

BCL3 regulates **RANKL**-induced osteoclastogenesis by interacting with **TRAF6** in bone marrow-derived macrophages

Kun Wang, Shuai Li, Yong Gao et al.(2018)

BONE REMODELING

PATHWAY NACH BINDUNG VON RANKL AN RANK

FORSCHUNGSFRAGE

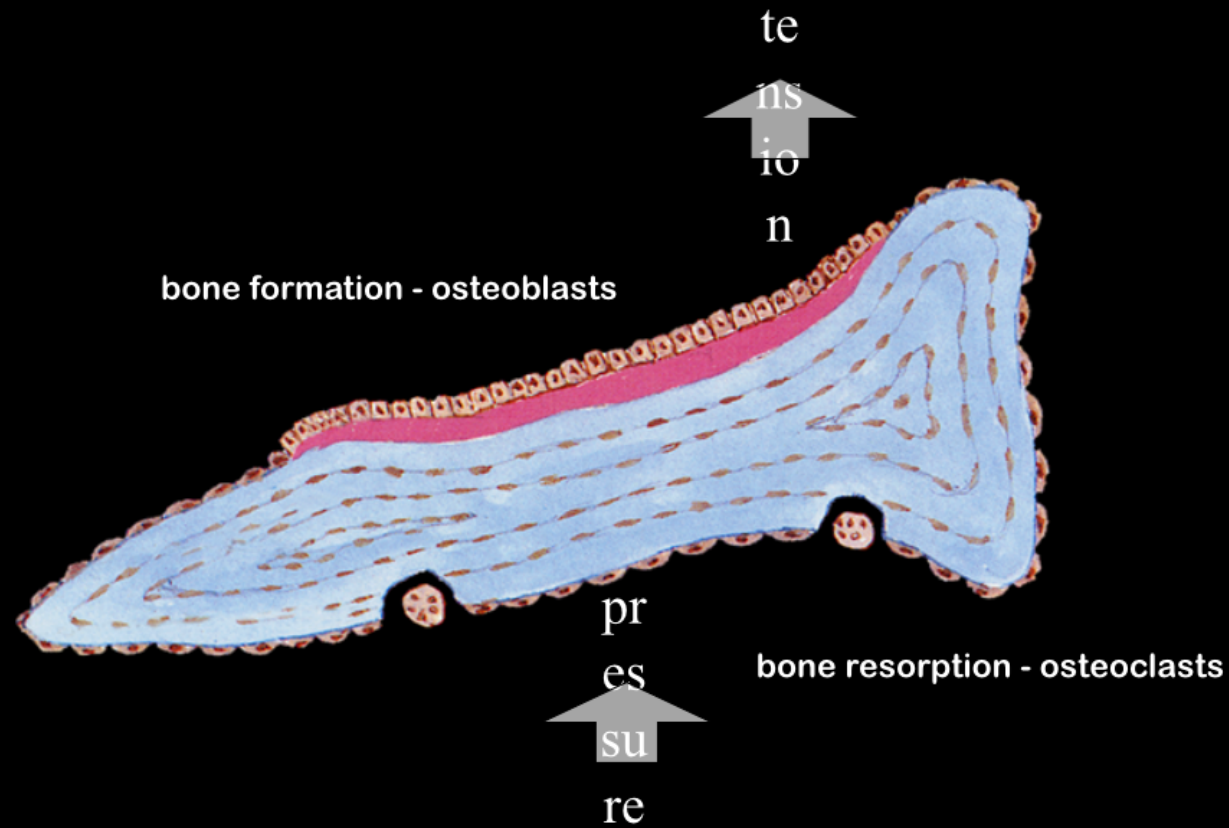
METHODS

RESULTS

CONCLUSION

lifelong physiologic turnover (formation & resorption)

HM Frost Curr Opin Orthop Rel Res 1997



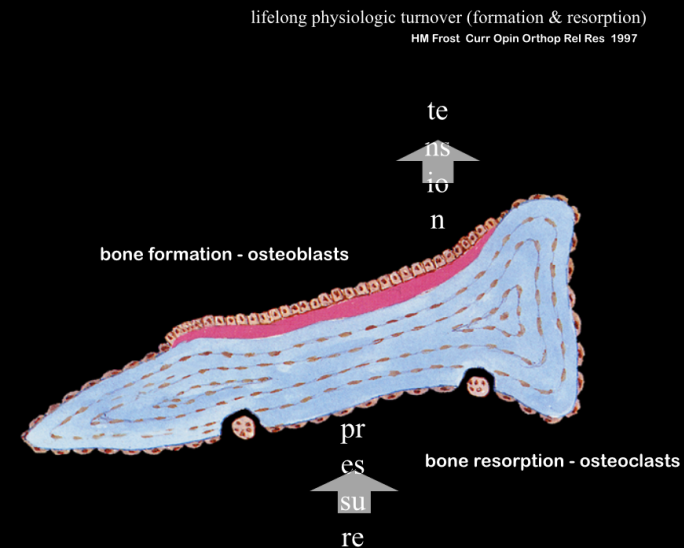
BONE REMODELING

Resorption alter Knochenmasse & **Synthese** neuer Knochenmatrix in **hoher** Frequenz

Circa **10%** der gesamten Knochenmasse/ **Jahr** durch neu synthetisierte Knochenmasse ersetzt

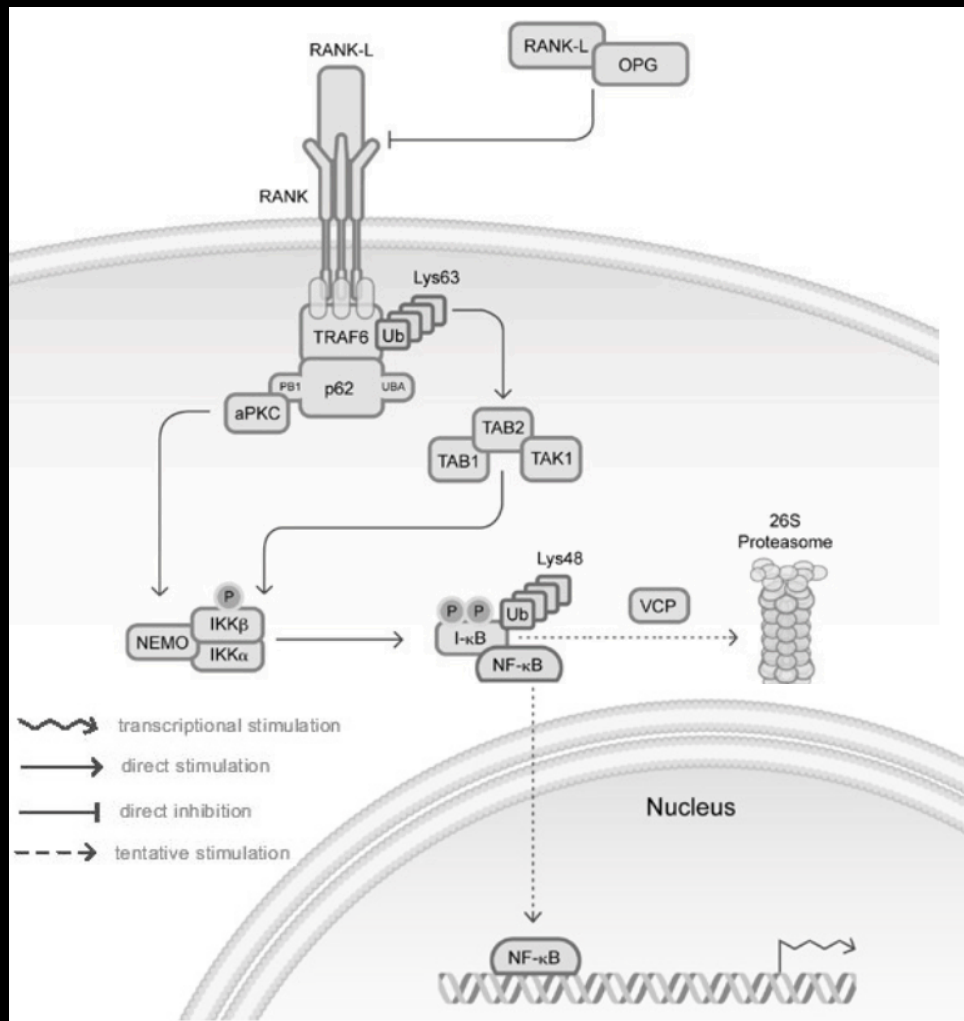
Osteoklasten -> Knochenresorption – Osteoblasten -> Synthese neuer Knochenmatrix

OPG/ RANK/ RANKL



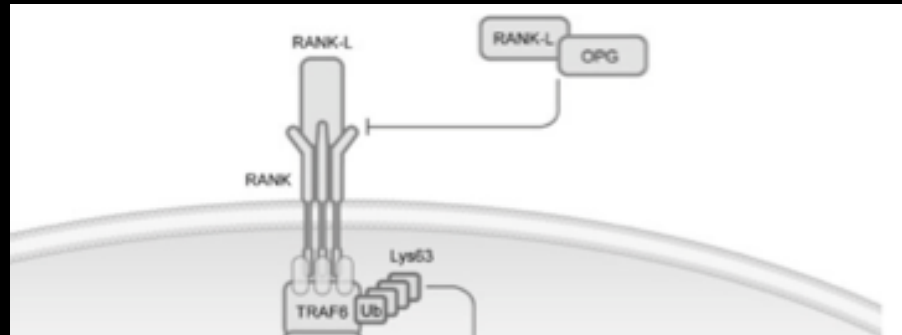
Asagiri M., Takayanagi H. et al.(2007): *The molecular understanding of osteoclast differentiation*. Bone. 40: 251-264.

