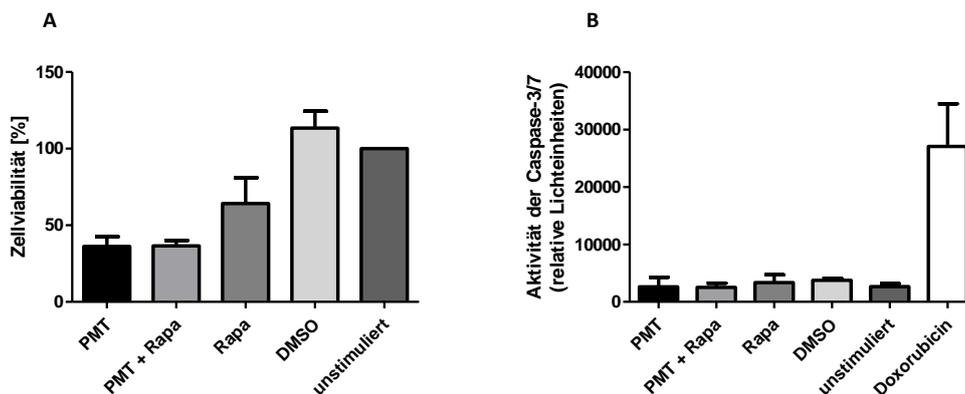


Abbildung 4.17: **Untersuchung von Viabilität und Apoptose in PMT-stimulierten Makrophagen.**

RAW264.7 Zellen wurden mit PMT (5 nM), der Kombination aus PMT und Rapamycin (10 ng/ml), Rapamycin alleine oder DMSO für 48 h behandelt. (A) Die Viabilität der Zellen wurde durch Bestimmung des zellulären ATP-Gehaltes mit dem *CellTiter-Glo* Lumineszenz Versuch untersucht. Dazu wurden die Zellen lysiert und die Entstehung eines Lichtsignals als proportionales Maß für die Anwesenheit von ATP an einem Luminometer gemessen. (B) Apoptose wurde mit dem *Caspase-Glo 3/7* Versuch analysiert. Dazu wurden die Zellen lysiert und durch die Umsetzung eines beigefügten Substrates der Caspasen 3/7 ein Lichtsignal erzeugt, das mit einem Luminometer gemessen wurde. Als Positivkontrolle für Apoptose wurden die Zellen mit Doxorubicin 1 μ M behandelt. (A)(B) Dargestellt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten \pm SD.

Nach viertägiger Stimulierung der Zellen mit PMT wurden Aufnahmen der Zellmorphologie (Abbildung 4.18) gemacht. Die Zellen hatten sich stark verändert: Es waren viele extrem große Zellen mit

großen Vakuolen im Vergleich zu den unstimulierten Zellen entstanden, die wie Osteoklasten aussahen. Die Behandlung mit Rapamycin inhibierte ihre Entstehung und lieferte bereits den ersten Hinweis, dass der mTOR-Signalweg eine Rolle für die PMT-induzierte Osteoklastogenese spielen könnte. Die Differenzierung zu Osteoklasten mit PMT könnte auch die verringerten ATP-Spiegel erklären, da auch schon für RANKL-differenzierte Osteoklasten zuvor gezeigt werden konnte, dass sie geringere ATP-Level besitzen als ihre undifferenzierten Monozyten/Makrophagen-Vorläuferzellen und dass dies sogar von großer Wichtigkeit für eine effektive Knochenresorption ist [328]. Die mTOR-Abhängigkeit der PMT-stimulierten Osteoklastendifferenzierung wurde im nächsten Abschnitt weiter untersucht.

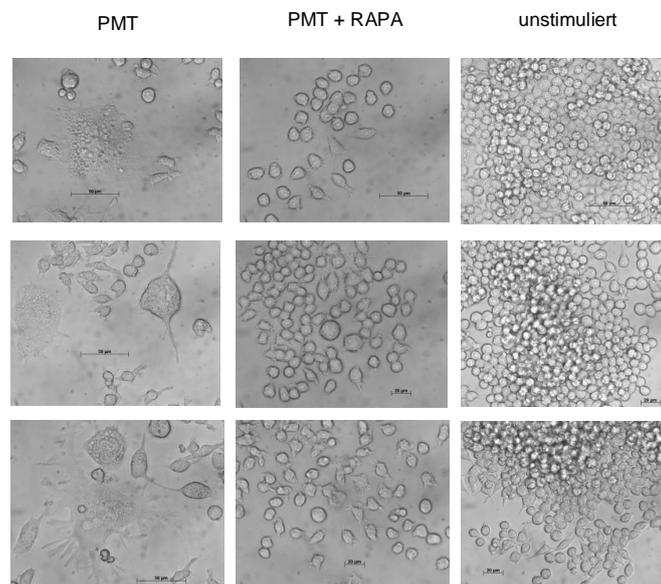


Abbildung 4.18: **Morphologie PMT-stimulierter Makrophagen.** RAW264.7 Zellen wurden mit PMT (5 nM) oder der Kombination aus PMT und Rapamycin (10 ng/ml) behandelt bzw. unstimuliert gelassen. Nach vier Tagen wurden lichtmikroskopische Aufnahmen der Zellen erstellt. Die gezeigten Aufnahmen sind repräsentativ für die typische Morphologie, die beobachtet wurde.

4.5.4 PMT stimuliert die Differenzierung von RAW264.7 Zellen zu Osteoklasten und die mTOR Kinase ist daran beteiligt

Um herauszufinden, ob es sich bei den Zellen, die mit PMT aus RAW264.7 Zellen in mTOR-abhängiger Weise differenziert waren, tatsächlich um Osteoklasten handelt, wurde die Fluoreszenz-basierte Methode für die spezifische Färbung des Enzyms TRAP mit Hilfe des ELF97 Substrates erneut angewandt (siehe Abschnitt 4.1.1). Die Differenzierung von Osteoklasten wurde dabei mit Hilfe des Konfokalen Mikroskops durch Analyse der Generierung von Zellen mit den Eigenschaften, mehr als drei Nuklei zu besitzen und das Enzym TRAP zu exprimieren (siehe Kapitel 2.4), bestimmt. Abbildung 4.19 A zeigt repräsentative Aufnahmen dieser Fluoreszenzfärbungen: Mit PMT wurde die

Differenzierung von Osteoklasten stimuliert, während eine Ko-Inkubation mit Rapamycin diese sehr effizient inhibierte. Mit der Positivkontrolle RANKL waren nach vier Tagen ebenfalls Osteoklasten differenziert, aber in vergleichsweise kleiner Anzahl. Um den beobachteten Sachverhalt zu quantifizieren, wurde die Anzahl der Osteoklasten aus drei unabhängigen Experimenten durch Zellzählung bestimmt. In Abbildung 4.19 B ist zu sehen, dass durch PMT-Stimulation viele Osteoklasten differenziert worden waren. Es konnten hierbei überraschenderweise sogar mehr Osteoklasten generiert werden als durch RANKL Stimulation. Die Inhibition des mTORc1 verringerte die Anzahl der differenzierten Osteoklasten enorm, allerdings nicht komplett auf das Niveau der Kontrollen, was eine Beteiligung zusätzlicher Signalwege suggeriert. Aus diesen Experimenten wurde schlussgefolgert, dass die PMT-induzierte Osteoklastogenese mTOR-abhängig ist.

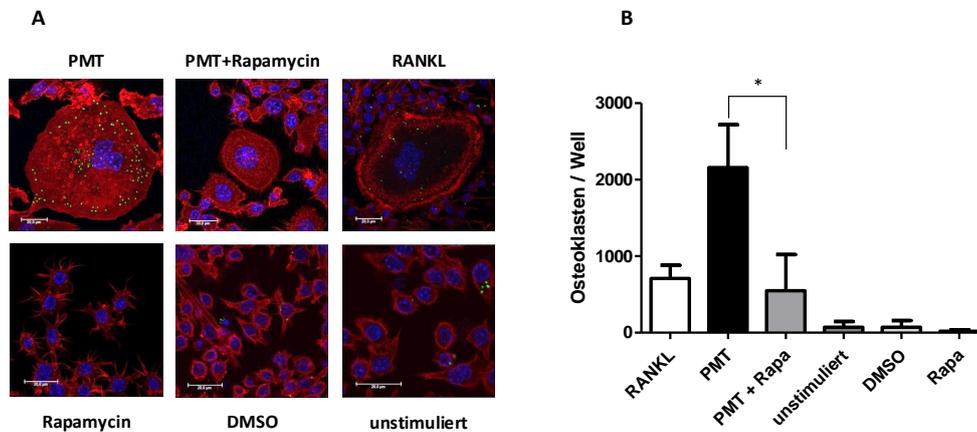


Abbildung 4.19: **PMT-stimulierte Osteoklastogenese ist mTORc1-abhängig.** RAW 264.7 Zellen wurden mit PMT (5 nM) alleine oder zusammen mit Rapamycin, mit nur Rapamycin oder der entsprechenden Lösungsmittelkontrolle (DMSO) stimuliert. Als weitere Negativkontrolle wurden Zellen unbehandelt belassen. Als Positivkontrolle für Osteoklastogenese wurden die Zellen mit sRANKL (50 ng/ml) stimuliert. (A) Nach vier Tagen der Differenzierung wurden charakteristische Osteoklastenmarker fluoreszenzmarkiert. Die Expression des Enzyms TRAP wurde durch eine enzymatische Fluoreszenzmarkierung mit dem ELF97-Substrat (grün) visualisiert. Die Multinuklearität wurde durch eine Zellkernfärbung mit DAPI (blau) angezeigt und die Zellgrenzen durch eine Färbung des Zytoskeletts mit TRITC-Phalloidin (rot) deutlich gemacht. Die Bilder wurden mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop mit einem 63er Objektiv erstellt. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen aus drei unabhängigen Versuchen. (B) Zur Quantifizierung wurde die Anzahl der differenzierten Osteoklasten je Well der 24-Well-Platte bestimmt. Dabei wurden TRAP⁺, multinukleäre (≥ 3 Nuklei) Zellen als Osteoklasten gezählt. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten \pm SD. Die statistische Relevanz wurde mit dem *Student's* t-Test berechnet (*, $p < 0,05$).

4.5.5 PMT aktiviert viele Signalwege, die als mTORc1-Aktivatoren bekannt sind

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit sollte untersucht werden, durch welche Mechanismen das Toxin die Aktivierung des mTORc1 in RAW264.7 Zellen erzielt. In den letzten Jahren wurden sehr viele Faktoren und Signalwege identifiziert, die alle in der Kontrolle der mTORc1-Aktivität involviert sind (siehe Kapitel 2.3.3). Der PI3K-Akt Signalweg gilt aufwärts als einer der Hauptaktivatoren des mTORc1. Wachstumsfaktoren wie Insulin oder IGF-1 stimulieren die Lipidkinase PI3K, die Membranlipide so moduliert, dass die Ser/Thr-Kinase Akt an die Membran rekrutiert wird und in dessen Folge aktiviert werden kann. Zur vollständigen Aktivierung muss die Akt Kinase an zwei Schlüssel-Aminosäure-Resten phosphoryliert werden: An Thr308 in der Aktivierungsschleife durch PDK-1 und an Ser473 in dem hydrophoben Motiv (HM) durch PDK-2, bei der es sich um mTORc2 handeln kann [93]. Wie schon in der Einleitung erwähnt, ist der TSC1/TSC2-Komplex ein Inhibitor von mTORc1, da er als GTPase-aktivierendes Protein (GAP) für die kleine GTPase Rheb dient [98, 99]. Rheb ist nur in seiner GTP-gebundenen Form ein proximaler Aktivator von mTORc1. TSC2 wird durch die aktivierte Akt Kinase an vielen Phosphorylierungsstellen phosphoryliert und so in seiner Funktion als GAP für Rheb inhibiert, was für die Aktivierung des mTORc1 unabdingbar ist [103]. Als zweiter Mechanismus, durch den Akt die mTORc1-Aktivierung beeinflussen kann, wurde auch eine Akt-abhängige Phosphorylierung von PRAS40 an Thr246 beschrieben, die wie schon erwähnt (siehe Kapitel 4.5.1) den Inhibitor PRAS40 vom Komplex wegrecrutiert. Da Akt eine solch zentrale Rolle für die mTORc1-Signalkette spielt, wurde seine Aktivierung untersucht.

Wie in Abbildung 4.20 A/B zu sehen ist, wurde Akt sowohl in seiner Aktivierungsschleife an Thr308 als auch an Ser473 im HM mit PMT phosphoryliert und damit vollständig aktiviert. Eine Behandlung mit Rapamycin beeinflusste diese Phosphorylierungen für die 3 h und 6 h Werte nicht. Das wurde auch erwartet, da Akt aufwärts von mTORc1 in dessen Signalweg steht. Erst nach 18 h wurde die Thr308 Phosphorylierung mit Rapamycin inhibiert. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass in vielen Zelltypen nach 24 h Inkubation mit Rapamycin auch mTORc2 inhibiert wird, der die Phosphorylierung von Akt als PDK-2 reguliert [95]. Die Verstärkung der Akt-Thr308 Phosphorylierung durch kombinierte Inkubation mit Rapamycin und PMT im Vergleich zur alleinigen PMT Stimulation nach 3 h könnte durch das Wegfallen der zuvor beschriebenen negativen *Feedback*-Hemmung erklärt werden, die durch P-P70s6K1 eingeleitet werden kann und die Phosphorylierung von Akt inhibieren kann [119].

Neben der Akt Kinase wird TSC2 auch von der ERK1/2 Kinase (*extracellular signal-regulated kinase 1/2*) phosphoryliert und inhibiert. Aktivierte ERK1/2 Kinase phosphoryliert TSC2 an Ser664 und bewirkt so die Dissoziation von TSC2 von TSC1, wodurch die Funktion des Heterodimers als mTORc1-Repressor verhindert wird [104, 329]. Des Weiteren wirkt ERK1/2 durch Phosphorylierung von Raptor an Ser696 und Ser863 auch direkt auf den mTORc1 ein, was eine gesteigerte mTOR-Aktivität bewirkt [107]. Wie in Abbildung 4.20 C zu sehen ist, bewirkt PMT eine langanhaltende, stabile ERK1/2 Phosphorylierung an Thr202/204 und zeigt damit eine weitere Möglichkeit auf, wie PMT die Akti-

vierung des mTORc1 erzielen könnte. Auch hier bewirkte wie erwartet eine Rapamycin-Behandlung keine Inhibition.

Als weitere mTORc1 aktivierende Faktoren sind die Pim Kinasen bekannt. Pim-1 ist neben Akt eine weitere Kinase, die die Dissoziation des Inhibitors PRAS40 durch Thr246 Phosphorylierung auslösen kann [112]. Die verwandte Pim-2 Kinase beteiligt sich währenddessen an der Aufhebung der supprimierenden Wirkung von TSC2 für den mTORc1 durch Phosphorylierung an Ser1798 [105]. Pim Kinasen werden über ihre Expressions-Level reguliert. In der Zelllinie HEK293 ist PMT ein sehr potenter Stimulator einer gesteigerten Pim-1 und Pim-2 Expression [71]. Daher waren die Pim Kinasen sehr wahrscheinliche Effektoren der PMT-stimulierten mTOR-Modulation und ihre Expression wurde in RAW264.7 Zellen nach PMT Stimulation untersucht. Sowohl für Pim-1 als auch für Pim-2 konnte eine gesteigerte Expression mit PMT detektiert werden (siehe Abbildung 4.20 D/E). Die wohl charakteristischste intrazelluläre Wirkung von PMT ist seine starke und konstitutive STAT-3 Aktivierung (siehe Kapitel 2.3.2), auf die eine Vielzahl seiner zellulären Effekte zurückzuführen sind. Da die *Pim-1* und *Pim-2* Kinasen wiederum Zielgene von STAT-3 sind [330], wurde dessen Aktivierung in RAW264.7 Zellen untersucht. Da des Weiteren bekannt ist, dass mTOR STAT-3 an Ser727 phosphorylieren kann, wurde der Phosphorylierungsstatus unter Rapamycinbehandlung überprüft, um herauszufinden, ob die STAT-3 Aktivierung in diesen Zellen aufwärts oder abwärts von mTOR liegt [331]. Wie in Abbildung 4.20 F/G zu sehen ist, wurde STAT-3 nach PMT Stimulation von RAW264.7 Zellen sowohl an Ser727 als auch an Tyr705 phosphoryliert. Die Ser727 Phosphorylierung durch PMT scheint nicht hauptsächlich durch mTOR stimuliert zu werden, da mit Rapamycin keine große Inhibition erreicht werden konnte. Alternativ könnte dafür die PMT-stimulierte Aktivierung von ERK1/2 (Abbildung 4.20 C) verantwortlich sein, die oberhalb von mTOR erfolgt [332]. Um zu analysieren welche der oben erwähnten Signalwege tatsächlich eine Rolle für die PMT-induzierte mTOR-Aktivierung spielen, wurden im nächsten Abschnitt Inhibitor-Experimente durchgeführt (4.5.6).

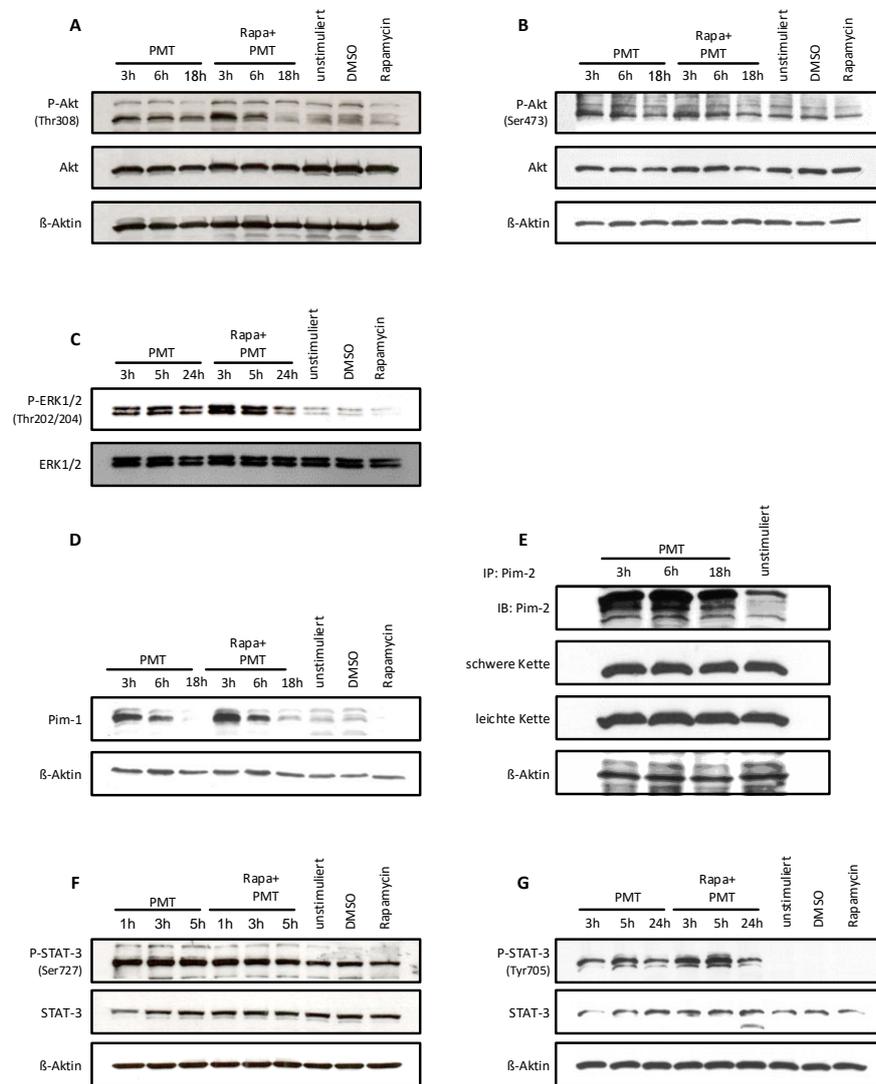


Abbildung 4.20: **PMT stimuliert mehrere bedeutende Aktivator-Kinasen des mTOR-Signalweges.** RAW264.7 Zellen wurden mit PMT (5 nM), der Kombination aus PMT und Rapamycin (10 ng/ml), Rapamycin alleine oder DMSO für die angegebenen Zeiten stimuliert. Die Phosphorylierungen von **(A)** Akt an Thr308, **(B)** Akt an Ser473, **(C)** ERK 1/2 an Thr202/204, **(F)** STAT-3 an Ser727 und **(G)** STAT-3 an Tyr705 wurden mittels *Western Blot* analysiert. Als Ladekontrollen dienten jeweils die gesamten, unphosphorylierten Proteine oder β -Aktin. **(D)** Die Expression von Pim-1 wurde durch *Immunoblot* untersucht. **(E)** Die Expression von Pim-2 wurde mit Hilfe einer Immunpräzipitation bestimmt. **(A)(C)(D)(E)(F)(G)** Die gezeigten Daten sind repräsentativ für drei bzw. **(B)** für zwei unabhängige Experimente.

4.5.6 PMT-induzierte Signalwege aktivieren mTORc1 in synergistischer Weise

Um zu untersuchen, welche der oben genannten und mit PMT aktivierten Signalwege tatsächlich eine Rolle bei der Aktivierung des mTORc1 spielen, wurden spezifische Inhibitoren eingesetzt. Der ERK1/2 Inhibitor U0126 konnte die Phosphorylierung von ERK1/2 erfolgreich inhibieren, wie in Abbildung 4.21 A zu sehen ist. Unter Stimulation mit PMT beeinflusste die Inhibition allerdings nicht den Phosphorylierungsstatus des mTORc1 Substrates P70s6K1. Eine Beteiligung der ERK1/2 Kinasen an der PMT-induzierten mTORc1-Aktivierung konnte daher ausgeschlossen werden. Die Inhibition der Pim Kinasen mit dem Pim-1 Inhibitor II oder Pim-1/2 Inhibitor V verursachte Apoptose in den Konzentrationsbereichen, die nötig waren, die Kinasen effizient zu inhibieren, so dass kein Wirkfenster mehr zur Verfügung stand um deren Effekte auf die mTOR-Aktivierung zu untersuchen. Inhibition der Phosphorylierung von STAT-3 mit dem JAK Inhibitor I erbrachte eine kleine Reduktion des Anteiles an phosphorylierter P70s6K1 (siehe Abbildung 4.21 B). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass der PMT-stimulierte JAK-STAT3 Signalweg zwar an der Aktivierung des mTORc1 partiell beteiligt ist, jedoch nicht ausreicht um die volle mTORc1-Aktivierung zu bewirken. Der Einsatz von Wortmannin, einem spezifischen Inhibitor für die PI3K führte zu einer erfolgreichen Inhibition der Thr308 Phosphorylierung von Akt (siehe Abbildung 4.21 C). Auch die Inhibition des PI3K-Akt Signalweges zeigte nur eine teilweise Reduktion der P70s6K1 Phosphorylierung. Ebenso konnte die PRAS40 Phosphorylierung, die im Abschnitt 4.5.1 beschrieben wurde, durch Wortmannin nur halbiert und nicht komplett inhibiert werden (siehe Abbildung 4.21 D).

Zusammengefasst zeigen die Daten, dass PMT mehrere Signalwege aktiviert, welche die mTORc1-Aktivierung in synergistischer Weise regulieren. Der aktivierende Effekt scheint nicht einem Signalweg komplett alleine zugeschrieben werden zu können, sondern der Summe an Faktoren aufwärts von mTOR. Der PI3K-Akt und der JAK-STAT-3 Signalweg scheinen aber auf alle Fälle involviert zu sein. Eine solch komplexe Feinregulierung gilt als charakteristisch für den mTOR-Signalweg. Dies liegt daran, dass der mTOR Kinase eine zentrale Rolle für wichtige zelluläre Prozesse wie das Überleben, Wachstum, Differenzierung und Metabolismus zukommt.

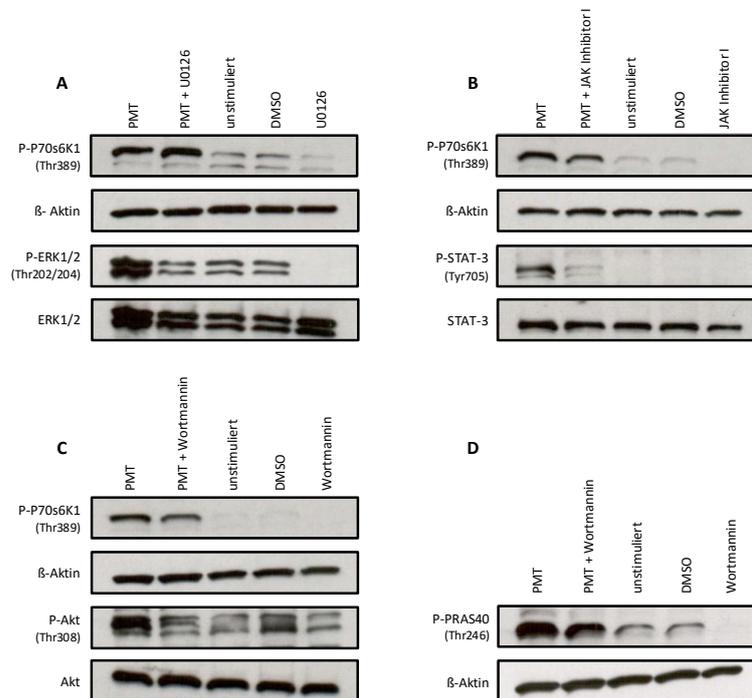


Abbildung 4.21: Dem PI3K-Akt- und dem JAK-STAT Signalweg kann eine Beteiligung an der PMT-induzierten mTORc1-Aktivierung zugesprochen werden. RAW264.7 Zellen wurden mit PMT (5 nM) für 3 h stimuliert und mit den Inhibitoren für diverse Signalwege behandelt. Als Kontrolle wurden Zellen nur mit den angegebenen Inhibitoren oder der korrespondierenden Lösungsmittelkontrolle (DMSO) behandelt bzw. wurden unbehandelt gelassen (A) Zur Inhibition von ERK1/2 wurde der spezifische Inhibitor U0126 (20 µM) eingesetzt. (B) Um den JAK-STAT Signalweg zu inhibieren wurde der JAK-1, JAK-2 und JAK-3 Inhibitor JAK Inhibitor I (1000 nM) benutzt. (C)(D) Zur Hemmung des PI3K-Akt Signalweges wurde Wortmannin (500 nM) eingesetzt. Alle Inhibitoren wurden vor der Stimulation mit PMT 1 h vorinkubiert. (A)(B)(C) Als Maß für den Einfluss dieser Signalwege auf die mTORc1-Aktivierung wurde die Phosphorylierung von P70s6K1 überwacht. Als Ladekontrolle wurde β-Aktin detektiert. Die Funktionalität der entsprechenden Inhibitoren wurde durch den Phosphorylierungsstatus von (A) ERK1/2 an Thr202/204, (B) STAT-3 an Tyr705 und (C) Akt an Thr308 kontrolliert. (D) Der Einfluss des PI3K-Akt Signalweges auf die mTORc1-Aktivierung wurde auch auf Ebene der PRAS40 Phosphorylierung an Thr246 untersucht. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Versuche.

