

## Biochemical and functional characterization of Fyn-PAG association and its role in T-cell anergy

### Zusammenfassung

Anergie ist ein Mechanismus der peripheren Toleranz, der eine Aktivierung von autoreaktiven T Zellen verhindert und damit der Entstehung verschiedener autoimmuner Erkrankungen vorbeugt. Trotz vieler Versuche, die modifizierte Signalwege zu definieren, welche den anresponsiven Phänotyp der anergischen Zellen verursachen, bleibt der molekulare Mechanismus bisher weitgehend unklar. Die wichtigsten Merkmale der anergischen Zellen sind sowohl eine erhöhte Fyn-Kinase-Aktivität und -Expression als auch ein Block in der Aktivierung des kleinen G-Proteins Ras. In humanen T Zellen ist ein Teil von Fyn konstitutiv an PAG gebunden, der auch für die PAG-Phosphorylierung verantwortlich ist. Interessanterweise sind T Zellen mit einer erhöhten PAG-Expression nach T-Zell-Rezeptor-Stimulation anresponsiv, ein Phänotyp, der Anergie sehr ähnelt. Auf diesen Grundlagen basierend war es Ziel der vorliegenden Dissertation, die Rolle von PAG für die Aufrechterhaltung von Anergie zu untersuchen. In anergischen humanen T Zellen konnten wir zeigen, dass die PAG-assoziierte Fyn-Kinase eine erhöhte Aktivität besitzt. Dies führt zu einer Hyperphosphorylierung von PAG. Nachfolgend bindet PAG mehr Csk. Trotzdem ein Teil von Csk nach der Stimulation der anergischen T Zellen seine Assoziation zu PAG verliert, bleibt es noch mehr Csk an PAG gebunden als in unstimulierten oder aktivierten T Zellen. Dies resultiert in einer erhöhten Phosphorylierung des inhibitorischen Tyrosins von Fyn. Dieser Mechanismus kann einen Block in den proximalen Signalwegen verursachen, der ein wesentliches Merkmal der anergischen Zellen darstellt.

Zusätzlich haben wir hier einen neuen Mechanismus für Fyn-Kinase-Regulation beschrieben. Wir haben belegt, dass die Fyn-Kinase nicht nur auf ihrem C-terminalen inhibitorischen Tyrosin phosphoryliert wird, sondern gleichzeitig auch an einem Tyrosin, das sich innerhalb der SH2-Domäne befindet. Wir behaupten, dass diese duale Phosphorylierung eine offene Struktur der Kinase bewirkt und so eine Hyperaktivierung von Fyn in humanen anergischen T Zellen herbeiführt.

Weiterhin haben wir einen Multiproteinkomplex entdeckt, der aus PAG, Fyn, Sam68 und p120RasGAP entsteht. Darüber hinaus haben wir eine wichtige Rolle von PAG für die

Inhibition der Ras-Aktivierung nachgewiesen. Hierzu konnten wir zeigen, dass das Vermögen von PAG, Ras-Aktivität zu regulieren, von seiner Fähigkeit, sowohl Csk als auch p120RasGAP zu rekrutieren, abhängt. Nur wenn beide Bindungsstellen für Csk und p120RasGAP eliminiert sind, hat PAG keinen Effekt auf die Ras-Signalwege mehr. Mit Hilfe von RNA-Interferenz ist es uns gelungen, zu zeigen, dass die Herunterregulierung der PAG-Expression zu einer unbalancierter Hochregulation von sowohl Src-Kinasen als auch Ras-Aktivität führt, der ein Verlust eines kritischen negativen Rückkopplungsmechanismen zugrunde liegt.

Zusätzlich haben wir ein neues Protein entdeckt, das wir IGAP benannt haben, da es sich um ein GTPase-aktivierendes Protein handelt, welches erst nach einer Stimulation der T Zellen exprimiert wird. Wir vermuten, dass IGAP erst in aktivierten Zellen benötigt wird, um ihre Aktivierung und Proliferation einzustellen und somit die Immunantwort zu beenden. Im Gegensatz zu p120RasGAP ist IGAP schon auf der Zellmembrane vorhanden und kann so effektiver seine Wirkung auf Ras-Proteine ausüben. Zusätzlich haben wir IGAP im Komplex mit PAG gefunden und schlagen vor, dass diese Assoziation einen Einfluss auf die IGAP-Regulation haben könnte.

Zusammengefasst haben wir PAG als einen potenten negativen Regulator der Ras-Aktivierung dargestellt, der zwei RasGAP Proteine rekrutieren kann. Wir vermuten, dass dieser regulatorischer Mechanismus auch eine wichtige Rolle in der Ausbildung und Aufrechterhaltung von Anergie spielen könnte. PAG ist also an der Regulation sowohl von Src-Kinasen als auch Ras beteiligt. Beide sind wichtige Onkoproteine, deren Defekte mit einer Vielzahl von Krebserkrankungen assoziiert sind. Aus diesem Grund spekulieren wir, dass verschiedene Änderungen in PAG-Expression bzw. Phosphorylierung und/oder verschiedene PAG-Mutationen in bestimmten Arten maligner Erkrankungen zu finden sind, die eine Dysregulation der zellulären Signalwege verursachen und somit zu einer pathologischen Transformation von Zellen führen.