PATHWAY: BINDUNG VON RANKL AN RANK AN DER OSTEOKLASTEN-VORLÄUFERZELLE



Layfield R., Shaw B.(2007): *Ubiquitin-mediated signaling and Paget's disease of bone*. BMC Biochemistry. 8: 1-5.

PATHWAY: BINDUNG VON RANKL AN RANK AN DER OSTEOKLASTEN-VORLÄUFERZELLE



Nach Bindung von RANKL an RANK -> Aktivierung von **TRAF6**

TRAF6 an RANK gebunden: **Ausgangspunkt** der **Signalkaskade**

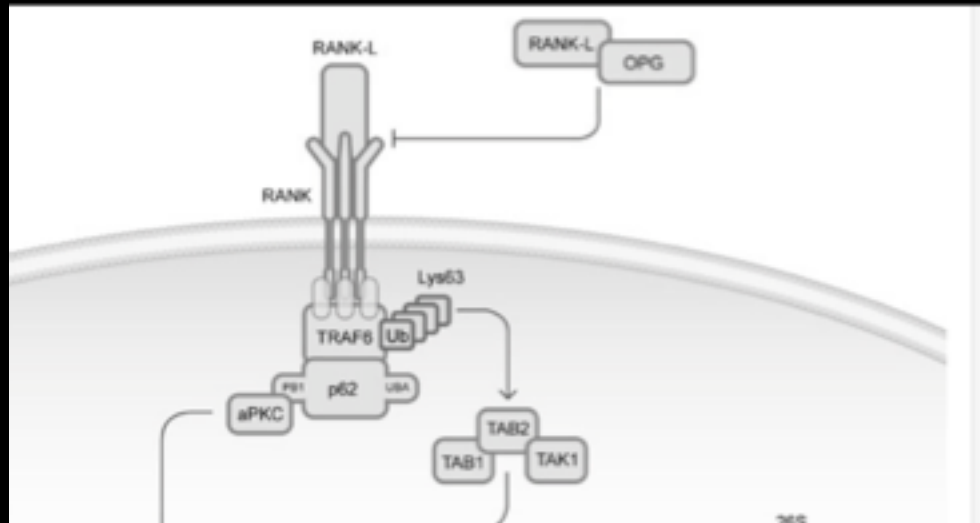
Lomaga et al.: **Mangel** an **TRAF6** führt zur Osteopetrose

TRAF6-vermittelte **Polyubiquitinierung** -> Aktivierung d. **TAK1-Kinase-Komplex**

Darnay B. G., Besse A. et al.(2007): *TRAFs in RANK signaling*. Ad. Exp. Med. Biol. 597: 152-159.

Lomaga M. A., Yeh W. C. et al.(1999): *TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD-40 and LPS signaling*. Genes Dev. 13: 1015-1024.

PATHWAY: BINDUNG VON RANKL AN RANK AN DER OSTEOKLASTEN-VORLÄUFERZELLE



TRAF6 ist ein Adaptor-Protein der **E3-Ligase**

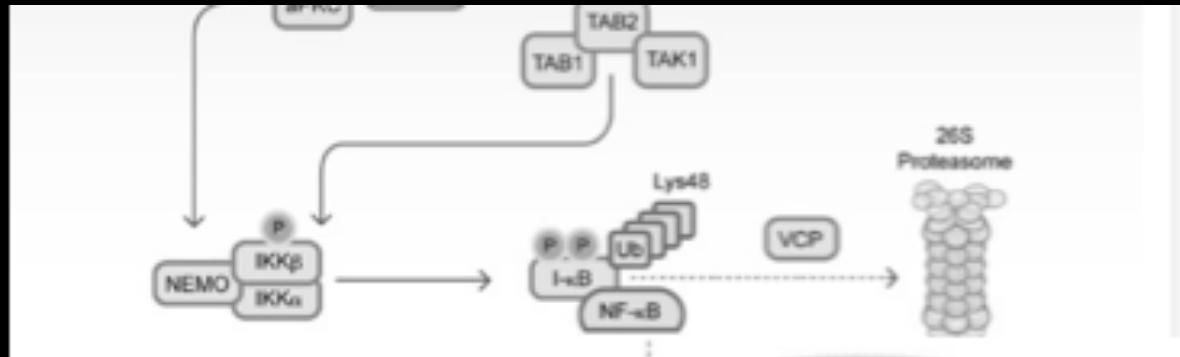
E3-Ligase katalysiert die **Übertragung von Ubiquitin** auf ein anderes Protein

Aktivierung d. **TAK1-Kinase-Komplex**

Darnay B. G., Besse A. et al.(2007): *TRAFs in RANK signaling*. Ad. Exp. Med. Biol. 597: 152-159.

Lomaga M. A., Yeh W. C. et al.(1999): *TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD-40 and LPS signaling*. Genes Dev. 13: 1015-1024.

PATHWAY: BINDUNG VON RANKL AN RANK AN DER OSTEOKLASTEN-VORLÄUFERZELLE



TAK1-Kinase-Komplex :

Phosphorylierung an Serinresten & dadurch **Aktivierung** der I-κB-Kinase

NFκB-Aktivierung (IKK)

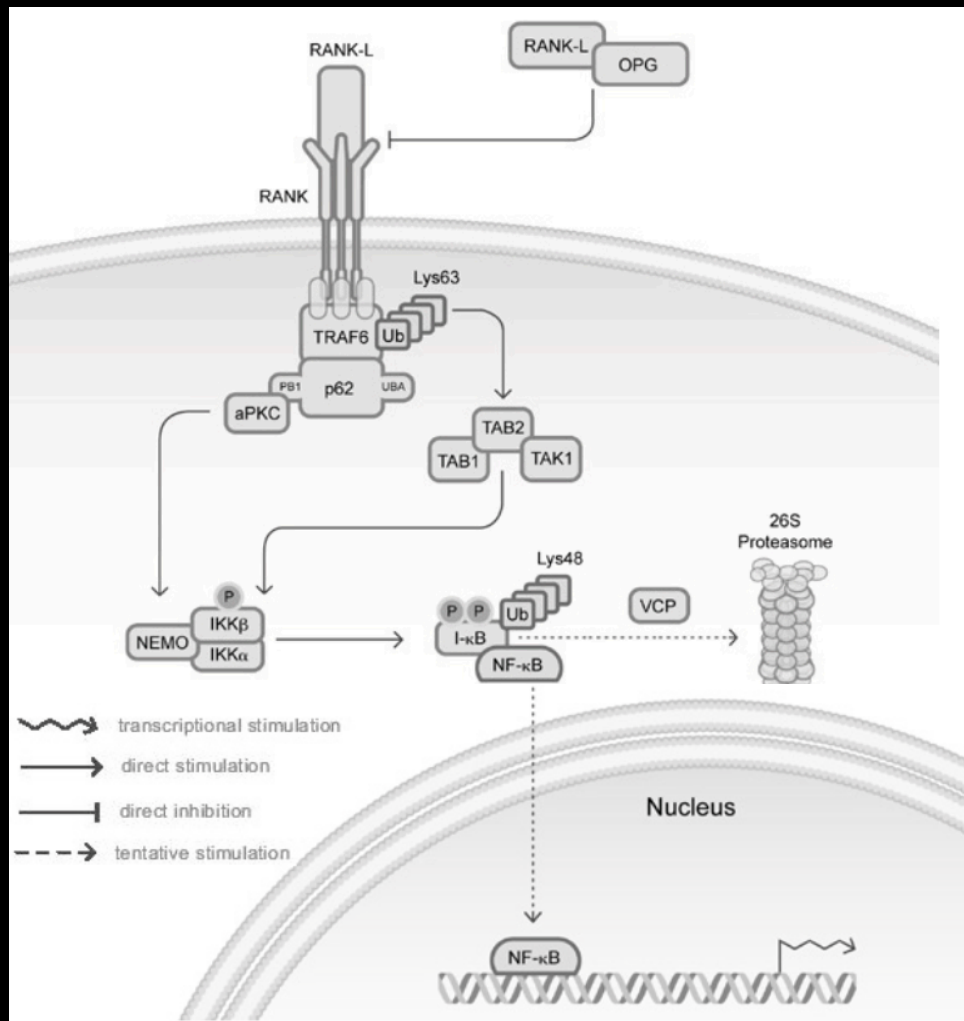
AP-1-Aktivierung (JNK)

Deng L., Wang C. et al.(2000): *Activation of the IκappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain.* Cell 103: 351-361.