4.5.7 PMT aktiviert mTOR-abhängig die Transkription von Osteoklasten-spezifischen Genen durch den Transkriptionsfaktor AP-1

Als Nächstes sollte aufgeklärt werden, durch welche Mechanismen die PMT-stimulierte mTORc1-Aktivierung eine Osteoklastogenese-fördernde Wirkung erzielt. NFATc1 ist bekannt als Masterregu-

lator der Osteoklastogenese. Die initiale Induktion der Transkription von *NFATc1* ist abhängig von dem Transkriptionsfaktor AP-1, der aus einem Dimer aus fos und jun besteht [198]. Daraufhin reguliert NFATc1 seine eigene Transkription durch Autoamplifikation [197] und kontrolliert zusammen mit AP-1 (fos/jun) die Transkription Osteoklasten-spezifischer Gene [198]. Eine Literaturrecherche erbrachte einen möglichen Zusammenhang zwischen der mTORc1-Aktivierung und der Kontrolle der Aktivität von AP-1. Das Protein PDCD4 kam hierbei als Regulator von AP-1 unterhalb von mTOR in Frage. In der Krebsforschung ist PDCD4 schon seit längerem als Tumorsuppressor bekannt, der die neoplastische Transformation unter anderem durch die Inhibition von AP-1 abhängiger Transkription negativ beeinflusst [333, 334]. Der AP-1 Inhibitor PDCD4 wurde außerdem als Substrat der P70s6K1 Kinase abwärts von mTORc1 beschrieben. Die P70s6K1-abhängige Phosphorylierung von PDCD4 führt zu dessen proteasomaler Degradation und gesteigerter AP-1 Aktivität [335]. Da des Weiteren zuvor beschrieben wurde, dass eine Modulation der PDCD4 Aktivität dazu führen kann, dass Vorläuferzellen vermehrt zu Osteoklasten differenzieren [286], verfolgten wir die Hypothese, dass PMT mTOR-abhängig den AP-1 Inhibitor PDCD4 reprimieren kann, um eine gesteigerte AP-1 abhängige Transkription von Osteoklasten-Genen zu erreichen.

Daher wurde zunächst die Expression von PDCD4 untersucht. Abbildung 4.22 A zeigt, dass unstimulierte RAW264.7 Zellen PDCD4 exprimierten und dass eine Behandlung mit Rapamycin diese Expression sogar noch steigern konnte. Eine Stimulation mit PMT konnte, wie aus unserem Hypothesenmodell erwartet, die Expression von PDCD4 schon nach 3 h stark eindämmen und nach 18 h maximal inhibieren. Unter Rapamycin-Behandlung der Zellen konnte PMT diese starke Reduktion in der PDCD4 Expression nicht erzielen. Neben der mTOR-Achse, die zur Degradation von PDCD4 führen kann, ist aus der Tumorforschung die miRNA21 als ein weiterer Faktor bekannt, der PDCD4 auf translationeller Ebene steuern kann [336]. Es wurde gezeigt, dass bei der RANKL-stimulierten Osteoklastogenese die nötige Abnahme des PDCD4 Proteinspiegels durch die miRNA21 vermittelt wird und dass diese entscheidend an der Aktivierung von c-fos und der Einleitung der Osteoklasten-Differenzierung beteiligt ist [286]. Eine Untersuchung der miRNA21 Expression ergab, dass diese durch PMT stark induziert wird. Allerdings ist die Aktivierung des mTOR-Signalweges mit PMT an dieser Induktion nicht beteiligt, da die Behandlung mit Rapamycin keine Inhibition der miRNA21 Expression erbrachte (Abbildung 4.22 B). Die Suche nach einer Erklärung, wie PMT die miRNA21 Expression alternativ stimulieren könnte, führte zu der in Abbildung 4.20 G gezeigten mTOR-unabhängigen STAT-3 Phosphorylierung an Tyr705 mit PMT in RAW264.7 Zellen. Eine STAT-3-abhängige Induktion der miRNA21 Expression wurde zuvor schon als Mechanismus in anderen Zelltypen beschrieben [279, 280] und diente so als Erklärung für die beobachtete Steigerung der miRNA21 mit PMT.

PDCD4 inhibiert die Transkription von AP-1-abhängigen Genen, indem es an die AP-1 Komponente c-jun bindet und so auf sterische Weise die Phosphorylierungen in dessen Transaktivierungsdomäne durch die JNK (*Jun-N-terminal kinase*) verhindert, die essentiell für die Aktivierung von Zielgenen sind [337]. Daher führt eine Verringerung des zellulären PDCD4-Spiegels zu einer gesteigerten Transaktivierung von c-jun durch JNK und damit letztlich auch zur Freisetzung der Inhibition von Osteoklasten-Genen. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob PMT durch die Inhibition von PDCD4

eine Transaktivierung von c-jun bewirken kann. Abbildung 4.22 C zeigt, dass eine Stimulation mit PMT schon nach 3 h zu einer gesteigerten Phosphorylierung von c-jun an Ser63 führte, die nach 24 h sogar noch gesteigert werden konnte. Die Untersuchung der mTORc1-Abhängigkeit dieser Phosphorylierung ergab interessanterweise, dass die frühe Transaktivierung (3 h) unabhängig von mTOR eingeleitet wurde, während die späte c-jun Modifikation mit der Aktivierung des mTOR-Signalweges in Zusammenhang stand. C-jun wird neben der Regulierung der Transaktivierung durch posttranslationale Modifikationen auch über Transkription und Proteinstabilität reguliert [338]. Abbildung 4.22 D zeigt, dass eine PMT Stimulierung auch zu einer gesteigerten nukleären Akkumulation von c-jun führte. Diese Akkumulation wurde durch Rapamycin zu späteren Zeitpunkten leicht gehemmt. Die gesteigerte nukleäre Akkumulation mit PMT war zu erwarten, da bekannt ist, dass die Ser63 Phosphorylierung von c-jun dessen Proteinstabilität durch reduzierte Ubiquitinylierung und proteasomalen Abbau erhöht [338] und ferner bekannt ist, dass c-jun ein Kernlokalisierungssignal besitzt [400]. Die Regulation der AP-1 Aktivität durch PMT scheint sich so in zwei Phasen zu gliedern, eine frühe mTOR unabhängige, deren detaillierte Mechanismen im Rahmen dieser Dissertation nicht aufgeklärt werden konnten und eine späte, die von mTOR abhängig und offensichtlich für die Differenzierung von Osteoklasten entscheidend ist, da eine Hemmung mit Rapamycin, wie in Abbildung 4.19 gezeigt, die Effektivität der Osteoklastendifferenzierung stark vermindert.

Um zu untersuchen, ob sich die mTOR-abhängige Modulation der AP-1 Transaktivierung auch in der Transkription von AP-1-abhängigen Zielgenen der Osteoklastogenese widerspiegelt, wurde die Aktivität von Kathepsin K bestimmt, da bekannt ist, dass dessen Transkription durch AP-1 reguliert wird [339, 340]. Kathepsin K wird hauptsächlich in Osteoklasten exprimiert und hat eine wichtige Funktion bei der Knochenresorption als Protease für Typ1-Kollagen, einen der Hauptbestandteile der organischen Knochenmatrix [341]. In Abbildung 4.22 E ist das Ergebnis des Kathepsin K Versuches zu sehen, bei dem in Zelllysaten die Aktivität des Enzyms durch Spaltung seiner spezifischen Substratsequenz und die daraus resultierende Freisetzung einer fluoreszierenden Substanz gemessen wurde. Zellen, die mit PMT stimuliert wurden, zeigten eine starke Aktivität von Kathepsin K im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Diese wurde fast auf das Niveau der Kontrollen durch Rapamycin-Behandlung gesenkt und bestätigt damit, dass sich die mTOR-abhängige Regulierung von AP-1 auch auf Zielgen-Ebene zeigt. Ein weiteres Zielgen von AP-1 ist *Acp5* (TRAP). Wie in Abbildung 4.22 F gezeigt, wurde die *Acp5* (TRAP) mRNA durch PMT in vergleichbarer Weise wie nach RANKL Stimulation exprimiert. Eine Behandlung mit Rapamycin inhibierte die Expression von *Acp5* (TRAP) mit PMT allerdings nur minimal. Die Regulation des *Acp5* (TRAP) Promotors ist allerdings auch als sehr komplex bekannt und beinhaltet viele weitere regulatorische Elemente neben AP-1.

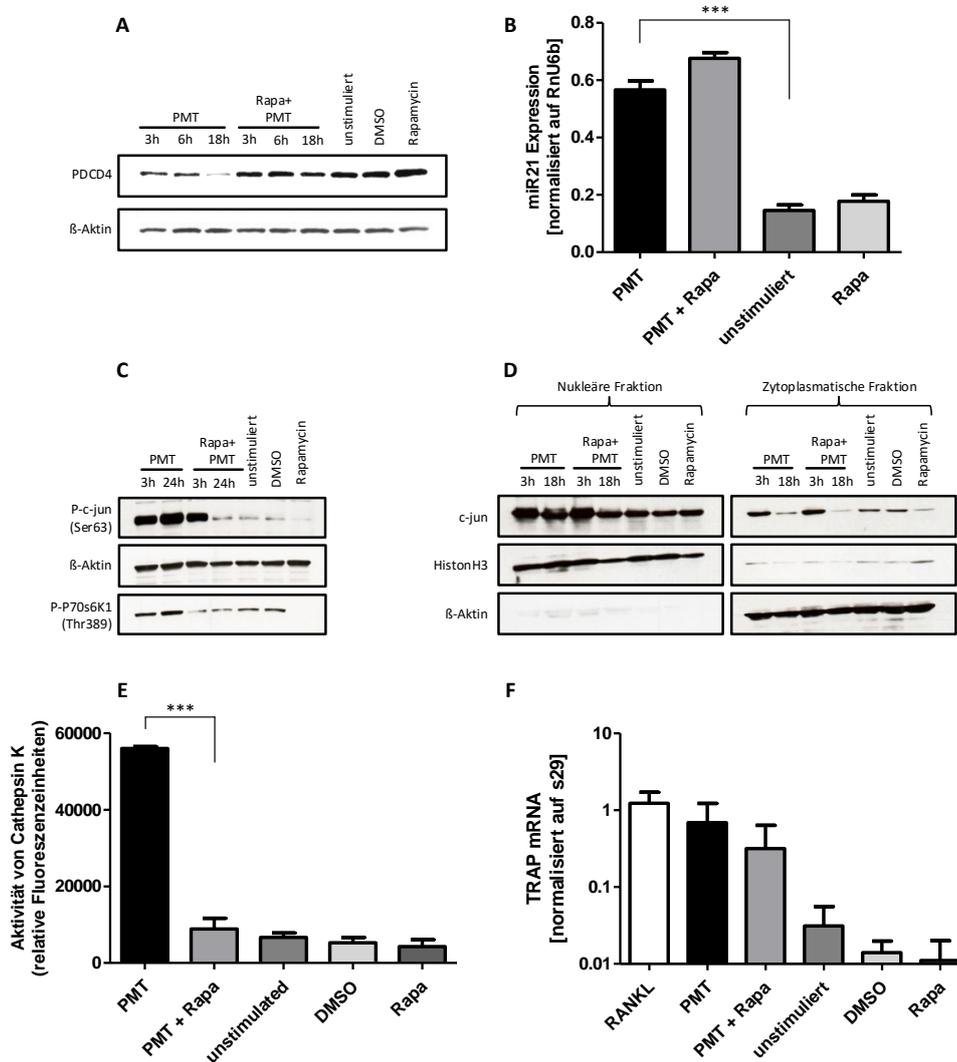


Abbildung 4.22: **PMT aktiviert den Transkriptionsfaktor AP-1 mTOR-abhängig durch Inhibition von PDCD4.** RAW264.7 Zellen wurden mit PMT (5 nM) mit bzw. ohne Rapamycin stimuliert (DMSO $\hat{=}$ Lösungsmittelkontrolle). **(A)** Die PDCD4-Expression wurde mittels *Western Blot* untersucht. **(B)** Die Expression der miRNA21 wurde mit qRT-PCR ermittelt (24h). **(C)** P-c-jun (Ser63) wurde mittels *Immunoblot* analysiert. Die Funktionalität von Rapamycin wurde mit der Phosphorylierung von P70s6K1 an Thr389 überprüft. **(D)** Die nukleäre Translokation von c-jun wurde durch *Western Blot*-Analyse nukleärer und zytoplasmatischer Fraktionen untersucht (HistonH3 bzw. β -Aktin $\hat{=}$ Kompartimentierungskontrollen). **(E)** Die Lyse vier Tage stimulierter Zellen wurden auf die Aktivität von Kathepsin K hin durch Spaltung ihres spezifischen Substrates und die Generierung eines Fluoreszenzsignals hin untersucht. **(F)** *Acp5* (TRAP) wurde durch qRT-PCR untersucht. **(B)(E)(F)** Dargestellt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten \pm SD. Statistische Relevanzen wurden mit dem *Student's t-Test* berechnet (***, $p < 0,0005$ und ****, $p < 0,0001$). **(C)(D)** Die gezeigten Daten sind repräsentativ für vier unabhängige Versuche bzw. **(A)** für drei.

Abbildung 4.23 zeigt zusammengefasst das resultierende Modell im Überblick, wie PMT mTOR-abhängig die Osteoklastogenese beeinflussen könnte. Über die Aktivierung des mTOR-Signalweges wird der Repressor PDCD4 für die proteasomale Degradation markiert. Erniedrigte PDCD4-Spiegel ermöglichen die Phosphorylierung von c-jun durch JNK und die Transaktivierung von AP-1 (c-jun/c-fos)-abhängigen Zielgenen, die folglich die Osteoklasten-Differenzierung einleiten können. Die STAT-3 abhängige Induktion der miRNA21 verstärkt den inhibitorischen Effekt von PMT auf PDCD4 noch weiter, da die Neusynthese von PDCD4 Proteinen über diesen Weg gehemmt wird und so stabil niedrige PDCD4-Spiegel gehalten werden können.

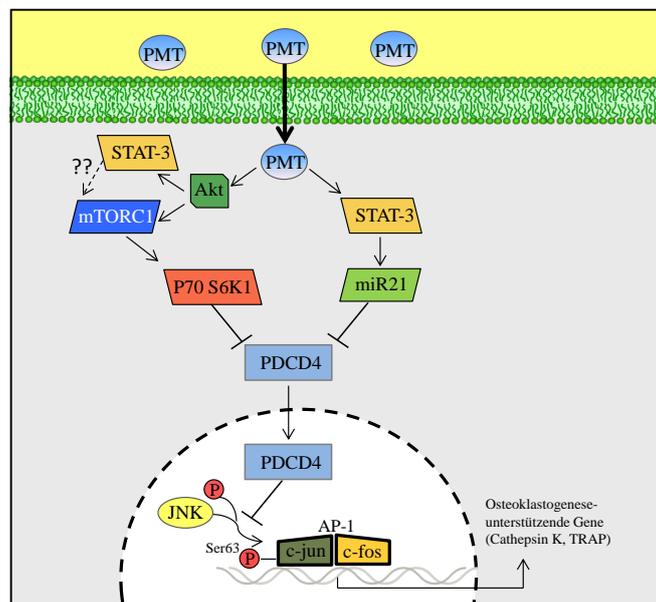


Abbildung 4.23: **Signal-Modell.** Gezeigt ist die Zusammenfassung des vorgeschlagenen Signalmodelles der PMT-vermittelten Aktivierung des mTORc1-Signalweges und der resultierenden, gesteigerten Osteoklastogenese. Durch Aktivierung des mTORc1 wird die Repression von AP-1 durch PDCD4 gehemmt, da die c-jun Transaktivierung durch die JNK Kinase ermöglicht wird und so der AP-1 Komplex aus c-jun/c-fos die Transkription von Osteoklasten-Genen einleiten kann.

5 Kapitel 5

Diskussion

5.1 Interaktionen des B-Zell- und des Skelettsystems nach PMT Stimulation

Zahlreiche Studien belegen, dass es einen sehr engen Zusammenhang zwischen dem Immunsystem und dem Skelettsystem gibt und setzen so den Grundstein für die Etablierung eines intermediären Forschungsgebietes, der Osteoimmunologie [1]. Es ist bekannt, dass langanhaltende, chronische Entzündungen Auslöser für eine gesteigerte Knochenresorption sein können, wie zum Beispiel bei der Rheumatoiden Arthritis (RA), Parodontitis, chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, Autoimmunerkrankungen wie *Diabetes mellitus* und *Lupus erythematoses*, chronisch viralen Infektionen und Krebserkrankungen wie zum Beispiel dem Multiplen Myelom [2-8]. Bei diesen pathologischen Knochenzerstörungen ist ein wesentlicher Faktor eine gesteigerte, unkontrollierte Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen durch Zellen des pathologisch aktivierten Immunsystems [12, 342, 343]. Die meisten Studien zum Verständnis der zellulären Interaktionen im Osteoimmunsystem wurden im Krankheitsmodell der RA durchgeführt. Somit ist der Kenntnisstand der Prozesse in diesem Bereich am weitesten vorangeschritten. Bei der Pathogenese von RA kommt es zu einer Infiltration des Synoviums mit Immunzellen, hauptsächlich T- und B-Zellen, dendritischen Zellen und Makrophagen auf der Basis eines autoimmunen Hintergrundes [12, 344-349]. Die Inflammation führt zu der Osteolyse des an das Synovium angrenzenden Knochens [350]. Es konnte gezeigt werden, dass eine Subpopulation an T-Zellen, die sogenannten Th17-Zellen, bei der Pathogenese eine große Rolle spielen, indem sie das Zytokin IL-17 sezernieren, das auf parakrine Weise residierende, synoviale Fibroblasten zur Sekretion des Osteoklasten-Faktors RANKL stimuliert [348, 350]. Als verstärkender Mechanismus führt IL-17 auch zur Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- α , IL-1 und IL-6 durch infiltrierte, synoviale Makrophagen [350-352]. Diese pro-inflammatorischen Mediatoren führen zum einen zur vermehrten Freisetzung von RANKL durch die synovialen Fibroblasten und stimulieren so indirekt die Differenzierung von Osteoklasten oder bewirken zum anderen eine direkte unterstützende Stimulierung von Osteoklasten-bezogenen Signalwegen [350, 353, 354]. Außerdem konnte als weiterer Osteoklastogenese-stimulierender Mechanismus gezeigt werden, dass Th17-Zellen Membran-gebundenen RANKL exprimieren [348].

Ein weiterer bekannter Interaktionsmechanismus zwischen dem Immunsystem und dem Skelettsystem ist die Bereitstellung von Osteoklastenvorläufern durch das Immunsystem [355]. Das klassische Konzept der Osteoklastendifferenzierung beschreibt Zellen der Monozyten/Makrophagen-Linie als

Vorläufer für die Differenzierung von Osteoklasten, die durch Stimulation mit den beiden Osteoklastenfaktoren M-CSF und RANKL eingeleitet werden kann [149-151]. Dass sich Osteoklasten und dendritische Zellen gemeinsame Vorläufer teilen, ist schon sehr lange bekannt [356]. In einer Publikation aus dem Jahr 2001 wurde postuliert, dass die Festlegung auf eine Differenzierung zu Osteoklasten oder dendritischen Zellen schon bei sehr frühen Vorläuferzellen (c-Kit⁺, c-Fms⁺, RANK⁻ Zellen) durch unterschiedliche Zytokinmuster eingeleitet wird und einen irreversiblen Prozess darstellt [357]. Demzufolge differenzieren durch eine Zytokinkombination aus M-CSF und RANKL Osteoklasten bzw. durch eine Kombination aus GM-CSF und RANKL entsprechend dendritische Zellen [357]. Die Linienfestlegung nach diesem Modell wird dabei durch eine GM-CSF-induzierte Inhibition der beiden Transkriptionsfaktoren c-fos und fra-1 gewährleistet, die bedeutsam für die Osteoklastendifferenzierung sind [357]. Die Ansicht, dass differenzierte dendritische Zellen auf ihre Identität und Funktion als phagozytierende, mononukleäre Antigen-präsentierende Zellen für den Rest ihres Lebenszyklus festgelegt bleiben müssen, wurde von Rivollier *et al.* und Speziani *et al.* infrage gestellt [177, 178]. Es konnte gezeigt werden, dass humane und murine, unreife, konventionelle dendritische Zellen (cDCs) *in vitro* zu funktionsfähigen Osteoklasten mit M-CSF und RANKL transdifferenziert werden können und somit ein größeres Potential an Plastizität besitzen, als zunächst angenommen wurde [177, 178]. Diese Transdifferenzierung wird durch pro-inflammatorische Zytokine aus der Synovialflüssigkeit von RA gefördert [177, 178]. Dass die Differenzierung von Osteoklasten aus dendritischen Zellen im physiologischen Rahmen eine Rolle spielt, wurde als eher unwahrscheinlich eingestuft, da die Anzahl an residenten DCs im Knochen sehr gering ist. Diese Differenzierung könnte allerdings pathophysiologisch von großer Bedeutung sein, so zum Beispiel bei der RA, bei der es zu einer Infiltration mit dendritischen Zellen kommt, die auf ein pro-inflammatorisches Mikromilieu stoßen und so diese Transdifferenzierung ermöglichen [177]. Die finale Beantwortung der Frage, ob DCs auch physiologisch als Osteoklastenvorläufer eine Rolle spielen, fordert allerdings noch weitere Studien. *In vivo* konnte bereits gezeigt werden, dass cDCs zu funktionalen Osteoklasten differenzieren können, wenn sie in eine osteopetrotische oc/oc-Maus ohne funktionelle Osteoklasten injiziert werden [358].

Der Lehrsatz, dass Monozyten bzw. Makrophagen die alleinigen Vorläufer für Osteoklasten sind, wurde zusätzlich durch Publikationen, die zeigen konnten, dass B-Zellen, also Zellen der lymphoiden Linie, als Vorläufer für Osteoklasten dienen könnten, auf den Prüfstand gestellt [223-225]. In diesen Publikationen wurden verschiedene Populationen an B-Zellen (Pro- und Pre- B-Zellen (B220⁺, CD43⁺), pan B-Zellen (B220⁺) bzw. bipotente B-Zell/Makrophagenvorläufer (B220⁺, CD11b⁺) mit unterschiedlichen Oberflächenmarkern aufgereinigt und *in vitro* demonstriert, dass diese mit M-CSF und RANKL zu Osteoklasten differenzieren können [223-225]. Die Frage, ob eine solche Differenzierung *in vivo* physiologisch vorkommt und eine Rolle spielt, konnte derzeit noch nicht zufriedenstellend geklärt werden. Ein Argument, das gegen eine entscheidende Rolle von B- und T-Zellen am alltäglichen Prozess des Knochenumbaus spricht, ist die Tatsache, dass in RAG-2^{-/-} *Knockout*-Mäusen mit einer Defizienz an reifen B- und T-Zellen keine offensichtlichen Defekte im Skelettsystem ersichtlich sind [359, 360]. Im pathophysiologischen Kontext existieren allerdings Daten, die darauf hindeuten, dass eine solche Differenzierung eventuell doch möglich wäre. So konnten in Sek-

tionen von Patienten mit fortgeschrittenem Multiplem Myelom und osteolytischen Läsionen Osteoklasten nachgewiesen werden, die Nuklei beinhalten, die translozierte Chromosomen von Plasmazellen des Multiplen Myeloms aufweisen [227]. Die Klärung der Frage, ob andere Immunzellen, z.B. dendritische Zellen oder B-Zellen, durch einen alternativen Differenzierungsweg bei Erkrankungen als Vorläufer dienen könnten, ist wichtig um Therapien zu finden, die gezielt die pathophysiologische Knochenzerstörung beeinflussen ohne die physiologischen Knochenumbauprozesse zu stören.

Nutt und Kollegen konnten zeigen, dass ein *Knockout* von *Pax-5* in Mäusen eine plastische B-Zellpopulation generiert, die ihre Festlegung auf die B-lymphoide Linie verloren hat und zu anderen Zellen differenziert werden kann, so auch zu Osteoklasten mit M-CSF und RANKL (siehe Kapitel 2.5) [216]. Da unpublizierte Vordaten aus der Arbeitsgruppe zeigten, dass PMT-stimulierte B-Zellen genau diesen Transkriptionsfaktor herunterregulieren und gezeigt werden konnte, dass die PMT-stimulierte Osteoklastendifferenzierung B-Zell-abhängig ist [24], sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob PMT ein geeignetes Mittel ist, die Knochen- und Immunzell-Differenzierung zu beeinflussen und ob B-Zellen als direkte Vorläufer für die PMT-induzierte Osteoklastendifferenzierung dienen können.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass PMT *in vitro* Knochenmarkszellen effektiv zu Osteoklasten differenzieren kann (Abbildung 4.1). Dies bestätigte Befunde, die zuvor schon anderweitig erhoben wurden. In anderen Publikationen wurde gezeigt, dass murine und porcine mononukleäre Zellen, die durch Zentrifugation aus dem Knochenmark bzw. aus dem Blut aufgereinigt wurden, mit PMT zu Osteoklasten differenziert werden können [134, 135]. Des Weiteren wurde zuvor auch schon die PMT-abhängige Osteoklastendifferenzierung aus totalem Knochenmark gezeigt [24]. Ein weiterer Fokus wurde in dieser Arbeit auf die Analyse der Morphologie der PMT-generierten Osteoklasten und die Organisation des Zytoskeletts gelegt, da PMT als potenter Aktivator von Rho GTPasen, vor allem RhoA, und Organisator von Stressfasern in anderen Zellmodellen bekannt ist [65, 66]. RhoA erwies sich in einer anderen Arbeit als ein kritischer Faktor für die Podosomenorganisation, Beweglichkeit und Resorption von Osteoklasten und damit als bedeutend für die Etablierung der *Sealing Zone*, einem Ring aus Aktin und Podosomen, einem wichtigen Strukturmerkmal von Osteoklasten (siehe Kapitel 2.4.1) [243, 361]. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des Zytoskeletts PMT-stimulierter Osteoklasten erbrachten den Hinweis, dass PMT-stimulierte Osteoklasten den für M-CSF und RANKL beschriebenen Aktinring nicht ausbilden (Abbildung 4.1). Die Aktinfilamente sind vielmehr gleichmäßig auf die gesamte Zelle verteilt. Es wurde beschrieben, dass sich Osteoklasten ohne spezifische Aktinstruktur in einer nicht-resorbierenden Phase befinden und beispielsweise migrieren [244]. Auch wenn sich PMT-generierte Osteoklasten morphologisch von den klassischen Osteoklasten unterscheiden, konnte in unserer Publikation Kloos *et al.* in Kooperation mit Prof. Dr. med. univ. Georg Schett und Dr. rer. nat. Ulrike Harre (Universitätsklinikum Erlangen) der Beweis erbracht werden, dass sie prinzipiell funktional sind und Knochen resorbieren können [380]. Auch im porcinen Modell konnte zuvor bewiesen werden, dass PMT-stimulierte Osteoklasten keinen Resorptionsdefekt aufweisen [135]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass PMT-stimulierte Osteoklasten Enzyme wie TRAP und Kathepsin K exprimieren, denen eine zentrale Bedeutung beim Prozess der Knochenresorption zukommt (Abbildung 4.1 und 4.22 E). Zudem ist auch bekannt, dass viele Osteoklasten einen

Aktinring erst auf ihrer nativen Matrix, dem Knochen, ausbilden [244]. Da die Osteoklasten, die für die Fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen generiert wurden, auf Poly-D-Lysin-beschichtetem Glas statt auf Knochen differenziert waren, könnte dies auch eine Erklärung für das Fehlen eines Aktinringes mit PMT sein.

