

Titel der Dissertation: „**Proteinkinase B- und TGFβ1-Signalwege: Untersuchungen zu ihrer Interaktion bei der Th-Zelldifferenzierung.**“

## **Zusammenfassung**

Proteinkinase B (PKB/Akt) wird durch TCR- und CD28-Signale sowie Zytokine aktiviert und fördert die Proliferation und das Überleben von T-Zellen. Verstärkte PKB-Signale sind daher mit der Tumorprogression assoziiert. *Transforming growth factor β1* (TGFβ1) dagegen gehört zu den potentesten Immunsuppressoren und ist für die Differenzierung peripherer T-Zellen in immunsuppressive regulatorische T-Zellen (iTreg) oder pro-inflammatorische Th17-Zellen essentiell. Es sollte daher in der vorliegenden Dissertation geklärt werden, wie konstitutiv-aktive myrPKB (PKB<sup>tg</sup>) TGFβ1-vermittelte Aktivierungs- und Differenzierungsprozesse naiver T-Zellen beeinflusst. Wildtyp und CD28<sup>-/-</sup> naive T-Zellen wurden bei TCR/CD3-Stimulation durch TGFβ1 in der Proliferation gehemmt. Hingegen wirkte TGFβ1 auf PKB<sup>tg</sup> wt und CD28<sup>-/-</sup> T-Zellen nicht hemmend, da sie so gut expandierten wie wt Zellen nach CD3+CD28-Ak-Stimulation. Insgesamt zeigte die höhere CD25-, CD69- und CD98-Expression und Zellgröße sowie die geringere Hemmung von mTOR und pS6, dass PKB-Signale die inhibitorische Wirkung von TGFβ1 aufheben (bei CD3-Stimulation) bzw. abmildern (bei CD3+CD28-Stimulation). PKB<sup>tg</sup> und PKB<sup>tg</sup> CD28<sup>-/-</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen differenzierten bei alleiniger CD3-Stimulation in Anwesenheit von TGFβ1 effizient zu iTreg, im Gegensatz zu wt T-Zellen, die auch hier auf CD28-Kostimulation angewiesen waren. Auf molekularer Ebene induzierten erhöhte PKB-Signale eine verstärkte und anhaltende Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT5, eine verminderte NFATc1-Aktivierung und die Expression von Foxp3, des „*master*“ Regulators für die iTreg-Differenzierung. TGFβ1-induzierte Smad-Proteine wurden in wt und PKB<sup>tg</sup> Zellen dagegen gleich gut aktiviert. Hinsichtlich der Th17-Polarisierung wirkten erhöhte PKB-Signale dagegen inhibierend, obwohl die Expression der Transkriptionsfaktoren RORγt und IRF4, welche die Th17-Differenzierung kontrollieren, vergleichbar war. Jedoch wurden in PKB<sup>tg</sup> T-Zellen STAT3, STAT1 und v.a. STAT5 und pSTAT6 verstärkt aktiviert, d.h. Transkriptionsfaktoren, die die Th17-Differenzierung hemmen bzw. die iTreg-Differenzierung fördern. Ein verändertes Zytokinprofil wurde dabei nicht festgestellt, so dass eine indirekte Hemmung der Th17-Differenzierung in PKB<sup>tg</sup> Zellen durch inhibitorische Zytokine eher nicht zutrifft. Somit reguliert PKB durch Beeinflussung des „STAT-Cocktails“ sowie der mTOR-S6-Signalachse TGFβ1-induzierte Differenzierungsprozesse und derart die Plastizität von Th-Zellen und die Immunbalance. Erhöhte PKB-Signale machen zudem CD28-Kostimulation abdingbar, so dass TCR-Aktivierung trotz TGFβ1 und fehlender CD28-Kostimulation zu einer Aktivierung naiver T-Zellen führen kann. Diese „Resistenz“ gegenüber TGFβ könnte in speziellen Situationen zu einer Aktivierung autoreaktiver T-Zellen beitragen oder die Transformation von T-Zellen und deren Tumorprogression fördern.

Titel der Dissertation: „**Proteinkinase B- und TGFβ1-Signalwege: Untersuchungen zu ihrer Interaktion bei der Th-Zelldifferenzierung.**“

## Summary

Protein kinase B (PKB/Akt) is activated by TCR and CD28 signals as well as cytokines and promotes the proliferation and survival of T cells. Increased PKB signals are often associated with tumor progression. In contrast, transforming growth factor β1 (TGFβ1) is one of the most potent immunosuppressants. It is also essential for the differentiation of immunosuppressive regulatory T cells (Treg) as well as proinflammatory Th17 cells. Here, we analyzed the effects of a constitutively active form of PKB<sub>α</sub> (PKBtg) on TGFβ1-mediated activation and differentiation processes of naive CD4<sup>+</sup> T cells.

TCR/CD3-induced proliferation of wild-type (wt) and CD28<sup>-/-</sup> naive T cells was strongly inhibited in the presence of TGFβ1. Intriguingly, TGFβ1 had no effect on the proliferation of PKBtg and PKBtg CD28<sup>-/-</sup> T cells, since both cell types expanded as well as wt T cells stimulated with CD3+CD28-Ab. Higher expression of CD25, CD69 and CD98, increased cell size and sustained mTOR and S6 activation showed that PKB signals abrogate (for CD3-Ab stimulation) or reduce (for CD3+CD28-Ab stimulation) the inhibitory effect of TGFβ1. PKBtg and PKBtg CD28<sup>-/-</sup> CD4<sup>+</sup> T cells efficiently differentiated into iTreg upon CD3-Ab stimulation in the presence of TGFβ1, in contrast to wt T cells which required CD28 costimulation. On the molecular level, elevated PKB signals in CD3-Ab +TGFβ1 stimulated T cells enhanced and sustained the activation of the transcription factor STAT5, reduced nuclear NFATc1 levels and induced the expression of Foxp3, the "master" regulator for iTreg differentiation. Surprisingly, TGFβ1-induced activation of Smad proteins was similar in wt and PKBtg T cells. On the other hand, elevated PKB signals strongly impaired the differentiation of naive CD4<sup>+</sup> T cells into Th17 cells, despite similar expression of the transcription factors RORγt and IRF4, which normally control the differentiation of Th17 cells. Notably, in PKBtg T cells the expression of pSTAT3, pSTAT1 and even more so of pSTAT5 and pSTAT6 was found to be increased, i.e. of transcription factors known to inhibit Th17 differentiation and to promote iTreg formation. PKBtg CD4<sup>+</sup> T cells showed the same cytokine profile as wt T cells under Th17 polarizing conditions, indicating that inhibition of Th17 differentiation does not result from secretion of inhibitory cytokines. Altogether, the data show that PKB strongly affects TGFβ1-induced differentiation processes and, thereby the plasticity of Th cell differentiation via enhancing mTOR-S6 signalling and altering the available cocktail of STAT factors. In addition, elevated PKB signals make CD28 costimulation dispensable, enabling naive T cells to proliferate upon TCR ligation in the presence of TGFβ1. This resistance to inhibitory TGFβ1 signals may enhance T cell autoreactivity and promote T cell transformation and tumorprogression.