Takaesu G., Kishida S. et al.(2000): *TAB2 a novel adaptor protein, mediates activation of TAK1 MAPKKK by linking TAK1 to TRAF6 in the IL-1 signal transduction pathway.* Mol. Cell. 5: 649-658.

Mizukami J., Takaesu G., et al.(2002): *Receptor activator of NF-κB ligand (RANKL) activates TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase through a signaling complex containing RANK, TAB2 and TRAF6.* Mol. Cell. Biol. 22: 992-1000.

PATHWAY: BINDUNG VON RANKL AN RANK AN DER OSTEOKLASTEN-VORLÄUFERZELLE



Layfield R., Shaw B.(2007): *Ubiquitin-mediated signaling and Paget's disease of bone*. BMC Biochemistry. 8: 1-5.

PATHWAY: BINDUNG VON RANKL AN RANK AN DER OSTEOKLASTEN-VORLÄUFERZELLE

Formation aus TRAF6, TAB2 & TAK1:

Entscheidend für **Weiterleitung** des **Signals** von **RANK** nach RANKL-Bindung

Regulation der **Differenzierung** und Funktion von **Osteoklasten**

Deng L., Wang C. et al.(2000): *Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain.* Cell 103: 351-361.

Takaesu G., Kishida S. et al.(2000): *TAB2 a novel adaptor protein, mediates activation of TAK1 MAPKKK by linking TAK1 to TRAF6 in the IL-1 signal transduction pathway.* Mol. Cell. 5: 649-658.

Mizukami J., Takaesu G., et al.(2002): *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. 22: 992-1000.

Ziel: Identifizierung weiterer zellulärer Faktoren, die mit TRAF6 interagieren

Hefe-Zwei-Hybrid-System = yeast two-hybrid screen system

BCL3 = B-cell chronic lymphatic leukemia protein 3

BMDMs: Mangel an BCL3 -> **Differenzierung zu Osteoklasten**

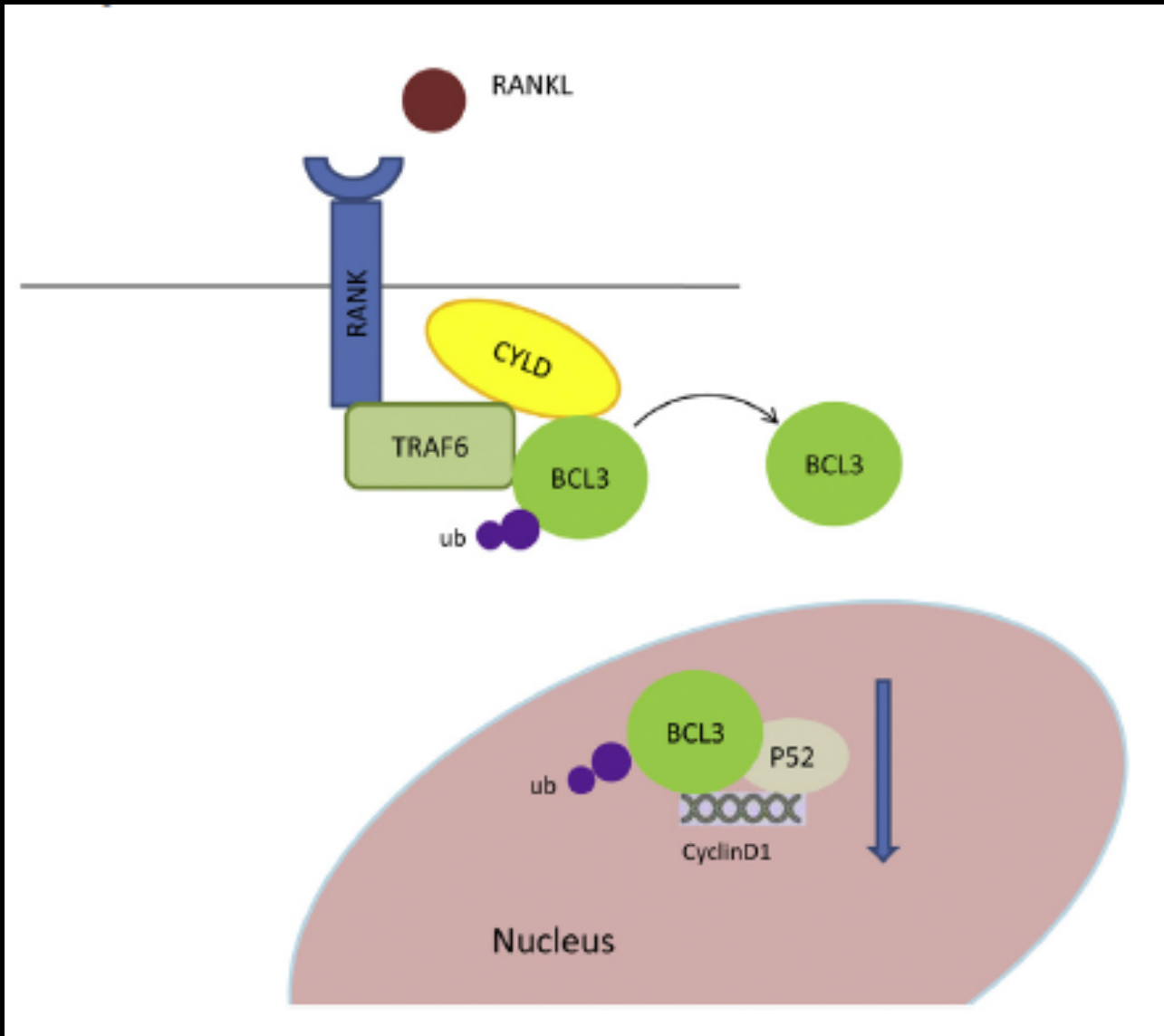
Hinzufügung von **CYLD** zum TRAF6-Komplex unter RANKL-Stimulation

Lys63-**Polyubiquitin-Kette** von BCL3 wurde durch CYLD **entfernt**

Retention von BCL3 im Zytoplasma: Inhibierung der Transkription von CyclinD1

Wang et al.(2018): *BCL3 regulates RANKL-induced osteoclastogenesis by interacting with TRAF6 in bone marrow-derived macrophages.*

BCL3 - TRAF6 - CYLD



Wang et al.(2018): *BCL3 regulates RANKL-induced osteoclastogenesis by interacting with TRAF6 in bone marrow-derived macrophages.*

M E T H O D S – yeast-two hybrid screening

Hefe-Zwei-Hybrid-System & Galactosidase assays (zur Verifizierung)

Zum Nachweis der Interaktion von BCL3 und TRAF6

DNA-bindende Domäne (GAL-BD) interagiert mit **Aktivierungsdomäne** (GAL-AD) ->Transkription des Reportergens lacZ aktiviert

