

Diplom-Biologe Thomas Drewes; Doktorarbeit mit dem Thema:

"Cross-talk of protein kinase B (PKB/Akt) with the transcription factor NFAT and the Src kinase Fyn"

### **Summary**

Protein kinase B (PKB), a ubiquitously expressed serine/threonine kinase, has central impact on several cellular processes including survival, proliferation and differentiation. In T cells, PKB is activated by growth factors, cytokines as well as TCR and CD28 stimulation. Previous studies performed with PKB transgenic (tg) mice, expressing a constitutively active version of PKB $\alpha$  (myrPKB) in the T cell lineage, revealed active PKB to influence TCR proximal signaling events. The aim of this study was to characterize the cross-talk of PKB with the transcription factor NFAT and the Src kinase Fyn at the biochemical and molecular level.

Expression of a hyperactive form of the phosphatase calcineurin ( $\Delta$ Cam) in thymocytes increased nuclear NFAT levels and caused a block in early thymocyte differentiation. Co-expression of PKB in  $\Delta$ Cam tg thymocytes reduced NFAT activity, induced Rag and TCR  $\beta$ -chain expression and abrogated the block in thymocyte differentiation. Rag2 promoter activity assays showed that NFATc1 as well as NFATc2 regulates the Rag2 promoter, NFAT factors thus being among the few transcription factors so far known to be involved in the regulation of *rag* expression in T cells. IL-2 promoter activity induced by NFAT was also down-modulated by active PKB. Furthermore, myrPKB enhanced the inhibition of NFAT activation in concert with the NFAT kinases PKA and GSK3 or the transcription factor Foxp3. Since recombinant PKB phosphorylated NFATc1 at (at least) two sites within the NFAT regulatory domain, NFAT could be a direct substrate of PKB. However, despite several mutations in GST-NFAT fusion proteins encompassing the regulatory domain, no single PKB site(s) could be elucidated, suggesting that a complex interplay of several residues is needed for NFAT phosphorylation by PKB.

Compared to wild type cells, peripheral myrPKB tg CD4<sup>+</sup> T cells showed enhanced proliferation after CD3 stimulation and in the presence of pharmacological Src kinase and MEK inhibitors. In addition, western blot analysis revealed enhanced Erk activity in myrPKB tg CD4<sup>+</sup> T cells and *in vitro* kinase assays (IVKs) showed increased Fyn activity in myrPKB tg CD4<sup>+</sup> T cells and thymocytes. By generating several GST-Fyn fusion proteins and mutagenesis of prospective PKB phosphorylation sites, a PKB phosphorylation site was identified in N-terminal Fyn, Fyn thus being a novel substrate of PKB *in vitro*. Furthermore, in transfected HEK 293T cells PKB and Fyn co-immunoprecipitated, supporting a direct interaction of PKB and Fyn *in vivo*. Interestingly, Fyn hyperactivity in PKB tg cells was not correlated with increased phosphorylation of the adapter molecule PAG at Y314, a known Fyn phosphorylation site and anchor for the recruitment of the kinase Csk, which inhibits Src kinase activity and, thereby, leads to the shut-down of T cell receptor signaling.

It is known that increased Fyn activity causes/coincides with T cell anergy. Interestingly, in the model of ionomycin induced anergy, myrPKB tg CD4<sup>+</sup> T cells were less susceptible to anergy induction. Whereas anergy, i.e. lack of proliferation after CD3 Ab restimulation, in wild type CD4<sup>+</sup> T cells correlated with enhanced Fyn activity, in comparison to untreated wild type cells, ionomycin treatment of myrPKB tg CD4<sup>+</sup> T cells did not enhance Fyn activity. Altogether the data reveal a novel interaction and impact of PKB on Fyn activity. PKB mediated changes in Fyn activity, possibly also resulting in altered interaction of Fyn with certain substrates, may be important in regulatory processes like anergy, as our initial results indicate. Finally, the cross-talk of PKB with Fyn, both known proto-oncogenes, could also be important for transformation and tumorigenesis.

Diplom-Biologe Thomas Drewes; Doktorarbeit mit dem Thema:

”Cross-talk of protein kinase B (PKB/Akt) with the transcription factor NFAT and the Src kinase Fyn”

### **Zusammenfassung**

Proteinkinase B (PKB), eine ubiquitär exprimierte Serin/Threonin-Kinase, hat zentralen Einfluss auf verschiedene zelluläre Prozesse, wie Überleben, Proliferation, Wachstum und Differenzierung. In T-Zellen erfolgt PKB-Aktivierung über Wachstumsfaktoren, Zytokine sowie TCR- und kostimulatorische CD28-Signale. Vorherige Arbeiten zur Rolle von PKB in transgenen (tg) Mäusen, die eine konstitutiv-aktive Form der PKB $\alpha$  (myrPKB) in der T-Zelllinie exprimieren, zeigten, dass aktive PKB proximale T-Zellrezeptor-Signale beeinflusst. In der vorliegenden Dissertationsarbeit sollte die Interaktion von PKB mit dem Transkriptionsfaktor NFAT und der Src Kinase Fyn auf biochemischer und molekularer Ebene untersucht werden.

