

Aus dem
CharitéCentrum für Innere Medizin mit Gastroenterologie und Nephrologie
Medizinische Klinik für Gastroenterologie, Infektiologie u. Rheumatologie
Direktor: Prof. Dr. med. Martin Zeitz

Habilitationsschrift

Bedeutung und Regulation von Selektin-Liganden
auf CD4⁺ T-Zellen

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Innere Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Uta Annett Syrbe

Berlin

Eingereicht: September 2012
Dekanin: Prof. Dr. med. Annette Grüters-Kieslich
1. Gutachter: Prof. Dr. Dietmar Vestweber
2. Gutachter: Prof. Dr. Hendrik Schulze-Koops

Der vorliegenden kumulativen Habilitationsschrift liegen folgende 6 Arbeiten zugrunde:

Kretschmer, U., Bonhagen, K., Debes, G.F., Mittrucker, H.W., Erb, K.J., Liesenfeld, O., Zaiss, D., Kamradt, T., Syrbe, U., Hamann, A. Expression of selectin ligands on murine effector and IL-10-producing CD4(+) T cells from non-infected and infected tissues. *Eur J Immunol*. 2004 Nov;34(11):3070-81.

Syrbe, U., Jennrich, S., Schottelius, A., Richter, A., Radbruch, A., Hamann, A. Differential regulation of P-selectin ligand expression in naive versus memory CD4+ T cells: evidence for epigenetic regulation of involved glycosyltransferase genes. *Blood*. 2004 Nov 15;104(10):3243-3248.

Siegmund, K., Feuerer, M., Siewert, C., Ghani, S., Haubold, U., Dankof, A., Krenn, V., Schon, M. P., Scheffold, A., Lowe, J. B., Hamann, A., Syrbe, U., Huehn, J.. Migration matters: regulatory T cell compartmentalization determines suppressive activity in vivo. *Blood*. 2005 Nov 1;106(9):3097-104.

Syrbe U., Hoffmann, U., Schlawe, K., Liesenfeld, O., Erb, K., Hamann, A. Microenvironment-dependent requirement of STAT4 for the induction of P-selectin ligands and effector cytokines on CD4+ T cells in healthy and parasite-infected mice. *J Immunol*. 2006 Dec 1;177(11):7673-9

Jennrich, S., Ratsch, B. A., Hamann A., Syrbe, U. Long-term commitment to Inflammation-Seeking Homing in CD4+ Effector Cells. *J Immunol*. 2007 Jun 15;178(12):8073-80.

Doebes, C., Siegmund, K., Loddenkemper, C., Lowe, J.B., Issekutz, A.C., Hamann, A., Huehn, J. Syrbe, U. Cellular players and role of selectin ligands in leukocyte recruitment in a T cell-initiated DTH reaction. *Am J Pathol*. 2008 Oct;173(4):1067-76.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	5
1.1. DIFFERENZIERUNG VON CD4+T-ZELLEN IN FUNKTIONELL DISTINKTE T-ZELLSUBSETS.....	5
1.2. REGULATION DER T-ZELL-DIFFERENZIERUNG.....	7
1.3. STABILISIERUNG DES ZYTOKIN-GEDÄCHTNISSES.....	8
1.4. DIE ADHÄSIONSKASKADE ALS BASIS DER LEUKOZYTEN- UND LYMPHOZYTENMIGRATION.....	9
1.5. DIFFERENZIERUNGS-ABHÄNGIGE REGULATION DES CD4+T-ZELL-HOMINGS.....	10
1.6. REGULATION DER ADHÄSIONSMOLEKÜLEXPRESSION AUF CD4+T-ZELLEN.....	11
1.7. BEDEUTUNG UND STRUKTUR DER P- SELEKTIN-LIGANDEN.....	14
1.8. REGULATION DER P-LIG EXPRESSION IN CD4+ T-ZELLEN.....	15
1.9. FRAGESTELLUNG DER ARBEIT.....	16
2. EIGENE ARBEITEN	18
2.1. EXPRESSION VON SELEKTIN-LIGANDEN AUF CD4+T-ZELLEN IN VIVO.....	18
2.2. BEDEUTUNG VON STAT4 FÜR DIE INDUKTION VON P-LIG UND EFFEKTORZYTOKINEN IN CD4+T-ZELLEN IN GESUNDEN UND MIT PARASITEN-INFIZIERTEN MÄUSEN.....	31
2.3. BEDEUTUNG DER SELEKTIN-LIGANDEN FÜR CD4+EFFEKTORZELLEN IN VIVO.....	39
2.4. ENTSCHEIDENDE ROLLE DER MIGRATION: DIE KOMPARTIMENTALISIERUNG REGULATORISCHER T- ZELLSUBSETS BESTIMMT IHRE SUPPRESSIVE AKTIVITÄT IN VIVO.....	50
2.5. DIFFERENTIELLE REGULATION DER P-SELEKTIN-LIGAND-EXPRESSION IN NAIVEN UND MEMORY CD4+T-ZELLEN: EVIDENZ FÜR EPIGENETISCHE REGULATION DER INVOLVIERTEN GLYKOSYLTRANSFERASEN.....	59
2.6. CD4+T-EFFEKTORZELLEN WERDEN LANGFRISTIG FÜR ENTZÜNDUNGSSPEZIFISCHES HOMING GEPRÄGT.....	66
3. DISKUSSION	75
3.1. EXPRESSION VON E- UND P-SELEKTIN-LIGANDEN AUF MULTIPLLEN EFFEKTORZELL- UND TREG-SUBSETS IN VIVO.....	75
3.2. ROLLE VON STAT4 FÜR DIE P-LIG-EXPRESSION AUF CD4+T-ZELLEN IN VIVO.....	78
3.3. FUNKTIONELLE BEDEUTUNG DER SELEKTIN-LIGANDEN AUF CD4+ EFFEKTORZELLEN IN VIVO.....	80
3.4. BEDEUTUNG DER SELEKTIN-LIGANDEN FÜR DIE IN VIVO FUNKTION DISTINKTER TREG-SUBSETS ..	83
3.5. BEDEUTUNG EPIGENETISCHER MECHANISMEN FÜR DIE REGULATION DER P-LIG-EXPRESSION IN CD4+T-ZELLEN.....	85
3.6. STABILITÄT DER P-LIG EXPRESSION AUF CD4+T-ZELLEN.....	87
4. ZUSAMMENFASSUNG	89
5. REFERENZEN	90
6. DANKSAGUNG	98
7. ERKLÄRUNG	99

Abkürzungen

Ag	Antigen
β 1,4GalT-I	Galaktosyltransferase-I
C2GlcNAcT-I	Core-2 β 1,6-Glykosaminyltransferase-I
DC	dendritische Zellen
DTH	Delayed type hypersensitivity reaction
E-Lig	E-Selektin-Ligand
Foxp3	Forkhead box P3
FucT	α 1,3-Fukosyltransferase
HEV	High Endothelial Venules
IFN γ	Interferon γ
IL	Interleukin
iTreg	induzierte regulatorische T-Zellen
MAdCAM-1	Mucosal addressin cell adhesion molecule
nTreg	natürliche regulatorische T-Zellen
P-Lig	P-Selektin-Liganden
PNAd	Peripheral Node Addressin
PSGL-1	P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1
STAT	Signal transducer and activator of transcription
Th-Zellen	T-Helferzellen
Treg	regulatorische T-Zellen
TZR	T-Zell-Rezeptor

1. Einleitung

1.1. *Differenzierung von CD4+T-Zellen in funktionell distinkte T-Zellsubsets*

CD4+T-Zellen sind Teil des adaptiven Immunsystems. Sie haben ihren Ursprung in den hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarkes. Diese differenzieren u. a. in lymphoide Vorläuferzellen, die vom Knochenmark über das Blut in den Thymus wandern. Hier erfolgt die Reifung der T-Zellen in CD4+ und CD8+T-Zellen und die Deletion autoreaktiver T-Zellen (zentrale Toleranz). Außerdem werden im Thymus die auf die Suppression und Regulation von Immunreaktionen spezialisierten regulatorischen T- Zellen (Treg) induziert. Diese im Thymus induzierten Treg werden als „natürliche“ oder nTreg bezeichnet; sie regulieren Immunantworten gegen Autoantigene (1). Die im Thymus gereiften T-Zellen werden in das Blut freigesetzt und erscheinen dort als naive, d.h. Antigen-unerfahrene, konventionelle T-Zellen oder als nTregs (Abb. 1).

Während die nTregs schon in der Lage sind ohne weitere funktionelle Differenzierung immunregulatorisch zu wirken, durchlaufen die konventionellen naiven T-Zellen eine weitere, durch Antigen-Kontakt ausgelöste Differenzierung. Im Rahmen der Antigen-Erkennung kommt es zur Ligation des hochspezifischen T-Zellrezeptor (TZR), was, moduliert durch kostimulatorische Moleküle und Zytokine, zur Aktivierung der naiven T-Zellen führt. Daraufhin produzieren die naiven T-Zellen Interleukin(IL)-2, einen autokrinen Wachstumsfaktor, und proliferieren. Zusätzlich kommt es in Abhängigkeit von Kostimulation und Zytokinen zu einer Differenzierung in funktionell distinkte T-Helferzell-Subsets (2). Daneben können sich aus den naiven T-Zellen auch sogenannte „induzierte“ Tregs (iTregs) entwickeln, die vorwiegend in die Regulation von Immunantworten gegen exogene Antigene involviert sind (3).

T-Helfer(Th)-Zellen erlangen im Zuge der Differenzierung die Fähigkeit, bestimmte, sogenannte Effektorzytokine innerhalb von Stunden nach wiederholter Stimulation zu produzieren, was sie funktionell von naiven T-Zellen unterscheidet. Mossman und Coffman beobachteten 1986 erstmals, dass einzelne T-Zell-Klone dabei entweder Interferon(IFN) γ oder IL-4, IL-5 und IL-13 produzieren und bezeichneten die IFN γ -produzierenden CD4+T-Zellen als T-Helfer-1-Zellen und IL-4-, IL-5- und IL-13-Produzenten als Th2-Zellen (4). Die Relevanz der funktionellen Differenzierung, d.h. die Bedeutung von Th1-Zellen für die Abwehr intrazellulärer Erreger und die protektive Funktion von Th2-Zellen in Wurminfektionen, wurde initial durch Locksley und Kollegen gezeigt (5) und später durch viele weitere Arbeiten belegt.

In den letzten Jahren wurden weitere Th-Subsets identifiziert, insbesondere die Th17-Zellen (6). Diese T-Zellen produzieren IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 und IL-26. Th17-Zellen tragen zur Abwehr von extrazellulären Bakterien und Pilzen, besonders in Organen mit Barrierefunktion, bei.

