

Philipp Lohneis

Dr. med.

## **L-Plastin in humanen T-Lymphozyten: Calmodulin-abhängige Verlagerung an die Immunologische Synapse**

Geboren am 22.02.1981 in Gräfelfing

Staatsexamen am 19.06.2008 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Immunologie

Doktormutter: Prof. Dr. med. Y. Samstag

Die Aktivierung von T-Lymphozyten stellt einen zentralen Mechanismus zur Ausbildung der adaptiven Immunantwort dar. Das Aktinzytoskelett der T-Zellen ist auf verschiedene Weise an der Aktivierung beteiligt. Es bildet einerseits ein stabiles Rückgrat, an dem entlang Rezeptorbewegungen stattfinden, andererseits erweist es sich durch schnellen Ab- und Umbau als sehr flexibel. Nur mit einem intakten Aktinzytoskelett kann die Immunologische Synapse (IS), eine hochgradig organisierte Kontaktzone zwischen APZ und T-Zelle, ausgebildet werden.

Das aktinbündelnde, leukozytäre Protein L-Plastin wird ebenso wie Aktin an die IS verlagert und bewirkt dort wahrscheinlich eine Stabilisierung der IS. Der molekulare Mechanismus der L-Plastin Verlagerung ist bislang ungeklärt. Denkbar wäre eine Regulation der L-Plastin Verlagerung über verschiedene funktionelle Domänen des Proteins, die in der 10kDa großen Kopfdomäne lokalisiert sind; namentlich zwei Kalziumbindestellen vom EF-Hand Typ, eine Phosphorylierungsstelle, sowie eine putative Calmodulinbindestelle. Um diese Mechanismen zu untersuchen wurde in peripheres Blut T-Lymphozyten (PB-T) gesunder Spender über Nukleofektion cDNA, die für verschiedene L-Plastin Konstrukte codiert, eingebracht. Die Konstrukte wiesen Deletionen der verschiedenen funktionellen Domänen des L-Plastins auf und waren an EGFP gekoppelt.

Es stellte sich heraus, dass die Deletion der Calmodulinbindedomäne eine signifikante Verringerung der L-Plastin Verlagerung an die IS verursacht. Weitere Experimente mit den Calmodulininhibitoren W7 und TFP bestätigten eine Abhängigkeit der Verlagerung von

Calmodulin. Des Weiteren konnte durch die Calmodulininhibitoren eine Inhibition der Aktin-, sowie der LFA-1-Verlagerung gezeigt werden. Auf den cSMAC Marker PKCtheta hatten sie keinen Einfluss. In der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie zeigte sich eine Kolo-kalisation von L-Plastin und Calmodulin an der IS. Dies macht eine direkte Interaktion der beiden Proteine wahrscheinlich. Schließlich zeigten Time-Lapse Video-Mikroskopie- Experimente, dass die Bindung von Calmodulin an L-Plastin notwendig ist, um die Verlagerung von L-Plastin an die IS zu stabilisieren; eine initiale Verlagerung findet dagegen auch bei der L-Plastin Mutante statt, die eine Deletion der Calmodulinbindestelle aufweist.

Zusammenfassend ergibt sich folgendes Modell: L-Plastin verlagert sich bei Antigenerkennung zusammen mit dem Aktinzytoskelett an die IS. Die Kalziumfreisetzung, in Folge der T-Zell Aktivierung, aktiviert Calmodulin. Das so aktivierte Calmodulin bindet an L-Plastin und stabilisiert dessen Lokalisation an der IS. Kann Calmodulin nicht an L-Plastin binden, kommt es zur schnellen Auflösung der L-Plastin Cluster an der Kontaktzone. Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit wurde erstmals gezeigt, dass Calmodulin an der Bildung bzw. Stabilisierung der IS beteiligt ist.