Durch Fortschritte bei der Erforschung der Pathogenese von RA ist bekannt, dass pro-inflammatorische Zytokine im Synovium eine große Rolle bei der inflammatorisch bedingten Osteolyse spielen und dass das Teilen von Signalbotenstoffen einer der wichtigsten Interaktionsmechanismen zwischen dem Immunsystem und dem Skelettsystem ist [12]. Dass PMT nicht nur ein lokal wirkendes Agens ist, sondern den Knochen auch tatsächlich erreichen kann, konnte in einer Publikation zuvor durch eine intraperitoneale Injektion des Toxines und dem anschließenden Nachweis der PMT-spezifischen Deamidierung von $G\alpha$ -UEs heterotrimerer G-Proteine in Knochenmarkszellen des Femurs gezeigt werden [23]. Daher ist es Gegenstand unserer Hypothese, dass PMT im Knochen ein ähnlich inflammatorisches Mikromilieu schaffen könnte, wie im Krankheitsmodell der RA oder wie in den Fällen von den Knochen betreffenden Krebserkrankungen mit Osteolyse, und dadurch eventuell ungewöhnliche Transdifferenzierungen von Immunzellen ermöglichen könnte. Dass PMT-stimulierte B-Zellen mehr inflammatorische Zytokine wie IL-1, IL-6 und TNF- α sekretieren, konnte bereits zuvor gezeigt werden [24]. In der Gelenkflüssigkeit von Patienten mit RA konnten vor allem infiltrierte B-Zellen als Quelle für die Produktion von RANKL ausgemacht werden [248]. PMT-stimulierte B-Zellen erwiesen sich ebenso als eine Quelle für sRANKL [24]. Daraus ergab sich der Ansatz, dass die PMT-stimulierten B-Zellen aus dem Knochenmark nicht nur gut mit PMT expandieren, wie aus der Publikation von Hildebrand *et al.* ersichtlich ist [24], sondern auch Quelle vieler verschiedener osteolytisch wirkender Substanzen sein könnten.

Um diese Substanzen zu finden, sollte das Sekretom PMT-stimulierter Zellen mittels Massenspektrometrie in dieser Arbeit bestimmt werden um neue, bislang unentdeckte „Spieler“ im Osteoimmunsystem ausfindig zu machen. Aufgrund von im Rahmen dieser Arbeit unlösbaren technischen Schwierigkeiten, die im Detail im Ergebnisteil beschrieben wurden, war es nur möglich einige wenige Faktoren aus dem Sekretom PMT-stimulierter Knochenmarkszellen zu identifizieren. Eines der hierbei aufgedeckten Proteine ist Lipocortin I, einem Ziel der miRNA21 und Aktivator des mTOR-Signalweges [249, 250]. Dieser Zusammenhang, der erst kürzlich beschrieben wurde, ist interessant im Hinblick auf die Ergebnisse aus Kapitel 4.5 dieser Arbeit, in dem gezeigt wird, dass PMT die Expression der miRNA21 hochregulieren und den mTOR-Signalweg aktivieren kann. Ob Lipocortin I im PMT-induzierten mTOR-Signalweg tatsächlich eine Rolle spielt, kann in zukünftigen Experimenten analysiert werden.

Neuroleukin war ein weiteres Ergebnis der Analyse. Hierbei handelt es sich um einen Faktor, der von T-Zellen sezerniert werden kann und die Immunglobulinsynthese stimuliert [254]. Interessanterweise zeigte Neuroleukin außerdem eine Wirkung auf die Knochenentwicklung und Knochenregeneration [251]. Darüber hinaus konnte das bakteriostatische Molekül NGAL in den PMT-spezifischen Überständen identifiziert werden. Die Sekretion von NGAL wird durch pro-inflammatorische Zytokine stimuliert [255]. Es ist bekannt, dass PMT-stimulierte B-Zellen eine Quelle von pro-inflammatorischen

Zytokinen sind [24]. Letztlich wurden auch S100 Proteine gefunden. Diese sind als Leukozyten Chemoattraktanzien und Makrophagenaktivatoren bekannt [362]. Der nächste Schritt könnte hier die Validation der Ergebnisse mittels *Western Blot* Analyse sein. Falls sich diese erneut als PMT-spezifisch reguliert erweisen, könnten funktionelle Studien initiiert werden.

Um die Liste der identifizierten Proteine zu verlängern, müsste eine andere Herangehensweise in Erwägung gezogen werden. Die Problematik hierbei besteht darin, dass es sich bei den bioaktiven, sezernierten Proteinen um niedrig abundante Proteine handelt, die in der Masse an häufig vorkommenden Proteinen untergehen. Erschwerend kommt hinzu, dass primäre Zellen Serum benötigen um ihre Viabilität in Kultur erhalten zu können. Serumkomponenten stellen allerdings ein Problem dar, da sie die Proteomanalysen der selten vorkommenden Proteine stören. Die Kultivierung in serumfreiem Medium wird von manchen Zellen, speziell Primärzellen, aber mit der Einleitung von apoptotischen Prozessen beantwortet, in deren Folge intrazelluläre Komponenten ins Sekretom gelangen und die Analyse der gesuchten Proteine maskieren. Der Kompromiss, die Zellen für einige Zeit in serumhaltigem Medium zu kultivieren, dann die Serumkomponenten wegzuwaschen und die Zellen anschließend für den Erhalt von konditioniertem Medium nur kurz in diesen ungünstigen serumfreien Bedingungen zu kultivieren, bringt wiederum die Schwierigkeit mit sich, dass durch das Waschen Zellen apoptotisch werden. Hier einen Mittelweg zu finden ist nicht für alle Zellen möglich und muss für jede Bedingung erneut optimiert werden. Diese Schwierigkeiten stellen daher nicht nur ein Problem dar, das speziell in der vorliegenden Arbeit nicht gelöst werden konnte, sondern eines, das bei vielen Primärzellen nicht gelöst werden kann und von Skalnikova *et al.* und Wetie *et al.* zuvor in einem *Review* zusammengefasst wurde [363, 364]. Eine Möglichkeit, zwischen Proteinen, die von den Zellen sezerniert werden, und Serumproteinen unterscheiden zu können, liefert die SILAC-Methode (*stable isotope labelling by aminoacids in cell culture*). Hierbei werden Zellen mit einer „schweren“ Isotopen-Form der Aminosäure Lysin (L-[¹³C₆,¹⁵N₂] Lysin) inkubiert, die bei Neusynthese in die Proteine eingebaut wird, so dass hinterher schwere Peptide (von den Zellen neu synthetisiert) von leichten Peptiden (Serumpeptide) per Massenspektrometrie voneinander unterschieden und quantifiziert werden können. Mit dieser Herangehensweise wurde zuvor das Proteom von humanem, viszeralem Fettgewebe bestimmt [365]. Des Weiteren wurde diese Methode auch schon erfolgreich von Greco *et al.* angewandt, um intrazelluläre Kontaminationen apoptotischer Zellen in den Überständen von den sezernierten Proteinen zu unterscheiden und das Proteom primärer, muriner Astrozyten zu bestimmen [366]. Es wäre denkbar, dass eine solche Herangehensweise eine Alternative ist, um die Liste identifizierter, PMT-spezifischer Sekretom-Proteine in Zukunft zu verlängern.

Neben der Sekretion von osteolytisch wirkenden Substanzen könnten PMT-stimulierte B-Zellen den Prozess der Osteoklastogenese auch durch die Ausbildung von direkten Zell-Zell-Kontakten unterstützen. *Transwell*-Experimente, die in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, sollten hierüber weiteren Aufschluss geben. B-Zellen wurden mit dem Pan-B-Zellmarker CD45R (B220) sortiert und durch eine semipermeable Membran (0,4 µm) von den restlichen Knochenmarkszellen getrennt kultiviert. In diesem System war die Ausbildung von direkten Zell-Zell-Kontakten zwischen den B-Zellen und den Knochenmarkszellen inhibiert und nur der Kontakt durch lösliche Mediatoren möglich. Die Analyse, ob die Osteoklastogenese der Knochenmarkszellen unter den gegebenen Um-

ständen noch effektiv ablaufen kann oder ob sie von einem direkten Zell-Zell-Kontakt zu B-Zellen abhängig ist, erbrachte das unerwartete Ergebnis, dass die Osteoklastogenese am effektivsten in der B-Zell-Fraktion vonstatten ging (Abbildung 4.2). Der Beweis, dass es sich auch tatsächlich um Osteoklasten handelt, wurde durch die Visualisierung der TRAP-Aktivität und der Multinuklearität mittels Konfokaler Mikroskopie erbracht (Abbildung 4.5). Eine solch direkte Differenzierung von B-Zellen zu Osteoklasten war möglich durch die Tatsache, dass PMT-stimulierte B-Zellen die Expression des B-Zell-spezifischen Transkriptionsfaktors Pax-5 herunterregulieren (unpublizierte Beobachtung von D. Hildebrand), der im Verdacht steht, plastische B-Zellpopulationen zu generieren, die zu Osteoklasten differenziert werden können [216]. Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass PMT-stimulierte B-Zellen auch ohne die Hilfe von löslichen Faktoren der Knochenmarkszellen in einem *Transwell*-unabhängigen Versuch effektiv zu Osteoklasten (TRAP⁺/multinukleär) differenzieren können (siehe Abbildung 4.3). Da bekannt ist, dass der Transkriptionsfaktor Pax-5 nur in zwei Stadien der B-Zell-Linie nicht exprimiert wird, den frühen Pro-B-Zellen und den späten, terminal differenzierten Plasmazellen (siehe Kapitel 2.5) [213], wurde untersucht, ob PMT die Differenzierung von Plasmazellen in die Wege leiten kann. Es konnte gezeigt werden, dass PMT stimulierte B-Zellen, mehr lösliches IgM sezernieren als IL-7 stimulierte B-Zellen, während die Sekretion von Affinitäts-gereiften IgG-Antikörpern weder durch PMT noch durch IL-7 stimuliert wird. Da die Sekretion von Immunglobulinen ein Plasmazell-spezifisches Ereignis ist, war dies schon einmal ein erster Hinweis, dass Plasmazellen durch PMT-Stimulation generiert werden könnten.

Pax-5 ist ein Transkriptionsfaktor mit dualer Rolle für die B-Zelllinie: Er stimuliert die Expression lymphoider Gene und unterdrückt gleichzeitig die Expression myeloider Gene [213, 215-217]. Daraus resultiert auch die Beobachtung, dass Plasmazellen, deren Differenzierung von einem Herunterregulieren von Pax-5 abhängig ist, wieder myeloide Gene exprimieren [215]. Da es sich z.B. auch bei dem *Csf1r* (M-CSF-R) um ein von Pax-5 unterdrücktes Gen handelt [266], ist es nicht undenkbar, dass dessen Re-Expression in terminal differenzierten Plasmazellen zusammen mit einer guten intrazellulären Ausstattung an myeloiden Genen, die Transdifferenzierung der Zellen mit PMT zu Osteoklasten ermöglichen könnte. Um zu analysieren, ob mit PMT demzufolge Zellen mit Eigenschaften von Plasmazellen und Osteoklasten differenzieren, einem Phänomen, dass auch im Multiplen Myelom beobachtet werden konnte [227], wurde die Expression des innerhalb des hämatopoetischen Systems Plasmazell-spezifischen Oberflächenmarkers Syndecan-1 (CD138) und der Osteoklasten-spezifischen Marker TRAP und Multinuklearität mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass PMT-stimulierte B-Zellen zu Syndecan-1⁺TRAP⁺-multinukleären Zellen differenziert sind (siehe Abbildung 4.5).

Aufgrund der Tatsache, dass die Osteoklasten sich nicht wieder ablösen ließen, war es nicht möglich, diese mit alternativen Methoden wie der FACS-Analyse weiter zu analysieren. Des Weiteren handelt es sich bei Osteoklasten um Zellen, die in geringer Quantität differenzieren und dennoch große Effekte auslösen können, was die Analyse von Plasmazell-spezifischen Genen mittels qRT-PCR oder die proteinbiochemische Analyse mittels *Western Blot* schwierig macht. Erschwerend ist darüber hinaus die Charakterisierung von terminal differenzierten Plasmazellen durch das Fehlen mehrerer anerkannter Plasmazellmarker wie Syndecan-1. Dies liegt daran, dass der Prozess der terminalen Plasmazell-

Differenzierung von der Aktivierung des Masterregulators Blimp-1 und dem Herunterregulieren von Pax-5 abhängig ist [269]. Es konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor Blimp-1 charakteristische B-lymphoide Gene unterdrückt. Dadurch verlieren die Zellen die Expression typischer B-Zell-spezifischer Marker wie CD19, CD20, CD45R und MHCII sowie BCR-Signalkomponenten wie BLNK, CD79A, syk und btk [271]. Gleichzeitig werden aber durch die Repression von Pax-5 myeloide Gene exprimiert [215], was in Kombination mit dem Verlust an lymphoiden Markern die Identifikation von Plasmazellen erschwert. Daher können Plasmazellen eher durch das Fehlen von B-Zellmarkern und die Expression von Syndecan-1 identifiziert werden. So konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Syndecan-1-positiven Zellen den B-Zellmarker CD45R nicht exprimieren, mit dem sie am Tag 0 sortiert wurden, was mit einer vermeintlichen Plasmazell-Differenzierung auch in Einklang stehen würde (siehe Abbildung 4.5) [271].

Eine intensive Literaturrecherche führte zu einer Vorstellung, wie dieser molekulare Schalter aussehen könnte, der im pathophysiologischen Zusammenhang, z.B. beim Multiplen Myelom oder der Infektion mit toxischen *Pasteurella multocida* Stämmen eventuell eine solche Differenzierung zu einem Zelltyp mit Eigenschaften von Osteoklasten sowie von Plasmazellen steuern könnte (Abbildung 4.10). Es war auffällig, dass die Aktivierung der Blimp-1-Bcl-6 Achse sowohl für die Einleitung der terminalen Plasmazell-Differenzierung als auch für die terminale Osteoklastendifferenzierung von großer Bedeutung ist [199, 271]. Eine STAT-3 vermittelte Hochregulierung von Blimp-1 führt zu einer Inhibition von Bcl-6 und leitet so die Transkription von Plasmazell-spezifischen Genen in die Wege [272]. Die Aktivierung von STAT-3 führt außerdem zu einer gesteigerten Expression der miRNA21 [279]. Dadurch, dass Blimp-1 bei der physiologischen Plasmazell-Differenzierung einer Expression der miRNA21 entgegensteuert, kann eine effektive Induktion dieser miRNA, die auch als „Onkomir“ bekannt ist, verhindert werden [280]. Beim Multiplen Myelom kommt es zu einer gesteigerten IL-6 Sekretion und einer konstitutiven Aktivierung von STAT-3, die als Ursache für eine gesteigerte Expression der miRNA21 in Multiplen Myelomzellen angesehen wird [282-284]. Eine Hyperaktivierung von STAT-3 ist auch ein Charakteristikum von PMT-stimulierten Zellen [76]. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Hypothese erarbeitet, dass es nach PMT-Stimulation oder im Multiplen Myelom durch die Hyperaktivierung von STAT-3 zu einem Verschieben der Balance zwischen Blimp-1 und der miRNA21 auf die Seite der miRNA21 kommen könnte, die eine bedeutende Rolle bei der Osteoklastogenese spielt [286]. Da die Blimp-1-Bcl-6 Achse für beide Differenzierungsprogramme wichtig ist, könnte über die Aktivierung der miRNA21 so ein fehlgesteuertes Programm eingeleitet werden. Es konnte gezeigt werden, dass PMT-stimulierte Makrophagen den Transkriptionsfaktor Blimp-1 hochregulieren und dass Bcl-6 tatsächlich invers korreliert ist und mit PMT herunterreguliert wird. Außerdem konnte gezeigt werden, dass PMT auch JAK-2 und STAT-3 in diesen Zellen aktiviert und indiziert damit eine STAT-3 abhängige Regulation der Blimp-1-Bcl-6 Achse. Um die STAT-3 vermittelte Induktion der Blimp-1-Bcl-6 Achse mit PMT abschließend zu beweisen, müsste die Bindung von STAT-3 an den *Prdm1* (Blimp-1) Promotor in zukünftigen Experimenten allerdings noch belegt werden. Passend zu dieser Hypothese konnte gezeigt werden, dass PMT-stimulierte B-Zellen (CD45R-positive Zellen) nach fünf Tagen tatsächlich eine erhöhte Expression der miRNA21 aufweisen (Abbildung 4.11). Ob die Blimp-1-Bcl-6 Achse und die miRNA21 tatsächlich eine Rolle bei

den beobachteten Differenzierungsprozessen mit PMT spielen, könnte in zukünftigen Experimenten durch die Inhibition der miRNA21 durch die Verwendung einer Antagomir untersucht werden.

Die Frage, ob B-Zellen tatsächlich unter bestimmten Bedingungen zu Osteoklasten differenzieren können, wird unter den Fachleuten der Osteoimmunologie sehr kritisch diskutiert. Ein Hauptkritikpunkt ist dabei, dass in den Publikationen, in denen unterschiedliche B-Zell-Populationen mit verschiedenen Markern aufgereinigt und mit M-CSF/sRANKL zu Osteoklasten differenziert wurden, die Reinheit variabel zwischen 94 % und 99 % lag und daher nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Differenzierung durch die 1-6 % der kontaminierenden Zellen ausgelöst worden war [223-225, 228]. Jacquin *et al.* demonstrierten dass CD45R-positive B-Zellen, die mit einer Reinheit von 99,14 % aufgereinigt wurden, mit M-CSF/sRANKL zu Osteoklasten differenzieren konnten, während Zellen mit einer Reinheit von 99,87 % diese Fähigkeit verloren haben und schlossen daraus, dass die Kontamination für die beobachtete Differenzierung verantwortlich war und im letzteren Fall zu gering ausfiel [228]. In diesem Fall könnte es sicherlich ein Diskussionspunkt sein, ob mittels FACS-Analyse eine Reinheit auf zwei Nachkommastellen genau angegeben werden kann. In den Versuchen, die in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, lag die Reinheit der CD45R-positiven Zellfraktionen variabel bei 95-98 %, so dass mit 2-5 % kontaminierenden Zellen gerechnet werden muss. Bei den *Transwell*-Versuchen war die Osteoklasten-Differenzierungseffizienz jedoch aus der CD45R-positiven Fraktion größer als aus der CD45R-negativen Fraktion, die ja so gesehen eine Anreicherung der kontaminierenden Zellen darstellen sollte. Mit den Daten der vorliegenden Arbeit kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass eine geringe Kontamination innerhalb der CD45R-positiven Zellfraktion für die beobachteten Differenzierungsprozesse mit PMT verantwortlich ist.

Zur Klärung der Kontaminationsfrage sollte in der vorliegenden Arbeit ein sogenanntes „*fate mapping*“ durchgeführt werden. Dazu sollten in Kooperation mit Prof. Dr. Hans-Reimer Rodewald IL-7R α Cre-Rekombinase *Knockin* Mäuse benutzt werden, um ein lymphoides Schicksal nachverfolgen zu können, da der IL-7-Rezeptor fast ausschließlich in der lymphoiden Linie exprimiert wird [367]. Durch Kreuzung mit einer sogenannten „Reportermaus“ sollte die IL-7R α -abhängige Aktivität der Cre-Rekombinase die kontinuierliche Expression eines roten fluoreszierenden Proteins (RFP) bewirken und so anzeigen, ob eine Zelle einen lymphoiden Ursprung hat [368]. Mit Hilfe dieser Methode sollte untersucht werden, ob PMT-differenzierte Osteoklasten einen lymphoiden Ursprung haben. Doch schließlich stellte sich das geplante System für die Untersuchung dieser Fragestellung als ungeeignet heraus, da unerwarteterweise ca. 3 % der Makrophagen (F4/80⁺, CD11b⁺) den IL-7-Rezeptor exprimierten [368].

Alternativ entstand in der vorliegenden Arbeit die Idee, für das „*fate mapping*“ eine Cre-Rekombinase kontrollierte Expression des Genes für *mb-1* zu nutzen, die von Pelanda *et al.* generiert wurde [369]. Bei *mb-1* handelt es sich um Ig- α , ein frühes B-Zell-spezifisches Transmembranprotein, das in allen Stadien der B-Zell-Differenzierung exprimiert wird, außer von terminal differenzierten Plasmazellen. Daher würde sich dieses „*fate mapping*“-System hervorragend dazu eignen, die Fragestellung des B-lymphoiden Ursprungs PMT-stimulierter Osteoklasten zu klären. Diese Versuche konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht mehr durchgeführt werden. Es soll aber nicht unerwähnt bleiben, dass

im Anschluss an diese Arbeit durch Dr. Sushmita Chakraborty erste Versuche mit dieser Reportermaus durchgeführt wurden. Da in diesem System die murinen B-Zellen aufgrund ihrer spezifischen Expression von Ig- α , einem Bestandteil des B-Zellrezeptors, positiv für ein grün fluoreszierendes Protein (eGFP) sind, wurde dieses Merkmal genutzt, um sie aus der Mischung an murinen Knochenmarkszellen mit Hilfe eines FACS zu isolieren. Dabei zeigte sich, dass eine PMT-Stimulation dieser eGFP-positiven B-Zell-Population keine Osteoklasten hervorbrachte. Gleichzeitig besaßen die CD45R-positiven Zellen, die mit Hilfe des AutoMACS aus dem Knochenmark dieser Reportermaus isoliert wurden (Reinheit 99 %), das Potential zu Osteoklasten zu differenzieren. Bei diesem Differenzierungsvergleich ist nicht ganz auszuschließen, dass auch die unterschiedlichen Aufreinigungsmethoden (AutoMACS vs. FACS) einen Einfluss auf das Differenzierungsvermögen nehmen könnten. Allerdings erscheint es wahrscheinlicher, dass der Versuch darauf hindeutet, dass die Osteoklasten, die aus der CD45R-positiven Fraktion mit PMT differenziert waren, keinen B-Zell-Ursprung besitzen.

CD45R ist allgemein als Pan-B-Zell-spezifischer Marker bekannt. Es gibt allerdings eine sehr seltene Population an DCs, die pDCs, die nur ca. 1 % aller Knochenmarkszellen ausmacht und auch CD45R exprimiert [263, 264]. Um auszuschließen, dass es sich bei den mit PMT differenzierten Osteoklasten um pDCs handelt, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung für den Marker Gr-1 in der vorliegenden Arbeit durchgeführt, da dieser von pDCs exprimiert wird, nicht aber von B-Zellen (Abbildung 4.5). Die Immunfluoreszenzfärbung war negativ für diesen Marker und suggerierte dass pDCs keine Rolle als Vorläufer spielen. Allerdings ist es möglich, dass differenzierte Osteoklasten die Expression dieses Markers wieder verlieren. Daher wurde im Anschluss an die Fertigstellung dieser Arbeit in ersten Versuchen, die durch Julia Zaman im Rahmen einer Bachelorarbeit durchgeführt wurden, getestet, ob pDCs mit PMT zu Osteoklasten differenziert werden können. Erste Ergebnisse deuten darauf hin, dass PMT in Kombination mit RANKL diese Differenzierung vorantreiben kann, während eine alleinige Stimulation mit PMT hierfür nicht ausreichend ist. Da bei den sortierten CD45R-positiven Zellen eine Stimulation mit PMT alleine genügte um Osteoklasten hervorzubringen, ist es möglich, dass die B-Zellen hierbei als Quelle für RANKL dienen [22, 248]. Zur Klärung dieser Fragestellung sind in Zukunft weitere intensive Studien nötig.

Nach aktuellem Kenntnisstand können konventionelle dendritische Zellen (cDCs) als Osteoklastenvorläuferzellen dienen, pDCs allerdings nicht [178]. Falls sich eine solche Differenzierung von pDCs mit PMT und RANKL in weiteren Experimenten zukünftig zeigen sollte, wäre dies eine bedeutsame Erkenntnis und könnte ein weiteres Indiz für einen möglichen lymphoiden Ursprung von Osteoklasten sein, da pDCs sowohl aus lymphoiden als auch aus myeloiden Vorläuferzellen differenzieren können [370]. Sowohl für murine als auch humane pDCs ist bekannt, dass sie viele B-Zellmarker exprimieren [370, 371]. In einer Studie, in der humane pDCs der Zunge mit DCs verglichen wurden, die aus Monozyten differenziert waren, zeigte sich, dass es sich bei 25 % der unterschiedlich exprimierten Gene um B-Zell-Transkripte handelt [372]. Des Weiteren ist bekannt, dass pDCs immer lymphoide Genexpressionsprogramme starten, unabhängig davon ob die Zelle einen lymphoiden oder myeloiden Ursprung besitzt [373]. Dies könnte erklären, warum die PMT-stimulierten Osteoklasten Eigenschaften von B-Zellen zeigen. PCR-Analysen mit einzelnen Zellen sind mittlerweile technisch realisierbar

und könnten in Zukunft hilfreich bei der Verifizierung und weiteren Charakterisierung der genauen Osteoklasten-Vorläuferzelle innerhalb der CD45R-positiven Zellfraktion mit PMT sein.

Darüber, inwiefern das *Pasteurella multocida* Bakterium aus einer solchen Manipulation von Immunzellen Überlebensvorteile schlagen könnte, kann nur spekuliert werden. Die Einleitung einer Differenzierung von Immunzellen zu Osteoklasten könnte Zellen unwirksam machen, die auf die Abwehr pathogener Keime spezialisiert sind. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, weisen PMT-stimulierte B-Zellen eine gesteigerte Sekretion von IgM im Vergleich zu IL-7 stimulierten Zellen auf. Die unselektive Differenzierung von B-Zellen zu IgM-sezierenden Plasmablasten wurde zuvor als Immunevasionsmechanismus von *Staphylococcus aureus* Bakterien beschrieben [374]. Die Generierung von sogenannten natürlichen Antikörpern anstatt von Affinitäts-gereiften Antikörpern ist für die pathogenen Mikroorganismen ungefährlicher. PMT ist als schlechtes Immunogen bekannt, da eine intranasale Applikation von PMT bei Schweinen keine messbare humorale Antwort auslösen kann [375, 376]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass PMT die Auslösung einer humoralen Immunantwort gegen andere Immunogene beeinträchtigen kann [377]. Ein besseres Verständnis über die Immunevasionsstrategien von *Pasteurella multocida* könnte bei der Entwicklung neuer Behandlungsstrategien gegen atrophische Rhinitis bei Tieren hilfreich sein.

5.2 PMT und die klassische Osteoklastendifferenzierung von Monozyten/Makrophagenvorläufern

Die Effizienz der Osteoklastendifferenzierung mit PMT wird durch die Anwesenheit von B-Zellen zwar stark gesteigert, ist allerdings auch ohne B-Zellen durch eine direkte Wirkung von PMT auf Osteoklastenvorläuferzellen möglich [23, 24]. Diese direkte Wirkung von PMT auf Osteoklastenvorläuferzellen war sehr lange unklar, wurde aber kürzlich von Strack *et al.* durch die direkte Differenzierung von aufgereinigten, murinen CD14⁺ Monozyten oder der Makrophagenzelllinie RAW264.7 zu Osteoklasten unter PMT-Stimulation gezeigt [23]. Die Untersuchung einer möglichen direkten Differenzierung von Osteoklasten mit PMT war zeitgleich auch Gegenstand dieser Arbeit und führte zum gleichen Ergebnis, dass eine direkte Stimulierung von Makrophagenvorläufern mit PMT eine Osteoklastendifferenzierung bewirken kann, wie in Abbildung 4.7 gezeigt. Diese Daten bekräftigen somit den von Strack *et al.* erhobenen Befund.