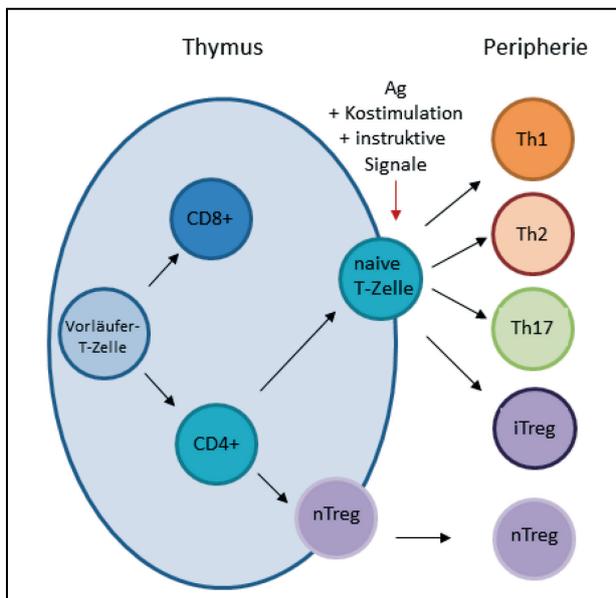


Abb. 1: Differenzierung der CD4+ T-Zellen: Aus Vorläuferzellen entwickeln sich im Thymus CD4+ und CD8+T-Zellen. Aus den CD4+T-Zellen gehen naive T-Zellen und nTregs hervor, die den Thymus verlassen. In der Peripherie differenzieren sich naive T-Zellen unter dem Einfluss von Antigen (Ag), Kostimulation und instruktiven Signalen in distinkte Effektorzellsubsets oder iTregs.

Im Gegensatz zu den genannten protektiven Funktionen können unkontrollierte T-Helferzellantworten zu allergischen Erkrankungen (Th2) und Autoimmunerkrankungen (Th1 und Th17) beitragen (6-8).

1.2. Regulation der T-Zell-Differenzierung

Die von den naiven T-Zellen ausgehende Differenzierung in mindestens vier funktionell distinkte T-Zell-Subsets wird instruiert und moduliert durch die Stärke des TZR-Stimulus, kostimulatorische Signale und Zytokine (7). Diese Signale führen zu Zell-intrinsischen Veränderungen wie der Induktion s. g. Mastertranskriptionsfaktoren, die den Phänotyp der sich entwickelnden T-Zellen bestimmen. Besonders gut ist der Einfluss bestimmter Zytokine auf die Instruktion und Differenzierung der T-Zellen charakterisiert. IL-12 ist das wesentliche instruktive Signal für die Th1-Differenzierung (7). Die IL-12-Wirkung wird dabei vermittelt durch den IL-12Rezeptor beta2 und durch das Signaltransduktionsmolekül „Signal transducer and activator of transcription“(STAT)4. Ligation des IL-12 Rezeptors führt zur Bindung und Phosphorylierung von STAT4, was dessen Dimerisierung und folgende Translokation in den Zellkern bewirkt. Im Zellkern reguliert es die Transkription von Zielgenen. Ein Zielgen von STAT4 ist der Transkriptionsfaktor T-bet, der als Master-Transkriptionsfaktor der Th1-Zellen u. a. die Expression von $IFN\gamma$ kontrolliert (9). So führt die ektope Expression von T-bet in IL-4-stimulierten T-Zellen in Abwesenheit von IL-12 zu einer Induktion von $IFN\gamma$ und einer Abschaltung der IL-4-Produktion. Entsprechend dieser fundamentalen Bedeutung von T-bet für die Th1-Differenzierung sind T-bet-defiziente Mäuse nicht in der Lage, Infektionen zu bekämpfen, deren Abwehr eine suffiziente Th1-Immunantwort benötigen (10). Schulz et al. konnten zeigen, dass IL-12 und $IFN\gamma$ bei der Instruktion des Th1-Phänotypes kooperieren und dass insbesondere die $IFN\gamma$ -abhängige Induktion der IL-12Rezeptor beta2-Expression nach Beendigung des TZR-Signals essentiell für die dauerhafte Prägung der Th1-Zellen ist (11). Im Gegensatz dazu ist IL-4 das wesentliche Th2-Instruktionssignal, welches über STAT6 den Mastertranskriptionsfaktor der Th2-

Zellen, GATA3, induziert. GATA3 kontrolliert in Kooperation mit c-Maf die IL-4-Produktion (12).

Th17-Zellen werden in Gegenwart von IL-23 und IL-6, die den Transkriptionsfaktor STAT3 aktivieren, generiert (13). Dabei wird ROR γ t, der Mastertranskriptionsfaktor der Th17-Zellen, induziert.

IL-2 ist essentiell für die Generierung von Tregs. STAT5, durch IL-2 aktiviert, kontrolliert die Expression von Foxp3 (Forkhead box P3), welches der Mastertranskriptionsfaktor der regulatorischen T-Zellen ist, der wesentliche suppressorische Funktionen der Tregs reguliert. Foxp3 kann außerdem an ROR γ t binden und die Entwicklung von Th17-Zellen hemmen (14).

1.3. Stabilisierung des Zytokin-Gedächtnisses

Während IL-12 als instruierendes Signal für die primäre Induktion von IFN γ in Th1-Zellen nötig ist, erfolgt die durch wiederholte Antigen-Stimulation von Effektorzellen ausgelöste IFN γ -Produktion unabhängig von IL-12 (15). Dies wird einerseits durch die Induktion und permanente Expression der Master-Transkriptionsfaktoren andererseits durch Gen-spezifische Modifikationen vermittelt. Diese Zell-intrinsischen Modifikationen werden während der initialen Aktivierung induziert und bei Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben (16). T-Effektorzellen entwickeln so ein Gedächtnis für den initial induzierten Zytokinphänotyp – ein Phänomen, das als Zytokin-Gedächtnis bezeichnet wird.

Arbeiten der letzten Jahre zeigen, dass insbesondere epigenetische Mechanismen an der Etablierung des Zytokingedächtnisses beteiligt sind (16). Diese epigenetischen Modifikationen regulieren die Zugänglichkeit von Genbereichen und beeinflussen darüber die Transkription. Sie spielen insbesondere in der Embryogenese eine wichtige Rolle und kontrollieren die Differenzierung von

Gewebe und Organen (17). Epigenetische Mechanismen im engeren Sinne umfassen die differenzielle Methylierung von CpG's und die posttranslationale Modifikation von Histonen, welche die DNA als Hüll-Proteine umgeben (16). Erste Evidenzen für die Beteiligung epigenetischer Mechanismen an der peripheren T-Zell-Differenzierung kamen vor Jahren von Bird et al. (18). Sie, und später weitere Gruppen, konnten zeigen, dass die Akquisition von Effektorfunktionen, nicht aber die Produktion von IL-2, an die Zellteilung bzw. den Eintritt der T-Zellen in den Zellzyklus gebunden ist (18, 19). Da der Zellzyklus als Zeitfenster gilt, in dem epigenetische Modifikationen etabliert werden, gaben diese Arbeiten erste Evidenz für eine Beteiligung epigenetischer Mechanismen an der T-Helferzell-Differenzierung.

1.4. Die Adhäsionskaskade als Basis der Leukozyten- und Lymphozytenmigration

Leukozyten einschließlich der Lymphozyten sind die mobilsten Zellen des Körpers. Insbesondere die Lymphozyten rezirkulieren ein- bis zweimal pro Tag zwischen dem Blut und Geweben, wie z.B. lymphoiden Organen oder anderen peripheren Geweben (20). Die Rekrutierung von T-Zellen aus dem Blut in diese Gewebe erfolgt dabei nicht zufällig sondern ist ein mehrstufiger Adhäsions- und Transmigrationsprozess (Abb.2), der durch Adhäsionsmoleküle und chemotaktische Substanzen, die Chemokine, kontrolliert wird (21-24). Dabei werden die zirkulierenden Zellen im ersten Schritt durch die Interaktion von Selektinen mit den entsprechenden Selektin-Liganden verlangsamt. Dies ermöglicht die Interaktion der auf dem Endothel präsentierten Chemokine mit den auf den Leukozyten exprimierten Chemokin-Rezeptoren. Die Ligation der Chemokin-Rezeptoren führt zu einem G-Protein-abhängigen intrazellulären Signal, was zur Aktivierung von Integrinen führt. Diese aktivierten Integrine können nun mit den Bindungspartnern auf dem Endothel interagieren und

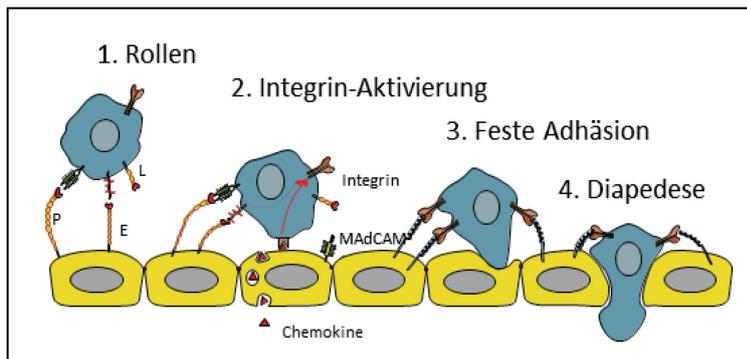


Abb.2: Darstellung der Mehrschritt-Adhäsionskaskade adaptiert an Ebnet et al. (24). Leukozyten werden durch Selektine (E, P, L) verlangsamt und rollen, was die Interaktion von Chemokinrezeptoren mit auf dem Endothel präsentierten Chemokinen ermöglicht.

Dies führt zur Integrin-Aktivierung, was deren Bindung an Integrin-Rezeptoren wie MAdCAM ermöglicht und zur festen Adhäsion und Diapedese führt.

eine feste Adhäsion mit folgender Transmigration über den parazellulären oder auch transzellulären Weg ermöglichen. Ähnlich dem Schlüssel-Schloss-Prinzip der Antigenerkennung müssen die auf dem Endothel exprimierten Adhäsionsmoleküle von den zirkulierenden Zellen erkannt werden – Defizienz oder Fehlen nur eines Moleküls kann die Rekrutierung verhindern.

1.5. Differenzierungs-abhängige Regulation des CD4+T-Zell-Homings

In vivo bestehen deutliche Unterschiede im Rezirkulationsverhalten der einzelnen T-Zellsubsets. So rezirkulieren naive CD4+T-Zellen überwiegend durch die Lymphknoten während Antigen-erfahrene Effektor/Memory-T-Zellen durch die Milz und periphere, insbesondere auch entzündete Gewebe rezirkulieren (21, 25). Naive T-Zellen sind auf eine Präsentation von Antigenen durch professionelle Antigen-präsentierende Zellen angewiesen. Sie patrouillieren daher durch die Lymphknoten, in denen dendritische Zellen (DC) als professionelle Antigen-präsentierende Zellen Antigene, die sie in peripheren Geweben aufgenommen haben, präsentieren. Der Lymphknoten ist somit der zentrale Ort der primären Immunantwort (26). Trifft eine naive T-Zelle im Lymphknoten auf ihr spezifisches Antigen, kommt es zur Aktivierung, Proliferation und Differenzierung in Effektorzellen. Diese verlassen, ähnlich den nicht-aktivierten naiven T-Zellen, den Lymphknoten über die efferenten Lymphgefäße zur nächstgelegenen Lymphknotenetage und werden letztlich über

den *Dc. thoracicus* wieder der Blutzirkulation zugeführt (21). Naive T-Zellen rezirkulieren wieder durch die Lymphknoten, während die Effektorzellen, deren Effektorfunktionen auf die direkte Abwehr von Krankheitserregern gerichtet sind, in periphere, nicht-lymphoide Organe wie Lunge, Leber, Haut oder Darm, d.h. potenzielle Eintrittspforten von Erregern, einwandern können (Abb. 3). Die Effektorzellen werden entweder Gewebe-resident oder wandern über die afferenten Lymphgefäße in die drainierenden Lymphknoten und erreichen die Blutzirkulation wie