Verstärkte Aktivität der Phosphatase Calcineurin ( $\Delta$ Cam) und damit einhergehende erhöhte nukleäre NFAT-Aktivität in frühen Thymozyten führte zu einem Differenzierungsblock der Thymozyten, der durch fehlende Rag- und TCR $\beta$ -Ketten-Expression bedingt ist. Koexpression von myrPKB in  $\Delta$ Cam transgenen Thymozyten verminderte die NFAT-Aktivierung, induzierte Rag-Expression und ermöglichte die Weiterdifferenzierung der Thymozyten. Es konnte diesbezüglich gezeigt werden, dass die Rag2-Promotoraktivität durch NFATc1 sowie NFATc2 reguliert wird, NFAT-Faktoren somit zu den wenigen bisher bekannten Transkriptionsfaktoren gehören, welche die Rag-Genexpression in T-Zellen steuern. NFAT-induzierte IL2-Promotoraktivität wurde durch myrPKB ebenfalls inhibiert und im Zusammenspiel mit den NFAT-Kinasen PKA und GSK3 sowie dem Transkriptionsfaktor Foxp3 steigerte myrPKB deren inhibitorischen Effekt auf die NFAT-Aktivierung. Eine direkte Regulation der NFAT-Aktivierung durch PKB erscheint möglich, da rekombinante PKB NFATc1 in der regulatorischen NFAT-Domäne an mindestens zwei Stellen *in vitro* phosphoryliert. Allerdings konnte trotz etlicher GST-NFATc1-Mutanten für potenzielle PKB-Phosphorylierungsstellen in der regulatorischen NFAT-Domäne keine „einzelne“ PKB-Stelle identifiziert werden. Nur bei Kombination mehrerer Mutationen wurde die NFAT-Phosphorylierung durch PKB unterbunden, was auf ein komplexes Zusammenspiel mehrerer Aminosäurereste für die NFAT-Phosphorylierung durch PKB hinweist.

MyrPKB tg CD4<sup>+</sup> T-Zellen zeigten gegenüber Wildtyp-Zellen eine verstärkte Proliferation nach TCR/CD3-Stimulation und eine deutlich erhöhte „Resistenz“ gegenüber pharmakologischen Src Kinase- und MEK-Inhibitoren. Dahingehend wurde in Western Blot-Analysen nach CD3/CD4-Stimulation eine deutlich erhöhte Erk-Aktivierung in myrPKB tg CD4<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen. *In vitro* kinase assays (IVKs) belegten, dass die Fyn-Aktivität,

d. h. Fyn-Autophosphorylierung an Y417 sowie Fyn-Transphosphorylierungsaktivität, in PKB tg CD4<sup>+</sup> T-Zellen erhöht ist. Anhand mehrerer Fyn-GST-Fusionsproteine und entsprechender Mutagenese wurde sodann im N-terminalen Bereich von Fyn eine PKB-Phosphorylierungsstelle identifiziert. Somit ist Fyn ein neues Substrat der PKB *in vitro*. Da in transfizierten HEK 293T-Zellen PKB und Fyn koimmunopräzipitiert werden konnten, scheint eine direkte Interaktion beider Kinasen *in vivo* gegeben.

Fyn-Hyperaktivität wurde auch in myrPKB tg Thymozyten nachgewiesen. Interessanterweise korreliert die erhöhte Fyn-Aktivität nicht mit vermehrter Phosphorylierung des Adaptermoleküls PAG an Tyrosin 314, welches durch Fyn phosphoryliert wird und sodann zur Rekrutierung der Kinase Csk führt, die wiederum Fyn/Lck inhibiert und derart zum Abschalten der T-Zellrezeptorsignalgebung führt. Analyse der *lipid raft* Fraktionen aktivierter Thymozyten zeigte in PKB tg Zellen eine deutlich erhöhte Menge an Y147 phosphorylierter aktiver Fyn, aber keine einhergehende erhöhte PAG Y314-Phosphorylierung. Erhöhte PKB-Signale führen daher nicht zu einer Sequestrierung von Fyn und PAG, fördern aber sehr wohl die Fyn-Aktivität, die aber nicht in die Negativregulation der TCR-Signalgebung über PAG-Csk einzufließen scheint.

Anerge T-Zellen sind areaktiv gegenüber TCR-Signalen und produzieren kein IL-2. T-Zell-Anergie wurde mit erhöhter Fyn-Aktivität korreliert. In dem durch Ionomycin-Behandlung induzierten Anergiesystem zeigten myrPKB tg CD4<sup>+</sup> T-Zellen eine deutlich „abgeschwächte“ Anergie, da sie im Gegensatz zu den entsprechenden Wildtyp-T-Zellen bei TCR/CD3-Restimulation wesentlich stärker proliferierten. Während anergisierte Wildtyp-T-Zellen im Vergleich zu den DMSO-behandelten Kontrollzellen eine höhere Fyn-Aktivität aufwiesen, im Einklang publizierter Daten, war die Fyn-Aktivität in Ionomycin-behandelten myrPKB tg T-Zellen nicht gesteigert. Insgesamt zeigen die gewonnenen Daten, dass erhöhte PKB-Signale die Fyn-Aktivität wesentlich beeinflussen und PKB über die Regulation von Fyn beim Abschalten ungewollter T-Zellaktivierung, z. B. bei der Anergie, eine zentrale Rolle spielen könnte. Der aufgezeigte *cross-talk* von PKB mit Fyn, zwei ausgewiesenen Protoonkogenen, könnte auch bei der Tumorbildung von entscheidender Bedeutung sein.