Beiden Funktionmodule beim Zwei-Hybrid-System **separat exprimiert**

Folgerichtig **keine Transkription** ausgelöst

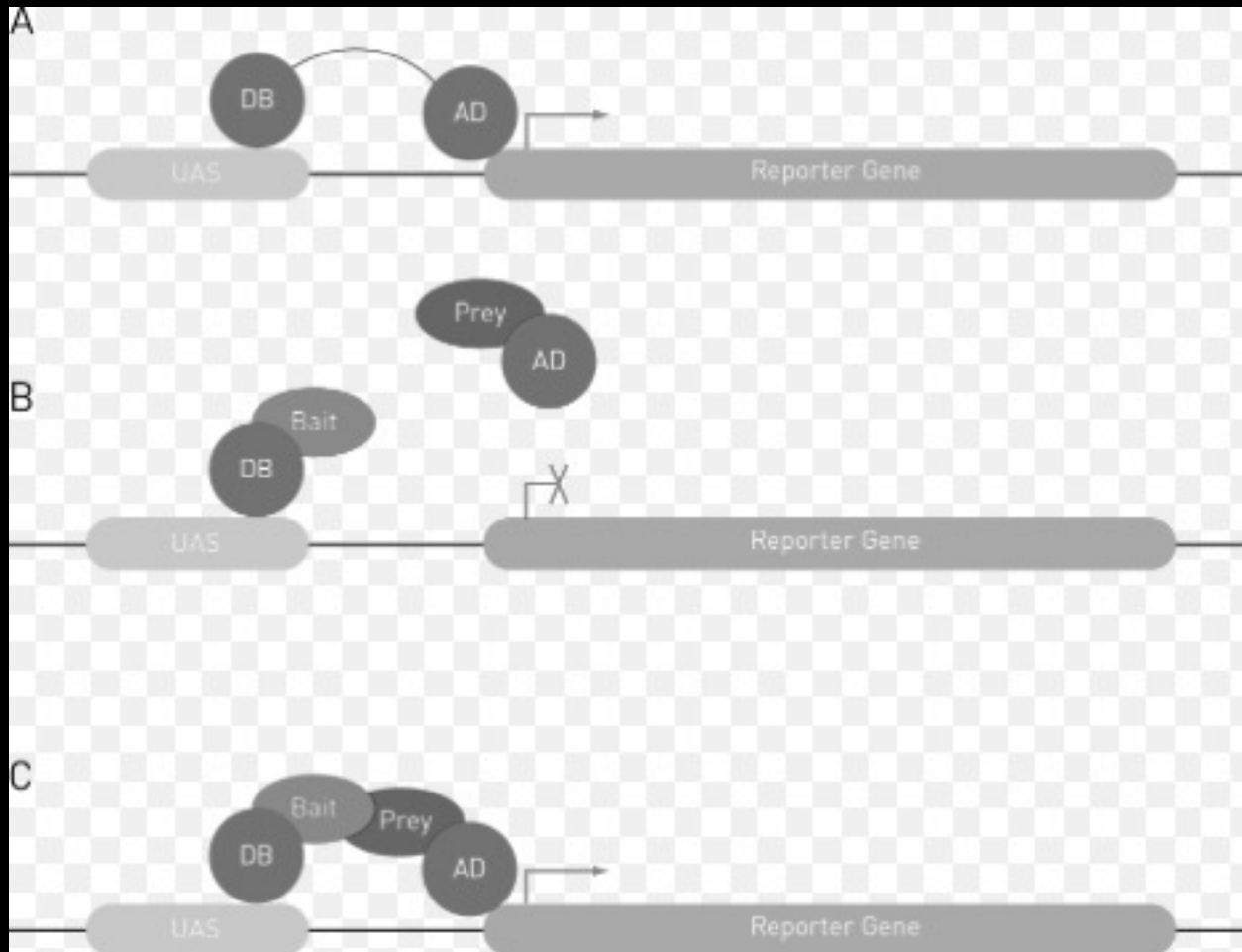
DNA-Bindungsdomäne besitzt kein Aktivierungspotential – Aktivierungsdomäne nicht in Nähe des Reportergens

Funktionsmodule mit **Proteinen fusioniert**, die **miteinander interagieren** können

-Interaktion zweier Proteine **indirekt** über Aktivierung der Transkription **messbar**-

Wang et al.(2018): *BCL3 regulates RANKL-induced osteoclastogenesis by interacting with TRAF6 in bone marrow-derived macrophages.*

METHODS – yeast-two hybrid screening



Yang J.(2019): *Yeast 2-hybrid*. Singer Instruments. UK. URL: <https://www.singerinstruments.com/application/yeast-2-hybrid/>

Wang et al.(2018): *BCL3 regulates RANKL-induced osteoclastogenesis by interacting with TRAF6 in bone marrow-derived macrophages*.

METHODS – β -Galactosidase-filter assays

β -Galactosidase-filter assays (zur Verifizierung)

Zum **Nachweis der Intensität** der **BCL3-TRAF6-Interaktion** in einem GAL4 Hefe-Zwei-Hybrid-System

β -Galactosidase vom lacZ-Gen codiert

Hydrolyse von X-Gal zu Galactose & einem **blauen Indigofarbstoff**

->zeigt Genexpression von lacZ an

Wang et al.(2018): *BCL3 regulates RANKL-induced osteoclastogenesis by interacting with TRAF6 in bone marrow-derived macrophages.*

METHODS - Plasmids

Full length human **TRAF6** cDNA synthetisiert & durch Sequencing verifiziert

Subcloning der TRAF6 cDNA in einen **pcDNA3.1/ His mammalian expression vector**

Plasmid zur Expression von **BCL3**: pCMV/ 3Flag

Sh-RNA zur **Stilllegung** von **TRAF6**, **CYLD**, **BCL3** synthetisiert und durch Subcloning in ein Plasmid (GV102) integriert

Wang et al.(2018): *BCL3 regulates RANKL-induced osteoclastogenesis by interacting with TRAF6 in bone marrow-derived macrophages.*

M E T H O D S – Cell culture and transfection

HEK293T in DMEM (Nährmedium für Zellkulturen) kultiviert

(10% inactivated FBS, Penicillin, Streptomycin bei 37 Grad Celsius und 5% CO₂ Konzentration in Atmosphäre)

BMDMs aus Femur und Tibia von **C57BL/6 Mäusen**

(M-CSF = Macrophage colony-stimulating factor)

Nach 7 Tagen: RANKL 100ng/ mL

Integration der Expressionsvektoren in HEK293T und BMDMs mit Hilfe von Lipofectamine 2000 (Steigerung der Effizienz der Transfektion)

M E T H O D S – Cell MTT assay

Überexprimierung & Knockdown von BCL3:

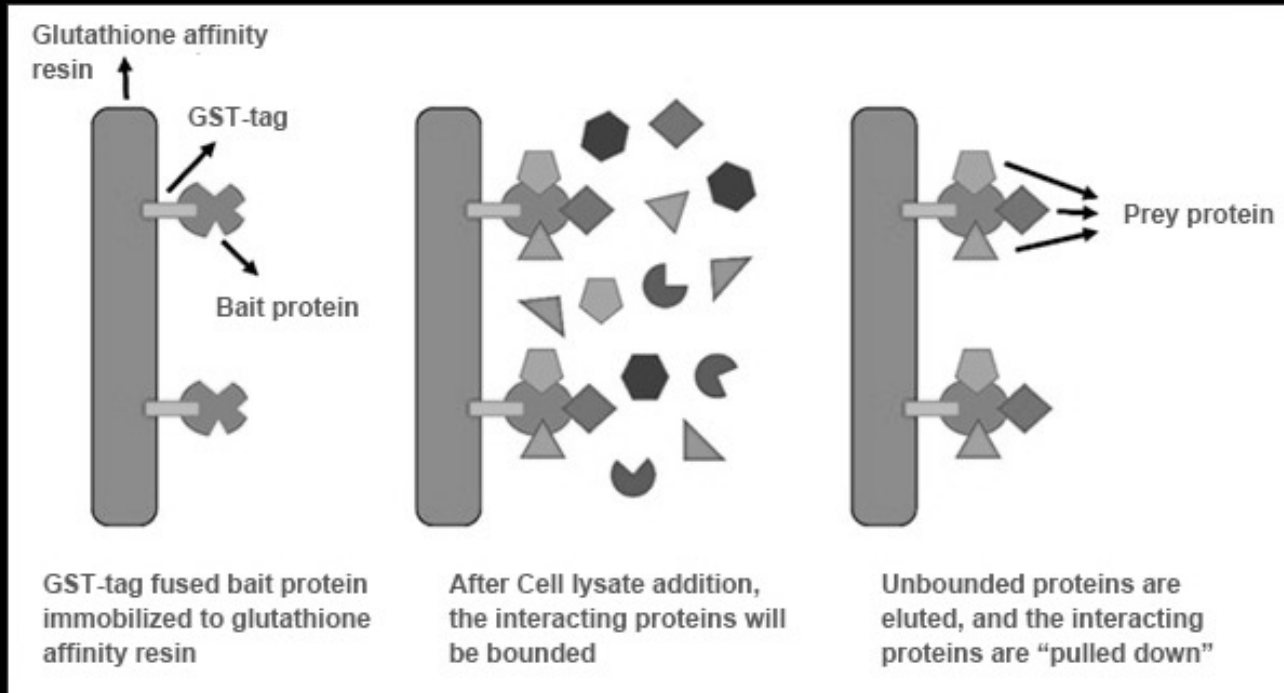
Kultivierung von 2×10^4 Zellen in Mikrotiterplatten (96)

Zellen in vitro mit **gelben Tetrazoliumsalz** behandelt -> Nachweis Zellvitalität beruht auf **Reduktion d. gelben Farbstoffes** -> BLAU-VIOLETT

Beobachtung der Zell-Proliferation

Wang et al.(2018): *BCL3 regulates RANKL-induced osteoclastogenesis by interacting with TRAF6 in bone marrow-derived macrophages.*