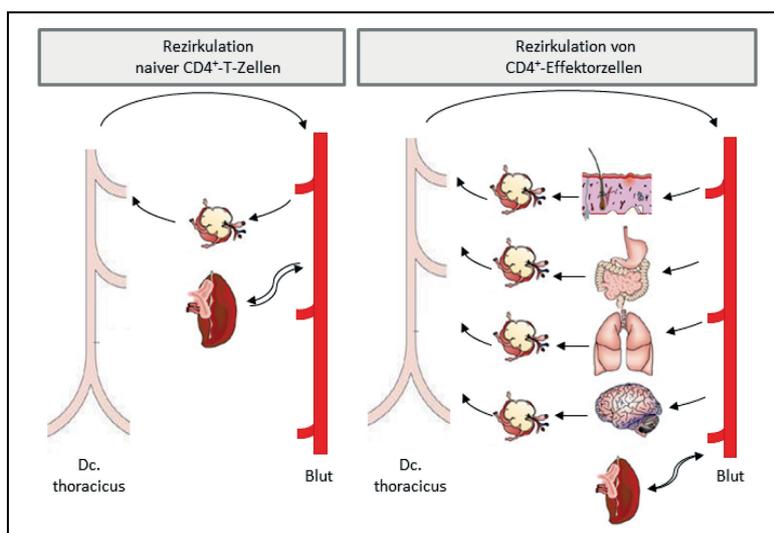


Abb. 3: Rezirkulation naiver und CD4⁺Effektorzellen. Naive T-Zellen rezirkulieren durch die Lymphknoten und die Milz. Effektorzellen wandern in periphere Gewebe ein und erreichen die drainierenden Lymphknoten über die efferente Lymphe.

die naiven T-Zellen über den *Dc. thoracicus*. Dementsprechend findet man in entzündeten Geweben nahezu ausschließlich T-Lymphozyten vom Effektor/Memory-Phänotyp (27, 28). Während das Homingverhalten der naiven T-Zellen relativ homogen ist, ist das Wanderungsverhalten der Effektorzellen eher heterogen und wird durch Entzündungs- und Umgebungsfaktoren bestimmt.

Somit stellt das zentrale Homing der naiven T-Zellen und das periphere Homing von Effektor/Memory-T-Zellen ein der Funktion angepasstes Lokalisationsverhalten dar. Basis ist die differentielle Expression von Adhäsionsmolekülen, welche die Migration der Leukozyten einschließlich der T-Lymphozyten kontrollieren (21, 27-29).

1.6. *Regulation der Adhäsionsmolekülexpression auf CD4+T-Zellen*

Naive T-Zellen sind gekennzeichnet durch die Expression von L-Selektin (CD62L) und CCR7 (21). L-Selektin fungiert als Ligand für das Peripheral Node Addressin (PNAd), während CCR7 die Chemokine CCL19 und CCL21 bindet (26). PNAd als auch CCL19 und CCL21 werden auf den Endothelzellen der „High Endothelial Venules“ (HEV) der Lymphknoten exprimiert bzw. präsentiert und kontrollieren die Rekrutierung der naiven T-Zellen in die Lymphknoten (30-32).

Im Zuge der Differenzierung in Effektorzellen kommt es, korrespondierend zum peripheren Homing der Effektorzellen, einerseits zur Herunterregulation von L-Selektin und CCR7 und andererseits zur Induktion peripherer Homingrezeptoren (33). Die Expression der peripheren Homingrezeptoren wird durch inflammatorische Stimuli und Milieufaktoren beeinflusst. So beeinflussen polarisierende Zytokine und die induzierten Mastertranskriptionsfaktoren nicht nur die Expression von Effektorfunktionen sondern z. T. auch das Muster induzierter Homingrezeptoren. Beispielsweise wird eine präferenzielle Expression von CCR5 und CXCR3 auf Th1-Zellen beobachtet, während Th2-Zellen präferenziell CCR4 und den Prostaglandin-Rezeptor DP1(auch CRTH2 genannt) exprimieren (34). CCR6 wird vor allem auf Th17-Zellen aber auch auf Tregs gefunden (35). Teilweise wird die Expression der Chemokinrezeptoren direkt durch die Mastertranskriptionsfaktoren kontrolliert. So führt die ektopische Expression von T-bet zur Induktion von CXCR3 (36), während GATA3 die Expression von CCR4 kontrolliert (37). ROR γ t scheint an der Expression von CCR6 beteiligt zu sein, da Überexpression von ROR γ t nicht nur IL-17 sondern auch die Expression von CCR6 induziert (38). IFN γ und IL-4 führen außerdem zur Induktion der jeweiligen Liganden im entzündeten Gewebe, was zu einer Amplifikation der Rekrutierung von Effektorzellen des jeweiligen Phänotyps und

damit der Entzündungsreaktion führt (34). Die polarisationsabhängige Induktion von Homingrezeptoren ist schematisch in Abb. 4 dargestellt.

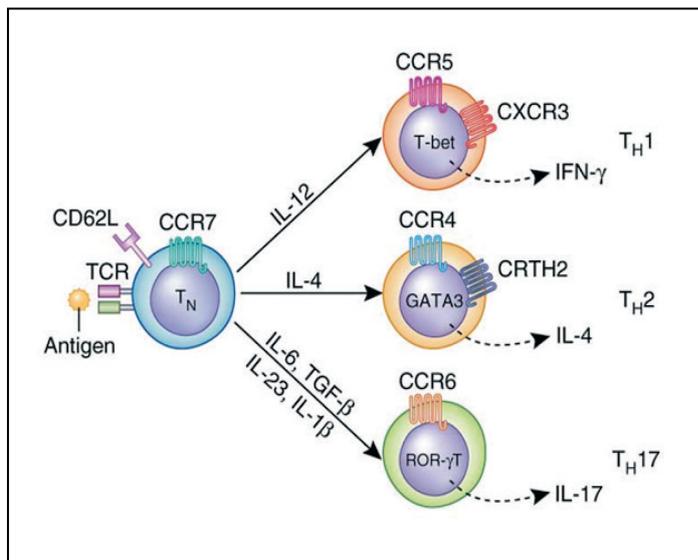


Abb. 4: Polarisationsabhängige Regulation von Homingrezeptoren: Naive T-Zellen (T_N) exprimieren CD62L und CCR7, welche im Zuge der Differenzierung in Effektorzellen herunterreguliert werden. Unter der Kontrolle der Mastertranskriptionsfaktoren werden Subset-spezifische Chemokinrezeptoren induziert. Quelle: Islam et al. (39)

Unabhängig von der polarisationsabhängigen Induktion von Homingrezeptoren entwickeln Effektorzellen gewebespezifische Homingeigenschaften (21). Da Erreger häufig distinkte Eintrittspforten nutzen, geht man davon aus, dass die gezielte Rekrutierung von Effektorzellen in das Gewebe des primären Antigen-Kontaktes, die Effizienz der Primärantwort und den Schutz vor einer Sekundärinfektion erhöht. Am besten sind bisher das Haut- und das Darm-spezifische Homingsystem charakterisiert. An der Rekrutierung von T-Zellen in die Haut ist das auf dem Endothel exprimierte E-Selektin, meist in Kooperation mit P-Selektin, sowie bestimmte Chemokine wie CCL17, CCL22 und CCL1 beteiligt (40). Der Haut-Tropismus von T-Zellen wird somit über die Expression der entsprechenden Liganden, d.h. E- und/oder P-Selektin-Liganden (E- und P-Lig) sowie CCR4, CCR8 oder CCR10 reguliert (Abb. 6). Im Gegensatz dazu werden auf dem Endothel des Darmes „Mucosal addressin cell adhesion molecule (MAdCAM)-1 und CCL25 exprimiert bzw. präsentiert; dementsprechend reguliert die Expression des Integrins $\alpha 4\beta 7$, welches mit MAdCAM-1 interagiert, und des Chemokinrezeptors CCR9 den Zugang zu mukosalem Gewebe (41). Die Induktion der topografischen Homing-

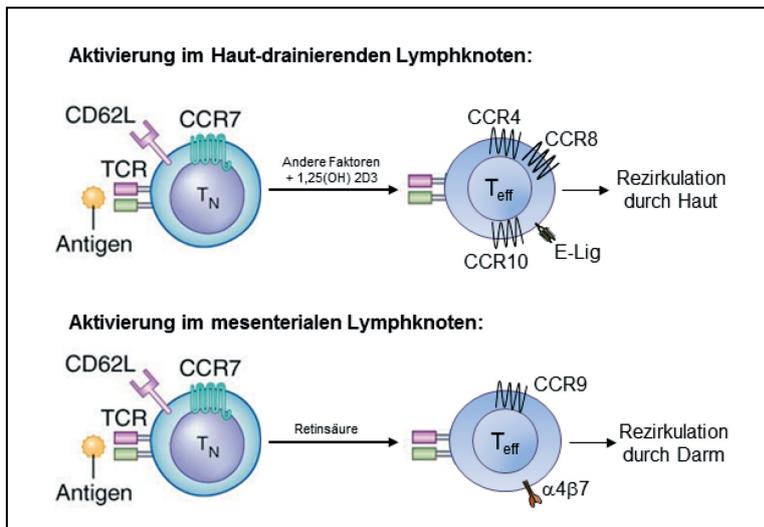


Abb. 6: Regulation des topografischen Homings von CD4+ T-Zellen: Nach Aktivierung naiver T-Zellen (T_N) kommt es zur Herabregulation von CCR7 und CD62L während in Abhängigkeit vom prägenden Organ unterschiedliche Chemokinrezeptoren und Homingmoleküle auf den Effektorzellen (T_{eff}) induziert werden.

eigenschaften erfolgt in den Haut- bzw. Darm-drainierenden Lymphknoten und wird z. T. über die lokal restringierte Verfügbarkeit bestimmter Vitamine reguliert (41, 42). So wird die CCR10-Expression durch, vor allem in den Haut-drainierenden Lymphknoten verfügbares, aktives Vitamin D ($1,25(OH)2D3$) gefördert, während Retinsäure, ein aktiver Vitamin A-Metabolit, der besonders in den mesenterialen Lymphknoten generiert wird, die Induktion der Darm-spezifischen Homingrezeptoren $\alpha4\beta7$ und CCR9 fördert (41, 43, 44).

Neben den topografisch geprägten, peripher rezirkulierenden T-Zellsubsets gibt es noch die s. g. „central memory“ T-Zellen, die durch die Expression von CCR7 und CD62L gekennzeichnet und die ein, den naiven T-Zellen ähnelndes Homingverhalten, d.h. Rezirkulation durch lymphoide Organe, zeigen (39).

Innerhalb der Tregs wurden ebenfalls Subsets mit distinktem Homingverhalten identifiziert. Insbesondere ein, durch die Expression von $\alpha E(CD103)$ gekennzeichneter Treg-Subset unterscheidet sich von den αE -negativen Tregs durch die Expression von peripheren Homingmolekülen. Korrespondierend dazu zeigen die αE^+ Tregs einen Effektor/Memoryzell-ähnlichen Homingphänotyp während die αE^- Tregs einen, den naiven Zellen gleichenden Homingphänotyp zeigen (45).