Alle bekannten Wege, die die Osteoklastendifferenzierung auf physiologische Weise stimulieren, haben als gemeinsame Endstrecke die Sekretion von RANKL und resultieren letztlich in der RANKL-vermittelten Osteoklastogenese. Da die PMT-vermittelte Osteoklastendifferenzierung einen alternativen Differenzierungsweg darzustellen scheint, wurden in der vorliegenden Arbeit Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen diesen beiden Differenzierungssystemen untersucht. Es wurden bislang sechs Schlüsselsignalwege identifiziert, über die RANKL die Transkription von Osteoklastenspezifischen Genen induziert: NFATc1, NF- κ B, Akt, JNK, ERK und p38 [289]. Die Untersuchung,

ob PMT ähnliche zelluläre Signalelemente aktivieren kann, ergab, dass PMT-stimulierte Makrophagen die Expression von NFATc1 auf Proteinebene in ähnlichem Maße steigern wie RANKL-stimulierte Zellen (siehe Abbildung 4.12 A). Zur Transkription von Osteoklasten-spezifischen Genen nach RANKL Stimulation ist der nukleäre Import von NFATc1 von großer Bedeutung, der durch die Calcium-sensitive Phosphatase Calcineurin bewirkt wird [378]. Calcineurin dephosphoryliert NFATc1 und legt auf diese Weise das nukleäre Translokationssignal frei und ermöglicht so dessen Translokation in den Nukleus [379]. Eine solche nukleäre Translokation ist nicht nur mit RANKL möglich, sondern wird auch durch PMT Stimulation gleichermaßen eingeleitet (Abbildung 4.12 B). Dass für die PMT-induzierte Differenzierung von Osteoklasten diese Ca^{2+} -abhängige Aktivierung von NFATc1 von Wichtigkeit ist, wurde von Strack *et al.* durch Versuche mit einem Inhibitor gezeigt, der die Interaktion zwischen NFATc1 und Calcineurin inhibiert [23]. Die transkriptionelle Aktivität von NFATc1 nach PMT Stimulation in Osteoklastenvorläuferzellen (RAW264.7 Zellen) wurde in der gleichen Publikation ebenfalls gezeigt [23].

Auch die Aktivierung der Akt Kinase und der MAPK p38 konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden (Abbildung 4.12 C/D). Neben der Aktivierung von p38 konnte die Aktivierung der anderen Osteoklastogenese-fördernden MAP Kinasen ERK1/2 und JNK nach PMT Stimulation von Strack *et al.* gezeigt werden [23]. Zuletzt konnte auch die Aktivität von NF- κ B durch die Phosphorylierung von p65 und p105 gezeigt werden (Abbildung 4.12 E/F) und bestätigen die von Strack *et al.* gezeigte Aktivität von NF- κ B nach PMT-Stimulation in Osteoklastenvorläuferzellen [23].

Zusammengefasst zeigen die Daten, ähnlich wie auch schon von Strack *et al.* beschrieben, dass PMT in Osteoklastenvorläuferzellen dazu befähigt ist, ein ähnliches Signalnetzwerk einzuleiten, wie das klassische Osteoklastenzytokin RANKL. Es ist mittlerweile auch bekannt, dass PMT diese Effekte auf die Osteoklastendifferenzierung speziell durch die Modulation der $G\alpha_{q/11}$ Familie an heterotrimeren G-Proteinen ausübt, da gezeigt wurde, dass die Inhibition dieser G-Protein Familie die Differenzierung komplett anhalten kann [23]. Flussabwärts wird der Aktivierung des PLC β -PKC Signalweges eine wichtige Bedeutung für die Transduktion der zellulären PMT Effekte auf die Osteoklastendifferenzierung in Vorläuferzellen und die Aktivierung von NFATc1 und der MAP Kinasen zugeschrieben [23]. Trotz der Aktivierung ähnlicher Signalnetzwerke nach RANKL oder PMT Stimulation in Osteoklastenvorläuferzellen unterscheiden sich auf beide Methoden terminal differenzierte Osteoklasten sehr stark, wie sich zum Beispiel auf Ebene ihrer Morphologie zeigt (siehe Abbildung 4.1): Während sich klassische, RANKL-differenzierte Osteoklasten durch Ausbildung eines charakteristischen Aktinringes auszeichnen, scheinen sich PMT-stimulierte Osteoklasten eher durch das Fehlen eines solchen Strukturmerkmals und das eher zufällige Verteilen von Aktin über das gesamte Zytoplasma hin auszuzeichnen (siehe Abbildung 4.1). Des Weiteren sind PMT-stimulierte Osteoklasten im Durchschnitt kleiner als RANKL-stimulierte Osteoklasten (siehe Abbildung 4.19) und beinhalten somit auch weniger Nuklei (ca. 5-10 Nuklei) als RANKL-stimulierte Osteoklasten (>10 Nuklei). Trotz dieser offensichtlichen Unterschiede in der Morphologie sind auch PMT-stimulierte Osteoklasten funktionell und dazu befähigt Knochen zu resorbieren [23, 380].

Um weitere Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen klassischen, mit M-CSF/RANKL und alternativen, mit PMT differenzierten Osteoklasten zu finden, wurde im Rahmen dieser Arbeit das Proteom der unterschiedlich differenzierten Osteoklasten untersucht und mit dem Proteom von mit M-CSF erhaltenen Makrophagen mittels der DIGE-Technik verglichen. Dabei ergab sich für 800 aller Proteinspots eine signifikante Veränderung zwischen den verschiedenen Bedingungen. Die Massenspektrometrieanalyse von 30 ausgewählten Spots erbrachte eine Liste identifizierter Proteine mit unterschiedlichstem Regulationsmuster zwischen den Bedingungen und ist im Anhang 10.1 festgehalten. Diese Liste liefert viele mögliche Anknüpfungspunkte für zukünftige Experimente. Einige der Proteintreffer wurden zuvor auch schon in Publikationen in Zusammenhang mit dem Prozess der Osteoklastogenese gebracht und könnten so tatsächlich wichtige potentielle Regulatoren der PMT-stimulierten Osteoklastendifferenzierung sein und so im Fokus zukünftiger Untersuchungen der Arbeitsgruppe stehen.

Bei einem der Proteinspots, die mit PMT signifikant erhöht sind, handelt es sich um die Arginase-1. Es ist bekannt, dass dieses Enzym in Konkurrenz mit der NO-Synthase um das Substrat Arginin steht und so zu einer verminderten NO Synthese führt, welches als Signalbotenstoff die Osteoklastogenese negativ beeinflusst [300, 301]. Des Weiteren befindet sich auch Annexin A2 in der Liste der mit PMT hochregulierten Proteine, dem eine Osteoklasten-fördernde Wirkung zugeschrieben werden konnte [302, 303]. Es gibt Hinweise, dass einem weiteren Protein der Liste, dem *Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD* (ASC), eine Beteiligung bei der Entstehung von Kollagen-induzierter Arthritis zukommt [304]. Wie genau dieses Protein in diesen Prozess involviert ist, ist dabei noch völlig unbekannt und legt die Möglichkeit offen, PMT als Werkzeug zu benutzen um mehr über diese Zusammenhänge zu erfahren. Zunächst müsste sich dazu diese Regulation mit PMT in zukünftigen Experimenten verifizieren lassen.

Ein weiteres Protein, das Prelamin-A/C, ging aus der DIGE Analyse als ein mit PMT signifikant erniedrigtes Protein hervor. Dabei handelt es sich um einen Vorläufer von Lamin-A/C, einem Molekül, dessen Inhibition zu verstärkter Sekretion von RANKL führt und in dessen Folge zu einer gesteigerten Osteoklastogenese [305]. Auch die Untersuchung dieses Hinweises könnte für die Suche nach weiteren Mechanismen der PMT-stimulierten Osteoklastendifferenzierung vielversprechend sein. Auch die MAP Kinasen p38 und ERK1/2 ergaben sich sowohl mit RANKL als auch mit PMT als regulierte Spots. Dies kann als Hinweis dafür gedeutet werden, dass die angewandte Methode der DIGE-Technik gut das tatsächliche Regulationsmuster mit PMT und RANKL widerspiegelt, da eine gleichartige Regulation dieser MAP Kinasen mit PMT in Osteoklastenvorläuferzellen auch mittels *Western Blot* Analyse gezeigt werden konnte (siehe Abbildung 4.12 D und 4.20 C) bzw. deren Regulation nach RANKL Stimulation anderweitig publiziert wurde [23, 307].

Die Ergebnisse der DIGE-Analyse PMT-stimulierter Makrophagen erbrachten ein Proteinexpressionsmuster, das charakteristisch für metabolisch sehr aktive Zellen ist (siehe Anhang 10.1). Diese Erkenntnis führte zu der Idee, dass der Aktivierung der mTOR Kinase eine große Bedeutung in PMT-stimulierten Osteoklastenvorläuferzellen zukommen könnte, da dieser Kinase eine zentrale Rolle bei der Integration von Umgebungssignalen wie der Verfügbarkeit von Nährstoffen und Wachstumsfak-

toren zukommt sowie bei der Einleitung einer darauf angepassten zellulären Reaktion wie dem Zellwachstum und der Proteinbiosynthese [381]. So ist die mTOR Kinase als bedeutender Regulator von metabolischen Prozessen bekannt [382]. Eine PMT-abhängige Aktivierung des mTOR-Signalweges wurde zuvor in einer Fibroblastenzelllinie beschrieben [125]. Der Aktivierung von mTOR konnte dort eine Beteiligung an der mitogenen Wirkung des Toxins in diesen Zellen zugeschrieben werden [126]. Des Weiteren ist bekannt, dass für die Funktion von Osteoklasten eine kontinuierlich hohe Translationsrate an Proteinen von großer Wichtigkeit ist [313]. Diese gesteigerte Proteinbiosynthese wird in Osteoklasten durch die Aktivierung des mTOR-Signalweges durch M-CSF, TNF- α und RANKL Stimulation gewährleistet [313]. Es wurde zuvor gezeigt, dass eine Inhibition der mTOR-Aktivierung in Osteoklastenvorläuferzellen die Differenzierung von TRAP⁺ Osteoklasten inhibiert und die Knochenresorption signifikant reduziert [313].

Daher wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob der mTOR-Signalweg auch in PMT-stimulierten Makrophagen aktiviert wird und ob die mTOR-Aktivierung bedeutsam für die Differenzierung von Makrophagen zu Osteoklasten mit PMT ist. Es konnte gezeigt werden, dass nach PMT Stimulation sowohl P70s6K1 als auch 4E-BP-1, die beiden bekanntesten Substrate der aktivierten mTOR Kinase, phosphoryliert werden (Abbildung 4.15 A/B). Dass die Phosphorylierungen von P70s6K1 und 4E-BP-1 nach PMT Behandlung in Abhängigkeit der mTOR Kinase erfolgten, wurde durch ihre Rapamycin-Sensitivität bewiesen. Die Phosphorylierung dieser beiden Proteine ist durch die Aktivierung vieler an der Translation beteiligter Proteine flussabwärts bedeutsam für die Stimulierung des Prozesses der *de novo* Proteinbiosynthese. Darüber hinaus wird der Befund, dass PMT den mTOR-Signalweg auch in Makrophagen aktivieren kann dadurch bekräftigt, dass auch die Phosphorylierung an der mTOR Kinase selbst an Ser2448 nach PMT Stimulation gezeigt werden konnte. Bei dieser Phosphorylierung handelt es sich um ein Event, das durch die aktivierte P70s6K1 Kinase selbst bewirkt wird [318]. Die Auswirkung dieser Phosphorylierung auf den mTOR-Signalweg ist bislang unbekannt geblieben, gilt allerdings als guter Marker für das Maß an mTOR-Aktivierung [318]. Ein vierter Beweis für die Aktivierung des mTOR-Signalweges mit PMT in RAW264.7 Makrophagen wurde zusätzlich auf Ebene der verschiedenen Bindungspartner im mTORc1 erbracht. Bei PRAS40 handelt es sich um einen sterischen Inhibitor der mTOR Kinase Aktivität im mTORc1. Die Dissoziation des Inhibitors vom mTORc1 und damit die Freigabe der mTOR-Signalweiterleitung kann durch eine Phosphorylierung von PRAS40 an Thr246 durch Aktivatoren des mTOR-Signalweges wie klassischerweise die Akt Kinase bewirkt werden [108, 109]. Diese Phosphorylierung von PRAS40 nach PMT-Stimulation in Makrophagen konnte ebenfalls gezeigt werden und bestätigt die Aussage, dass PMT in Osteoklastenvorläuferzellen den mTOR-Signalweg aktivieren kann.

Bei der Untersuchung der zellulären Auswirkung der PMT-stimulierten mTOR-Aktivierung in Makrophagen ergab sich, dass diese keinen Einfluss auf die Proliferationsrate hat (Abbildung 4.17 A), ein Effekt der zuvor in Fibroblasten beschrieben wurde, sondern das Differenzierungsschicksal dieser Zellen beeinflusst. So konnte gezeigt werden, dass die PMT Stimulation die Differenzierung der Makrophagen zu Osteoklasten einleiten konnte und dass dieser Prozess von der PMT-stimulierten Aktivierung der mTOR Kinase abhängig ist (Abbildung 4.19 A/B). Die mTOR-Abhängigkeit der Differenzierung konnte dadurch gezeigt werden, dass eine Rapamycin-Behandlung die Osteoklasten-

differenzierungseffizienz um circa 75 % reduziert (Abbildung 4.19 B). Die Osteoklastendifferenzierung war zwar sehr stark, jedoch nicht komplett auf das Level der Kontrollen reduziert. Dies suggeriert, dass PMT neben der Aktivierung des mTOR-Signalweges noch weitere Signalwege aktivieren kann, die den Prozess der Osteoklastogenese fördern. Hier könnte der PMT-stimulierten Aktivierung der MAP Kinasen sowie des NF- κ B Signalweges, die in Abbildung 4.12 gezeigt wurden, eine Rolle zukommen.

Die PMT-stimulierte Osteoklastendifferenzierung in Makrophagen ging mit einer Verminderung des zellulären ATP-Levels einher, die allerdings nicht zu einer gesteigerten Apoptoserate führte (Abbildung 4.17 A/B). Dies steht im Kontrast zu zuvor publizierten Daten der PMT-stimulierten mTOR-Aktivierung in Fibroblasten, die in diesem zellulären Kontext zu einem ATP-Anstieg führte [125]. Allerdings ist bekannt, dass Osteoklasten sehr sensitiv auf Veränderungen des intra- und extrazellulären ATP-Spiegels reagieren und daher könnte es sich hierbei um Zelltyp-spezifisch variable Effekte handeln [328, 383]. Es wurde zuvor beschrieben, dass mit RANKL differenzierte Osteoklasten niedrigere Spiegel an intrazellulärem ATP besitzen, als ihre undifferenzierten aus dem Knochenmark isolierten Monozyten/Makrophagen-Vorläuferzellen [328]. Es wurde gezeigt, dass niedrige ATP-Spiegel eine wichtige Voraussetzung für eine effektive Knochenresorption sind, da erhöhte ATP-Spiegel zu einer erhöhten Freisetzung in den Extrazellularraum und damit zu einer parakrinen bzw. autokrinen Stimulation von purinergen Rezeptoren, wie zum Beispiel dem P2X7 Rezeptor, führen. Diese ATP-Stimulation beeinflusst negativ die Umlagerungen des Zytoskeletts, die für eine effektive Knochenresorption der reifen Osteoklasten von großer Wichtigkeit sind [328]. Des Weiteren ist auch bekannt, dass eine Stimulation mit ATP eine Liganden-induzierte Endozytose der P2X7 Rezeptoren bewirkt, die wiederum als bedeutend für die Fusion von Osteoklastenvorläuferzellen zu Osteoklasten mit mehreren Zellkernen beschrieben wurde [383]. Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass die niedrigen ATP-Spiegel nach PMT-Stimulation von RAW264.7 Makrophagen eine Konsequenz der Zunahme der Osteoklastendifferenzierung sind. Die Diskrepanz der ATP-Spiegel PMT-stimulierter Fibroblasten und Makrophagen könnte dadurch begründet sein, dass eine mTOR-Aktivierung in den verschiedenen Zelltypen unterschiedliche, zelluläre Auswirkungen erzielt (Proliferation gegen Osteoklastogenese). Außerdem stimuliert die Aktivierung des mTOR-Signalweges eine gesteigerte Proteinbiosynthese und Zellwachstum [81]. Hierbei handelt es sich um Energie (ATP)-verbrauchende Prozesse, so dass zu erwarten war, dass die mTOR-Aktivierung mit PMT mit einer Abnahme des ATP-Spiegels einhergeht.

Zur Beantwortung der Frage, durch welchen Mechanismus PMT in Makrophagen den mTOR-Signalweg anschaltet, wurden verschiedene Kinasen flussaufwärts untersucht, denen Hauptrollen bei der Aktivierung der mTOR Kinase im mTORc1 aus der Literatur zugesprochen wurden. Dabei wurde die Aktivierung des PI3K-Akt Signalweges, der ERK1/2 Kinase und der Pim Kinasen Pim-1 und Pim-2 nach PMT Stimulation näher analysiert, da diesen entweder eine Beteiligung bei der Deaktivierung des mTORc1 Inhibitor Komplexes TSC1/TSC2 bzw. der Entfernung des inhibitorisch wirkenden Gerüstproteins PRAS40 zugesprochen wurde oder diese eine stimulierende Wirkung auf das mTOR-Hilfsprotein Raptor besitzen (siehe Kapitel 2.3.3) [80, 107, 108]. Die Ergebnisse zeigen, dass die Akt Kinase durch PMT Stimulation in Makrophagen vollständig aktiviert wird, da sowohl die Thr308

Phosphorylierung in der Aktivierungsschleife, als auch die Ser473 Phosphorylierung des hydrophoben Motivs (HM) gezeigt werden konnte (Abbildung 4.20 A/B). Darüber hinaus konnte auch die Thr202/204 Phosphorylierung von ERK1/2 nach PMT Stimulation gezeigt werden (Abbildung 4.20 C), der sowohl ein Einfluß auf die Raptor Aktivierung als auch auf die Inhibition von TSC1/TSC2 zugesprochen wird [104, 107]. Auch für die Expressionsraten der Pim Kinasen Pim-1 und Pim-2 konnte eine Steigerung mit PMT gezeigt werden (Abbildung 4.20 D/E). Dass die gezeigten Aktivierungen dieser Signalwege auch tatsächlich oberhalb der mTOR-Aktivierung vonstatten gehen, konnte dadurch gezeigt werden, dass das Signal durch eine gleichzeitige Rapamycin-Behandlung unter PMT Stimulation keinesfalls abgeschwächt wurde. Es nahm sogar in den meisten Fällen unter Rapamycin-Behandlung noch zu, was durch das Wegfallen von negativen *Feedback*-Mechanismen erklärt werden könnte. Einer der bekannten negativen *Feedback*-Mechanismen ist beispielsweise die P70s6K1-vermittelte Inhibition der Akt-Phosphorylierung [119].

Da der JAK-STAT-3 Signalweg als möglicher Initiator der Transkription von *Pim-1* und *Pim-2* bekannt ist und die Aktivierung dieses Signalweges ein zuvor häufig beschriebenes, für PMT charakteristisches Ereignis ist, auf das eine Vielzahl der zellulären PMT Effekte zurückgeführt werden konnte, wurde die Aktivierung von STAT-3 und dessen potentielle Bedeutung für die Aktivierung des mTOR-Signalweges zusätzlich untersucht [74, 330]. Zunächst konnte die prinzipielle Aktivierung von STAT-3 durch eine gesteigerte Phosphorylierung an Tyr705 und Ser727 nach PMT Stimulation gezeigt werden (Abbildung 4.20 F/G). Die Inhibition der mTOR Kinaseaktivität mit Rapamycin erbrachte hier den Hinweis, dass die mTOR Kinase keinen Einfluss auf die Tyr705 Phosphorylierung von STAT-3 und nur einen geringen Einfluss auf die Ser727 Phosphorylierung hat. Die Beobachtung, dass die mTOR Kinase STAT-3 an Ser727 phosphorylieren kann, wurde zuvor in anderen Publikationen beschrieben [331].

Um zu analysieren, welcher dieser Signalwege wie stark in die Aktivierung des mTORc1 mit PMT involviert ist, wurden Inhibitoren für die oben erwähnten Signalwege eingesetzt und die Phosphorylierung des mTOR-Substrates P70s6K1 detektiert. Dabei ergab sich sowohl für die Inhibition des JAK-STAT Signalweges mit dem JAK Inhibitor I als auch für die Inhibition des PI3K-Akt Signalweges mit Wortmannin eine Reduktion der Aktivierung der P70s6K1. Allerdings konnte keiner der beiden Inhibitoren die Phosphorylierung auf die Ebene der Kontrollen inhibieren. Die negative Beeinflussung des ERK1/2 *Signalling* durch die Inhibition von MEK1 und MEK2 durch den U0126 Inhibitor flussaufwärts erzielte keine Hemmung bei der Aktivierung des mTOR-Signalweges, so dass die Daten darauf hinweisen, dass die ERK1/2 Aktivierung durch PMT keine Bedeutung bei der Stimulierung des mTOR-Signalweges durch das Toxin hat. Die Inhibition der Pim Kinasen mit dem Pim-1 Inhibitor II oder dem Pim-1/2 Inhibitor V resultierte in zellulärer Apoptose. Dies deutet darauf hin, dass in RAW264.7 Makrophagen die Überlebenssignale, die durch die Pim Kinasen erbracht werden, unabdingbar für die Viabilität der Zellen sein könnten und erschweren somit die Untersuchung der Rolle dieser Kinasen an der PMT-induzierten mTOR-Aktivierung in dieser Zelllinie. Die Rolle der Pim Kinasen für die PMT-stimulierte mTOR-Aktivierung und Osteoklastendifferenzierung könnte in zukünftigen Experimenten alternativ in primären Makrophagen aus dem Knochenmark untersucht werden, da in diesen Zellen zuvor die Inhibition von Pim-1 erfolgreich durchgeführt werden und

so die Rolle dieser Kinase an der RANKL-induzierten Osteoklastogenese untersucht werden konnte [384].

Zusammengefasst konnte durch die erzielten Daten die Aktivierung des mTOR-Signalweges mit PMT nicht alleinig auf die Aktivierung nur eines einzigen der untersuchten Signalwege zurückgeführt werden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass PMT mehrere Signalwege aktivieren kann, wie den PI3K-Akt und JAK-STAT Signalweg und eventuell noch weitere Signalwege, die in Synergie eine aktivierende Wirkung auf den mTOR-Signalweg erzielen. Eine solch fein abgestufte Regulierung der mTOR Kinase Aktivität durch multiple Signalebenen erscheint angesichts der zentralen Rolle der mTOR Kinase als Regulator des Metabolismus als physiologisch sinnvoll. Die Studien der vorliegenden Arbeit zielten nicht darauf ab, den Aktivierungsweg der PMT-stimulierten mTOR-Aktivierung im Detail aufzudecken, sondern konzentrierten sich darauf, mögliche beteiligte Signalkomponenten aufzuzeigen. Dabei ist es sehr wahrscheinlich, dass die Signalwege, die für die PMT-stimulierte mTOR-Aktivierung in Makrophagen verantwortlich sind, durch die PMT vermittelte Deamidierung von $G\alpha_q$ eingeleitet werden, da zuvor publiziert wurde, dass die Inhibition speziell dieses G-Proteins die PMT-stimulierte Osteoklastendifferenzierung vollständig anhalten kann [23].

Aus den Daten der vorliegenden Arbeit geht hervor, dass sich die Mechanismen der PMT-stimulierten mTOR-Aktivierung in Fibroblasten und Makrophagen stark zu unterscheiden scheinen. Während in PMT stimulierten Fibroblasten keine Aktivierung der Akt Kinase gezeigt werden konnte und darüber hinaus die Inhibition dieses Signalweges mit Wortmannin keinen Einfluss auf die mTOR-Aktivierung zeigte, konnte die Aktivierung dieses Signalweges in PMT-stimulierten Makrophagen gezeigt werden (siehe Abbildung 4.20 A/B) und diesem Signalweg zumindest eine partielle Rolle zugeschrieben werden (siehe Abbildung 4.21 C) [125]. Anstelle einer klassischen mTOR-Aktivierung durch den PI3K-Akt Signalweg, wird dem PLC β /PKC Signalweg eine Beteiligung an der mTOR Kinase Aktivität in Fibroblasten nach PMT Stimulation von Oubrahim *et al.* zugeschrieben [125]. Des Weiteren konnten die Autoren dieser Veröffentlichung in einer weiteren Publikation zeigen, dass die Sekretion eines löslichen Faktors, dem CTGF (*connective tissue growth factor*) durch PMT Stimulation auf parakrine und autokrine Weise die initiale mTOR-Aktivierung noch weiter verstärkt [126]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass auf ähnliche Weise lösliche Faktoren auch in PMT-stimulierten Makrophagen eine Rolle bei der mTOR-Aktivierung und der Osteoklastendifferenzierung spielen könnten. Es konnte gezeigt werden, dass PMT in Makrophagen die Freisetzung der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α bewirkt, während keine Freisetzung von IL12p40 bzw. des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 gezeigt werden konnte (siehe Abbildung 4.16). Es ist bekannt, dass eine TNF- α Stimulation in murinen Osteoklasten die Aktivierung des mTOR-Signalweges stimuliert, wie an der Phosphorylierung von P70s6K1, rpS6 und 4E-BP-1 zuvor gezeigt werden konnte [313]. Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass die PMT-induzierte Freisetzung von TNF- α in unserem Modellsystem die direkte Stimulierung des mTOR-Signalweges durch PMT zusätzlich unterstützt und somit die Differenzierung von Osteoklasten bzw. deren Überleben durch diesen Mechanismus weiter positiv beeinflusst [313]. Darüber hinaus wurde zuvor beschrieben, dass eine Kombination von IL-6 und TNF- α in murinen Makrophagen die Expression von c-fos, einem wichtigen Dimerpartner für die Bildung des Osteoklastogenese-fördernden Transkriptionsfak-

tors AP-1 stimuliert und somit die Osteoklastendifferenzierung fördert [245]. Im Hinblick auf die Literatur ist somit anzunehmen, dass die Stimulierung der Osteoklastogenese mit PMT sowohl durch direkte zelluläre Effekte in den Vorläuferzellen als auch durch indirekte Effekte wie die Stimulation der Zytokinsekretion ausgelöst wird.

In Antigen-präsentierenden Zellen, u.a. Makrophagen, konnte gezeigt werden, dass nach Stimulation mit TLR-Liganden die Aktivierung des mTOR-Signalweges von großer Bedeutung bei der Eindämmung einer überschießenden pro-inflammatorischen Antwort ist, indem der aktivierte Signalweg zu einer verminderten Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6, TNF- α und IL12p40 sowie einer erhöhten Freisetzung des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 führt [320]. In der vorliegenden Arbeit sollte daher geklärt werden, ob die PMT-stimulierte mTOR-Aktivierung in Makrophagen auch einen Einfluss auf die Balance der Zytokinfreisetzung nimmt. Dabei zeigte sich, dass die PMT-stimulierte Sekretion von IL-6 und TNF- α von der Aktivierung des mTOR-Signalweges mit PMT unbeeinflusst ist, da eine Behandlung mit Rapamycin das Level der Freisetzung in keiner Form veränderte (siehe Abbildung 4.16). Eine Freisetzung des Zytokins IL12p40 nach PMT Stimulation konnte nicht gezeigt werden. Auch eine Inhibition der mTOR Kinase mit Rapamycin erbrachte keine Sekretion dieses Zytokins und zeigt somit, dass der mTOR-Signalweg hier auch nicht an einer Limitierung von IL12p40 beteiligt ist (siehe Abbildung 4.16). IL-10 wurde durch eine PMT Behandlung der Makrophagen nicht induziert und Rapamycin erbrachte keine Veränderungen. Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass die PMT-stimulierte mTOR-Aktivierung keinen Einfluß auf das Zytokin-Expressionsmuster der untersuchten löslichen Mediatoren in RAW264.7 Makrophagen hat und sich somit in ihren Auswirkungen von einer LPS-stimulierten mTOR-Aktivierung in humanen Monozyten zu unterscheiden scheint [320]. Ein so unterschiedliches Zytokinfreisetzungsmuster trotz einer mTOR-Aktivierung in beiden Modellsystemen von Monozyten/Makrophagen resultiert wahrscheinlich aus Unterschieden in den Signalwegen, die von den beiden Stimulanzien PMT und LPS aktiviert werden. Darüber hinaus unterscheidet sich auch die Spezifität der Zellen, da die Untersuchungen in unterschiedlichen Modellsystemen durchgeführt wurden und sich primäre, humane Monozyten sicherlich anders verhalten als eine transformierte Makrophagen/Monozyten Mauszelllinie, die RAW264.7 Zellen. Dies zeigt sich auch daran, dass die Zytokinantwort auf eine PMT-Stimulation in den unterschiedlichen Zellmodellen anders ausfällt, da zuvor gezeigt werden konnte, dass PMT-stimulierte humane Monozyten kein IL12p40 und kein TNF- α freisetzen, lediglich geringe Mengen an IL-6 und IL-10 [325]. Interessanterweise wurde zuvor beschrieben, dass eine Differenzierung von Osteoklasten aus myeloiden Vorläuferzellen nicht zwingend mit einem Verlust der Funktion dieser Zellen als Immunzellen zu fungieren einhergehen muss, da gezeigt werden konnte, dass sie weiterhin die inflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-6 und IL-10 freisetzen und Antigene an T-Zellen präsentieren können [385].