METHODS – GST-pulldown assay



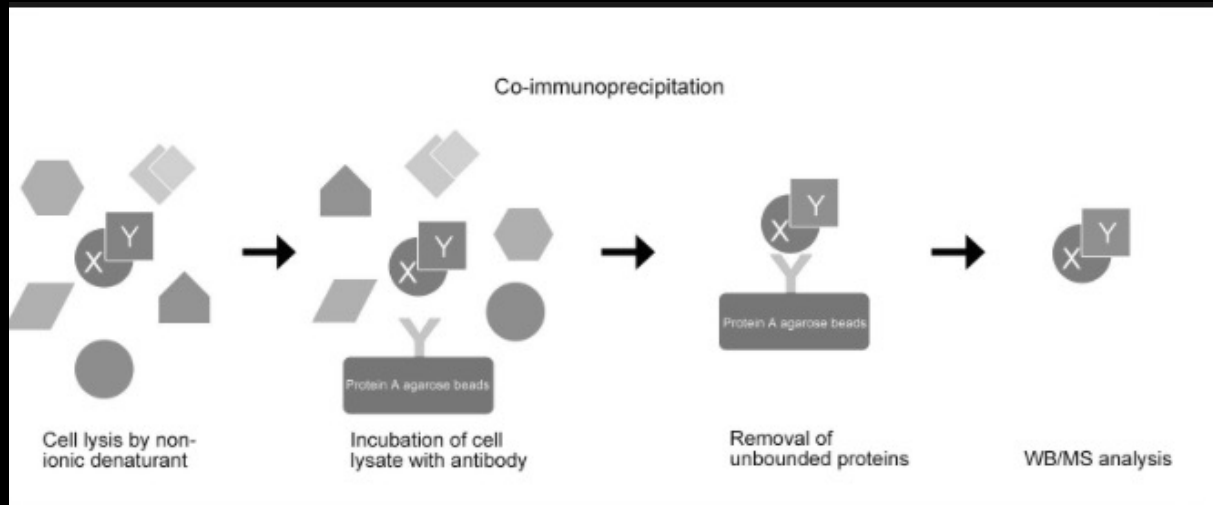
BCL3 in HEK293T-Zell-Lysat mit GST-TRAF6 inkubiert (4h)

Anschließend inkubiert mit Glutathione Sepharose beads (2h – 4 Grad Celsius)

Waschung -> interagierende Proteine verbunden => Western-Blot

Wang et al.(2018): *BCL3 regulates RANKL-induced osteoclastogenesis by interacting with TRAF6 in bone marrow-derived macrophages.*

METHODS – Immunoprecipitation



Zell-Lysat mit spezifischen **Antikörper** (an **Protein A/G beschichtete beads gebunden**) inkubiert

Antikörper **bindet** an **Zielproteine samt Interaktionspartner**

Isolierung der Antikörper-Protein-Komplexe durch Zentrifugation und mehrere Waschschrirte -> **Entfernung nicht gebundener, unspezifischer Proteine**

Western-Blot

Wang et al.(2018): *BCL3 regulates RANKL-induced osteoclastogenesis by interacting with TRAF6 in bone marrow-derived macrophages.*

M E T H O D S – Osteoclast differentiation assay & bone resorption pit assays

BMDMs im DMEM-Nährmedium mit 10%FBS kultiviert

Behandlung der Zellen mit RANKL (100ng/ mL) für 7 Tage

TRAP-Staining (Tartrate-Resistant Acid Phosphatase in Osteoklasten)

Bestimmung der Zahl TRAP-positiver Zellen

TRAP-positive Zellen für 7 Tage auf osteo-slice-surface inkubiert

Entfernung der Zellen und Färbung der Resorption pits mit Toluidin-Blau

Wang et al.(2018): *BCL3 regulates RANKL-induced osteoclastogenesis by interacting with TRAF6 in bone marrow-derived macrophages.*

R E S U L T S – Identification of BCL3 as a factor interacting with TRAF6

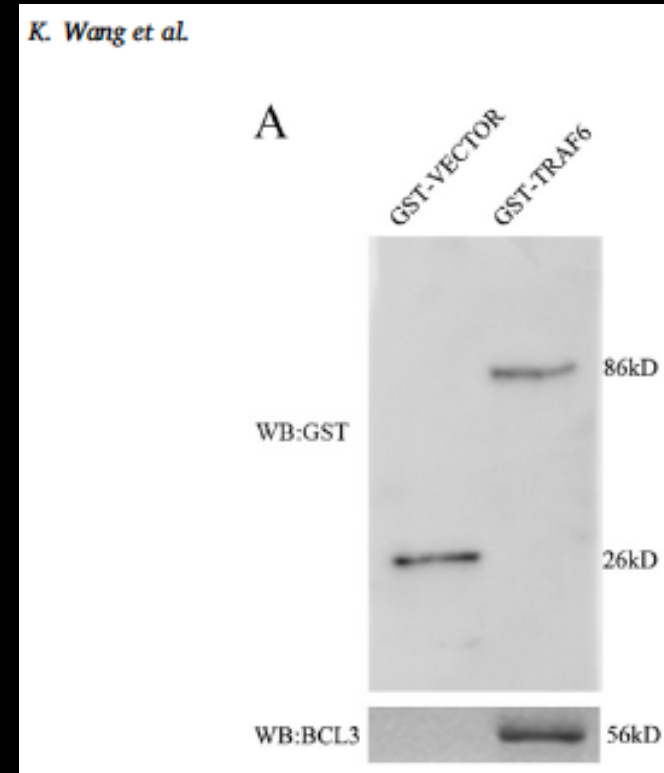
Als Nachweis der Interaktion von TRAF6 mit BCL3:

GST – pulldown assay mit **bakteriell exprimierten GST-TRAF6**

Keine eigenständige Bindung von BCL3 an GST-gebundene Agarose-Perlen

Bindung an Agarose-Perlen -> **gekoppelt an rekombinantes GST-TRAF6**

⇒ BCL3 interagiert in vitro spezifisch mit TRAF6



Wang et al.(2018): *BCL3 regulates RANKL-induced osteoclastogenesis by interacting with TRAF6 in bone marrow-derived macrophages.*

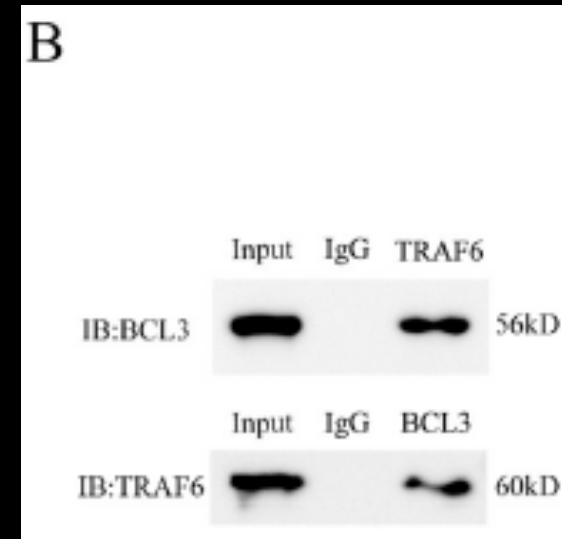
RESULTS – Identification of BCL3 as a factor interacting with TRAF6

Durchführung einer Co-Immunoprecipitation

Analyse der Interaktion von BCL3 mit TRAF6 in von RANKL stimulierten Zellen (BMDMs):

⇒ BCL3 wurde in BMDMs mit TRAF6 präzipitiert

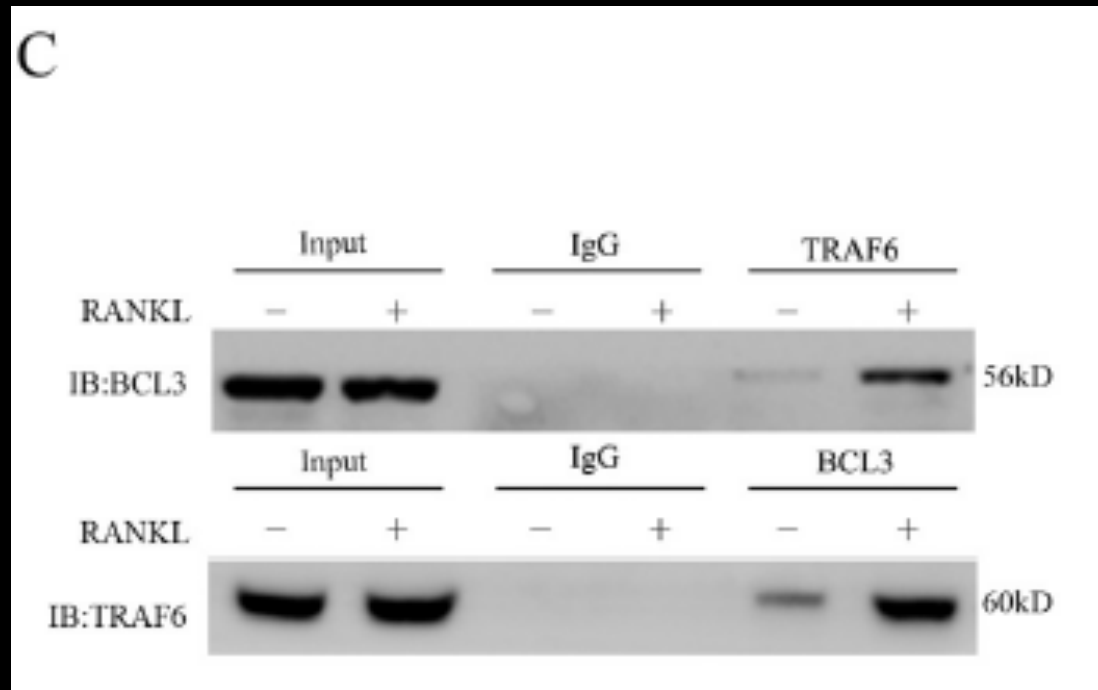
⇒ TRAF6 wurde im Gegenzug auch mit BCL3 präzipitiert