1.7. Bedeutung und Struktur der P-Selektin-Liganden

Wie schon erwähnt, sind E- und P-Selektin-abhängige Adhäsionswege ein wesentlicher Bestandteil des Haut-spezifischen Homingsystems. So hemmt die Behandlung mit Antikörpern gegen E- und P-Selektin kutane Entzündungsreaktionen und die Auslösbarkeit T-Zell-abhängiger Hautreaktionen ist in Selektin-Ligand-defizienten Mäusen reduziert (46-48). E- und P-Selektin wirken dabei meist redundant. So führt die Blockade von P-Selektin durch einen P-Selektin-Antikörper zu einer Hemmung der DTH-Reaktion in E-Selektin-defizienten Mäusen, nicht aber in Wildtyp-Mäusen (49).

Auf T-Zellen werden E- und P-Liganden vor allem auf in der Haut befindlichen T-Zellen gefunden (50) und präferenziell während der T-Zell-Aktivierung in peripheren Lymphknoten induziert (42, 50). Neben dieser topografisch gesteuerten Induktion fördern proinflammatorische Signale die Induktion, so dass auch während einer experimentellen Colitis P-Ligand-positive T-Zellen in den drainierenden mesenterialen Lymphknoten gefunden werden (51). Daher wird vor allem das P-Selektin-P-Ligand-Adhäsionssystem eher als entzündungsspezifisches Homingsystem gesehen.

Der P-Selektin-Ligand besteht aus einem Trägerprotein P-Selektin-Glykoprotein-Ligand (PSGL)-1. PSGL-1 allein hat keine Bindungskapazität für Selektine, erlangt diese aber durch posttranslationale Modifikation. So werden die Selektin-bindenden Epitope durch eine spezifische Glykosylierung und Sulfatierung von PSGL-1 geschaffen (52). Für die Generierung der P-Selektin-bindenden Epitope sind insbesondere die α 1,3-Fukosyltransferasen (FucT)-IV und FucT-VII, die Core-2 β 1,6-Glykosaminyltransferase-I (C2GlcNAcT-I) sowie zwei Tyrosinsulfotransferasen, die das Trägerprotein PSGL-1 sulfatieren, nötig (Abb. 7). Während der Großteil der P-Selektin-bindenden Aktivität auf Leukozyten PSGL-1-abhängig ist (53, 54) werden E-Ligand-Epitope überwiegend PSGL-1-unabhängig generiert (50, 55).

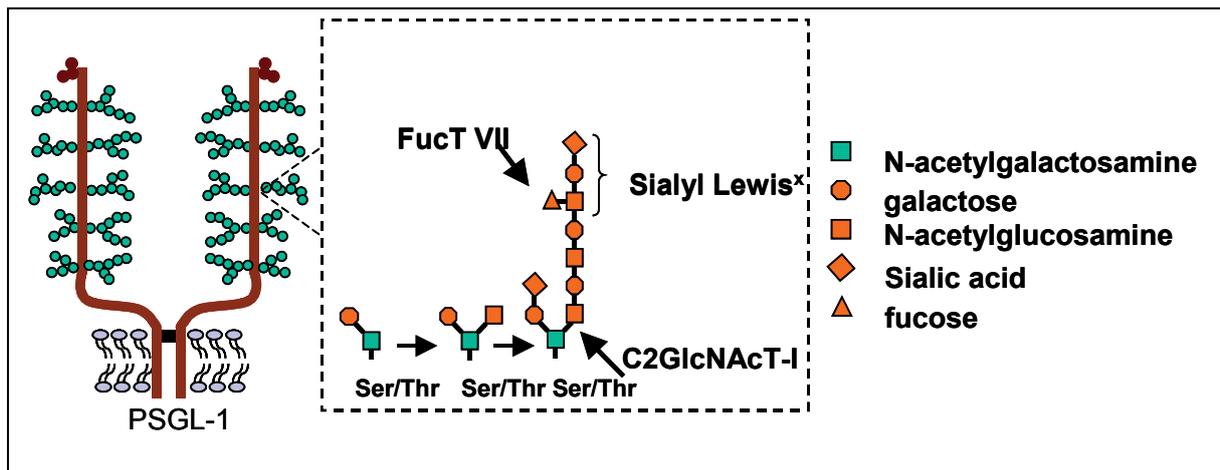


Abb. 7: Struktur der P-Selektin-Liganden (modifiziert nach Ley und Kansas 2004): P-Selektin-Liganden bestehen aus einem Trägermolekül PSGL-1. Die P-Selektin-bindenden Epitope werden durch posttranslationale Glykosylierung unter Beteiligung verschiedener Glykosyltransferasen hinzugefügt.

E- und P-Selektin-Liganden werden auf verschiedenen Leukozytensubsets exprimiert. Myeloide Zellen und NK-Zellen exprimieren die Selektin-Liganden konstitutiv (56). In CD4⁺T-Zellen werden die E- und P-Selektin-bindenden Epitope erst nach Aktivierung und Differenzierung in Effektorzellen generiert. Die Induktion der Selektin-Liganden in Effektorzellen korreliert mit der Induktion von FucT-VII und C2GlcNAcT-I (57, 58). Studien in Knockout-Mäusen konnten die individuelle Bedeutung der Transferasen für die Synthese der E-Lig und P-Lig zeigen. FucT-VII-Defizient führte dabei zu einer Verminderung der Bindung sowohl an E- als auch an P-Selektin, während Defizienz in der Expression von C2GlcNAcT-I vor allem die Bindung an P-Selektin, weniger aber die an E-Selektin beeinträchtigte (59-61).

1.8. Regulation der P-Selektin-Ligand-Expression in CD4⁺T-Zellen

Initiale in vitro Studien suggerierten eine Assoziation des Th1-Effektorzellphänotypes mit der Expression von P-Selektin-Liganden. So wurde eine deutliche Induktion von FucT-VII und C2GlcNAcT-I in vitro unter Th1-Polarisationsbedingungen beobachtet (46, 57, 62, 63). IL-12 wurde als Induktor und IL-4 als Suppressor der P-Lig-Induktion beschrieben (57). Im Gegensatz zu diesen Daten fand sich in einigen Laboren eine

P-lig-Induktion auch in Abwesenheit von IL-12, ein Phänomen, was zumindest teilweise auf den Einfluss von im Serum enthaltenen Faktoren zurückzuführen war (59). Darüberhinaus gab es eine Reihe von Untersuchungen, die in vivo eine Expression von Selektin-Liganden auch auf Th2-Zellen beschrieben (64-66), so dass das Konzept der Th1-assoziierten P-Lig-Regulation kontrovers diskutiert wurde.

1.9. *Fragestellung der Arbeit*

Im Rahmen der Arbeit sollten wesentliche Aspekte der Regulation und Bedeutung der Selektin-Liganden auf CD4+T-Zellen untersucht werden. Im Detail sollten die folgenden Fragen geklärt werden:

- 1) Besteht in vivo tatsächlich eine Assoziation der Expression der Selektin-Liganden mit dem Th1-Phänotyp, wie es durch in vitro Arbeiten suggeriert wurde, oder sind die Selektin-Liganden ein generell genutztes Homingprinzip von Effektor- und regulatorischen Zellen?
- 2) Sind die Selektin-Liganden essentiell für die Rekrutierung von Effektorzellen und Tregs in kutane Entzündungsreaktionen? Ist die in vivo-Funktion der Effektorzellen und Tregs an die Lokalisation im Antigen-haltigen Gewebe bzw. Entzündungsgebiet und die Nutzung E- und P-Selektin-abhängiger Adhäsionswege gekoppelt?
- 3) Werden P-Selektin-Liganden dauerhaft auf CD4+Effektorzellen entsprechend einer langfristigen Prägung exprimiert? Spielen epigenetische Mechanismen eine Rolle für eine solche dauerhafte Prägung der Selektin-Ligand-Expression?

Die Beantwortung dieser Fragen wird zum besseren Verständnis der funktionellen und topografischen Differenzierung der CD4+Zellen beitragen.

2. Eigene Arbeiten

2.1. Expression von Selektin-Liganden auf CD4+T-Zellen in vivo

(Kretschmer, U., Bonhagen, K., Debes, G.F., Mittrucker, H.W., Erb, K.J., Liesenfeld, O., Zaiss, D., Kamradt, T., Syrbe, U., Hamann, A. Expression of selectin ligands on murine effector and IL-10-producing CD4(+) T cells from non-infected and infected tissues. *Eur J Immunol.* 2004 Nov;34(11):3070-81)

Initiale in vitro Studien suggerierten eine Korrelation zwischen der Induktion eines Th1-Phänotyps und der Induktion von Selektin-Liganden auf CD4+T-Zellen. Unklar war, ob das in vivo ähnlich reguliert ist. Um dies zu klären, analysierten wir die E- und P-Lig-Expression auf in vivo generierten Th-Zellen. Unter homöostatischen Bedingungen fand sich eine deutlich höhere Frequenz P-Lig+Th-Zellen in peripheren Lymphknoten als in mesenterialen Lymphknoten, was die topografische Regulation in vivo bestätigt. Jedoch fanden sich auf Th1- und Th2-Zellen vergleichbare Frequenzen E- und P-Lig-positiver Zellen. In Übereinstimmung damit beobachteten wir eine Induktion von P- und teilweise E-Lig sowohl i. R. einer dominanten Th1-Entzündung (Influenza-Virus, Listerien oder Toxoplasma-Infektion) als auch einer dominanten Th2-Entzündung (Nippostrongylus-Infektion). D.h. es bestand in vivo kein Zusammenhang zwischen Selektin-Ligand-Expression und dem Th1-Phänotyp. Überraschenderweise zeigte der potentiell regulatorisch wirkende Tr1-Subset, charakterisiert durch die Produktion von IL-10, die höchste Frequenz E- bzw. P-Lig-positiver Zellen.

Zusammengefasst konnten wir zeigen, dass in vivo, im Gegensatz zu den in vitro-Bedingungen, die E- und P-Lig-Expression nicht auf den Th1-Subset begrenzt ist, sondern dass sowohl Th1- als auch Th2-dominante Entzündungen die Akquisition der Selektin-Liganden fördern.

2.2. Bedeutung von STAT4 für die Induktion von P-Lig und Effektorzytokinen in CD4+T-Zellen in gesunden und mit Parasiten-infizierten Mäusen

(Syrbe U., Hoffmann, U., Schlawe, K., Liesenfeld, O., Erb, K., Hamann, A. Microenvironment-dependent requirement of STAT4 for the induction of P-selectin ligands and effector cytokines on CD4+ T cells in healthy and parasite-infected mice. J Immunol. 2006 Dec 1;177(11):7673-9)

IL-12 fördert in vitro die Induktion von Th1-Zellen aber auch die Expression von E- und P-Lig. Beide Effekte werden durch STAT4, einem essentiellen Bestandteil des IL-12-Signalweges, vermittelt. Allerdings findet man in vivo Selektin-Liganden auf verschiedenen Effektor-Subsets was auf komplexere, auch STAT4-unabhängige Induktionswege schließen lässt.

Um die Bedeutung des IL-12/STAT4-abhängigen Signalweges für die P-Lig-Expression in vivo zu klären, analysierten wir die Expression von P-Lig auf CD4+T-Zellen in STAT4-defizienten Mäusen unter homöostatischen und unter inflammatorischen Th2-dominanten-Bedingungen. Unter homöostatischen Bedingungen fanden wir in peripheren Lymphknoten von STAT4-defizienten Mäusen eine geringere Frequenz P-Lig+CD4+T-Zellen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen, nicht jedoch in der Milz oder im Lungengewebe. Im Rahmen einer Th2-Immunantwort ausgelöst durch eine Wurminfektion mit *Nippostrongylus brasiliensis* zeigte sich überraschend eine verminderte Induktion von P-Lig aber auch eine verminderte Induktion von IL-4 auf CD4+ T-Zellen im Lungengewebe von STAT4^{-/-} Mäusen.