Ein weiteres Ziel der Arbeit war es, eine Erklärung für die beobachtete mTOR-Abhängigkeit der PMT-stimulierten Osteoklastendifferenzierung auf molekularer Ebene zu finden. Dabei ergab sich eine mTOR-abhängige Regulationsachse zur Aktivierung von AP-1-abhängiger Transkription von Osteoklasten-spezifischen Genen, die als zentrales Ereignis die Eliminierung eines AP-1 Repressors, dem PDCD4, beinhaltet. Eine initiale AP-1-abhängige Transkription des Osteoklasten-Master-

regulators *NFATc1* gilt als bedeutend für die Einleitung des Osteoklastendifferenzierungsprogrammes [198]. PDCD4 ist ein Inhibitor der Transaktivierung der AP-1 Komponente c-jun durch eine JNK Phosphorylierung [337]. Das allgemeine Wissen um die Regulation von PDCD4 konnte in den letzten Jahren stark erweitert werden, da das Protein aufgrund seiner Funktion als Tumorsuppressor in den Fokus der Krebsforschung gelangte. Es ist bekannt, dass die Aktivierung des mTOR-Signalweges dessen proteasomalen Abbau stimuliert. Diese erhöhte zelluläre Degradation wird durch eine P70s6K1 bzw. Akt vermittelte Phosphorylierung von PDCD4 erreicht, die die Bindung der E3-Ubiquitin Ligase β -TrCP1 fördert [335, 386]. Die Analyse des zellulären Proteinspiegels an PDCD4 erbrachte, dass das Protein durch PMT-Stimulation herunterreguliert wird. Eine Behandlung mit Rapamycin verhinderte diese Abnahme an PDCD4 Molekülen nahezu komplett, was die mTOR-Abhängigkeit dieser Degradation nach PMT-Stimulation aufzeigt (siehe Abbildung 4.22 A). Zum späten Zeitpunkt nach PMT-Stimulation (18 h) wurde eine weitere Reduktion an PDCD4 erreicht. Über die Gründe dieser weiteren Abnahme kann aus den Daten der vorliegenden Arbeit nur spekuliert werden: Es ist bekannt, dass eine Inflammation die proteasomale Degradation in Makrophagen fördert [387]. Daher ist es möglich, dass die pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α , die nach 24 h Stimulation mit PMT in den Überständen nachgewiesen werden konnten (siehe Abbildung 4.16), diesen direkten PMT Effekt auf die PDCD4 Degradation auf parakrine Weise verstärken.

Neben der PDCD4 Regulation auf Basis seiner Proteinstabilität wird das Protein zusätzlich auf der Ebene seiner Neusynthese reguliert. Ein bekannter Modulator dieses Prozesses ist die miRNA21. Dabei ist bekannt, dass die miRNA21 die Translation der *PDCD4* mRNA hemmt [388]. Über diesen Mechanismus der PDCD4 Inhibition und der daraus resultierenden Transaktivierung von AP-1 abhängiger Transkription von Osteoklasten-spezifischen Genen ist die miRNA21 von Bedeutung für die RANKL-stimulierte Osteoklastogenese [286]. In diesem Zusammenhang wurde zuvor eine positive Rückkopplungsschleife beschrieben, da nicht nur die miRNA21 bei der Aktivierung von AP-1 beteiligt sein kann, sondern im Gegenzug der Transkriptionsfaktor AP-1 auch an der Regulation der Expression der miRNA21 involviert sein kann, da bekannt ist, dass AP-1 auch an den Promotor der miRNA21 binden kann [286, 389, 390]. Die in dieser Arbeit durchgeführte Analyse der miRNA21 Expression ergab, dass eine PMT Stimulation zu einer erhöhten Expressionsrate dieser miRNA führt. Diese gesteigerte Expressionsrate mit PMT zeigte sich als mTORc1-unabhängig, da eine Behandlung mit Rapamycin hier keinen Einfluss zeigte (siehe Abbildung 4.22 B). Daher scheint der zuvor beschriebenen mTOR/AP-1-Signalachse in unserem Modellsystem keine große Bedeutung bei der Induktion der miRNA21 zuzukommen. Daher muss die miRNA21 Stimulation in unserem System über einen alternativen Mechanismus erzielt werden und aus den vorliegenden Daten ergibt sich hier der JAK-STAT Signalweg als sehr wahrscheinlicher Kandidat dafür. Es ist aus der Literatur bekannt, dass in anderen Immunzellen (B-Zellen und T-Zellen) aktiviertes STAT-3 die Induktion der miRNA21 vorantreibt [285, 391]. Wie schon im vorherigen Abschnitt erwähnt, ist PMT ein effektiver Aktivator des JAK-STAT Signalweges durch die Aktivierung von $G\alpha_q$ [74]. In RAW264.7 Zellen zeigte sich nach PMT Stimulation schon nach 3 h eine starke STAT-3 Phosphorylierung an Tyr705, die sehr lange Bestand hatte und noch nach 24 h zu detektieren war (siehe Abbildung 4.20 G). Eine solche Hyperaktivierung von STAT-3 ist charakteristisch für PMT und der wahrscheinliche Auslöser der

miRNA21 Expression, da eine Hyperaktivierung von STAT-3 auch ein Aktivierungsmotiv für die OnkomiR miRNA21 in einigen Krebszellen (Multiples Myelom und Sézary Syndrom) darstellt [76, 285, 391]. Um die Beteiligung der miRNA21 an der PMT-stimulierten PDCD4 Degradation zu untersuchen war es nötig, die Wirkung der miRNA21 durch eine Antagomir zu inhibieren. Diese Versuche sind nicht Teil der vorliegenden Arbeit, sondern wurden im Anschluss von Dr. Sushmita Chakraborty ergänzend durchgeführt. Bei dieser Versuchsreihe stellte sich heraus, dass eine Inhibition der miRNA21 mit einer Antagomir unter PMT Stimulation keine Erhöhung der PDCD4 Spiegel zur Folge hat [380].

Die Aktivität des für die Osteoklastogenese so bedeutenden Transkriptionsfaktors AP-1 kann entweder über die Häufigkeit seiner beiden Dimer-Komponenten reguliert werden oder durch posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierungen [338]. PDCD4 verhindert die Transaktivierung der AP-1 Komponente c-jun, indem es auf sterische Weise die Phosphorylierung durch die JNK verhindert [337]. Da es Gegenstand unserer Hypothese war, dass PMT mTOR-abhängig die PDCD4 Degradation in die Wege leitet und so eine gesteigerte Transaktivierung der AP-1 Komponente c-jun bewirkt, wurde der c-jun Phosphorylierungsstatus an Ser63 nach PMT Stimulation untersucht. Dabei konnte eine starke Phosphorylierung von c-jun schon sehr früh, nach 3 h PMT Stimulation, nachgewiesen werden und verstärkte sich nach 24 h auf ein Maximum (siehe Abbildung 4.22 C). Die Betrachtung der mTOR-Abhängigkeit dieses Phosphorylierungsereignisses teilte die c-jun Transaktivierung in zwei unterschiedliche Zeitphasen: Eine frühe, Rapamycin-resistente (3 h) und eine späte, Rapamycin-sensitive Phase (24 h). Des Weiteren wurden auch das Expressionslevel von c-jun und dessen Translokation in den Nukleus, dem Ort der Transkription, untersucht. Dabei zeigte sich nach PMT Stimulation eine stark gesteigerte Expressionsrate sowie eine nukleäre Lokalisation des Transkriptionsfaktors (siehe Abbildung 4.22 D). Auch hier zeigte eine Behandlung mit Rapamycin, ähnlich wie schon für die Phosphorylierung, eine frühe mTOR-Unabhängigkeit und eine späte teilweise mTOR-Abhängigkeit. Diese Expressionsraten lassen sich aus der beobachteten Phosphorylierung von c-jun an Ser63 erklären: Der Promotor von *c-jun* wird sehr effizient durch ein Heterodimer aus c-jun und ATF2 aktiviert [392]. Dieses Heterodimer kann nur effizient die Transkription von *c-jun* vorantreiben, wenn c-jun zuvor durch die JNK Kinase an Ser63 phosphoryliert wurde [393]. Daher könnte sich die späte mTOR-Abhängigkeit der c-jun Phosphorylierung in einem späten Rapamycin-sensitiven Expressionslevel widerspiegeln.

Ein genauer Mechanismus wie die frühe mTOR-unabhängige c-jun-Phosphorylierung alternativ zu Stande kommen könnte, konnte im Rahmen dieser Arbeit leider nicht gefunden werden. Es kann nur spekuliert werden, dass PDCD4 zum frühen Zeitpunkt eventuell eine andere zelluläre Funktion erfüllt: Es ist nämlich bekannt, dass PDCD4 sowohl als translationaler Repressor im Zytoplasma fungieren als auch als transkriptioneller Suppressor im Nukleus agieren und somit unter bestimmten Umständen seine Lokalisation zwischen den Kompartimenten wechseln kann [337]. Es ist daher nicht ausgeschlossen, dass PDCD4 durch eine andere zelluläre Lokalisation zum frühen Zeitpunkt keinen inhibitorischen Einfluss auf die Transaktivierung von c-jun ausübt und somit die mTOR-abhängige Degradation noch keine Wirkung zeigt. Eine solche Hypothese müsste in zukünftigen Experimenten jedoch noch weiter untersucht werden. Es könnte sein, dass die phosphorylierten c-jun Monome-

re zum frühen Zeitpunkt mit anderen Monomerpartnern wie beispielsweise ATF, c/EBP, Maf oder NF-E2 Heterodimere bilden und so die Transkription von Genen einleiten, die keine Bedeutung für die Osteoklastendifferenzierung haben. Zum späten Zeitpunkt (24 h) bilden die durch Beteiligung des mTOR-Signalweges transaktivierte c-jun Monomere vermutlich vorrangig c-jun/c-fos Heterodimere, da bekannt ist, dass ein solcher AP-1 Komplex bedeutend für die Transkription von Osteoklastenspezifischen Genen ist [394, 395]. Auch wenn sich auf mechanistischer Ebene die Unterschiede in der mTOR-Abhängigkeit zwischen der frühen und der späten c-jun Aktivierung nicht eindeutig klären ließen, ist die Wichtigkeit des mTOR-Signalweges für eine effektive Differenzierung von Osteoklasten mit dem Toxin ein evidenter Effekt (siehe Abbildung 4.19). Dieser spiegelt sich auch auf funktionaler Ebene wider, da gezeigt werden konnte, dass die Aktivität der für die Degradation der organischen Knochenmatrix so wichtigen Protease Kathepsin K auch mTOR-abhängig in PMT-stimulierten Makrophagen ist (siehe Abbildung 4.22 E).

5.3 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass PMT die Differenzierung von klassischen Vorläuferzellen der myeloiden Linie, den Makrophagen/Monozyten, zu Osteoklasten stimulieren kann. Hierbei aktiviert das Toxin mehrere Signalwege, die auch bedeutend für die klassische, M-CSF/RANKL-stimulierte Osteoklastogenese sind. Dass es aber auch Unterschiede zwischen diesen beiden Differenzierungswegen gibt, konnte schon durch die Visualisierung der Osteoklasten mittels Immunfluoreszenzmikroskopie deutlich gemacht werden: auf morphologischer Ebene hatten PMT-differenzierte Osteoklasten durchschnittlich eine kleinere Größe und wiesen auch ein anders organisiertes Zytoskelett auf. Da PMT als potenter Aktivator der kleinen GTPase RhoA in anderen Zellen schon bekannt ist und RhoA einen bedeutenden Einfluss auf Umlagerungen des Zytoskeletts hat, wäre es interessant, in zukünftigen Experimenten die Zytoskelettlagerungen in PMT-stimulierten Osteoklastenvorläuferzellen zu analysieren und deren Rolle für die PMT-stimulierte Osteoklastendifferenzierung und Osteoklastenfunktionalität näher zu untersuchen.

Um weitere Gemeinsamkeiten und vor allem Unterschiede zwischen diesen beiden Differenzierungswegen herausfinden zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit das Proteom PMT-stimulierter Vorläuferzellen mit dem M-CSF/RANKL-stimulierter Vorläuferzellen mit Hilfe der DIGE-Technik verglichen und es konnten einige differentiell regulierte Proteine mit Bezug zum Prozess der Osteoklastogenese identifiziert werden, deren Beteiligungen an den Toxin-vermittelten Mechanismen in zukünftigen Experimenten untersucht werden könnten. Erkenntnisse daraus könnten uns dem Ziel näher bringen, den Prozess der Toxin-vermittelten Osteoklastendifferenzierung besser zu verstehen. Die Erkenntnis, dass die PMT-stimulierte Osteoklastogenese von der Aktivierung des mTOR-Signalweges abhängig ist, konnte in der vorliegenden Arbeit schon erbracht werden. Doch auch hier bestehen noch viele offene Fragen, beispielsweise, wie die PMT-stimulierte Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen, die in der Arbeit gezeigt werden konnte, an der Aktivierung des mTOR-Signalweges

beteiligt ist und generell welche Rolle diese Zytokine für die PMT-stimulierte Osteoklastogenese spielen.

Des Weiteren ist die Klärung der Frage, inwiefern das *Pasteurella multocida* Bakterium von der Toxin-vermittelten Modulierung des Osteoimmunsystems im Sinne einer Immunevasionsstrategie profitiert, noch offen. Dabei ist auch die Frage, ob mit PMT noch alternative Vorläufer zu Osteoklasten differenzieren können, von großem Interesse. In der Arbeit konnte gezeigt werden, dass sortierte CD45R-positive Vorläufer aus dem Knochenmark effektiv zu Osteoklasten differenzieren können. Zur weiteren Charakterisierung dieser Zellen und zur Klärung, ob es sich dabei um B-Zellen handelt, die zu Osteoklasten differenzieren können oder eventuell doch um eine seltene Sorte an dendritischen Zellen, den pDCs, die diesen Marker auch exprimieren, könnte die Durchführung von „fate mapping“-Systemen oder die Analyse dieser Zellen auf Einzelzellebene weiteren Aufschluss geben.

6 Kapitel 6

Literatur

1. Arron, J.R. and Y. Choi, *Osteoimmunology: bone versus immune system*. Nature, 2000. **408**(6812): p. 535-536.
2. Lopez, I. and A.L. Buchman, *Metabolic bone disease in IBD*. Current gastroenterology reports, 2000. **2**(4): p. 317-322.
3. Sato, K. and H. Takayanagi, *Osteoclasts, rheumatoid arthritis, and osteoimmunology*. Curr Opin Rheumatol, 2006. **18**(4): p. 419-26.
4. Ramaswamy, B. and C.L. Shapiro. *Osteopenia and osteoporosis in women with breast cancer. in Seminars in oncology*. 2003. Elsevier.
5. Berenson, J.R., et al., *Efficacy of pamidronate in reducing skeletal events in patients with advanced multiple myeloma*. New England Journal of Medicine, 1996. **334**(8): p. 488-493.
6. Hofbauer, L.C., et al., *Osteoporosis in patients with diabetes mellitus*. Journal of Bone and Mineral Research, 2007. **22**(9): p. 1317-1328.
7. Teichmann, J., et al., *Bone metabolism and bone mineral density of systemic lupus erythematosus at the time of diagnosis*. Rheumatology international, 1999. **18**(4): p. 137-140.
8. Thomas, J. and S.M. Doherty, *HIV Infection-A Risk Factor for Osteoporosis*. JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes, 2003. **33**(3): p. 281-291.
9. Danks, L. and H. Takayanagi, *Immunology and bone*. Journal of biochemistry, 2013. **154**(1): p. 29-39.
10. Alnaeeli, M., J.M. Penninger, and Y.-T.A. Teng, *Immune interactions with CD4⁺ T cells promote the development of functional osteoclasts from murine CD11c⁺ dendritic cells*. The Journal of Immunology, 2006. **177**(5): p. 3314-3326.
11. Zupan, J., M. Jeras, and J. Marc, *Osteoimmunology and the influence of pro-inflammatory cytokines on osteoclasts*. Biochemia medica, 2013. **23**(1): p. 43-63.
12. McInnes, I.B. and G. Schett, *Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. Nature Reviews Immunology, 2007. **7**(6): p. 429-442.
13. Dougall, W.C., et al., *RANK is essential for osteoclast and lymph node development*. Genes & development, 1999. **13**(18): p. 2412-2424.
14. Kong, Y.-Y., et al., *OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis*. Nature, 1999. **397**(6717): p. 315-323.
15. Desanti, G.E., et al., *Developmentally regulated availability of RANKL and CD40 ligand reveals distinct mechanisms of fetal and adult cross-talk in the thymus medulla*. The Journal of Immunology, 2012. **189**(12): p. 5519-5526.
16. Trumpp, A., M. Essers, and A. Wilson, *Awakening dormant haematopoietic stem cells*. Nature Reviews Immunology, 2010. **10**(3): p. 201-209.
17. Mercier, F.E., C. Ragu, and D.T. Scadden, *The bone marrow at the crossroads of blood and immunity*. Nature Reviews Immunology, 2012. **12**(1): p. 49-60.
18. Gattei, V., et al., *Human osteoclasts and preosteoclast cells (FLG 29.1) express functional c-kit receptors and interact with osteoblast and stromal cells via membrane-bound stem cell factor*. Cell Growth Differ, 1996. **7**(6): p. 753-63.
19. Zhu, J., et al., *Osteoblasts support B-lymphocyte commitment and differentiation from hematopoietic stem cells*. Blood, 2007. **109**(9): p. 3706-3712.

20. Chu, V.T. and C. Berek, *The establishment of the plasma cell survival niche in the bone marrow*. Immunological reviews, 2013. **251**(1): p. 177-188.
21. Croucher, P.I., et al., *Osteoprotegerin inhibits the development of osteolytic bone disease in multiple myeloma*. Blood, 2001. **98**(13): p. 3534-3540.
22. Kawai, T., et al., *B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease*. The American journal of pathology, 2006. **169**(3): p. 987-998.
23. Strack, J., et al., *Noncanonical G-Protein-Dependent Modulation of Osteoclast Differentiation and Bone Resorption Mediated by Pasteurella multocida Toxin*. mBio, 2014. **5**(6): p. e02190-14.
24. Hildebrand, D., K. Heeg, and K.F. Kubatzky, *Pasteurella multocida toxin-stimulated osteoclast differentiation is B cell dependent*. Infection and immunity, 2011. **79**(1): p. 220-228.
25. Pasteur, L., *De l'atténuation du virus du choléra des poules*. C R Acad Sc Paris 91, 1880: p. 673-680.
26. Wilson, B.A. and M. Ho, *Pasteurella multocida: from zoonosis to cellular microbiology*. Clinical microbiology reviews, 2013. **26**(3): p. 631-655.
27. Harper, M., J.D. Boyce, and B. Adler, *Pasteurella multocida pathogenesis: 125 years after Pasteur*. FEMS microbiology letters, 2006. **265**(1): p. 1-10.
28. WEBER, D.J., et al., *Pasteurella multocida infections: report of 34 cases and review of the literature*. Medicine, 1984. **63**(3): p. 133-154.
29. Francis, D.P., M.A. Holmes, and G. Brandon, *Pasteurella multocida: infections after domestic animal bites and scratches*. Jama, 1975. **233**(1): p. 42-45.
30. Kimura, R., et al., *Pasteurella multocida septicemia caused by close contact with a domestic cat: case report and literature review*. Journal of infection and chemotherapy, 2004. **10**(4): p. 250-252.
31. Rimler, R. and K. Rhoades, *Serogroup F, a new capsule serogroup of Pasteurella multocida*. Journal of clinical microbiology, 1987. **25**(4): p. 615-618.
32. Carter, G.R., *Serological classification of pasteurella*. Vet Rec, 1988. **122**(13): p. 311.
33. Harper, M., J.D. Boyce, and B. Adler, *The key surface components of Pasteurella multocida: capsule and lipopolysaccharide, in Pasteurella multocida*. 2012, Springer. p. 39-51.
34. Harper, M., et al., *A heptosyltransferase mutant of Pasteurella multocida produces a truncated lipopolysaccharide structure and is attenuated in virulence*. Infection and immunity, 2004. **72**(6): p. 3436-3443.
35. Boyce, J.D. and B. Adler, *The capsule is a virulence determinant in the pathogenesis of Pasteurella multocida M1404 (B: 2)*. Infection and immunity, 2000. **68**(6): p. 3463-3468.
36. Chung, J.Y., et al., *Role of capsule in the pathogenesis of fowl cholera caused by Pasteurella multocida serogroup A*. Infection and immunity, 2001. **69**(4): p. 2487-2492.
37. Foged, N.T., J.P. Nielsen, and S.E. Jorsal, *Protection against progressive atrophic rhinitis by vaccination with Pasteurella multocida toxin purified by monoclonal antibodies*. Vet Rec, 1989. **125**(1): p. 7-11.
38. Frandsen, P.L., et al., *Characterization of toxin from different strains of Pasteurella multocida serotype A and D*. Journal of Veterinary Medicine, Series B, 1991. **38**(1-10): p. 345-352.
39. Foged, N.T., *Pasteurella multocida toxin. The characterisation of the toxin and its significance in the diagnosis and prevention of progressive atrophic rhinitis in pigs*. APMIS. Supplementum, 1991. **25**: p. 1-56.
40. Lax, A.J. and N. Chanter, *Cloning of the toxin gene from Pasteurella multocida and its role in atrophic rhinitis*. Journal of general microbiology, 1990. **136**(1): p. 81-87.
41. Buys, W., et al., *Sequence of the dermonecrotic toxin of Pasteurella multocida ssp. multocida*. Nucleic acids research, 1990. **18**(9): p. 2815.
42. Kitadokoro, K., et al., *Crystal structures reveal a thiol protease-like catalytic triad in the C-terminal region of Pasteurella multocida toxin*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007. **104**(12): p. 5139-5144.
43. Kamitani, S., et al., *Characterization of the membrane-targeting C1 domain in Pasteurella multocida toxin*. Journal of Biological Chemistry, 2010. **285**(33): p. 25467-25475.

44. Aminova, L.R., et al., *The C3 domain of Pasteurella multocida toxin is the minimal domain responsible for activation of Gq-dependent calcium and mitogenic signaling*. Protein Science, 2008. **17**(5): p. 945-949.
45. Orth, J.H., D. Blocker, and K. Aktories, *His1205 and His1223 are essential for the activity of the mitogenic Pasteurella multocida toxin*. Biochemistry, 2003. **42**(17): p. 4971-7.
46. Ward, P.N., et al., *Activity of the mitogenic Pasteurella multocida toxin requires an essential C-terminal residue*. Infection and immunity, 1998. **66**(12): p. 5636-5642.
47. Orth, J.H., et al., *Pasteurella multocida toxin activation of heterotrimeric G proteins by deamidation*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009. **106**(17): p. 7179-7184.
48. Aktories, K., *Bacterial protein toxins that modify host regulatory GTPases*. Nature Reviews Microbiology, 2011. **9**(7): p. 487-498.
49. Pettit, R., M. Ackermann, and R. Rimler, *Receptor-mediated binding of Pasteurella multocida dermonecrotic toxin to canine osteosarcoma and monkey kidney (vero) cells*. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology, 1993. **69**(1): p. 94-100.
50. Brothers, M.C., et al., *Membrane interaction of Pasteurella multocida toxin involves sphingomyelin*. FEBS Journal, 2011. **278**(23): p. 4633-4648.
51. Pettit, R.K., M.R. Ackermann, and R.B. Rimler, *Receptor-mediated binding of Pasteurella multocida dermonecrotic toxin to canine osteosarcoma and monkey kidney (vero) cells*. Lab Invest, 1993. **69**(1): p. 94-100.
52. Repella, T.L., et al., *Arf6-dependent intracellular trafficking of Pasteurella multocida toxin and pH-dependent translocation from late endosomes*. Toxins, 2011. **3**(3): p. 218-241.
53. Baldwin, M.R., J.H. Lakey, and A.J. Lax, *Identification and characterization of the Pasteurella multocida toxin translocation domain*. Molecular microbiology, 2004. **54**(1): p. 239-250.
54. Orth, J.H. and K. Aktories, *Molecular biology of Pasteurella multocida toxin*, in *Pasteurella multocida*. 2012, Springer. p. 73-92.
55. Wilson, B.A. and M. Ho, *Recent insights into Pasteurella multocida toxin and other G-protein-modulating bacterial toxins*. Future microbiology, 2010. **5**(8): p. 1185-1201.
56. Neer, E.J. and D.E. Clapham, *Roles of G protein subunits in transmembrane signalling*. Nature, 1988. **333**(6169): p. 129-34.
57. Bourne, H.R., D.A. Sanders, and F. McCormick, *The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions*. Nature, 1990. **348**(6297): p. 125-132.
58. Stryer, L. and H.R. Bourne, *G proteins: a family of signal transducers*. Annual review of cell biology, 1986. **2**(1): p. 391-419.
59. Cassel, D. and Z. Selinger, *Mechanism of adenylate cyclase activation through the beta-adrenergic receptor: catecholamine-induced displacement of bound GDP by GTP*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1978. **75**(9): p. 4155-4159.
60. Gilman, A.G., *G proteins: transducers of receptor-generated signals*. Annual review of biochemistry, 1987. **56**(1): p. 615-649.
61. Pierce, K.L., R.T. Premont, and R.J. Lefkowitz, *Seven-transmembrane receptors*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2002. **3**(9): p. 639-650.
62. Cassel, D. and Z. Selinger, *Mechanism of adenylate cyclase activation by cholera toxin: inhibition of GTP hydrolysis at the regulatory site*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1977. **74**(8): p. 3307-3311.
63. Orth, J.H., et al., *Substrate specificity of Pasteurella multocida toxin for α subunits of heterotrimeric G proteins*. The FASEB Journal, 2013. **27**(2): p. 832-842.
64. Orth, J.H., et al., *Activation of G α i and subsequent uncoupling of receptor-G α i signaling by Pasteurella multocida toxin*. Journal of Biological Chemistry, 2008. **283**(34): p. 23288-23294.
65. Orth, J.H., et al., *Pasteurella multocida toxin-induced activation of RhoA is mediated via two families of G α proteins, G α q and G α 12/13*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(44): p. 36701-36707.