Wang et al.(2018): *BCL3 regulates RANKL-induced osteoclastogenesis by interacting with TRAF6 in bone marrow-derived macrophages.*

R E S U L T S – Identification of BCL3 as a factor interacting with TRAF6

Interaktionen zwischen TRAF6 und BCL3 bei RANKL-Stimulation verstärkt:



Wang et al.(2018): *BCL3 regulates RANKL-induced osteoclastogenesis by interacting with TRAF6 in bone marrow-derived macrophages.*

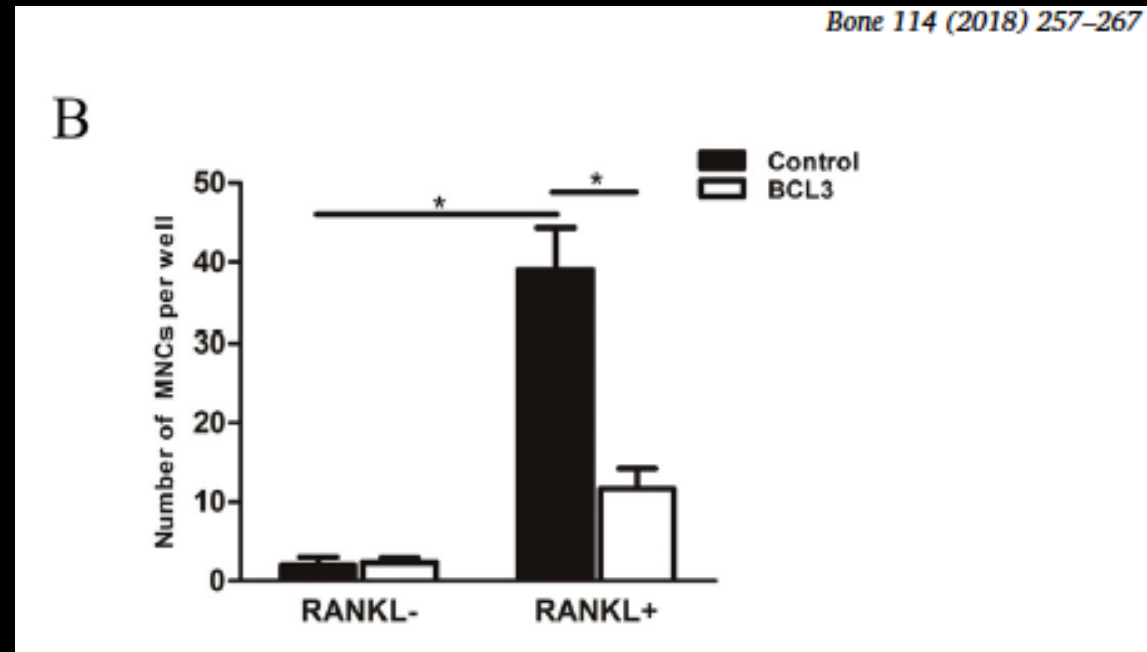
R E S U L T S – BCL3 is an inhibiting factor in osteoclastogenesis

Es stellt sich natürlich die Frage, **welchen Einfluss BCL3** durch die Interaktion mit TRAF6 **auf die Regulation der Osteoklastogenese** hat:

BMDMs in M-CSF Wachstumsmedium kultiviert

1)Anwesenheit von RANKL

2)Abwesenheit von RANKL



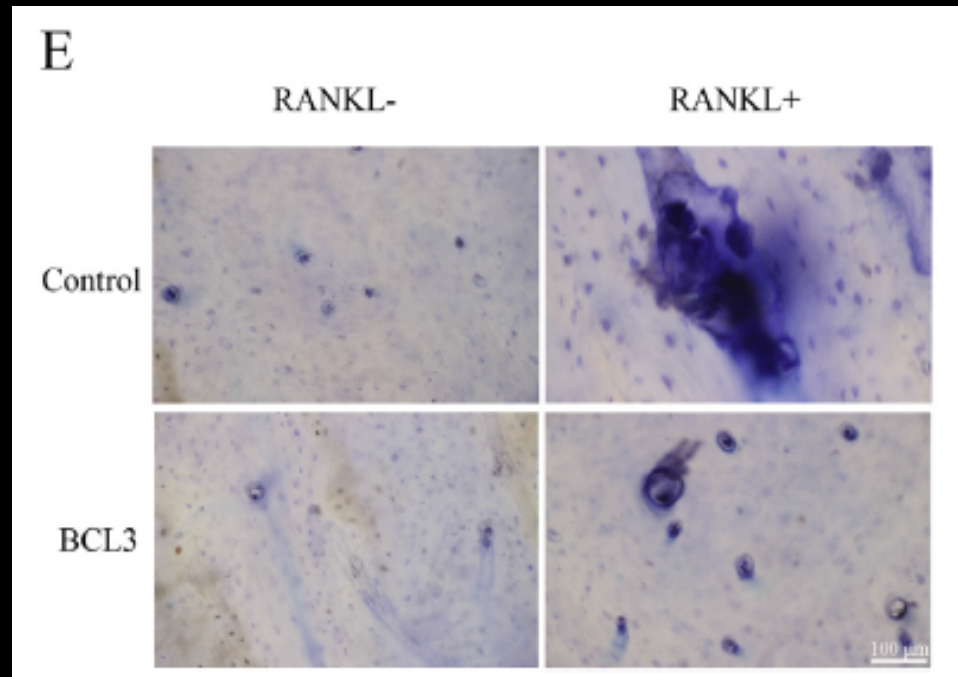
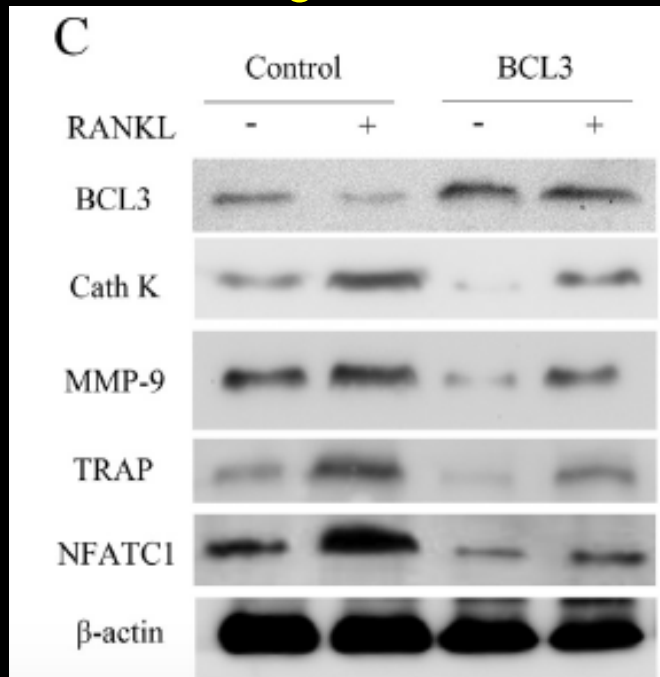
Wang et al.(2018): *BCL3 regulates RANKL-induced osteoclastogenesis by interacting with TRAF6 in bone marrow-derived macrophages.*

R E S U L T S – BCL3 is an inhibiting factor in osteoclastogenesis

Marker der Osteoklastogenese wie **Cathepsin K**, **TRAP**, **NFATC1** & **MMP-9**

⇒ Nach Behandlung mit RANKL verstärkt exprimiert

⇒ BCL3 **verminderte** die RANKL-induzierte **Expression** von **Osteoklastogenese-assoziierten Markern**