Somit konnten wir zeigen, dass unter homöostatischen Bedingungen ein Großteil der P-Lig-Expression auf CD4+ T-Zellen unabhängig von STAT4 ist. Im Rahmen einer Th2-dominierten Immunantwort zeigte sich eine bisher nicht bekannte Bedeutung von STAT4 für die Generierung von Th2-Zellen sowie der koexprimierten P-Lig.

2.3. *Bedeutung der Selektin-Liganden für CD4+Effektorzellen in vivo*

(Doebes, C., Siegmund, K., Loddenkemper, C., Lowe, J.B., Issekutz, A.C., Hamann, A., Huehn, J. Syrbe, U. Cellular players and role of selectin ligands in leukocyte recruitment in a T cell-initiated DTH reaction. Am J Pathol. 2008 Oct;173(4):1067-76)

T-Zellabhängige Hautreaktionen, z.B. die DTH-Reaktion, sind durch eine ausgeprägtes zelluläres Infiltrat gekennzeichnet. Die Blockade der Selektin-abhängigen Interaktionen durch blockierende Antikörper inhibiert DTH-Reaktionen. Unklar ist jedoch, ob die Inhibition der Rekrutierung eines spezifischen Zelltypes verantwortlich für diesen anti-inflammatorischen Effekt ist, oder ob alle Leukozytenpopulationen in ihrer Rekrutierung beeinflusst sind.

Um diese Frage zu klären, nutzten wir das OVA-DTH-Modell, in dem die DTH-Reaktion durch adoptiv transferierte OVA-spezifische Th1-Zellen induziert wird. Wir konnten zeigen, dass bei Transfer Selektin-Ligand-defizienter, OVA-spezifischer Th1-Zellen die DTH vermindert war, nicht jedoch nach Transfer Selektin-Ligand-kompetenter, OVA-spezifischer Th1-Zellen in Selektin-Ligand-defiziente Mäuse. Die histologische Analyse zeigte zwar eine Verminderung des Infiltrates unter letztgenannten Bedingungen, was jedoch zu keiner Beeinträchtigung der lokalen Schwellung führte. Dabei zeigte sich, dass insbesondere Granulozyten entscheidend an der DTH-Auslösung beteiligt sind und offensichtlich wenige Selektin-Ligand-unabhängig rekrutierte Granulozyten effektiv sind.

Somit ist insbesondere die Expression der Selektin-Liganden auf den induzierenden T-Zellen, nicht jedoch die auf myeloiden Leukozytenpopulationen, wesentlich für die Auslösung der DTH-Reaktion. T-Zellen scheinen somit der dominante Angriffsort einer Antikörper-vermittelten Selektin-Blockade zu sein.

2.4. Entscheidende Rolle der Migration: Die Kompartimentalisierung regulatorischer T-Zellsubsets bestimmt ihre suppressive Aktivität in vivo

(Siegmund, K., Feuerer, M., Siewert, C., Ghani, S., Haubold, U., Dankof, A., Krenn, V., Schon, M. P., Scheffold, A., Lowe, J. B., Hamann, A., Syrbe, U., Huehn, J.. Migration matters: regulatory T cell compartmentalization determines suppressive activity in vivo. *Blood*. 2005 Nov 1;106(9):3097-104)

Regulatorische T-Zellen spielen eine entscheidende Rolle für die Suppression von Immunreaktionen. Obwohl viele Gruppen die Anwesenheit von Tregs in Entzündungsregionen beschrieben hatten, war unklar, ob Tregs tatsächlich im entzündeten Gewebe supprimieren. Unter Nutzung αE^+ Effektor/Memory-ähnlicher Tregs von FucT-VII-defizienten Mäusen, die weder E- noch P-Lig exprimieren, analysierten wir die Bedeutung der korrekten Treg-Lokalisation für ihre suppressive Funktion in vivo in einem Entzündungsmodell.

Wir konnten zeigen, dass E- und P-lig-defiziente Tregs im Vergleich zu Wildtyp-Tregs weniger effektiv eine T-zellabhängige DTH-Reaktion supprimierten. Somit sind Selektin-Liganden auch für Subsets von Tregs essentiell für die Einwanderung in periphere Entzündungsregionen – diese wiederum ist entscheidend für die suppressorische Wirkung in vivo. Dies deutet daraufhin, dass Tregs direkt im Entzündungsgebiet anti-inflammatorisch wirken. Im Gegensatz dazu waren αE^- negative Tregs, welche präferentiell durch Lymphknoten rezirkulieren, effizienter in der Kontrolle der Proliferation naiver T-Zellen während der Induktionsphase von Immunantworten.

Zusammengefasst, geben diese Arbeiten erstmals Anhalt für die funktionelle Dichotomie unterschiedlicher Treg-Subsets, die durch ein differenzielles Homingverhalten bestimmt wird.

2.5. Differentielle Regulation der P-Selektin-Ligand-Expression in naiven und Memory-CD4+T-Zellen: Evidenz für epigenetische Regulation der involvierten Glykosyltransferasen

(Syrbe, U., Jennrich, S., Schottelius, A., Richter, A., Radbruch, A., Hamann, A. Differential regulation of P-selectin ligand expression in naive versus memory CD4+ T cells: evidence for epigenetic regulation of involved glycosyltransferase genes. Blood. 2004 Nov 15;104(10):3243-3248)

Die Induktion von P- und E-Lig erfolgt in CD4+ T-Zellen während der Differenzierung und Polarisierung in Effektor/Memory-T-Zellen. Die funktionelle Differenzierung, das heißt die Induktion des Zytokin-Gedächtnisses, wird teilweise durch epigenetische Modifikation der Zytokingene während der Differenzierung ermöglicht. Wir fragten hier, ob epigenetische Mechanismen auch an der Regulation der Selektin-Ligand-Expression auf CD4+ T-Zellen beteiligt sind.

Unter Nutzung eines in vitro-Induktionsprotokolls für Selektin-Liganden konnten wir zeigen, dass die Induktion von P-Lig nach Aktivierung naiver, nicht aber nach Aktivierung von Effektor/Memory-T-Zellen, vom Eintritt der Zellen in den für Chromatinmodifikationen sensitiven Zellzyklus abhängt. Zellzyklus-Arrest verhinderte die transkriptionelle Aktivierung der Glykosyltransferasen, die entscheidend für die Generierung der Selektin-Liganden auf T-Zellen sind. Artifizielle DNA-Demethylierung erhöhte die Frequenz der P-Lig-exprimierenden T-Zellen. Dies suggeriert, dass Methylierung der DNA im Bereich der Transferasegene die Ablesbarkeit, d.h. die Transkription, dieser Gene reguliert. Somit gibt diese Studie erste Evidenz dafür, dass die Selektin-Ligand-abhängigen, entzündungsspezifischen Homingeigenschaften von CD4+-T-Zellen durch epigenetische Modifikationen während der T-Zell-Differenzierung „imprinted“, d.h. epigenetisch fixiert, werden.

2.6. CD4+T-Effektorzellen werden langfristig für entzündungsspezifisches Homing geprägt

(Jennrich, S., Ratsch, B. A., Hamann A., Syrbe, U. Long-term Commitment to Inflammation-Seeking Homing in CD4+ Effector Cells. J Immunol. 2007 Jun 15;178(12):8073-80)

Lymphozyten „erinnern“ den Ort des initialen Antigenkontaktes und entwickeln ein Organ-spezifisches Gedächtnis. Jedoch gibt es keine eindeutigen Daten über die Stabilität der Homingrezeptorexpression auf CD4+T-Zellen in vivo.

Ziel dieser Studie war es daher zu klären, ob CD4+Effektorzellen entzündungsspezifische Homingeigenschaften dauerhaft exprimieren. Wir sortierten daher entweder in vitro oder in vivo generierte P-Lig+CD4+T-Zellen, transferierten diese Zellen in Rezipientenmäuse und verfolgten die Expression der P-Lig auf den transferierten Zellen über 60 Tage. Bei Verwendung in vitro generierter P-Lig+T-Zellen fand sich bei ca. 30% eine Langzeitexpression von P-Lig. Wiederholte Stimulation unter permissiven P-Lig-induzierenden Bedingungen erhöhte den Anteil von Zellen, die P-Lig dauerhaft exprimieren, was ein Hinweis auf die graduelle Fixierung des Phänotyps während der Differenzierung ist. In Übereinstimmung damit zeigten ex vivo isolierte P-Lig+Memory-T-Zellen den höchsten Anteil dauerhaft P-Lig-exprimierender Zellen. Eine gewebespezifische Umgebung war nicht notwendig für die Aufrechterhaltung der P-Lig-Expression auf den transferierten Zellen.

Diese Daten zeigen, dass die Expression der Selektin-Liganden unter bestimmten, gewebe- und entzündungsspezifischen Bedingungen klonal fixiert wird, dass aber auch ein Großteil der Zellen hinsichtlich der Homingeigenschaften flexibel und bereit für weitere umgebungsabhängige Modulation bei Restimulation bleibt.

3. Diskussion

3.1. *Expression von E- und P-Selektin-Liganden auf multiplen Effektorzell- und Treg-Subsets in vivo*

IL-12 ist in vitro der wesentliche Induktor der P-Lig-Expression auf CD4+T-Zellen, weshalb eine Assoziation der P-Lig-Expression mit dem Th1-Effektorphänotyp angenommen wurde (57, 58, 62). Wir konnten durch systematische Analyse der E- und P-Lig-Expression in vivo (67) zeigen, dass hier die Expression von E- und P-Lig nicht auf die Th1-Effektorzellen begrenzt ist. Wir fanden ähnlich hohe Frequenzen E- und P-Lig-positiver Zellen unter Th2-Zellen wie unter Th1-Zellen und konnten somit Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen, die vor allem auch im humanen System die Expression des E-Selektin-Ligand-Epitops „Cutaneous Leukocyte Antigen“ (CLA) auf Th2-Zellen beschrieben, bestätigen (64-66). Sowohl Th1-dominierte als auch Th2-dominierte Entzündungsreaktionen waren begleitet von einem Anstieg der P-Lig+Zellen innerhalb des jeweils dominanten Subsets. Somit scheinen in vivo sowohl Th1-spezifische Polarisationsfaktoren wie IL-12, aber auch Th2-spezifische Polarisationsfaktoren, wie möglicherweise IL-4, die Induktion der Selektin-Liganden zu unterstützen. Da auch für Th17-Zellen die Fähigkeit der E-Selektin-Bindung beschrieben wurde (68), scheint die E- und P-Selektin-abhängige Adhäsion ein universelles inflammatorisches Homingprinzip von pro-inflammatorischen Effektorzell-Subsets zu sein.