66. Lacerda, H.M., A.J. Lax, and E. Rozengurt, *Pasteurella multocida* Toxin, a Potent Intracellularly Acting Mitogen, Induces p125^{cas} and Paxillin Tyrosine Phosphorylation, Actin Stress Fiber Formation, and Focal Contact Assembly in Swiss 3T3 Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 1996. **271**(1): p. 439-445.
67. Zywiets, A., et al., *Pleiotropic effects of Pasteurella multocida* toxin are mediated by Gq-dependent and-independent mechanisms involvement of Gq but not G11. *Journal of Biological Chemistry*, 2001. **276**(6): p. 3840-3845.
68. Staddon, J.M., et al., *Pasteurella multocida* toxin, a potent mitogen, stimulates protein kinase C-dependent and-independent protein phosphorylation in Swiss 3T3 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 1990. **265**(20): p. 11841-11848.
69. Staddon, J.M., et al., *Pasteurella multocida* toxin, a potent mitogen, increases inositol 1, 4, 5-trisphosphate and mobilizes Ca²⁺ in Swiss 3T3 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 1991. **266**(8): p. 4840-4847.
70. Preuß, I., et al., *Pasteurella multocida* toxin activates Gβγ dimers of heterotrimeric G proteins. *Cellular signaling*, 2009. **21**(4): p. 551-558.
71. Preuß, I., et al., *Pasteurella multocida* toxin is a potent activator of anti-apoptotic signalling pathways. *Cellular microbiology*, 2010. **12**(8): p. 1174-1185.
72. Rozengurt, E., et al., *Pasteurella multocida* toxin: potent mitogen for cultured fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1990. **87**(1): p. 123-127.
73. Hoskins, I., L. Thomas, and A. Lax, *Nasal infection with Pasteurella multocida* causes proliferation of bladder epithelium in gnotobiotic pigs. *Veterinary record*, 1997. **140**(1): p. 22-22.
74. Orth, J.H., K. Aktories, and K.F. Kubatzky, *Modulation of host cell gene expression through activation of STAT transcription factors by Pasteurella multocida* toxin. *Journal of Biological Chemistry*, 2007. **282**(5): p. 3050-3057.
75. Ungureanu, D., et al., *Regulation of Jak2 through the ubiquitin-proteasome pathway involves phosphorylation of Jak2 on Y1007 and interaction with SOCS-1*. *Molecular and cellular biology*, 2002. **22**(10): p. 3316-3326.
76. Hildebrand, D., et al., *Pasteurella multocida* Toxin-induced Pim-1 expression disrupts suppressor of cytokine signalling (SOCS)-1 activity. *Cellular microbiology*, 2010. **12**(12): p. 1732-1745.
77. Orth, J.H. and K. Aktories, *Pasteurella multocida* toxin activates various heterotrimeric G proteins by deamidation. *Toxins*, 2010. **2**(2): p. 205-214.
78. Brunn, G.J., et al., *The mammalian target of rapamycin phosphorylates sites having a (Ser/Thr)-Pro motif and is activated by antibodies to a region near its COOH terminus*. *Journal of Biological Chemistry*, 1997. **272**(51): p. 32547-32550.
79. Hoeffler, C.A. and E. Klann, *mTOR signaling: at the crossroads of plasticity, memory and disease*. *Trends in neurosciences*, 2010. **33**(2): p. 67-75.
80. Bai, X. and Y. Jiang, *Key factors in mTOR regulation*. *Cellular and molecular life sciences*, 2010. **67**(2): p. 239-253.
81. Yang, Q. and K.-L. Guan, *Expanding mTOR signaling*. *Cell research*, 2007. **17**(8): p. 666-681.
82. Kunz, J., et al., *Target of rapamycin in yeast, TOR2, is an essential phosphatidylinositol kinase homolog required for G1 progression*. *Cell*, 1993. **73**(3): p. 585-596.
83. Brown, E.J., et al., *A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex*. *Nature*, 1994. **369**(6483): p. 756-758.
84. Kunz, J. and M.N. Hall, *Cyclosporin A, FK506 and rapamycin: more than just immunosuppression*. *Trends in biochemical sciences*, 1993. **18**(9): p. 334-338.
85. Vezina, C., A. Kudelski, and S. Sehgal, *Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle*. *The Journal of antibiotics*, 1975. **28**(10): p. 721-726.

86. Eng, C., S. Sehgal, and C. Vézina, *Activity of rapamycin (AY-22,989) against transplanted tumors*. The Journal of antibiotics, 1984. **37**(10): p. 1231-1237.
87. Douros, J. and M. Suffness, *New antitumor substances of natural origin*. Cancer treatment reviews, 1981. **8**(1): p. 63-87.
88. Sehgal, S.N., *Rapamune®(RAPA, rapamycin, sirolimus): mechanism of action immunosuppressive effect results from blockade of signal transduction and inhibition of cell cycle progression*. Clinical biochemistry, 1998. **31**(5): p. 335-340.
89. Stepkowski, S.M., et al., *Rapamycin, a potent immunosuppressive drug for vascularized heart, kidney, and small bowel transplantation in the rat*. Transplantation, 1991. **51**(1): p. 22-26.
90. Loewith, R., et al., *Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control*. Molecular cell, 2002. **10**(3): p. 457-468.
91. Jacinto, E., et al., *Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive*. Nature cell biology, 2004. **6**(11): p. 1122-1128.
92. Sarbassov, D.D., et al., *Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton*. Current biology, 2004. **14**(14): p. 1296-1302.
93. Sarbassov, D.D., et al., *Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex*. Science, 2005. **307**(5712): p. 1098-1101.
94. Alessi, D.R., et al., *Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1*. The EMBO journal, 1996. **15**(23): p. 6541.
95. Sarbassov, D.D., et al., *Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB*. Molecular cell, 2006. **22**(2): p. 159-168.
96. Laplante, M. and D.M. Sabatini, *mTOR signaling in growth control and disease*. Cell, 2012. **149**(2): p. 274-293.
97. Yu, Y., et al., *Structural basis for the unique biological function of small GTPase RHEB*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(17): p. 17093-17100.
98. Tee, A.R., et al., *Tuberous sclerosis complex gene products, Tuberin and Hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb*. Current biology, 2003. **13**(15): p. 1259-1268.
99. Inoki, K., et al., *Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling*. Genes & development, 2003. **17**(15): p. 1829-1834.
100. Potter, C.J., L.G. Pedraza, and T. Xu, *Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2*. Nature cell biology, 2002. **4**(9): p. 658-665.
101. Dan, H.C., et al., *Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway regulates tuberous sclerosis tumor suppressor complex by phosphorylation of tuberin*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(38): p. 35364-35370.
102. Manning, B.D., et al., *Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway*. Molecular cell, 2002. **10**(1): p. 151-162.
103. Cai, S.-L., et al., *Activity of TSC2 is inhibited by AKT-mediated phosphorylation and membrane partitioning*. The Journal of cell biology, 2006. **173**(2): p. 279-289.
104. Ma, L., et al., *Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk: implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis*. Cell, 2005. **121**(2): p. 179-193.
105. Lu, J., et al., *Pim2 is required for maintaining multiple myeloma cell growth through modulating TSC2 phosphorylation*. Blood, 2013. **122**(9): p. 1610-1620.
106. Hara, K., et al., *Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action*. Cell, 2002. **110**(2): p. 177-189.
107. Carriere, A., et al., *ERK1/2 phosphorylate Raptor to promote Ras-dependent activation of mTOR complex 1 (mTORC1)*. Journal of Biological Chemistry, 2011. **286**(1): p. 567-577.
108. Sancak, Y., et al., *PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase*. Molecular cell, 2007. **25**(6): p. 903-915.

109. Wang, L., et al., *PRAS40 regulates mTORC1 kinase activity by functioning as a direct inhibitor of substrate binding*. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(27): p. 20036-20044.
110. Oshiro, N., et al., *The proline-rich Akt substrate of 40 kDa (PRAS40) is a physiological substrate of mammalian target of rapamycin complex 1*. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(28): p. 20329-20339.
111. Vander Haar, E., et al., *Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40*. Nature cell biology, 2007. **9**(3): p. 316-323.
112. Zhang, F., et al., *PIM1 protein kinase regulates PRAS40 phosphorylation and mTOR activity in FDCP1 cells*. Cancer biology & therapy, 2009. **8**(9): p. 846-853.
113. Burnett, P.E., et al., *RAFT1 phosphorylation of the translational regulators p70 S6 kinase and 4E-BP1*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998. **95**(4): p. 1432-1437.
114. Fingar, D.C., et al., *mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/eukaryotic translation initiation factor 4E*. Molecular and cellular biology, 2004. **24**(1): p. 200-216.
115. Holz, M.K., et al., *mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events*. Cell, 2005. **123**(4): p. 569-580.
116. Ruvinsky, I. and O. Meyuhas, *Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size*. Trends in biochemical sciences, 2006. **31**(6): p. 342-348.
117. Pause, A., et al., *Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function*. Nature, 1994. **371**(6500): p. 762-7.
118. Gingras, A.-C., et al., *Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism*. Genes & development, 1999. **13**(11): p. 1422-1437.
119. Harrington, L.S., et al., *The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins*. The Journal of cell biology, 2004. **166**(2): p. 213-223.
120. Wan, X., et al., *Rapamycin induces feedback activation of Akt signaling through an IGF-1R-dependent mechanism*. Oncogene, 2007. **26**(13): p. 1932-1940.
121. Soares, H.P., et al., *Different patterns of Akt and ERK feedback activation in response to rapamycin, active-site mTOR inhibitors and metformin in pancreatic cancer cells*. PloS one, 2013. **8**(2): p. e57289.
122. O'Reilly, K.E., et al., *mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt*. Cancer research, 2006. **66**(3): p. 1500-1508.
123. Higgins, T.E., et al., *Pasteurella multocida toxin is a potent inducer of anchorage-independent cell growth*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1992. **89**(10): p. 4240-4244.
124. Lax, A.J. and A.E. Grigoriadis, *Pasteurella multocida toxin: the mitogenic toxin that stimulates signalling cascades to regulate growth and differentiation*. International journal of medical microbiology, 2001. **291**(4): p. 261-268.
125. Oubrahim, H., et al., *Mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) plays a role in Pasteurella multocida toxin (PMT)-induced protein synthesis and proliferation in Swiss 3T3 cells*. Journal of Biological Chemistry, 2013. **288**(4): p. 2805-2815.
126. Oubrahim, H., et al., *Pasteurella multocida toxin (PMT) upregulates CTGF which leads to mTORC1 activation in Swiss 3T3 cells*. Cellular signalling, 2013. **25**(5): p. 1136-1148.
127. Chapuis, N., et al., *Perspectives on inhibiting mTOR as a future treatment strategy for hematological malignancies*. Leukemia, 2010. **24**(10): p. 1686-1699.
128. Felix, R., H. Fleisch, and P. Frandsen, *Effect of Pasteurella multocida toxin on bone resorption in vitro*. Infection and immunity, 1992. **60**(12): p. 4984-4988.
129. Brogden, K.A., et al., *Atrophic Rhinitis*. 2002.
130. Chanter, N., J. Rutter, and A. Mackenzie, *Partial purification of an osteolytic toxin from Pasteurella multocida*. Journal of general microbiology, 1986. **132**(4): p. 1089-1097.

131. Horiguchi, Y., *Swine atrophic rhinitis caused by Pasteurella multocida toxin and Bordetella dermonecrotic toxin, in Pasteurella multocida*. 2012, Springer. p. 113-129.
132. Jutras, I. and B. Martineau-Doize, *Stimulation of osteoclast-like cell formation by Pasteurella multocida toxin from hemopoietic progenitor cells in mouse bone marrow cultures*. Canadian journal of veterinary research, 1996. **60**(1): p. 34.
133. Sterner-Kock, A., et al., *Effects of the Pasteurella multocida toxin on osteoblastic cells in vitro*. Veterinary Pathology Online, 1995. **32**(3): p. 274-279.
134. Jutras, I. and B. Martineau-Doize, *Stimulation of osteoclast-like cell formation by Pasteurella multocida toxin from hemopoietic progenitor cells in mouse bone marrow cultures*. Can J Vet Res, 1996. **60**(1): p. 34-9.
135. Gwaltney, S., et al., *Effects of Pasteurella multocida toxin on porcine bone marrow cell differentiation into osteoclasts and osteoblasts*. Veterinary Pathology Online, 1997. **34**(5): p. 421-430.
136. Martineau-Doize, B., et al., *Effects of Pasteurella multocida toxin on the osteoclast population of the rat*. Journal of comparative pathology, 1993. **108**(1): p. 81-91.
137. Siegert, P., et al., *Pasteurella Multocida Toxin Prevents Osteoblast Differentiation by Transactivation of the MAP-Kinase Cascade via the Gαq/11-p63RhoGEF-RhoA Axis*. 2013.
138. Mullan, P.B. and A.J. Lax, *Pasteurella multocida toxin is a mitogen for bone cells in primary culture*. Infection and immunity, 1996. **64**(3): p. 959-965.
139. Bélanger, L.F., *Osteocytic osteolysis*. Calcified Tissue International, 1969. **4**(1): p. 1-12.
140. Nakashima, T., M. Hayashi, and H. Takayanagi, *New insights into osteoclastogenic signaling mechanisms*. Trends in Endocrinology & Metabolism, 2012. **23**(11): p. 582-590.
141. Pead, M., et al., *Increased 3H-uridine levels in osteocytes following a single short period of dynamic bone loading in vivo*. Calcified tissue international, 1988. **43**(2): p. 92-96.
142. Bonewald, L.F., *The amazing osteocyte*. Journal of Bone and Mineral Research, 2011. **26**(2): p. 229-238.
143. McNamara, L.M., et al., *Attachment of osteocyte cell processes to the bone matrix*. Anat Rec (Hoboken), 2009. **292**(3): p. 355-63.
144. Schaffler, M.B., et al., *Osteocytes: master orchestrators of bone*. Calcif Tissue Int, 2014. **94**(1): p. 5-24.
145. Robling, A.G., A.B. Castillo, and C.H. Turner, *Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling*. Annu. Rev. Biomed. Eng., 2006. **8**: p. 455-498.
146. Caetano-Lopes, J., H. Canhao, and J. Fonseca, *Osteoimmunology-the hidden immune regulation of bone*. Autoimmunity reviews, 2009. **8**(3): p. 250-255.
147. Caplan, A.I., *Mesenchymal stem cells*. Journal of orthopaedic research, 1991. **9**(5): p. 641-650.
148. SUDA, T., N. TAKAHASHI, and T.J. MARTIN, *Modulation of osteoclast differentiation*. Endocrine reviews, 1992. **13**(1): p. 66-80.
149. Loutit, J. and N. Nisbet, *The origin of osteoclasts*. Immunobiology, 1982. **161**(3): p. 193-203.
150. Udagawa, N., et al., *Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1990. **87**(18): p. 7260-7264.
151. Takahashi, N., N. Udagawa, and T. Suda, *A new member of tumor necrosis factor ligand family, ODF/OP-GL/TRANSE/RANKL, regulates osteoclast differentiation and function*. Biochemical and biophysical research communications, 1999. **256**(3): p. 449-455.
152. Yoshida, H., et al., *The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene*. 1990.
153. Lagasse, E. and I.L. Weissman, *Enforced expression of Bcl-2 in monocytes rescues macrophages and partially reverses osteopetrosis in op/op mice*. Cell, 1997. **89**(7): p. 1021-31.

154. Arai, F., et al., *Commitment and differentiation of osteoclast precursor cells by the sequential expression of c-Fms and receptor activator of nuclear factor κ B (RANK) receptors*. The Journal of experimental medicine, 1999. **190**(12): p. 1741-1754.
155. Lacey, D.L., et al., *Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation*. Cell, 1998. **93**(2): p. 165-76.
156. Lee, S.-K. and J.A. Lorenzo, *Parathyroid hormone stimulates TRANCE and inhibits osteoprotegerin messenger ribonucleic acid expression in murine bone marrow cultures: correlation with osteoclast-like cell formation I*. Endocrinology, 1999. **140**(8): p. 3552-3561.
157. Kitazawa, R., S. Kitazawa, and S. Maeda, *Promoter structure of mouse RANKL/TRANCE/OPGL/ODF gene*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression, 1999. **1445**(1): p. 134-141.
158. Udagawa, N., et al., *Osteoblasts/stromal cells stimulate osteoclast activation through expression of osteoclast differentiation factor/RANKL but not macrophage colony-stimulating factor: receptor activator of NF- κ B ligand*. Bone, 1999. **25**(5): p. 517-23.
159. Kong, Y.-Y., et al., *Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand*. Nature, 1999. **402**: p. 43-47.
160. Xiong, J. and C.A. O'Brien, *Osteocyte RANKL: new insights into the control of bone remodeling*. Journal of Bone and Mineral Research, 2012. **27**(3): p. 499-505.
161. Teitelbaum, S.L., *Bone resorption by osteoclasts*. Science, 2000. **289**(5484): p. 1504-1508.
162. Lee, S.-H., et al., *v-ATPase V0 subunit d2-deficient mice exhibit impaired osteoclast fusion and increased bone formation*. Nature medicine, 2006. **12**(12): p. 1403-1409.
163. Yagi, M., et al., *DC-STAMP is essential for cell-cell fusion in osteoclasts and foreign body giant cells*. The Journal of experimental medicine, 2005. **202**(3): p. 345-351.
164. Kim, K., et al., *NFATc1 induces osteoclast fusion via up-regulation of Atp6v0d2 and the dendritic cell-specific transmembrane protein (DC-STAMP)*. Molecular endocrinology, 2008. **22**(1): p. 176-185.
165. Teitelbaum, S.L., *The osteoclast and its unique cytoskeleton*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2011. **1240**(1): p. 14-17.
166. McHugh, K.P., et al., *Mice lacking β 3 integrins are osteosclerotic because of dysfunctional osteoclasts*. Journal of Clinical Investigation, 2000. **105**(4): p. 433.
167. Destaing, O., et al., *Podosomes display actin turnover and dynamic self-organization in osteoclasts expressing actin-green fluorescent protein*. Molecular biology of the cell, 2003. **14**(2): p. 407-416.
168. Väänänen, H.K. and M. Horton, *The osteoclast clear zone is a specialized cell-extracellular matrix adhesion structure*. Journal of cell science, 1995. **108**(8): p. 2729-2732.
169. Blair, H.C., et al., *Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump*. Science, 1989. **245**(4920): p. 855-857.
170. Väänänen, H., et al., *Evidence for the presence of a proton pump of the vacuolar H (+)-ATPase type in the ruffled borders of osteoclasts*. The Journal of cell biology, 1990. **111**(3): p. 1305-1311.
171. Schlesinger, P.H., et al., *Characterization of the osteoclast ruffled border chloride channel and its role in bone resorption*. Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(30): p. 18636-18643.
172. Vaananen, H., et al., *The cell biology of osteoclast function*. Journal of cell science, 2000. **113**(3): p. 377-381.
173. Drake, F.H., et al., *Cathepsin K, but not cathepsins B, L, or S, is abundantly expressed in human osteoclasts*. Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(21): p. 12511-12516.
174. Saftig, P., et al., *Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998. **95**(23): p. 13453-13458.
175. Minkin, C., *Bone acid phosphatase: tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function*. Calcified tissue international, 1982. **34**(1): p. 285-290.

176. Halleen, J.M., et al., *Intracellular fragmentation of bone resorption products by reactive oxygen species generated by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(33): p. 22907-22910.
177. Rivollier, A., et al., *Immature dendritic cell transdifferentiation into osteoclasts: a novel pathway sustained by the rheumatoid arthritis microenvironment*. Blood, 2004. **104**(13): p. 4029-4037.
178. Speziani, C., et al., *Murine dendritic cell transdifferentiation into osteoclasts is differentially regulated by innate and adaptive cytokines*. European journal of immunology, 2007. **37**(3): p. 747-757.
179. Kubatzky, K.F., B. Kloos, and D. Hildebrand, *Signaling cascades of Pasteurella multocida toxin in immune evasion*. Toxins, 2013. **5**(9): p. 1664-1681.
180. Bruzzaniti, A., et al., *Dynamin forms a Src kinase-sensitive complex with Cbl and regulates podosomes and osteoclast activity*. Molecular biology of the cell, 2005. **16**(7): p. 3301-3313.
181. Wong, B.R., et al., *The TRAF family of signal transducers mediates NF- κ B activation by the TRANCE receptor*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(43): p. 28355-28359.
182. Lomaga, M.A., et al., *TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling*. Genes & development, 1999. **13**(8): p. 1015-1024.
183. Wong, B.R., et al., *TRANCE, a TNF family member, activates Akt/PKB through a signaling complex involving TRAF6 and c-Src*. Molecular cell, 1999. **4**(6): p. 1041-1049.
184. Sugatani, T. and K.A. Hruska, *Akt1/Akt2 and mammalian target of rapamycin/Bim play critical roles in osteoclast differentiation and survival, respectively, whereas Akt is dispensable for cell survival in isolated osteoclast precursors*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(5): p. 3583-3589.
185. Nakamura, I., et al., *Phosphatidylinositol-3 kinase is involved in ruffled border formation in osteoclasts*. Journal of cellular physiology, 1997. **172**(2): p. 230-239.
186. Mizukami, J., et al., *Receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) activates TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase through a signaling complex containing RANK, TAB2, and TRAF6*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(4): p. 992-1000.
187. Matsumoto, K., *The kinase TAK1 can activate the NIK-I κ B as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway*. Nature, 1999. **398**(6724): p. 252256.
188. Feng, X., *RANKing intracellular signaling in osteoclasts*. IUBMB life, 2005. **57**(6): p. 389-395.
189. Asagiri, M. and H. Takayanagi, *The molecular understanding of osteoclast differentiation*. Bone, 2007. **40**(2): p. 251-264.
190. Iotsova, V., et al., *Osteopetrosis in mice lacking NF- κ B1 and NF- κ B2*. Nature medicine, 1997. **3**(11): p. 1285-1289.
191. David, J.-P., et al., *JNK1 modulates osteoclastogenesis through both c-Jun phosphorylation-dependent and-independent mechanisms*. Journal of cell science, 2002. **115**(22): p. 4317-4325.
192. Lee, S., et al., *The phosphatidylinositol 3-kinase, p38, and extracellular signal-regulated kinase pathways are involved in osteoclast differentiation*. Bone, 2002. **30**(1): p. 71-77.
193. Lee, S.W., et al., *TAK1-dependent activation of AP-1 and c-Jun N-terminal kinase by receptor activator of NF- κ B*. Journal of biochemistry and molecular biology, 2002. **35**(4): p. 371-376.
194. Ge, B., et al., *MAPKK-independent activation of p38 α mediated by TAB1-dependent autophosphorylation of p38 α* . Science, 2002. **295**(5558): p. 1291-1294.
195. Takayanagi, H., et al., *Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts*. Developmental cell, 2002. **3**(6): p. 889-901.
196. Ivashkiv, L.B., *Cross-regulation of signaling by ITAM-associated receptors*. Nature immunology, 2009. **10**(4): p. 340-347.
197. Asagiri, M., et al., *Autoamplification of NFATc1 expression determines its essential role in bone homeostasis*. The Journal of experimental medicine, 2005. **202**(9): p. 1261-1269.

198. Teitelbaum, S.L., *RANKing c-Jun in osteoclast development*. Journal of Clinical Investigation, 2004. **114**(4): p. 463.
199. Miyachi, Y., et al., *The Blimp1-Bcl6 axis is critical to regulate osteoclast differentiation and bone homeostasis*. The Journal of experimental medicine, 2010. **207**(4): p. 751-762.
200. Kondo, M., et al., *Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application*. Annual review of immunology, 2003. **21**(1): p. 759-806.
201. Uchida, N., et al., *High doses of purified stem cells cause early hematopoietic recovery in syngeneic and allogeneic hosts*. Journal of Clinical Investigation, 1998. **101**(5): p. 961.
202. Morrison, S.J., et al., *Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors*. Development, 1997. **124**(10): p. 1929-1939.
203. Kondo, M., I.L. Weissman, and K. Akashi, *Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow*. Cell, 1997. **91**(5): p. 661-672.
204. Akashi, K., et al., *A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages*. Nature, 2000. **404**(6774): p. 193-197.
205. Orkin, S.H., *Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages*. Nature Reviews Genetics, 2000. **1**(1): p. 57-64.
206. Shizuru, J.A., R.S. Negrin, and I.L. Weissman, *Hematopoietic stem and progenitor cells: clinical and preclinical regeneration of the hematology system*. Annu. Rev. Med., 2005. **56**: p. 509-538.
207. Wagers, A.J. and I.L. Weissman, *Plasticity of adult stem cells*. Cell, 2004. **116**(5): p. 639-648.
208. Heyworth, C., et al., *Transcription factor-mediated lineage switching reveals plasticity in primary committed progenitor cells*. The EMBO journal, 2002. **21**(14): p. 3770-3781.
209. Graf, T., *Differentiation plasticity of hematopoietic cells*. Blood, 2002. **99**(9): p. 3089-3101.
210. Wang, J.-H., et al., *Selective defects in the development of the fetal and adult lymphoid system in mice with an Ikaros null mutation*. Immunity, 1996. **5**(6): p. 537-549.
211. O'Riordan, M. and R. Grosschedl, *Coordinate regulation of B cell differentiation by the transcription factors EBF and E2A*. Immunity, 1999. **11**(1): p. 21-31.
212. Urbánek, P., et al., *Complete block of early B cell differentiation and altered patterning of the posterior mid-brain in mice lacking Pax5/BSAP*. Cell, 1994. **79**(5): p. 901-912.
213. Cobaleda, C., et al., *Pax5: the guardian of B cell identity and function*. Nature immunology, 2007. **8**(5): p. 463-470.
214. Nutt, S.L., et al., *Essential functions of Pax5 (BSAP) in pro-B cell development: difference between fetal and adult B lymphopoiesis and reduced V-to-DJ recombination at the IgH locus*. Genes & Development, 1997. **11**(4): p. 476-491.
215. Delogu, A., et al., *Gene repression by Pax5 in B cells is essential for blood cell homeostasis and is reversed in plasma cells*. Immunity, 2006. **24**(3): p. 269-281.
216. Nutt, S.L., et al., *Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5*. Nature, 1999. **401**(6753): p. 556-562.
217. Nutt, S.L., et al., *Identification of BSAP (Pax-5) target genes in early B-cell development by loss-and gain-of-function experiments*. The EMBO Journal, 1998. **17**(8): p. 2319-2333.
218. Adams, B., et al., *Pax-5 encodes the transcription factor BSAP and is expressed in B lymphocytes, the developing CNS, and adult testis*. Genes & Development, 1992. **6**(9): p. 1589-1607.
219. Li, Y.-S., et al., *Identification of the earliest B lineage stage in mouse bone marrow*. Immunity, 1996. **5**(6): p. 527-535.
220. Fuxa, M. and M. Busslinger, *Reporter gene insertions reveal a strictly B lymphoid-specific expression pattern of Pax5 in support of its B cell identity function*. The Journal of Immunology, 2007. **178**(5): p. 3031-3037.

