

5. SUMMARY

This study has identified cofilin, an actin binding protein, as a control element in the reorganization of the actin cytoskeleton which is highly relevant for T lymphocyte activation. Cofilin is regulated in its activity by reversible phosphorylation which is inducible by stimulation through accessory receptors such as CD2 and CD28.

First it could be demonstrated that accessory receptor triggering induces the transient association of cofilin with the actin cytoskeleton and that only the dephosphorylated form of cofilin possesses the capacity to bind cytoskeletal actin *in vivo*. PI3-kinase inhibitors block both the dephosphorylation of cofilin and its association with the actin cytoskeleton. Importantly, cofilin, actin, PI3-kinase and one of its substrates, namely phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PtdIns(4,5)P₂) which can bind to cofilin, co-localize within CD2-receptor caps.

The cofilin/F-actin interaction has been identified as a crucial regulatory element for receptor cap formation and the strength of signal transduction. To this end, appropriately designed cell permeable non-toxic peptides that are homologous to actin binding motifs of the human cofilin sequence were introduced into untransformed human peripheral blood T lymphocytes. These peptides competitively and dose dependently inhibit the activation induced interaction of cofilin with the actin cytoskeleton *in vivo*. By this approach it was possible to study, for the first time, the functional consequences of this interaction in immunocompetent T cells. The present data demonstrate that inhibition of the actin/cofilin interaction in human T lymphocytes by means of these cofilin derived peptides abolishes receptor cap formation and strongly modulates functional T cell responses such as T cell proliferation, interleukin-2 production, cell surface expression of CD69, γ IFN production, and CD95L expression. Importantly, receptor independent activation by PMA and calcium ionophore circumvents these peptide produced inhibitory effects on lymphocyte

stimulation and places the cofilin/actin interaction to a proximal step in the cascade of signaling events following T cell activation via surface signals.

The present results are novel since as yet no information existed regarding the molecular elements which link cell surface receptor stimulation directly to the resulting reorganization of the actin cytoskeleton.

ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, dass Cofilin, ein aktin-bindendes Protein, als Kontrollelement bei der Reorganisation des Aktinzytoskeletts fungiert und damit von besonderer Bedeutung für die Aktivierung von T-Lymphozyten ist. Cofilin wird in seiner Aktivität durch reversible Phosphorylierung reguliert, die induzierbar ist über eine Stimulation durch akzessorische Rezeptoren wie CD2 und CD28.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation über akzessorische Rezeptoren zu einer transienten Assoziation von Cofilin mit dem Aktinzytoskelett führt und dass nur die dephosphorylierte Form von Cofilin die Fähigkeit besitzt, *in vivo* an das Aktinzytoskelett zu binden. Inhibitoren der PI3-Kinase blockieren sowohl die Dephosphorylierung von Cofilin, als auch seine Assoziation mit dem Aktinzytoskelett. Hervorzuheben ist, dass Cofilin, zusammen mit Aktin, PI3-Kinase und einem ihrer Substrate, Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat (PtdIns(4,5)P₂), welches an Cofilin binden kann, mit CD2-Rezeptor-"Caps" kolokalisiert.

Die Cofilin/F-Aktin-Interaktion konnte als wesentliches regulatorisches Element für die Rezeptor-"Cap"-bildung und die Stärke der Signalübertragung identifiziert werden. Hierzu wurden maßgeschneiderte zellpermeable Peptide, welche homolog zu aktin-bindenden Motiven der humanen Cofilin-Sequenz sind, in nicht-transformierte humane periphere T-Lymphozyten eingeschleust. Diese Peptide hemmen kompetitiv und dosisabhängig die durch Aktivierung induzierte Interaktion von Cofilin mit dem Aktinzytoskelett *in vivo*. Dieser Ansatz ermöglichte erstmals die Untersuchung funktioneller Konsequenzen dieser Interaktion in immunkompetenten T-Zellen. Die vorgelegten Ergebnisse zeigen, dass die Blockierung der Interaktion von Cofilin mit dem Aktinzytoskelett in humanen T-Zellen mittels von Cofilin abgeleiteter Peptide die Rezeptor-"Cap"-bildung verhindert, sowie zu einer deutlichen Modulation funktioneller T-Zell-Antworten, wie T-Zellproliferation, Interleukin-2-Produktion, Zelloberflächenexpression von CD69, γ IFN-Produktion und Expression von CD95L führt. Hervorzuheben ist, dass rezeptor-unabhängige Aktivierung

ber PMA und Calciumionophor diese durch Peptide verursachten inhibitorischen Effekte umgeht und die Cofilin/Aktin-Interaktion somit als einen proximalen Schritt in der ber Oberflaechenmolekule vermittelten Signalbertragungskaskade in T-Zellen identifiziert.

Die vorgestellten Ergebnisse sind neu, da bisher keine Informationen bezueglich der molekularen Elemente existierten, welche eine Stimulation von Zelloberflaechenrezeptoren direkt mit der Reorganisation des Aktinzytoskeletts verbinden.