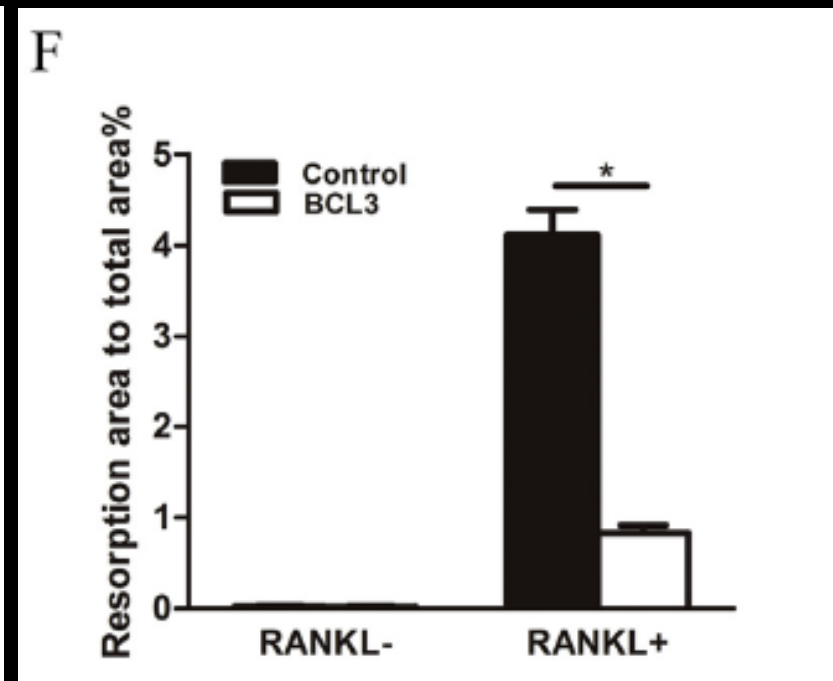
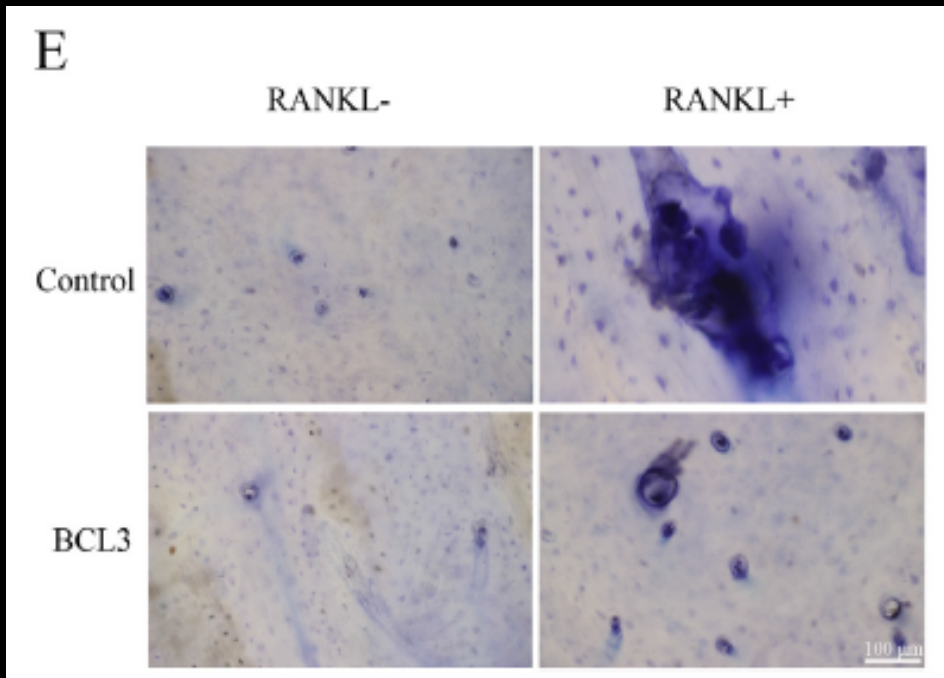


Wang et al.(2018): *BCL3 regulates RANKL-induced osteoclastogenesis by interacting with TRAF6 in bone marrow-derived macrophages.*

RESULTS – BCL3 is an inhibiting factor in osteoclastogenesis

Nach RANKL-Stimulation

⇒ bei BMDMs mit **BCL3-Überexpression Knochenresorption** signifikant **reduziert** im Vergleich zur Kontrollgruppe



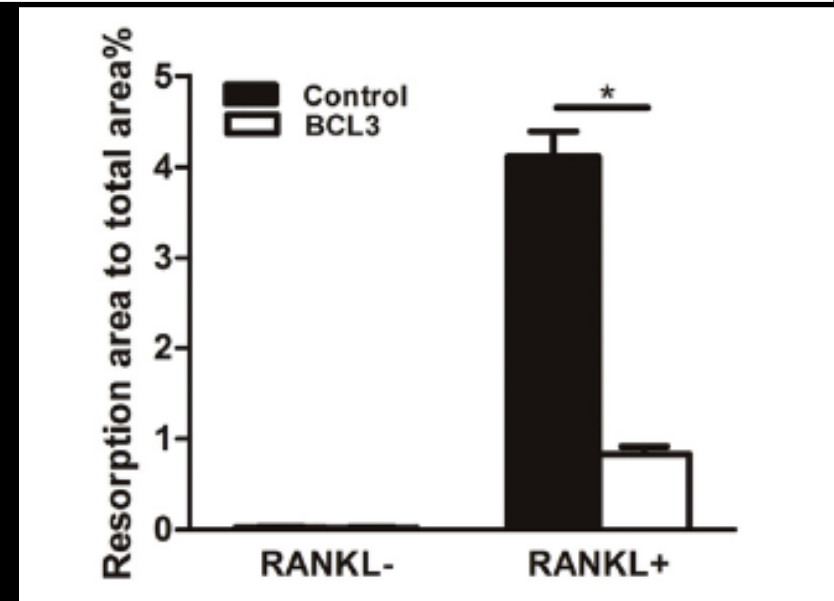
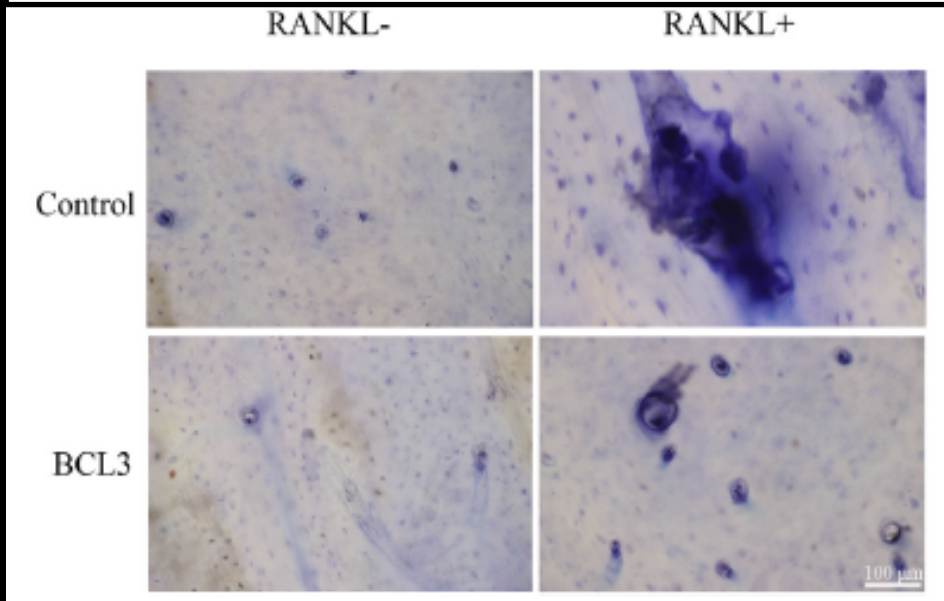
Wang et al.(2018): *BCL3 regulates RANKL-induced osteoclastogenesis by interacting with TRAF6 in bone marrow-derived macrophages.*

R E S U L T S – BCL3 is an inhibiting factor in osteoclastogenesis

Nach RANKL-Stimulation

⇒ bei BMDMs mit **BCL3-Überexpression Knochenresorption** signifikant **reduziert** im Vergleich zur Kontrollgruppe

BCL3 schwächt die durch RANKL induzierte Knochenresorption signifikant ab

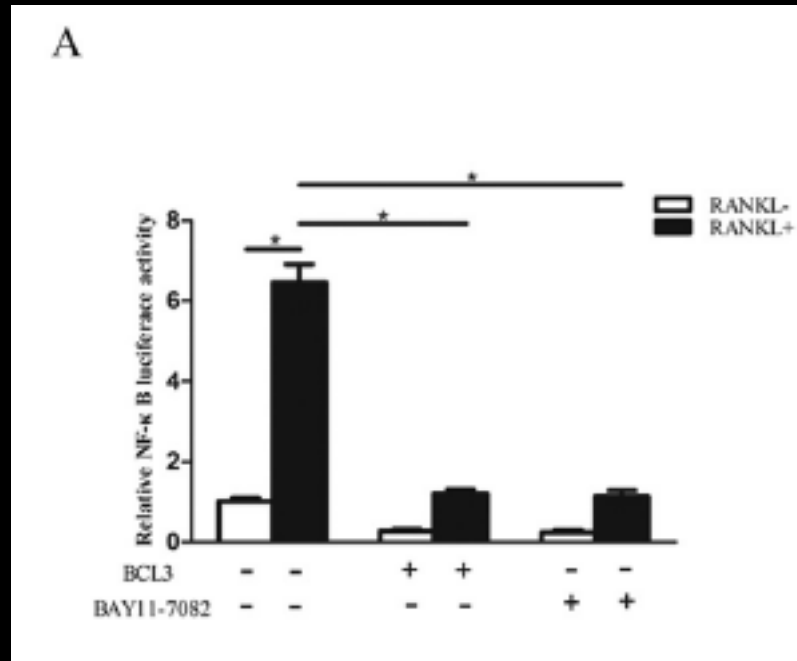


Wang et al.(2018): *BCL3 regulates RANKL-induced osteoclastogenesis by interacting with TRAF6 in bone marrow-derived macrophages.*