221. Barberis, A., et al., *A novel B-cell lineage-specific transcription factor present at early but not late stages of differentiation*. Genes & development, 1990. **4**(5): p. 849-859.
222. Schaniel, C., et al., *Multiple hematopoietic cell lineages develop in vivo from transplanted Pax5-deficient pre-B I-cell clones*. Blood, 2002. **99**(2): p. 472-478.
223. Manabe, N., et al., *Connection between B lymphocyte and osteoclast differentiation pathways*. The Journal of Immunology, 2001. **167**(5): p. 2625-2631.
224. Blin-Wakkach, C., et al., *Characterization of a novel bipotent hematopoietic progenitor population in normal and osteopetrotic mice*. Journal of Bone and Mineral Research, 2004. **19**(7): p. 1137-1143.
225. Katavic, V., et al., *The surface antigen CD45R identifies a population of estrogen-regulated murine marrow cells that contain osteoclast precursors*. Bone, 2003. **32**(6): p. 581-590.
226. Sato, T., et al., *Generation of Bone-Resorbing Osteoclasts from B220⁺ Cells: Its Role in Accelerated Osteoclastogenesis due to Estrogen Deficiency**. Journal of Bone and Mineral Research, 2001. **16**(12): p. 2215-2221.
227. Andersen, T.L., et al., *Osteoclast nuclei of myeloma patients show chromosome translocations specific for the myeloma cell clone: a new type of cancer-host partnership?* The Journal of pathology, 2007. **211**(1): p. 10-17.
228. Jacquin, C., et al., *Identification of multiple osteoclast precursor populations in murine bone marrow*. Journal of Bone and Mineral Research, 2006. **21**(1): p. 67-77.
229. Hsu, H., et al., *Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(7): p. 3540-5.
230. Moon, J.B., et al., *Akt induces osteoclast differentiation through regulating the GSK3 β /NFATc1 signaling cascade*. J Immunol, 2012. **188**(1): p. 163-9.
231. Takami, M., et al., *Stimulation by Toll-Like Receptors Inhibits Osteoclast Differentiation*. The Journal of Immunology, 2002. **169**(3): p. 1516-1523.
232. Boltz-Nitulescu, G., et al., *Differentiation of rat bone marrow cells into macrophages under the influence of mouse L929 cell supernatant*. J Leukoc Biol, 1987. **41**(1): p. 83-91.
233. Stanley, E.R. and P.M. Heard, *Factors regulating macrophage production and growth. Purification and some properties of the colony stimulating factor from medium conditioned by mouse L cells*. J Biol Chem, 1977. **252**(12): p. 4305-12.
234. Raschke, W.C., et al., *Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus*. Cell, 1978. **15**(1): p. 261-7.
235. Filgueira, L., *Fluorescence-based staining for tartrate-resistant acidic phosphatase (TRAP) in osteoclasts combined with other fluorescent dyes and protocols*. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 2004. **52**(3): p. 411-414.
236. Hildebrand, D., et al., *Granzyme A produces bioactive IL-1 β through a nonapoptotic inflammasome-independent pathway*. Cell Rep, 2014. **9**(3): p. 910-7.
237. Elling, F. and K.B. Pedersen, *The pathogenesis of persistent turbinate atrophy induced by toxigenic Pasteurella multocida in pigs*. Vet Pathol, 1985. **22**(5): p. 469-74.
238. Martineau-Doizé, B., J.C. Frantz, and G.P. Martineau, *Effects of purified Pasteurella multocida dermonecrotin on cartilage and bone of the nasal ventral conchae of the piglet*. The Anatomical Record, 1990. **228**(3): p. 237-246.
239. Chambers, T., *Phagocytosis and trypsin-resistant glass adhesion by osteoclasts in culture*. The Journal of pathology, 1979. **127**(2): p. 55-60.
240. Qin, A., et al., *V-ATPases in osteoclasts: structure, function and potential inhibitors of bone resorption*. Int J Biochem Cell Biol, 2012. **44**(9): p. 1422-35.
241. Teitelbaum, S.L. and W. Zou, *The osteoclast cytoskeleton: How does it work?* IBMS BoneKEy, 2011. **8**(2): p. 74-83.

242. Wilson, S.R., et al., *Cathepsin K activity-dependent regulation of osteoclast actin ring formation and bone resorption*. Journal of Biological Chemistry, 2009. **284**(4): p. 2584-2592.
243. Chellaiah, M.A., et al., *Rho-A is critical for osteoclast podosome organization, motility, and bone resorption*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(16): p. 11993-12002.
244. Saltel, F., et al., *Apatite-mediated actin dynamics in resorbing osteoclasts*. Molecular biology of the cell, 2004. **15**(12): p. 5231-5241.
245. Yokota, K., et al., *Combination of Tumor Necrosis Factor α and Interleukin-6 Induces Mouse Osteoclast-like Cells With Bone Resorption Activity Both In Vitro and In Vivo*. Arthritis & Rheumatology, 2014. **66**(1): p. 121-129.
246. Nakamura, I. and E. Jimi, *Regulation of Osteoclast Differentiation and Function by Interleukin-1*. Vitamins & Hormones, 2006. **74**: p. 357-370.
247. Lorenzo, J., M. Horowitz, and Y. Choi, *Osteoimmunology: interactions of the bone and immune system*. Endocrine reviews, 2008. **29**(4): p. 403-440.
248. Yeo, L., et al., *Cytokine mRNA profiling identifies B cells as a major source of RANKL in rheumatoid arthritis*. Annals of the rheumatic diseases, 2011. **70**(11): p. 2022-2028.
249. Bhardwaj, A., et al., *Abstract A115: Annexin A1: A novel gene target of miRNA-21*. Molecular Cancer Research, 2013. **11**(10 Supplement): p. A115-A115.
250. Bhardwaj, A., et al., *Annexin A1 Preferentially Predicts Poor Prognosis of Basal-Like Breast Cancer Patients by Activating mTOR-S6 Signaling*. 2015.
251. Zhi, J., et al., *Differential expression of neuroleukin in osseous tissues and its involvement in mineralization during osteoblast differentiation*. Journal of Bone and Mineral Research, 2001. **16**(11): p. 1994-2004.
252. Yoon, J.H., et al., *Proteomic Analysis of the Palmitate-induced Myotube Secretome Reveals Involvement of the Annexin A1-Formyl Peptide Receptor 2 (FPR2) Pathway in Insulin Resistance*. Molecular & Cellular Proteomics, 2015. **14**(4): p. 882-892.
253. Geary, L.A., et al., *CAF-Secreted Annexin A1 Induces Prostate Cancer Cells to Gain Stem Cell-like Features*. Molecular Cancer Research, 2014. **12**(4): p. 607-621.
254. Gurney, M.E., et al., *Neuroleukin: a lymphokine product of lectin-stimulated T cells*. Science, 1986. **234**(4776): p. 574-581.
255. Chakraborty, S., et al., *The multifaceted roles of neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) in inflammation and cancer*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer, 2012. **1826**(1): p. 129-169.
256. Salama, I., et al., *A review of the S100 proteins in cancer*. Eur J Surg Oncol, 2008. **34**(4): p. 357-64.
257. Suda, T., et al., *Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families*. Endocrine reviews, 1999. **20**(3): p. 345-357.
258. Horowitz, M.C., et al., *Pax5-deficient mice exhibit early onset osteopenia with increased osteoclast progenitors*. The Journal of Immunology, 2004. **173**(11): p. 6583-6591.
259. Seidel, C., et al., *Serum syndecan-1: a new independent prognostic marker in multiple myeloma*. Blood, 2000. **95**(2): p. 388-392.
260. O'Connell, F.P., J.L. Pinkus, and G.S. Pinkus, *CD138 (syndecan-1), a plasma cell marker immunohistochemical profile in hematopoietic and nonhematopoietic neoplasms*. Am J Clin Pathol, 2004. **121**(2): p. 254-63.
261. Calame, K.L., K.I. Lin, and C. Tunyaplin, *Regulatory mechanisms that determine the development and function of plasma cells*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 205-30.
262. Racine, R., et al., *IgM production by bone marrow plasmablasts contributes to long-term protection against intracellular bacterial infection*. The journal of immunology, 2011. **186**(2): p. 1011-1021.
263. Nakano, H., M. Yanagita, and M.D. Gunn, *CD11c⁺ B220⁺ Gr-1⁺ cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells*. The Journal of experimental medicine, 2001. **194**(8): p. 1171-1178.

264. Gilliet, M., et al., *The development of murine plasmacytoid dendritic cell precursors is differentially regulated by FLT3-ligand and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor*. The Journal of experimental medicine, 2002. **195**(7): p. 953-958.
265. Chang, D.H., C. Angelin-Duclos, and K. Calame, *BLIMP-1: trigger for differentiation of myeloid lineage*. Nature immunology, 2000. **1**(2): p. 169-176.
266. Tagoh, H., et al., *The mechanism of repression of the myeloid-specific c-fms gene by Pax5 during B lineage restriction*. The EMBO journal, 2006. **25**(5): p. 1070-1080.
267. Borzillo, G.V., R.A. Ashmun, and C. Sherr, *Macrophage lineage switching of murine early pre-B lymphoid cells expressing transduced fms genes*. Molecular and cellular biology, 1990. **10**(6): p. 2703-2714.
268. Xie, H., et al., *Stepwise reprogramming of B cells into macrophages*. Cell, 2004. **117**(5): p. 663-676.
269. Lin, K.-I., et al., *Blimp-1-dependent repression of Pax-5 is required for differentiation of B cells to immunoglobulin M-secreting plasma cells*. Molecular and cellular biology, 2002. **22**(13): p. 4771-4780.
270. Shaffer, A., A. Rosenwald, and L.M. Staudt, *Lymphoid malignancies: the dark side of B-cell differentiation*. Nature Reviews Immunology, 2002. **2**(12): p. 920-933.
271. Shaffer, A., et al., *Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program*. Immunity, 2002. **17**(1): p. 51-62.
272. Diehl, S.A., et al., *STAT3-mediated up-regulation of BLIMP1 Is coordinated with BCL6 down-regulation to control human plasma cell differentiation*. The Journal of Immunology, 2008. **180**(7): p. 4805-4815.
273. Brodskyn, C., et al., *Glycoinositolphospholipids from Trypanosoma cruzi interfere with macrophages and dendritic cell responses*. Infect Immun, 2002. **70**(7): p. 3736-43.
274. Qin, H., et al., *LPS induces CD40 gene expression through the activation of NF- κ B and STAT-1 α in macrophages and microglia*. Blood, 2005. **106**(9): p. 3114-3122.
275. Drozina, G., et al., *Sequential modifications in class II transactivator isoform 1 induced by lipopolysaccharide stimulate major histocompatibility complex class II transcription in macrophages*. Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(52): p. 39963-39970.
276. Lim, W., et al., *Regulation of B7. 1 costimulatory molecule is mediated by the IFN regulatory factor-7 through the activation of JNK in lipopolysaccharide-stimulated human monocytic cells*. The Journal of Immunology, 2005. **175**(9): p. 5690-5700.
277. Martins, G.A., et al., *Blimp-1 directly represses Il2 and the Il2 activator Fos, attenuating T cell proliferation and survival*. The Journal of experimental medicine, 2008. **205**(9): p. 1959-1965.
278. Zhou, G. and S.J. Ono, *Induction of BCL-6 gene expression by interferon- γ and identification of an IRE in exon I*. Experimental and molecular pathology, 2005. **78**(1): p. 25-35.
279. Iliopoulos, D., et al., *STAT3 activation of miR-21 and miR-181b-1 via PTEN and CYLD are part of the epigenetic switch linking inflammation to cancer*. Molecular cell, 2010. **39**(4): p. 493-506.
280. Barnes, N.A., et al., *BLIMP-1 and STAT3 counterregulate microRNA-21 during plasma cell differentiation*. The Journal of Immunology, 2012. **189**(1): p. 253-260.
281. Selcuklu, S.D., M.A. Donoghue, and C. Spillane, *miR-21 as a key regulator of oncogenic processes*. Biochemical Society Transactions, 2009. **37**(4): p. 918.
282. Corthals, S., et al., *MicroRNA signatures characterize multiple myeloma patients*. Leukemia, 2011. **25**(11): p. 1784.
283. Leone, E., et al., *Targeting miR-21 inhibits in vitro and in vivo multiple myeloma cell growth*. Clinical Cancer Research, 2013. **19**(8): p. 2096-2106.
284. Catlett-Falcone, R., et al., *Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells*. Immunity, 1999. **10**(1): p. 105-115.
285. Löffler, D., et al., *Interleukin-6-dependent survival of multiple myeloma cells involves the Stat3-mediated induction of microRNA-21 through a highly conserved enhancer*. Blood, 2007. **110**(4): p. 1330-1333.

286. Sugatani, T., J. Vacher, and K.A. Hruska, *A microRNA expression signature of osteoclastogenesis*. *Blood*, 2011. **117**(13): p. 3648-3657.
287. Lu, T.X., A. Munitz, and M.E. Rothenberg, *MicroRNA-21 is up-regulated in allergic airway inflammation and regulates IL-12p35 expression*. *J Immunol*, 2009. **182**(8): p. 4994-5002.
288. Fuller, K., et al., *Macrophage colony-stimulating factor stimulates survival and chemotactic behavior in isolated osteoclasts*. *The Journal of experimental medicine*, 1993. **178**(5): p. 1733-1744.
289. Boyle, W.J., W.S. Simonet, and D.L. Lacey, *Osteoclast differentiation and activation*. *Nature*, 2003. **423**(6937): p. 337-42.
290. Negishi-Koga, T. and H. Takayanagi, *Ca²⁺-NFATc1 signaling is an essential axis of osteoclast differentiation*. *Immunol Rev*, 2009. **231**(1): p. 241-56.
291. Moon, J.B., et al., *Akt induces osteoclast differentiation through regulating the GSK3 β /NFATc1 signaling cascade*. *The Journal of Immunology*, 2012. **188**(1): p. 163-169.
292. Huang, H., et al., *Induction of c-Fos and NFATc1 during RANKL-stimulated osteoclast differentiation is mediated by the p38 signaling pathway*. *Biochemical and biophysical research communications*, 2006. **351**(1): p. 99-105.
293. Soysa, N. and N. Alles, *NF- κ B functions in osteoclasts*. *Biochemical and biophysical research communications*, 2009. **378**(1): p. 1-5.
294. Franzoso, G., et al., *Requirement for NF- κ B in osteoclast and B-cell development*. *Genes Dev*, 1997. **11**(24): p. 3482-96.
295. Vaira, S., et al., *RelA/p65 promotes osteoclast differentiation by blocking a RANKL-induced apoptotic JNK pathway in mice*. *The Journal of clinical investigation*, 2008. **118**(6): p. 2088.
296. Sakurai, H., et al., *I κ B kinases phosphorylate NF- κ B p65 subunit on serine 536 in the transactivation domain*. *Journal of Biological Chemistry*, 1999. **274**(43): p. 30353-30356.
297. Ciechanover, A., et al., *Mechanisms of ubiquitin-mediated, limited processing of the NF- κ B1 precursor protein p105*. *Biochimie*, 2001. **83**(3): p. 341-349.
298. Timms, J.F. and R. Cramer, *Difference gel electrophoresis*. *Proteomics*, 2008. **8**(23-24): p. 4886-4897.
299. Marouga, R., S. David, and E. Hawkins, *The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology*. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2005. **382**(3): p. 669-678.
300. El Kasmi, K.C., et al., *Toll-like receptor-induced arginase 1 in macrophages thwarts effective immunity against intracellular pathogens*. *Nature immunology*, 2008. **9**(12): p. 1399-1406.
301. MacIntyre, I., et al., *Osteoclastic inhibition: an action of nitric oxide not mediated by cyclic GMP*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1991. **88**(7): p. 2936-2940.
302. Menaa, C., et al., *Annexin II increases osteoclast formation by stimulating the proliferation of osteoclast precursors in human marrow cultures*. *Journal of Clinical Investigation*, 1999. **103**(11): p. 1605.
303. Takahashi, S., et al., *Cloning and identification of annexin II as an autocrine/paracrine factor that increases osteoclast formation and bone resorption*. *Journal of Biological Chemistry*, 1994. **269**(46): p. 28696-28701.
304. Ippagunta, S.K., et al., *Inflammasome-independent role of apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC) in T cell priming is critical for collagen-induced arthritis*. *Journal of Biological Chemistry*, 2010. **285**(16): p. 12454-12462.
305. Rauner, M., et al., *Inhibition of lamin A/C attenuates osteoblast differentiation and enhances RANKL-dependent osteoclastogenesis*. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2009. **24**(1): p. 78-86.
306. Li, X., et al., *p38 MAPK-mediated signals are required for inducing osteoclast differentiation but not for osteoclast function*. *Endocrinology*, 2002. **143**(8): p. 3105-3113.
307. Matsumoto, M., et al., *Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway in osteoclastogenesis mediated by receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL)*. *Journal of Biological Chemistry*, 2000. **275**(40): p. 31155-31161.

308. Mostowy, S. and P. Cossart, *Septins: the fourth component of the cytoskeleton*. Nature reviews Molecular cell biology, 2012. **13**(3): p. 183-194.
309. Dudet, L.I., et al., *Pasteurella multocida toxin stimulates mitogenesis and cytoskeleton reorganization in Swiss 3T3 fibroblasts*. Journal of cellular physiology, 1996. **168**(1): p. 173-182.
310. Miyazaki, T., et al., *Reciprocal role of ERK and NF- κ B pathways in survival and activation of osteoclasts*. The Journal of cell biology, 2000. **148**(2): p. 333-342.
311. Yecies, J.L. and B.D. Manning, *Transcriptional control of cellular metabolism by mTOR signaling*. Cancer research, 2011. **71**(8): p. 2815-2820.
312. Fong, J.E., et al., *Moderate excess of pyruvate augments osteoclastogenesis*. Biology open, 2013: p. BIO20133269.
313. Glantschnig, H., et al., *M-CSF, TNF α and RANK ligand promote osteoclast survival by signaling through mTOR/S6 kinase*. Cell Death & Differentiation, 2003. **10**(10): p. 1165-1177.
314. Collin-Osdoby, P., et al., *RANKL-mediated osteoclast formation from murine RAW 264.7 cells, in Bone Research Protocols*. 2003, Springer. p. 153-166.
315. Yang, H., et al., *mTOR kinase structure, mechanism and regulation*. Nature, 2013. **497**(7448): p. 217-223.
316. Holz, M.K. and J. Blenis, *Identification of S6 kinase 1 as a novel mammalian target of rapamycin (mTOR)-phosphorylating kinase*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(28): p. 26089-26093.
317. James, M.J. and J.C. Zomerdijk, *Phosphatidylinositol 3-kinase and mTOR signaling pathways regulate RNA polymerase I transcription in response to IGF-1 and nutrients*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(10): p. 8911-8918.
318. Chiang, G.G. and R.T. Abraham, *Phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR) at Ser-2448 is mediated by p70S6 kinase*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(27): p. 25485-25490.
319. Um, S.H., D. D'Alessio, and G. Thomas, *Nutrient overload, insulin resistance, and ribosomal protein S6 kinase 1, S6K1*. Cell metabolism, 2006. **3**(6): p. 393-402.
320. Weichhart, T., et al., *The TSC-mTOR signaling pathway regulates the innate inflammatory response*. Immunity, 2008. **29**(4): p. 565-577.
321. Zou, W., et al., *Tumor necrosis factor- α mediates RANK ligand stimulation of osteoclast differentiation by an autocrine mechanism \ddagger* . Journal of cellular biochemistry, 2001. **83**(1): p. 70-83.
322. Horwood, N.J., et al., *IL-12 alone and in synergy with IL-18 inhibits osteoclast formation in vitro*. The Journal of Immunology, 2001. **166**(8): p. 4915-4921.
323. Kurihara, N., et al., *IL-6 stimulates osteoclast-like multinucleated cell formation in long term human marrow cultures by inducing IL-1 release*. The Journal of Immunology, 1990. **144**(11): p. 4226-4230.
324. Owens, J.M., A.C. Gallagher, and T.J. Chambers, *IL-10 modulates formation of osteoclasts in murine hemopoietic cultures*. The Journal of Immunology, 1996. **157**(2): p. 936-940.
325. Hildebrand, D., et al., *Regulation of Toll-like receptor 4-mediated immune responses through Pasteurella multocida toxin-induced G protein signalling*. Cell. Commun. Signal, 2012. **10**: p. 22.
326. Gerriets, V.A. and J.C. Rathmell, *Metabolic pathways in T cell fate and function*. Trends in immunology, 2012. **33**(4): p. 168-173.
327. Cunningham, J.T., et al., *mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1 α transcriptional complex*. nature, 2007. **450**(7170): p. 736-740.
328. Miyazaki, T., et al., *Intracellular and extracellular ATP coordinately regulate the inverse correlation between osteoclast survival and bone resorption*. Journal of Biological Chemistry, 2012. **287**(45): p. 37808-37823.
329. Ma, L., et al., *Identification of S664 TSC2 phosphorylation as a marker for extracellular signal-regulated kinase-mediated mTOR activation in tuberous sclerosis and human cancer*. Cancer research, 2007. **67**(15): p. 7106-7112.

330. Shirogane, T., et al., *Synergistic roles for Pim-1 and c-Myc in STAT3-mediated cell cycle progression and antiapoptosis*. Immunity, 1999. **11**(6): p. 709-719.
331. Yokogami, K., et al., *Serine phosphorylation and maximal activation of STAT3 during CNTF signaling is mediated by the rapamycin target mTOR*. Current Biology, 2000. **10**(1): p. 47-50.
332. O'Rourke, L. and P.R. Shepherd, *Biphasic regulation of extracellular-signal-regulated protein kinase by leptin in macrophages: role in regulating STAT3 Ser727 phosphorylation and DNA binding*. Biochemical Journal, 2002. **364**(Pt 3): p. 875.
333. Yang, H.-S., et al., *Pdcd4 suppresses tumor phenotype in JB6 cells by inhibiting AP-1 transactivation*. Oncogene, 2003. **22**(24): p. 3712-3720.
334. Wang, Q., Z. Sun, and H. Yang, *Downregulation of tumor suppressor Pdcd4 promotes invasion and activates both β -catenin/Tcf and AP-1-dependent transcription in colon carcinoma cells*. Oncogene, 2008. **27**(11): p. 1527-1535.
335. Dorrello, N.V., et al., *S6K1-and β TRCP-mediated degradation of PDCD4 promotes protein translation and cell growth*. Science, 2006. **314**(5798): p. 467-471.
336. Jazbutyte, V. and T. Thum, *MicroRNA-21: from cancer to cardiovascular disease*. Current drug targets, 2010. **11**(8): p. 926-935.
337. Bitomsky, N., M. Böhm, and K.-H. Klempnauer, *Transformation suppressor protein Pdcd4 interferes with JNK-mediated phosphorylation of c-Jun and recruitment of the coactivator p300 by c-Jun*. Oncogene, 2004. **23**(45): p. 7484-7493.
338. Karin, M., Z.-g. Liu, and E. Zandi, *AP-1 function and regulation*. Current opinion in cell biology, 1997. **9**(2): p. 240-246.
339. Troen, B.R., *The role of cathepsin K in normal bone resorption*. Drug News Perspect, 2004. **17**(1): p. 19-28.
340. Pang, M., et al., *AP-1 stimulates the cathepsin K promoter in RAW 264.7 cells*. Gene, 2007. **403**(1): p. 151-158.
341. Costa, A.G., et al., *Cathepsin K: its skeletal actions and role as a therapeutic target in osteoporosis*. Nature Reviews Rheumatology, 2011. **7**(8): p. 447-456.
342. Graves, D., *Cytokines that promote periodontal tissue destruction*. J Periodontol, 2008. **79**(8 Suppl): p. 1585-91.
343. Lane, N.E., *Therapy insight: osteoporosis and osteonecrosis in systemic lupus erythematosus*. Nature Clinical Practice Rheumatology, 2006. **2**(10): p. 562-569.
344. Doorenspleet, M., et al., *Rheumatoid arthritis synovial tissue harbours dominant B-cell and plasma-cell clones associated with autoreactivity*. Annals of the rheumatic diseases, 2014. **73**(4): p. 756-762.
345. Santiago-Schwarz, F., et al., *Dendritic cells (DCs) in rheumatoid arthritis (RA): progenitor cells and soluble factors contained in RA synovial fluid yield a subset of myeloid DCs that preferentially activate Th1 inflammatory-type responses*. The Journal of Immunology, 2001. **167**(3): p. 1758-1768.
346. Highton, J., et al., *Cells expressing dendritic cell markers are present in the rheumatoid nodule*. The Journal of rheumatology, 2000. **27**(2): p. 339-346.
347. Thomas, R., et al., *Dendritic cells and the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. Journal of leukocyte biology, 1999. **66**(2): p. 286-292.
348. Sato, K., et al., *Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction*. J Exp Med, 2006. **203**(12): p. 2673-82.
349. Yanni, G., et al., *Synovial tissue macrophages and joint erosion in rheumatoid arthritis*. Annals of the rheumatic diseases, 1994. **53**(1): p. 39-44.
350. Takayanagi, H., *Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems*. Nature Reviews Immunology, 2007. **7**(4): p. 292-304.
351. van den Berg, W.B. and P. Miossec, *IL-17 as a future therapeutic target for rheumatoid arthritis*. Nature Reviews Rheumatology, 2009. **5**(10): p. 549-553.

352. Jovanovic, D.V., et al., *IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL- β and TNF- α , by human macrophages*. The Journal of Immunology, 1998. **160**(7): p. 3513-3521.
353. Hashizume, M., N. Hayakawa, and M. Mihara, *IL-6 trans-signalling directly induces RANKL on fibroblast-like synovial cells and is involved in RANKL induction by TNF- α and IL-17*. Rheumatology, 2008. **47**(11): p. 1635-1640.
354. Gravallese, E.M., et al., *Synovial tissue in rheumatoid arthritis is a source of osteoclast differentiation factor*. Arthritis & Rheumatism, 2000. **43**(2): p. 250.
355. Walsh, M.C., et al., *Osteoimmunology: interplay between the immune system and bone metabolism*. Annu. Rev. Immunol., 2006. **24**: p. 33-63.
356. Akagawa, K.S., et al., *Generation of CD1+ RelB+ dendritic cells and tartrate-resistant acid phosphatase-positive osteoclast-like multinucleated giant cells from human monocytes*. Blood, 1996. **88**(10): p. 4029-4039.
357. Miyamoto, T., et al., *Bifurcation of osteoclasts and dendritic cells from common progenitors*. Blood, 2001. **98**(8): p. 2544-2554.
358. Wakkach, A., et al., *Bone marrow microenvironment controls the in vivo differentiation of murine dendritic cells into osteoclasts*. Blood, 2008. **112**(13): p. 5074-5083.
359. Boyce, B.F., E.M. Schwarz, and L. Xing, *Osteoclast precursors: cytokine-stimulated immunomodulators of inflammatory bone disease*. Current opinion in rheumatology, 2006. **18**(4): p. 427-432.
360. Shinkai, Y., et al., *RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement*. Cell, 1992. **68**(5): p. 855-867.
361. Itzstein, C., F.P. Coxon, and M.J. Rogers, *The regulation of osteoclast function and bone resorption by small GTPases*. Small GTPases, 2011. **2**(3): p. 117-130.
362. Salama, I., et al., *A review of the S100 proteins in cancer*. European Journal of Surgical Oncology (EJSO), 2008. **34**(4): p. 357-364.
363. Skalnikova, H., et al., *Mapping of the secretome of primary isolates of mammalian cells, stem cells and derived cell lines*. Proteomics, 2011. **11**(4): p. 691-708.
364. Ngounou Wetie, A.G., et al., *Automated mass spectrometry-based functional assay for the routine analysis of the secretome*. J Lab Autom, 2013. **18**(1): p. 19-29.
365. Alvarez-Llamas, G., et al., *Characterization of the human visceral adipose tissue secretome*. Molecular & Cellular Proteomics, 2007. **6**(4): p. 589-600.
366. Greco, T.M., et al., *Quantitative mass spectrometry-based proteomics reveals the dynamic range of primary mouse astrocyte protein secretion*. Journal of proteome research, 2010. **9**(5): p. 2764-2774.
367. Mazzucchelli, R. and S.K. Durum, *Interleukin-7 receptor expression: intelligent design*. Nature Reviews Immunology, 2007. **7**(2): p. 144-154.
368. Schlenner, S.M., et al., *Fate mapping reveals separate origins of T cells and myeloid lineages in the thymus*. Immunity, 2010. **32**(3): p. 426-36.
369. Pelanda, R., et al., *Cre recombinase-controlled expression of the mb-1 allele*. Genesis-The Journal of Genetics and Development, 2002. **32**(2): p. 154-157.
370. Naik, S.H., L.M. Corcoran, and L. Wu, *Development of murine plasmacytoid dendritic cell subsets*. Immunology and cell biology, 2005. **83**(5): p. 563-570.
371. Pelayo, R., et al., *Derivation of 2 categories of plasmacytoid dendritic cells in murine bone marrow*. Blood, 2005. **105**(11): p. 4407-4415.
372. Rissoan, M.-C., et al., *Subtractive hybridization reveals the expression of immunoglobulinlike transcript 7, Eph-B1, granzyme B, and 3 novel transcripts in human plasmacytoid dendritic cells*. Blood, 2002. **100**(9): p. 3295-3303.
373. Shigematsu, H., et al., *Plasmacytoid dendritic cells activate lymphoid-specific genetic programs irrespective of their cellular origin*. Immunity, 2004. **21**(1): p. 43-53.