Interessanterweise fanden wir nicht nur auf den Th1- und Th2-Zellen eine hohe E- und P-Lig-Expression sondern auch auf dem potenziell regulatorisch wirkenden Tr1-Subset, d.h. den IL-10-produzierenden CD4+T-Zellen (67). Auch Huehn et al. beschrieben einen distinkten Subset von regulatorischen Zellen, der durch die Expression des Markers α E gekennzeichnet ist und sich von den α E-negativen Tregs

durch die Expression weiterer Homingmoleküle unterscheidet (45). So exprimieren auch die α E-positiven Tregs E- und P-Lig sowie inflammatorische Chemokinrezeptoren wie CCR5, während α E-negative Tregs CCR7 und L-Selektin exprimieren. Diese distinkten Homingrezeptormuster korrespondieren zum peripheren Homing-Phänotyp der α E⁺T-Zellen und zum zentralen, den naiven T-Zellen ähnelnden, Homingphänotyp der α E-negativen Tregs.

Somit scheinen in vivo pro-inflammatorische Stimuli unabhängig vom dominierenden Polarisationsmilieu, aber auch Konditionen, die die Differenzierung von Tregs begünstigen, permissiv für die Induktion von E- und P-Selektin-Liganden zu sein. Dies macht E- und P-Lig zu einem universellen inflammatorischen Homingprinzip von pro-inflammatorischen als auch anti-inflammatorischen T-Zell-Subsets, welches diesen funktionell distinkten T-Zellsubsets den Eintritt in Entzündungsregionen ermöglicht.

Zusätzlich beobachteten wir topografische Einflüsse auf die E- und P-Lig-Expression (67). So fanden wir unter homöostatischen Bedingungen, wie von Campbell et al. vorbeschrieben, eine präferenzielle Expression der E- und P-Selektin-Liganden auf den aus den peripheren Lymphknoten isolierten Effektorzellen im Vergleich zu den aus mesenterialen Lymphknoten isolierten Effektorzellen (42). D.h. neben den inflammatorischen Signalen beeinflussen Signale des lokalen Mikroenvironments die Expression der E- und P-Selektin-Liganden. Retinsäure, wurde als Faktor identifiziert, der in Darm-assoziierten lymphoiden Organen zur Induktion von α 4 β 7 beiträgt und gleichzeitig die Induktion von P-Lig supprimiert (44). Die lokale Verfügbarkeit von Retinsäure wird dabei durch die DC-spezifische Expression von Enzymen reguliert, die die Metabolisierung von Retinal zu Retinsäure ermöglichen (44, 69-71). In der Arbeit von Kretschmar et al. untersuchten wir die Expression der Selektin-Liganden unter entzündlichen Bedingungen vorwiegend in extraintestinalen

Gewebe bzw. Organen, d.h. der Lunge und der Leber. Arbeiten anderer Arbeitsgruppen und auch eigene noch nicht publizierte Daten zeigen, dass unter inflammatorischen Konditionen im Darm, d.h. z.B. im Rahmen einer experimentellen Ileitis oder Colitis, auch in mesenterialen Lymphknoten eine verstärkte E- und P-Lig-Expression auf T-Zellen gefunden wird (51, 72). Inflammatorische Stimuli können offenbar die gewebespezifische Regulation aufheben; alternativ könnte man auch annehmen, dass Retinsäure weniger die Induktion jedoch eher die Stabilität der im Darm induzierten E- und P-Lig beeinflusst. Dies könnte die Diskrepanz zu der unter homöostatischen Bedingungen in mesenterialen Lymphknoten beobachteten deutlich geringeren Frequenz von E- und P-Lig auf Th1-Zellen, d.h. IFN γ -Produzenten, die ja höchstwahrscheinlich auch unter dem Einfluss von IL-12 geprägt wurden, erklären. Ebenso finden sich Rota-Virus-reaktive T-Zellen im Subset der $\alpha 4\beta 7$ +Darm-spezifischen jedoch nicht unter den CLA-positiven T-Zellen (73), obwohl zum Zeitpunkt der Rota-Infektion ebenfalls erhöhte Spiegel von IL-12 gemessen werden und sehr wahrscheinlich ein für die P-Lig-Expression permissives Milieu herrscht (74).

Ebenfalls unklar ist, welche Signale die Induktion peripherer Homingrezeptoren auf den Tregs kontrollieren. Untersuchungen von Siewert et al. (75) und eigene Daten belegen unter homöostatischen Bedingungen ebenfalls eine topografisch kontrollierte Expression der Selektin-Liganden auf Tregs – so finden sich auch in den peripheren Lymphknoten hohe Frequenzen und in den mesenterialen Lymphknoten niedrige Frequenzen E- und P-Lig+Zellen unter den Tregs. Da sich αE +Tregs, d.h. E- und P-Lig-exprimierende Tregs, sowohl aus αE -negative Tregs bzw. „naive-like“ Tregs (CD62L+CD25+) aber auch aus konventionellen naiven CD4+Zellen entwickeln können (76), ist davon auszugehen, dass periphere Homingrezeptoren direkt im Zuge dieser Differenzierung induziert werden können. In vitro werden E- und P-Lig

jedoch nach Aktivierung von „naive-like“ Tregs in Anwesenheit von IL-2 und IL-12 induziert (75). Auch Koch et al. beschrieben die Induktion von CXCR3, einem inflammatorischen Chemokinrezeptor in Tregs durch $IFN\gamma$ (77). Somit können offenbar pro-inflammatorische Zytokine periphere Homingrezeptoren direkt auf Tregs induzieren.

Abb. 8 zeigt schematisch die Regulation und Expression von E- und P-Lig auf in vivo generierten CD4+Effektorzell- und Treg-Subsets.

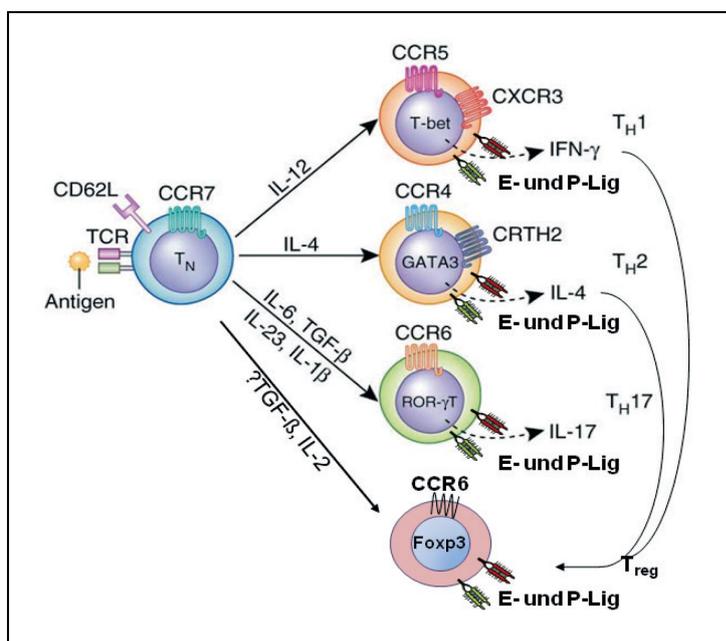


Abb. 8: Induktion und Expression von E- und P-Selektin-Liganden (E- und P-Lig) in vivo auf T-Effektorzellsubsets und Tregs. E- und P-Lig werden durch unterschiedliche Polarisations-signale auf den Effektorzellen induziert. Tregs regulieren E- und P-Lig entweder im Rahmen der Differenzierung hoch oder unter dem Einfluss pro-inflammatorischer Zytokine.

3.2. Rolle von STAT4 für die P-Lig-Expression auf CD4+T-Zellen in vivo

Die Bedeutung von IL-12 für die Induktion von P-Lig unter Th1-dominierter Entzündung wurde in vitro aber auch in vivo in verschiedenen Modellen gezeigt (72, 78). Jedoch zeigten unsere o. g. in vivo Daten und die anderer Gruppen, dass in vivo die Regulation von E- und P-Lig nicht an Th1-dominierte Entzündungsreaktionen gebunden ist, sondern z. B. auch durch Th2-dominierte Entzündungsreaktionen unterstützt wird (64-67). Um zu klären, wie wichtig der IL-12/STAT4-Signalweg für die Generierung von P-Lig in vivo tatsächlich ist, untersuchten wir die Expression von P-Lig in $STAT4^{-/-}$ Mäusen (79). Vor allem in den peripheren Lymphknoten von $STAT4^{-/-}$

Mäusen, nicht jedoch in der Milz, fand sich ein verminderter Anteil P-Lig+CD4+T-Zellen. Dies suggeriert, dass der Großteil der P-Lig in vivo tatsächlich unabhängig vom IL-12/STAT4-Signalweg induziert wird und dass es in der Nutzung dieses Signalweges offenbar regionale Unterschiede gibt. Insbesondere für T-Zellen, die durch die Milz rezirkulieren, scheint IL-12/STAT4 für die P-Lig-Expression entbehrlich. Ähnliche Ergebnisse fanden sich in einer Studie von Carlow et al. (80). Auch hier wurde eine Induktion von P-Lig in Abwesenheit von IL-12 auf CD8+T-Zellen vor allem in der Milz beobachtet. Welche alternativen Stimuli zur dieser Induktion beitragen, ist unklar. TGF β wurde im humanen System als alternativer P-Lig-Induktor diskutiert (63); unsere eigenen Daten im murinen System unterstützen dies bisher nicht. Da in vivo auch Th2-Zellen die Selektin-Liganden exprimieren und Th2-Immunreaktionen mit einem Anstieg der Frequenz P-Lig-positiver CD4+T-Zellen verbunden ist (67), untersuchten wir, ob die i. R. einer Th2-Antwort getriggerte P-Lig-Expression durch IL-12/STAT4-abhängige Signale beeinflusst ist. Überraschenderweise fanden wir eine reduzierte Frequenz P-Lig-positiver T-Zellen und auch eine verminderte Frequenz von Th2-Zellen in STAT4^{-/-} Mäusen i. R. einer Wurminfektion mit *Nippostrongylus brasiliensis* (79). Eher passend zum Th1/Th2-Paradigma wurde auch nach Applikation von rekombinantem IL-12 eine verminderte Th2-Antwort mit Förderung des Wurmüberlebens i. R. dieser Infektion beschrieben (81). Andererseits beobachteten Ishikawa et al. in der Frühphase der Infektion nach Migration der Würmer in den Darm eine Th1-ähnliche Antwort mit Expression von IFN γ in den mesenterialen Lymphknoten, so dass möglicherweise eine kurzfristige Th1-Antwort protektive Effekte im Rahmen dieser Infektion hat, während eine prolongierte IL-12-Präsenz zur Beeinträchtigung und Antagonisierung der protektiven Th2-Antwort führt (82). Andererseits wurde auch in vitro und in vivo ein positiver Effekt von IFN γ auf die IL-4-Produktion beschrieben und Raman et al. beobachteten

in Übereinstimmung mit unseren Daten in STAT4^{-/-} Mäusen eine Inhibition einer Th2-dominierten Lungenentzündung (83, 84).

Somit scheint der IL-12/STAT4-Signalweg in vivo wichtig für einen wesentlichen Anteil der induzierten P-Lig, z.T. sogar auf Th2-Zellen, zu sein. Daneben gibt es jedoch ebenfalls einen Großteil von CD4⁺T-Zellen, der P-Lig unabhängig von STAT4-Signalen generiert und vor allem durch die Milz rezirkuliert.

Andere Gruppen und auch wir konnten in vitro zeigen, dass die P-Lig-Expression mit der C2GlcNAcT-I nicht aber der FucT-VII-mRNA Expression korreliert (59, 85). Somit liegt der in vivo beobachteten P-Lig-Expression in Abwesenheit von STAT4 eine STAT4-unabhängig regulierte C2GlcNAcT-I Expression zu Grunde.