R E S U L T S – BCL3 affects RANKL-induced NF-kB signaling via p52

RANKL - induzierte in BMDMs signifikant die transkriptionelle Aktivität von NFkB

⇒ Im Vergleich dazu führte die Behandlung mit BCL3 zur signifikanten Hemmung der RANKL – induzierten transkriptionellen Aktivität von NFkB



Wang et al.(2018): *BCL3 regulates RANKL-induced osteoclastogenesis by interacting with TRAF6 in bone marrow-derived macrophages.*

RESULTS – RANKL mediates BCL3 deubiquitination and prevents nuclear accumulation of BCL3

TRAF6 enthält als E2 - (Ubiquitin-konjugierend) Ubiquitin Ligase eine **Ring-Domäne**

Notwendig für das **Downstream-Signaling**, die **Ubiquitination** & die **Regulierung** der **Osteoklastogenese**

Beeinflusst TRAF6 die Polyubiquitination von BCL3?

Überprüfung der Hypothese:

Immunopräzipitation in Anwesenheit/ Abwesenheit von RANKL in BMDMs

Anschließende Bestimmung des Statuses der Ubiquitinierung von BCL3

=> **Reduktion** der **Ubiquitinierung von BCL3** in mit **RANKL-behandelten** Zellen

Wang et al.(2018): *BCL3 regulates RANKL-induced osteoclastogenesis by interacting with TRAF6 in bone marrow-derived macrophages.*

RESULTS – RANKL mediates BCL3 deubiquitination and prevents nuclear accumulation of BCL3

⇒ Reduktion der **Ubiquitinierung von BCL3** in mit **RANKL-behandelten** Zellen

In BMDMs wurde in einem weiteren Versuch (K48R/ K63R HA-tagged) Ubiquitin und BCL3 (3-Flag-tagged) infiltriert und anschließend **CYLD – shRNA** transfiziert:

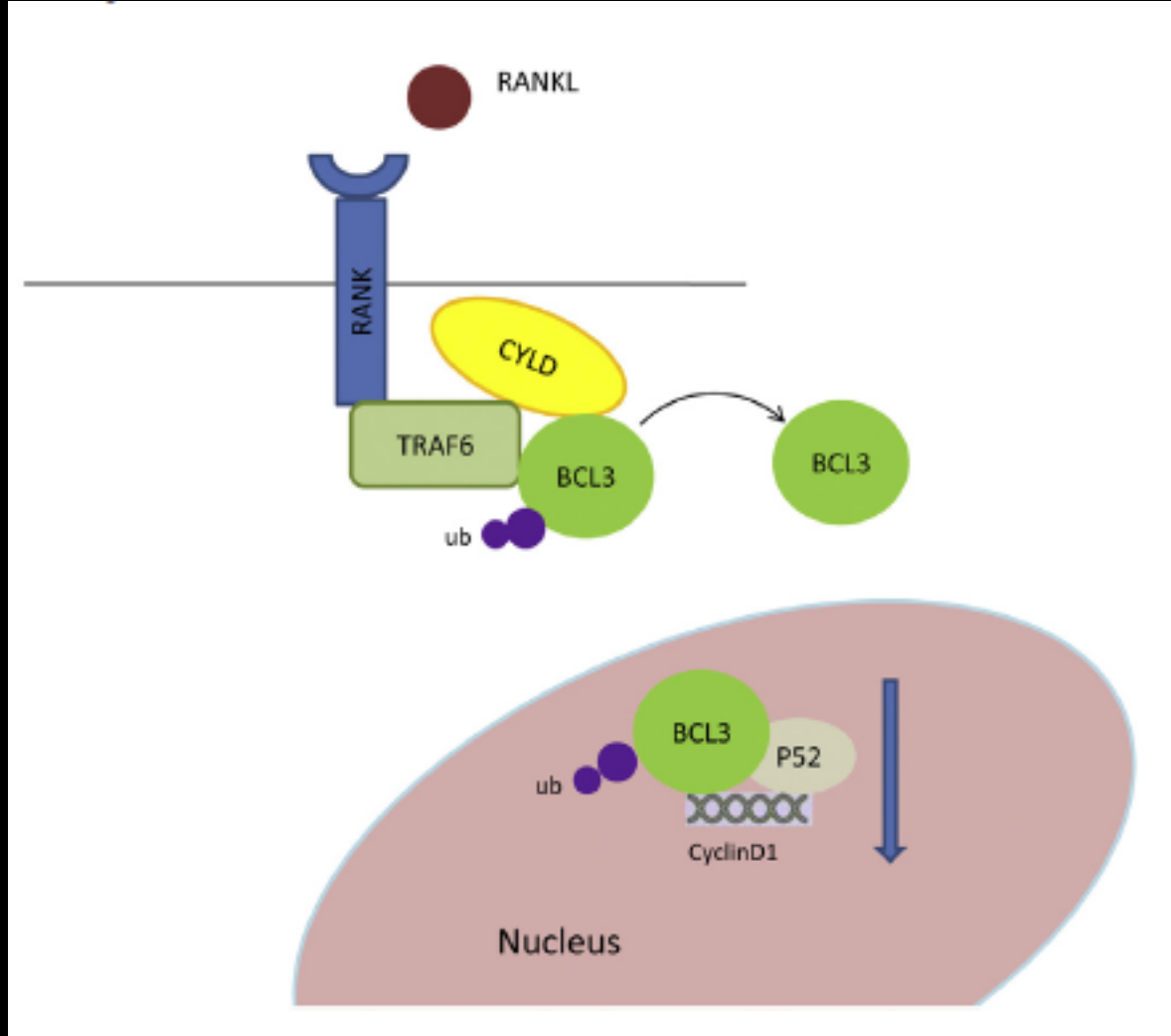
⇒ BMDMs mit **CYLD-Knockdown**: Verstärkung der BCL3 – Polyubiquitinierung

⇒ CYLD **katalysiert Abbau** der **Lys63-Polyubiquitin-Ketten** an **BCL3**

Retention im Zytoplasma und dadurch Inaktivierung von BCL3

Wang et al.(2018): *BCL3 regulates RANKL-induced osteoclastogenesis by interacting with TRAF6 in bone marrow-derived macrophages.*

RESULTS – RANKL mediates BCL3 deubiquitination and prevents nuclear accumulation of BCL3



Wang et al.(2018): *BCL3 regulates RANKL-induced osteoclastogenesis by interacting with TRAF6 in bone marrow-derived macrophages.*

CONCLUSION

Interaktion von TRAF6 mit BCL3

TRAF6 fördert die RANKL-induzierte Osteoklastogenese:

⇒ BCL3 – **Deubiquitinierung**

BCL3 hemmt die RANKL-induzierte Aktivität des Transkriptionsfaktors NF-κB

BCL3 - Überexpression führt zur **Hemmung** der **RANKL-induzierten Knochenresorption** in BMDMs

BCL3 **vermindert** die RANKL-induzierte **Expression** von **Osteoklastogenese-assoziierten Markern**

=> BCL3 führt zur Hemmung der Osteoklastogenese

Wang et al.(2018): *BCL3 regulates RANKL-induced osteoclastogenesis by interacting with TRAF6 in bone marrow-derived macrophages.*

VIELEN DANK FÜR DIE AUFMERKSAMKEIT!

Asagiri M., Takayanagi H. et al.(2007): *The molecular understanding of osteoclast differentiation*. Bone. 40: 251-264.

Layfield R., Shaw B.(2007): *Ubiquitin-mediated signaling and Paget's disease of bone*. BMC Biochemistry. 8: 1-5.

Darnay B. G., Besse A. et al.(2007): *TRAFs in RANK signaling*. Ad. Exp. Med. Biol. 597: 152-159.

Lomaga M. A., Yeh W. C. et al.(1999): *TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD-40 and LPS signaling*. Genes Dev. 13: 1015-1024.

Deng L., Wang C. et al.(2000): *Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain*. Cell 103: 351-361.

Takaesu G., Kishida S. et al.(2000): *TAB2 a novel adaptor protein, mediates activation of TAK1 MAPKKK by linking TAK1 to TRAF6 in the IL-1 signal transduction pathway*. Mol. Cell. 5: 649-658.

Mizukami J., Takaesu G., et al.(2002): *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. 22: 992-1000.

Wang et al.(2018): *BCL3 regulates RANKL-induced osteoclastogenesis by interacting with TRAF6 in bone marrow-derived macrophages*.