374. Parcina, M., et al., *Pathogen-triggered activation of plasmacytoid dendritic cells induces IL-10-producing B cells in response to Staphylococcus aureus*. J Immunol, 2013. **190**(4): p. 1591-602.
375. Van Diemen, P., G. de Vries Reilingh, and H. Parmentier, *Immune responses of piglets to Pasteurella multocida toxin and toxoid*. Veterinary immunology and immunopathology, 1994. **41**(3): p. 307-321.
376. Foged, N., K. Pedersen, and F. Elling, *Characterization and biological effects of the Pasteurella multocida toxin*. FEMS microbiology letters, 1987. **43**(1): p. 45-51.
377. Van Diemen, P., G. de Vries Reilingh, and H. Parmentier, *Effect of Pasteurella multocida toxin on in vivo immune responses in piglets*. Veterinary quarterly, 1996. **18**(4): p. 141-146.
378. Sun, L., et al., *Evidence that calcineurin is required for the genesis of bone-resorbing osteoclasts*. American Journal of Physiology-Renal Physiology, 2007. **292**(1): p. F285-F291.
379. Beals, C.R., et al., *Nuclear localization of NF-ATc by a calcineurin-dependent, cyclosporin-sensitive intramolecular interaction*. Genes & development, 1997. **11**(7): p. 824-834.
380. Kloos, B., et al., *Pasteurella multocida toxin-induced osteoclastogenesis requires mTOR activation*. Cell Communication and Signaling, 2015. **13**(1): p. 40.
381. Hay, N. and N. Sonenberg, *Upstream and downstream of mTOR*. Genes & development, 2004. **18**(16): p. 1926-1945.
382. Düvel, K., et al., *Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1*. Molecular cell, 2010. **39**(2): p. 171-183.
383. Hiken, J.F. and T.H. Steinberg, *ATP downregulates P2X7 and inhibits osteoclast formation in RAW cells*. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2004. **287**(2): p. C403-C412.
384. Kim, K., et al., *Pim-1 regulates RANKL-induced osteoclastogenesis via NF- κ B activation and NFATc1 induction*. The Journal of Immunology, 2010. **185**(12): p. 7460-7466.
385. Li, H., et al., *Cross talk between the bone and immune systems: osteoclasts function as antigen-presenting cells and activate CD4+ and CD8+ T cells*. Blood, 2010. **116**(2): p. 210-217.
386. Schmid, T., et al., *Translation inhibitor Pdc4 is targeted for degradation during tumor promotion*. Cancer research, 2008. **68**(5): p. 1254-1260.
387. Schmid, T., et al., *Inflammation-induced loss of Pdc4 is mediated by phosphorylation-dependent degradation*. Carcinogenesis, 2011. **32**(10): p. 1427-1433.
388. Lu, Z., et al., *MicroRNA-21 promotes cell transformation by targeting the programmed cell death 4 gene*. Oncogene, 2008. **27**(31): p. 4373-4379.
389. Talotta, F., et al., *An autoregulatory loop mediated by miR-21 and PDCD4 controls the AP-1 activity in RAS transformation*. Oncogene, 2009. **28**(1): p. 73-84.
390. Fujita, S., et al., *miR-21 Gene expression triggered by AP-1 is sustained through a double-negative feedback mechanism*. Journal of molecular biology, 2008. **378**(3): p. 492-504.
391. van der Fits, L., et al., *MicroRNA-21 expression in CD4+ T Cells is regulated by STAT3 and is pathologically involved in sézary syndrome*. Journal of Investigative Dermatology, 2011. **131**(3): p. 762-768.
392. Van Dam, H., et al., *ATF-2 is preferentially activated by stress-activated protein kinases to mediate c-jun induction in response to genotoxic agents*. The EMBO Journal, 1995. **14**(8): p. 1798.
393. Karin, M., *The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases*. Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(28): p. 16483-16486.
394. Matsuo, K. and N. Ray, *Osteoclasts, mononuclear phagocytes, and c-Fos: new insight into osteoimmunology*. The Keio journal of medicine, 2004. **53**(2): p. 78-84.
395. Ikeda, F., et al., *Critical roles of c-Jun signaling in regulation of NFAT family and RANKL-regulated osteoclast differentiation*. The Journal of clinical investigation, 2004. **114**(4): p. 475-484.
396. Sanderson, R.D., P. Lalor, and M. Bernfield, *B lymphocytes express and lose syndecan at specific stages of differentiation*. Cell regulation, 1989. **1**(1): p. 27-35.

397. Derksen, P.W., et al., *Cell surface proteoglycan syndecan-1 mediates hepatocyte growth factor binding and promotes Met signaling in multiple myeloma*. *Blood*, 2002. **99**(4): p. 1405-1410.
398. Averbek, M., et al., *Switch in syndecan-1 and syndecan-4 expression controls maturation associated dendritic cell motility*. *Experimental dermatology*, 2007. **16**(7): p. 580-589.
399. Wegrowski, Y., et al., *Cell surface proteoglycan expression during maturation of human monocytes-derived dendritic cells and macrophages*. *Clinical & Experimental Immunology*, 2006. **144**(3): p. 485-493.
400. Waldmann, I., S. Wälde, and R.H. Kehlenbach, *Nuclear import of c-Jun is mediated by multiple transport receptors*. *Journal of Biological Chemistry*, 2007. **282**(38): p. 27685-27692.

7 Kapitel 7

Abkürzungsverzeichnis

AC	adenylyl cyclase
AGC	protein kinase A, G and C
ALP	alkalische Phosphatase
A-Mul V	Abelson Leukemia Virus
AP-1	activator protein-1
ARF-6	ADP-ribosylation factor 6
ATP	adenosine triphosphate
ATP6V0D2	ATPase, H ⁺ Transporting, Lysosomal 38 kDa, V0 Subunit D2
Bcl-6	B cell lymphoma-6
Blimp-1	B-lymphocyte-induced maturation protein-1
BMM Φ	bone marrow derived macrophages
BSA	bovine serum albumin
CalcR	Calcitonin Rezeptor
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CARD	Caspase activation and recruitment domain
cDC	conventional dendritic cell
cDNA	complementary DNA
CLP	common lymphoid progenitor
CMP	common myeloid progenitor
Ct	cycle threshold
CTGF	connective tissue growth factor
DAG	diacylglycerol
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DC	dendritic cell
DC-Stamp	dendritic cell-specific transmembrane protein
DIGE	differential in gel electrophoresis
DMEM	dulbecco's modified eagle medium
DMSO	dimethylsulfoxide

7 Abkürzungsverzeichnis

DNA	deoxyribonucleic acid
EBF	early B cell factor
eIF4E	eukaryotic translation initiation factor 4E
eIF4B	eukaryotic translation initiation factor 4B
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ERK1/2	extracellular signal-regulated kinase 1/2
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCS	fetal calf serum
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
Gr-1	granulocyte receptor-1 antigen
GTP	Guanosintriphosphat
HEK Zellen	human embryonic kidney Zellen
HIV	Humane Immundefizienz-Virus
HM	hydrophobic motiv
HSC	Hematopoietic Stem Cell
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IKK	I κ B-kinase
IL	Interleukin
IP ₃	Inositoltrisphosphat
IRS-1	insulin receptor substrate 1
JAK	janus kinase
JNK	jun N-terminal kinase
KMZ	Knochenmarkzellen
LPS	lipopolysaccharide
MAPK	mitogen activated protein kinase
M-CSF	macrophage colony stimulating factor
miRNA21	micro RNA 21
mLST8	mammalian lethal with sec13 protein 8

7 Abkürzungsverzeichnis

MPP	multipotente Progenitorzellen
mRNA	messenger ribonucleic acid
mSIN1	mammalian stress-activated protein kinase-interacting protein 1
mTOR	mechanistic target of rapamycin
NFATc1	Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1
NIK	NF κ B-inducing kinase
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NO	nitric oxide
Pax-5	paired box protein
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PBS	phosphate buffered saline
PDCD4	programmed cell death 4
pDCs	plasmazytoide dendritische Zellen
PK-1	3-phosphoinositide dependent protein kinase-1
PGE2	Prostaglandin E2
PH	Parathormon
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
Pim-1	Moloney murine leukemia virus 1
PIP ₂	phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PKC	protein kinase C
PLC- β	Phospholipase C- β
PMA	phorbol-12-myristate-13-acetate
PMT	Pasteurella multocida Toxin
PRAS-40	proline-rich Akt/PKB substrate 40 kDa
PRR5	proline-rich repeat protein 5
P/S	Penicillin/Streptomycin
Pyk2	proline rich tyrosine kinase 2
P70s6K1	P70 ribosomal S6 kinase 1
qRT-PCR	quantitative real-time PCR
RANK	Receptor Activator of NF- κ B Ligand
RAPTOR	Regulatory-associated protein of mTOR
Ras	Rat sarcoma
Rheb	Ras homolog enriched in brain

7 Abkürzungsverzeichnis

Rictor	Rapamycin-insensitive companion of mammalian target of Rapamycin
RNA	ribonucleic acid
ROS	reactive oxygen-species
rpm	revolutions per minute
rpS6	ribosomale Protein S6
RT	Raumtemperatur
SCF	Stem Cell factor
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SKAR	S6K1 Aly/REF-like substrate
SOCS-1	suppressor of cytokine signaling 1
sRANKL	soluble Receptor Activator of NF- κ B Ligand
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TAK-1	Transforming growth factor beta-activated kinase 1
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
TRAF-6	TNF receptor associated factor-6
TRAP	tartrate resistant acid phosphatase
TRITC	Tetramethylrhodamine
TSC2	Tuberous Sclerosis Complex 2
UE	Untereinheit
Xbp-1	X-box binding protein 1
4E-BP-1	eukaryotic initiation factor 4E binding protein-1

8 Kapitel 8

Abbildungsverzeichnis

2.1	Schematischer Aufbau von PMT	7
2.2	Der GTPase-Zyklus	9
2.3	PMT-induzierte Signalkaskaden	11
2.4	Der mTOR-Signalweg	12
2.5	Osteolytische Veränderungen der Schnauze bei Schweinen mit atrophischer Rhinitis	16
2.6	Polarer Osteoklast mit typischer Sealing Zone und Ruffled Border	19
2.7	RANKL-stimulierte Signalkaskaden der Osteoklastogenese	21
2.8	Die Hämatopoese	22
2.9	Rolle von Pax-5 in der B-Zelllinie	24
4.1	PMT-stimulierte Knochenmarkszellen differenzieren zu Osteoklasten	59
4.2	CD45R-positive Zellfraktion differenziert mit PMT im <i>Transwell</i> -Versuch über der negativen Zellfraktion zu Osteoklasten	63
4.3	CD45R-positive Zellen differenzieren zu TRAP-positiven, multinukleären Osteoklasten mit PMT	64
4.4	PMT-stimulierte CD45R-positive Knochenmarkszellen sezernieren erhöhte Mengen an IgM Antikörpern	65
4.5	Durch Stimulation von CD45R ⁺ Zellen mit PMT entstehen bipotente Zellen mit Osteoklasten- und Plasmazell-Charakteristika	67
4.6	Kontrolle der Makrophagendifferenzierung	70
4.7	PMT-stimulierte Makrophagen differenzieren zu Osteoklasten	71
4.8	PMT aktiviert die Blimp-1-Bcl-6 Achse	72
4.9	PMT aktiviert den JAK-STAT Signalweg in Makrophagen	74
4.10	Hypothetisches Modell des molekularen Schalters	75
4.11	PMT-stimulierte CD45R-positive Zellen exprimieren die miRNA21	76
4.12	PMT aktiviert Signalkaskaden, die bedeutsam für die klassische, RANKL-vermittelte Osteoklastogenese sind	78
4.13	Exemplarisches DIGE Gel	80
4.14	Exemplarische Beispiele für signifikant regulierte Proteinspots.	81
4.15	PMT aktiviert den mTOR-Signalweg in Makrophagen	86
4.16	Die Aktivierung des mTOR-Signalweges mit PMT hat keinen Einfluss auf die Produktion von IL-6, TNF- α , IL12p40 oder IL-10.	88
4.17	Untersuchung von Viabilität und Apoptose in PMT-stimulierten Makrophagen	89
4.18	Morphologie PMT-stimulierter Makrophagen	90
4.19	PMT-stimulierte Osteoklastogenese ist mTORc1-abhängig	91
4.20	PMT stimuliert mehrere bedeutende Aktivator-Kinasen des mTOR-Signalweges	94
4.21	Dem PI3K-Akt- und dem JAK-STAT Signalweg kann eine Beteiligung an der PMT-induzierten mTORc1-Aktivierung zugesprochen werden	96
4.22	PMT aktiviert den Transkriptionsfaktor AP-1 mTOR-abhängig durch Inhibition von PDCD4	99
4.23	Signal-Modell	100
		145

9 Kapitel 9

9 Tabellenverzeichnis

4.1	Ergebnis der Sekretom-Analyse drei Tage PMT-stimulierter Knochenmarkszellen	61
4.2	Selektion einiger Ergebnisse der Massenspektrometrie	82
10.1	Proteine, die mit PMT signifikant erhöht sind im Vergleich zu M-CSF- und M-CSF/sRANKL-stimulierten KM-Makrophagen (PMT↑, M-CSF↓, M-CSF/sRANKL↓)	147
10.2	Proteine, die mit PMT und M-CSF/sRANKL signifikant erniedrigt sind im Vergleich zu M-CSF-stimulierten KM-Makrophagen (PMT↓, M-CSF/sRANKL↓, M-CSF↑)	147
10.3	Proteine, die mit PMT signifikant erniedrigt sind im Vergleich zu M-CSF- und M-CSF/sRANKL-stimulierten KM-Makrophagen: (PMT↓, M-CSF/sRANKL↑, M-CSF↑)	148
10.4	Proteine, die mit M-CSF/sRANKL signifikant erhöht sind im Vergleich zu PMT- und M-CSF/sRANKL-stimulierten KM-Makrophagen: (PMT↓, M-CSF/sRANKL↑, M-CSF↓)	148

10 Kapitel 10 Anhang

10.1 Identifizierte Proteine der DIGE-Analyse

Protein Beschreibung	Masse [Da]	Coverage [%]
Uncharacterized protein LOC433182	47453	84,8
Tetratricopeptide repeat protein 38	51018	74,4
Arginase-1	34957	77,1
Annexin A2	38937	47,5
Lipocortin I	38952	55,2
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	36072	73,3
Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	32340	66,4
Citrate lyase beta subunit	37837	44,4
Unnamed protein product (phosphoglycerate mutase 1)	28799	73,2
Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD	21502	76,2

Tabelle 10.1: Proteine, die mit PMT signifikant erhöht sind im Vergleich zu M-CSF- und M-CSF/sRANKL-stimulierten KM-Makrophagen (**PMT ↑, M-CSF↓, M-CSF/sRANKL↓**)

Protein Beschreibung	Masse [Da]	Coverage [%]
Moesin	67700	19,6
Prelamin-A/C	74200	15,5
WD repeat-containing protein 1	66400	30,0
Tyrosine-tRNA ligase, cytoplasmic	59100	20,3
Pyruvate kinase isozymes M1/M2	57800	17,3
Serine/Threonine-protein kinase 38	54100	3,7
Tryptophan-tRNA ligase, cytoplasmic	54300	39,1
Septin-11	49700	26,7

Tabelle 10.2: Proteine, die mit PMT und M-CSF/sRANKL signifikant erniedrigt sind im Vergleich zu M-CSF-stimulierten KM-Makrophagen (**PMT↓, M-CSF/sRANKL↓, M-CSF↑**)

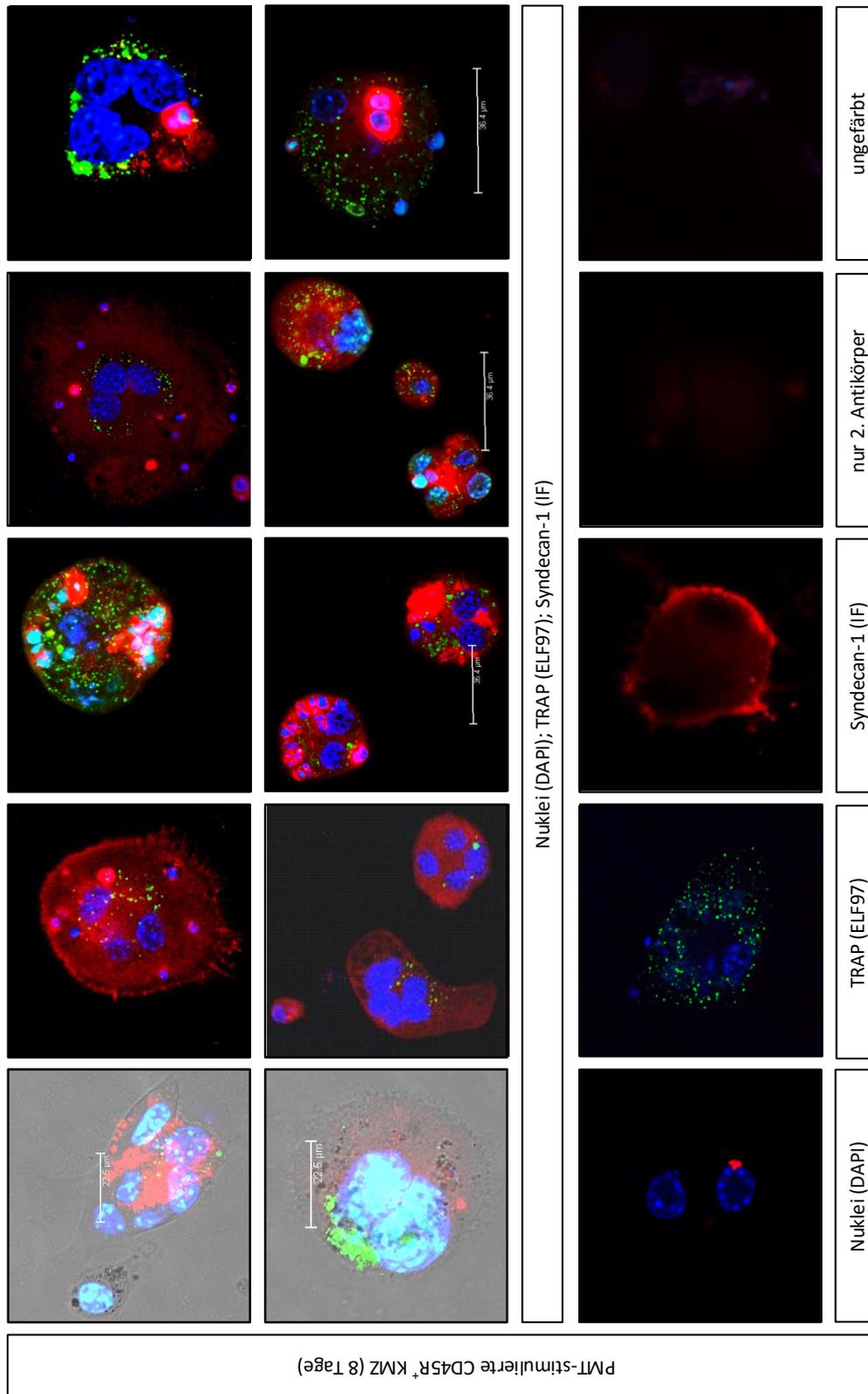
Protein Beschreibung	Masse [Da]	Coverage [%]
Far upstream element-binding protein 1	68500	30,0
Vimentin	53700	31,3
Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 1	56600	28,7
Catalase	59800	20,9
Macrophage-capping protein	39200	35,0
Mitogen-activated protein kinase 1	41200	31,0
Annexin A1	38700	29,5
Proteasome subunit beta type-8	30200	13,0

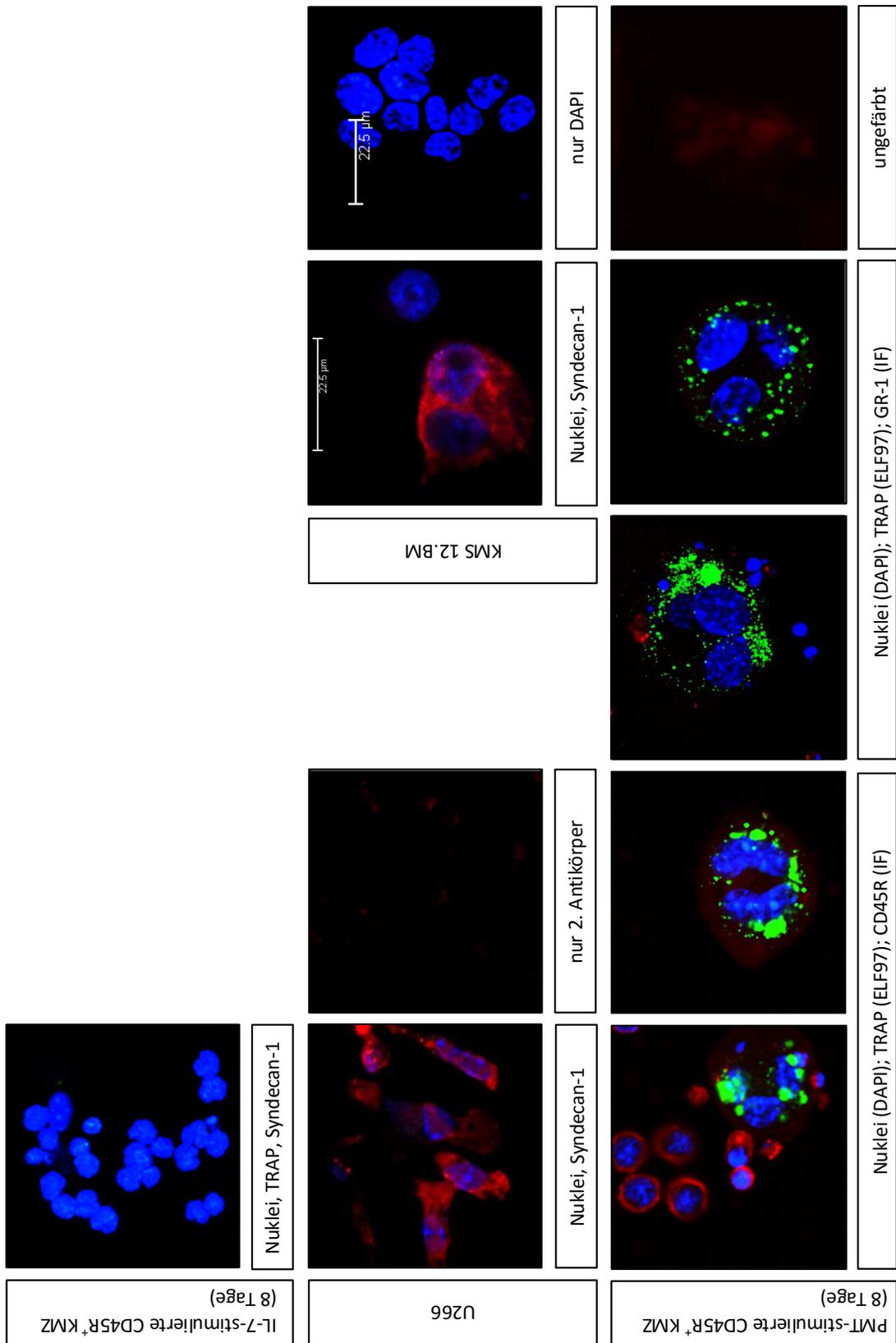
Tabelle 10.3: Proteine, die mit PMT signifikant erniedrigt sind im Vergleich zu M-CSF- und M-CSF/sRANKL-stimulierten KM-Makrophagen: (PMT↓, M-CSF/sRANKL↑, M-CSF↑)

Protein Beschreibung	Masse [Da]	Coverage [%]
Argininosuccinate synthase	46600	42,0
Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	50900	39,6
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit H	39800	13,6
Twinfilin-2	39400	17,77

Tabelle 10.4: Proteine, die mit M-CSF/sRANKL signifikant erhöht sind im Vergleich zu PMT- und M-CSF/sRANKL-stimulierten KM-Makrophagen: (PMT↓, M-CSF/sRANKL↑, M-CSF↓)

10.2 Vergrößerte Darstellung der Abbildung 4.5





10.3 Veröffentlichungen

Kloos B, Chakraborty S, Lindner SG, Noack K, Harre U, Schett G, Krämer OH, Kubatzky KF. *Pasteurella multocida* toxin- induced osteoclastogenesis requires mTOR activation. *Cell Commun Signal*. 2015 Sep 14;13(1):40. doi: 10.1186/s12964-015-0117-7.

Kubatzky KF, Kloos B, Hildebrand D. Signaling cascades of *Pasteurella multocida* toxin in immune evasion. *Toxins (Basel)*. 2013 Sep 24;5(9):1664-81. doi: 10.3390/toxins5091664. Review.

10.4 Präsentationen

10.4.1 Vorträge

Pasteurella multocida toxin as a tool to modulate bone and immune cell differentiation. IMMUNOBONE International Meeting 2013, Grandhotel Sonnenbichl, Garmisch-Partenkirchen, Deutschland, Juni 2013.

mTOR in *Pasteurella multocida* toxin -stimulated osteoclast differentiation. IMMUNOBONE Annual Meeting 2014, Stadthotel Münster, Münster, Deutschland, April 2014.

10.4.2 Posterpräsentationen

Bianca Kloos, Dagmar Hildebrand, Klaus Heeg und Katharina F. Kubatzky. The *Pasteurella multocida* toxin as a tool to modulate bone and immune cell differentiation. 15th joint Meeting - Signal Transduction; Weimar, Deutschland, November 2011.

Bianca Kloos, Dagmar Hildebrand, Klaus Heeg und Katharina F. Kubatzky. *Pasteurella multocida* toxin-induced crosstalk between B-Cells and osteoclasts. 4th International Conference on Osteoimmunology: Korfu, Griechenland, Juni 2012

Bianca Kloos, Dagmar Hildebrand, Klaus Heeg und Katharina F. Kubatzky. Signalling mechanism shared between B-cells and osteoclasts. 16th joint Meeting - Signal Transduction; Weimar, Deutschland, November 2012.

10.5 Preise

Erhalt eines Posterpreises der 4th International Conference on Osteoimmunology: „Interactions of the Immune and Skeletal Systems“ (20.06.2012, Korfu, Griechenland).

Erhalt des 3. Posterpreises der Gesellschaft für Signaltransduktion beim 16th Joint Meeting: „Receptors, Mediators and Genes“ (05.07.2012, Weimar, Deutschland).

10.6 Stipendien

Reisekostenstipendium von der Gesellschaft für Signaltransduktion für das 15th Joint Meeting: Signal Transduction; Weimar, Deutschland; November 2011.

Reisekostenstipendium von der Gesellschaft für Signaltransduktion für das 16th Joint Meeting: Signal Transduction; Weimar, Deutschland; November 2012.