Bisherige in vitro Daten zeigten, dass IL-12/STAT4-Signale die C2GlcNAcT-I mRNA Expression regulieren (86, 87). Unsere präliminären Daten belegen, dass Retinsäure neben seinen Effekten auf FucT-VII auch die Zytokin-abhängige Regulation von C2GlcNAcT-I beeinflusst (Promotion M. Schroeter, unpublizierte Daten M. Pink). So sahen wir in vitro in Anwesenheit eines Retinsäure-Antagonisten eine starke P-Lig-Induktion, die mit hoher C2GlcNAcT-I-Induktion korrelierte, was darauf hindeutet, dass C2GlcNAcT-I auch über STAT4-unabhängige Wege, z.B. durch IL-4, induzierbar ist und die STAT4-unabhängige Expression von P-Lig in vivo in den STAT4^{-/-}Mäusen erklären könnte.

3.3. Funktionelle Bedeutung der Selektin-Liganden auf CD4⁺Effektorzellen in vivo

Die Expression der Selektin-Liganden auf Granulozyten, Effektorzellen und Tregs wirft Fragen nach deren funktioneller Relevanz auf den einzelnen Leukozyten- und Lymphozytenpopulationen auf. Es ist bekannt, dass die Rekrutierung von T-Zellen in die Haut komplett abhängig von der Expression der Selektin-Liganden ist (88) und es somit zur selektiven Akkumulation Selektin-Ligand-positiver T-Zellen in der Haut kommt (89).

In einem T-Zell-abhängigen Hautentzündungsmodell (DTH) konnten wir zeigen, dass die Antigen-spezifischen Th1-Zellen eine Pionierfunktion ausüben, die innerhalb der ersten 24 Stunden zur Konditionierung des Gewebes und folgenden „High-Rate“-Rekrutierung weiterer Granulozyten und Lymphozyten führt (90). In der Arbeit von Doebis et al. konnten wir einerseits bestätigen, dass E- und P-Lig an der Rekrutierung von Th1-Zellen in die etablierte DTH beteiligt sind, andererseits fanden wir, dass E- und P-Lig vor allem essentiell auf den als Pionierzellen wirkenden Antigen-spezifischen Th1-Zellen sind (91). So waren nur Selektin-Ligand-positive Antigen-spezifische Th1-Zellen in der Lage die DTH auszulösen, während Antigen-spezifische FucT-VII^{-/-} Th1-Zellen nur eine deutlich verminderte DTH induzierten. Somit ist die konditionierende Funktion der Antigen-spezifischen Th1-Zellen an deren Einwanderung in die Haut gebunden und offensichtlich abhängig von der Expression der Selektin-Liganden. Gebhardt et al. zeigten kürzlich, dass vorwiegend die CD4+T-Effektorzellen durch die Haut rezirkulieren, während CD8+T-Zellen eher einen residenten, epithelial-lokalisierten Zellpool generieren (92). Die Rezirkulation der CD4+Effektorzellen war in dieser Studie ebenso E- und P-Selektin abhängig.

Im DTH-Modell beobachteten wir außerdem, dass die Selektin-Ligand-Defizienz von Granulozyten zwar deren Rekrutierung in die Haut verringerte, dass aber auch die geringere Anzahl von in FucT-VII^{-/-}Mäusen rekrutierten Granulozyten effektiv die lokale Entzündung in Form einer Schwellung triggern konnte (91). Dass die Granulozyten tatsächlich entscheidend mit an der Auslösung der DTH beteiligt sind, konnten wir durch Depletion dieser Zellen mittels depletierender Antikörper zeigen, was die vorbeschriebene Bedeutung der Granulozyten für T-Zell-abhängige Entzündungen bestätigt (93-95). Des Weiteren zeigen die Daten ein bisher wenig beachtetes Zusammenspiel zwischen T-Zellen und Granulozyten. So entsprach die in FucT-VII verbleibende Granulozytenrekrutierung in etwa der, wie sie auch durch

einen unspezifischen Stimulus (inkomplettes Freud's Adjuvans) ausgelöst wurde. Bedenkt man die unterschiedliche Lokalreaktion, ist davon auszugehen, dass die durch den unspezifischen Stimulus rekrutierten Granulozyten offensichtlich nicht die gleiche pathogene Potenz haben wie die wenigen in die konditionierte DTH rekrutierten Granulozyten. $\text{IFN}\gamma$, was neben $\text{TNF}\alpha$ entscheidend für die Konditionierung des DTH-Gewebes für die „High-rate“ Rekrutierung war (90), könnte ebenso eine wesentliche, die Neutrophilen aktivierende Rolle spielen. So wurde kürzlich gezeigt, dass $\text{IFN}\gamma$ in der Lage ist, das Überleben der Granulozyten und ihre Funktion zu steigern (96).

Somit konnten wir zeigen, dass die korrekte Lokalisation der induzierenden, d.h. als Pionierzellen wirkenden, Antigen-spezifischen Th1-Zellen im Antigen-haltigen Gewebe essentiell für die Auslösung der lokalen Entzündungsreaktion ist und dass dafür in der Haut E- und P-Lig von besonderer Bedeutung sind.

In den Untersuchungen von Kretschmer et al. beobachteten wir eine Zunahme von P- und teilweise E-Lig auch in extrakutanen Geweben, wie der Lunge und der Leber. Unklar ist, ob die Anreicherung dieser Zellen die verstärkte, entzündungstriggerte Induktion der Liganden reflektiert, oder ob die Selektin-Liganden tatsächlich für die Rekrutierung in die Lunge genutzt werden und somit zur Selektion der Selektin-Ligand-positiven Zellen und deren lokalen Anreicherung beitragen. Obwohl die Blutgefäße in der Lunge E- und P-Selektin unter Entzündungsbedingungen exprimieren (97), ist die Bedeutung Selektin-abhängiger Adhäsionswege für die Lunge unklar. So wurde einerseits gezeigt, dass Selektine zur Rekrutierung von T-Zellen in die Lunge beitragen (97); Daten unserer Arbeitsgruppe zeigen jedoch auch, dass aktivierte T-Zellen unabhängig von Selektin-Liganden, teils vermittelt über LFA-1, in Lunge und Leber akkumulieren (98). Die Blockade mit E- und P-Selektin-Antikörpern im Rahmen der Influenza-Infektion führte zwar teilweise zu einer

Reduktion der absoluten Zahl von Effektorzellen; eine selektive Reduktion Selektin-Ligand-positiver T-Zellen in der Lunge wurde jedoch nicht beobachtet (Daten nicht gezeigt). Somit hängt die Bedeutung Selektin-abhängiger Adhäsionswege für die Rekrutierung von Effektorzellen vom Gewebe ab; in der Lunge spielen offensichtlich andere Adhäsionswege eine stärkere Bedeutung.

3.4. Bedeutung der Selektin-Liganden für die in vivo Funktion distinkter Treg-Subsets

Unsere in vivo Analysen zeigten, dass neben den Th1- und Th2-Zellen auch IL-10-produzierende Tr1-Zellen E- und P-Lig exprimieren (67). Auch die Identifizierung des α E+Treg-Subsets, der durch einen peripheren Homing-Phänotyp und die Fähigkeit, in periphere Entzündungsregionen einzuwandern (45), charakterisiert ist, suggerierte, dass Tregs auch direkt im peripheren Gewebe supprimieren. Außerdem wurde die Anwesenheit von Tregs in verschiedenen Entzündungsregionen wie der Synovialflüssigkeit von Patienten mit entzündlich-rheumatischen Erkrankungen (99, 100), in Tumoren (101, 102), in Transplantaten (103, 104), in Hautläsionen von *Leishmania major*-infizierten Mäusen (105), in den Lungen von *Pneumocystis carinii*-infizierten Mäusen (106), in den Langerhans-Inseln in Diabetes-Modellen (107-109) und im entzündeten Darm in Kolitismodellen (110) beschrieben. In Siegmund et al. konnten wir nun zeigen, dass die Inhibition der DTH-Reaktion durch α E-positive Tregs in vivo tatsächlich an deren Fähigkeit gebunden ist, in die periphere Hautentzündung einzuwandern (111). Korrespondierend zum differentiellen Homingphänotyp waren zum einen die α E+Tregs effektiver als α E-negative Tregs in der Suppression der DTH, während beide Populationen eine vergleichbare suppressive Aktivität in vitro zeigten. Außerdem konnten Selektin-Ligand-defiziente α E+Tregs, isoliert aus FucT-VII-/-Mäusen, die DTH nicht effektiv supprimieren und

verhielten sich wie „naive-like“ α E-negative Tregs. Dies zeigt die Bedeutung der Selektin-Ligand-abhängigen Lokalisation der α E+Tregs in der DTH als essentiellen Faktor der in vivo Funktion dieses Treg-Subsets. α E-negative Tregs waren entsprechend ihrer präferenziellen Rezirkulation durch Lymphknoten (45) effektiver in der Suppression der Proliferation naiver T-Zellen in den drainierenden Lymphknoten. Somit konnten wir zeigen, dass in vivo eine Arbeitsteilung zwischen verschiedenen Treg-Subsets besteht – während α E+Effektorzell-ähnliche Tregs direkt periphere Entzündungsreaktionen inhibieren, supprimieren die α E-negativen Tregs primär die Proliferation von naiven T-Zellen im Lymphknoten. Dieses Modell wird auch unterstützt durch Daten aus einem Kontakt-Hypersensitivitätsmodell, in dem nicht-separierte, vorwiegend CD62L+Tregs nur die Induktionsphase nicht aber die Effektorphase unterdrücken konnten (112). Wurden die Tregs jedoch direkt in die Haut injiziert, konnten auch diese Tregs die Effektorantwort hemmen. Zhang et al. beschrieben dagegen in einem allogenen Inselzell-Transplantationsmodell die sequentielle Lokalisation von Tregs mit einer initialen Einwanderung in das Pankreas und folgender Auswanderung in den lokalen drainierenden Lymphknoten, in dem vorwiegend die Suppression erfolgte (113). Auch wir beobachteten in der Frühphase einer Sekundärantwort der DTH eine starke Abwanderung von Effektorzellen aus dem Entzündungsgebiet; ähnliches wurde auch für Tregs beschrieben (114, 115). Andererseits zeigen Untersuchungen von Menning et al., dass die Suppression der α E+Tregs im DTH-Modell nicht durch CCR7-Defizienz, was die Rekrutierung in die drainierenden Lymphknoten verhindert, beeinträchtigt ist (116). Somit scheinen die Tregs im kutanen Entzündungsmodell tatsächlich lokal zu wirken und nicht über die Suppression im Lymphknoten.

Sehr wahrscheinlich bestehen in vivo verschiedene Mechanismen der Suppression, dies wird auch deutlich durch die unterschiedliche Effektivität verschiedener Treg-Subsets in vivo in Abhängigkeit vom Modell. So zeigte sich eine hohe und exklusive Effektivität von CD62L^{high}CD25+CD4+Tregs in Diabetes-Modellen (107, 117, 118) und in Graft-versus-Host-Modellen (119). Für die Suppression kutaner Immunreaktionen scheint jedoch die periphere Lokalisation der Tregs entscheidend zu sein. Dies schließt die Immunsurveillance der Haut ein, für die auch die E- und P-Lig-Expression auf den Tregs entscheidend zu sein scheint. So zeigten Dudda et al., dass Tregs aus FucT-VII-defizienten Mäusen, die keine funktionellen E- und P-Selektin-Liganden generieren, nicht in der Lage sind, die Entwicklung von Hautentzündungen im SCID-Transfer-Modell zu verhindern (120). Somit ist die Induktion peripherer Homingeigenschaften und die Lokalisation in peripheren Geweben nicht nur essentiell für die pro-inflammatorische in vivo Funktion von Effektorzellen sondern auch für die suppressive Funktion von Tregs.

3.5. Bedeutung epigenetischer Mechanismen für die Regulation der P-Lig-Expression in CD4+T-Zellen

Untersuchungen mehrerer Gruppen zeigten vor Jahren, dass Zellzyklus-Arrest nach TZR-Aktivierung die Differenzierung in funktionell distinkte Effektorzellsubsets verhindert, nicht aber die Induktion der Helferzell-spezifischen Mastertranskriptionsfaktoren (18, 19, 121). Dies suggerierte, dass epigenetische Mechanismen in die Differenzierung von T-Helferzellsubsets involviert sind, was im Folgenden durch Nachweis von Veränderungen im DNA-Methylierungsmuster und im Muster der Histonazetylierung in spezifischen Bereichen des *Il4*- und *Ifn γ* -Genes nachgewiesen wurde (122-124). Genom-weite Analysen des Musters von Histonmodifikationen und Genome-weite DNA-Methylierungsanalysen bestätigen

diese Daten und zeigen, dass vor allem die Zytokingene Ziel der epigenetischen Modulation sind (125). Wir nahmen an, dass die Homingmolekülexpression, und damit das Wanderungsverhalten, der T-Helferzellen auch im Zuge der Differenzierung fixiert wird, um dauerhaft die Lokalisation der T-Zellen in der Peripherie zu gewährleisten. Unsere Daten belegen, dass die Induktion der P-Selektin-Liganden nach Aktivierung naiver T-Zellen ebenso von der Progression durch den Zellzyklus abhängt, wie die Induktion der Effektorzytokine (126). So war auch die Induktion der beiden für die P-Lig-Expression auf T-Zellen wichtigen Glykosyltransferasen, FucT-VII und C2GlcNAcT-I, durch Zellzyklus-Arrest blockiert bzw. nahm mit steigender Zellteilung zu. Artifizielle DNA-Demethylierung mittels 5-Aza-deoxyzytidin erhöhte die Frequenz P-Lig+T-Zellen nach Stimulation naiver T-Zellen unter nicht-permissiven Bedingungen. Somit gaben diese Daten erstmals Evidenz dafür, dass auch die Homingmolekülexpression, speziell die von P-Lig, durch epigenetische Mechanismen kontrolliert wird. Dafür sprach auch, dass ein Teil der Memory-T-Zellen P-Lig ohne Progression durch den Zellzyklus hochregulieren konnte. Diese Fraktion entspricht in etwa der Fraktion P-Lig+T-Zellen, die wir in vivo unter inflammatorischen Bedingungen beobachteten (67), was suggeriert, dass in diesem Teil der Memory-T-Zellen die Gene der involvierten Glykosyltransferasen geöffnet wurden und in einem, der Transkriptionsmaschinerie und den Transkriptionsfaktoren zugänglichen Zustand sind.

Der Nachweis, dass die Stabilität von Homingrezeptoren tatsächlich epigenetisch reguliert sein kann, wurde kürzlich für das CCR6-Gen erbracht – hier fand sich eine differenziell methylierte Region in einem Enhancer-Bereich korrespondierend mit differenzieller Stabilität (127).

Unsere weiterführenden Daten (Promotion M. Schroeter, unpublizierte Daten M. Pink) belegen, dass das *Fukosyltransferase 7*-Gen ebenfalls Ziel differentieller DNA-Methylierung ist, während das für die C2GlcNAcT-I kodierende Gen, *Gcnt1*, durch Modulation des Musters der Histonmodifikationen reguliert zu sein scheint (Schroeter, M., und Pink, M.).

3.6. *Stabilität der P-Lig Expression auf CD4+T-Zellen*

Effektorzellen sind Initiatoren sekundärer, vor allem auch in peripheren Geweben lokalisierter Immunreaktionen. Es ist anzunehmen, dass eine schnelle und korrekte Rekrutierung dieser Zellen die Sekundärantwort begünstigt. Dies setzt eine dauerhafte Expression gewebe- oder entzündungsspezifischer Homingrezeptoren voraus. Diese Hypothese wird unterstützt durch Studien, die zeigen, dass CLA auf Antigen-spezifischen-Memory-T-Zellen von Patienten mit allergischer Dermatitis exprimiert wird (128). Unsere o. g. Daten suggerieren, dass epigenetische Mechanismen an der Regulation der P-Lig-Expression beteiligt sind, was ebenso auf eine Fixierung des Homingphänotyps hindeutet. Eine eindeutige klonale Analyse von T-Zellen mit einem Haut-bzw. entzündungsspezifischen Homingphänotyp war bisher jedoch nicht erfolgt. Unsere Daten belegen, dass P-Lig tatsächlich auf einem Teil von in vitro generierten Effektorzellen nach Transfer in Rezipientenmäuse dauerhaft exprimiert wird (129). T-Zellen, die P-Lig über einen Zeitraum von 60 Tagen verloren, zeigten weiter eine reduzierte CD62L-Expression, d.h. konvertierten nicht einfach zu „Central Memory“ T-Zellen. Repetitive Stimulation unter permissiven Bedingungen erhöhte den Anteil von T-Zellen mit dauerhafter P-Lig-Expression, was ebenso ein Hinweis auf eine epigenetische Regulation ist. Die höchste Stabilität fanden wir unter in vivo-generierten P-Lig+T-Zellen. Differenzierungsstadien, die durch epigenetische Mechanismen fixiert werden, können entweder zu einer permanenten Expression

eines Genes führen, wie z.B. CD4 oder CD8, oder sie können schnelle Recall-Antworten, wie z.B. die schnelle Produktion von Effektorzytokinen nach Re-Stimulation, ermöglichen (130-132). Die Daten von Jennrich et al. suggerieren, dass P-Lig stabil auf einer signifikanten Fraktion von Effektorzellen exprimiert werden. Die Re-Induktion scheint quantitativ begünstigt zu sein, ist jedoch weiter an gewebespezifische Faktoren gebunden.

Mora et al. postulierten, dass Darm- oder Haut-spezifische CD8+T-Zellen durch gewebespezifische DCs re-programmiert werden, d.h. dass die Expression der Darm- und Haut-spezifischen Homingrezeptoren flexibel ist (70). Auch wir beobachteten, dass P-Lig+Memory T-Zellen nach TZR-Restimulation in Anwesenheit von Retinsäure $\alpha 4\beta 7$ hochregulieren; die P-Lig-Expression blieb jedoch stabil unter diesen Bedingungen. Auch in vivo führte die Aktivierung von P-Lig+T-Zellen in mesenterialen Lymphknoten nicht zu einem Verlust der P-Lig-Expression. Dies deutet daraufhin, dass die P-Lig-Expression „imprinted“, d. h. epigenetisch fixiert wird und relativ resistent gegen Modulation durch gewebespezifische Faktoren ist. Für eine epigenetische Fixierung der Expression spricht auch, dass Milieufaktoren nicht notwendig für die Aufrechterhaltung der Expression sind, da Blockade der Rezirkulation durch die peripheren Lymphknoten, nicht zu einem Verlust der P-Lig-Expression führte. Flexibilität und Plastizität besteht jedoch durch zusätzliche Akquisition von $\alpha 4\beta 7$ bei Re-Stimulation in Anwesenheit von Retinsäure. Eine ähnliche Plastizität wurde auch für das Zytokin-Gedächtnis von Th2-Zellen beschrieben. So kann Stimulation von Th2-Zellen unter Th1-Bedingungen zur Ko-Induktion von T-bet und Ausbildung eines funktionell distinkten Th2+1-Phänotypes führen (133).

4. Zusammenfassung

Im Mittelpunkt dieser Arbeit standen Untersuchungen zur Bedeutung und Regulation der Haut- und entzündungsspezifischen Homingrezeptoren E- und P-Selektin-Ligand auf CD4+T-Zellen. Wir fanden, dass im Gegensatz zu in vitro-Daten, in vivo keine Assoziation zwischen der E- und P-Lig-Expression und dem Th1-Phänotyp besteht, sondern dass E- und P-Selektin-abhängige Adhäsionsmechanismen ein universelles Homingprinzip von Effektorzellen aber auch Tregs sind. In diesem Sinne fanden wir auch nur eine begrenzte Abhängigkeit der P-Lig-Expression in vivo vom IL-12/STAT4-Signalweg.

Wir konnten auch zeigen, dass die Selektin-Liganden essentiell für die in vivo Funktion von Effektorzellen und „effektor-like“ Tregs i. R. kutaner Entzündungsreaktionen sind. Für Tregs konnten wir erstmals eine funktionelle Dichotomie zwischen verschiedenen Treg-Subsets in vivo zeigen, die durch einen differentiellen Homingphänotyp bestimmt wird.

Des Weiteren konnten wir erste Evidenzen dafür erbringen, dass die Induktion der Selektin-Liganden in T-Zellen epigenetische Mechanismen involviert, welche den entzündungsspezifischen Homingphänotyp fixieren könnten. Wir konnten auch zeigen, dass Effektorzellen die P-Selektin-Liganden, einer topografischen Gedächtnisfunktion entsprechend, tatsächlich dauerhaft und resistent gegen Reprogrammierung exprimieren.

Damit erweitert die Arbeit das Wissen über die Regulation und Mechanismen der topografischen Prägung von CD4+T-Zellen und unterstreicht insbesondere die Bedeutung der korrekten Lokalisation für die in vivo-Funktion verschiedener T-Zellsubsets. Interessant wird es in der Zukunft sein, die molekulare Basis der E- und P-Lig-Expression und ihrer Fixierung in funktionell distinkten Subsets zu klären.

5. Referenzen

1. Sakaguchi, S. 2005. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 6: 345-352.
2. Zhu, J., H. Yamane, and W. E. Paul. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu Rev Immunol* 28: 445-489.
3. Sakaguchi, S., T. Yamaguchi, T. Nomura, and M. Ono. 2008. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 133: 775-787.
4. Mosmann, T. R., H. Cherwinski, M. W. Bond, M. A. Giedlin, and R. L. Coffmann. 1986. Two types of murine helper T cell clones I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 136: 2348-2357.
5. Heinzl, F. P., M. D. Sadick, B. J. Holaday, R. L. Coffman, and R. M. Locksley. 1989. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J Exp Med* 169: 59-72.
6. Ouyang, W., J. K. Kolls, and Y. Zheng. 2008. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity* 28: 454-467.
7. Murphy, K. M., and S. L. Reiner. 2002. The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol* 2: 933-944.
8. Wilson, C. B., E. Rowell, and M. Sekimata. 2009. Epigenetic control of T-helper-cell differentiation. *Nature reviews. Immunology* 9: 91-105.
9. Szabo, S. J., S. T. Kim, G. L. Costa, X. Zhang, C. G. Fathman, and L. H. Glimcher. 2000. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100: 655-669.
10. Szabo, S. J., B. M. Sullivan, C. Stemmann, A. R. Satoskar, B. P. Sleckman, and L. H. Glimcher. 2002. Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells. *Science* 295: 338-342.
11. Schulz, E. G., L. Mariani, A. Radbruch, and T. Hofer. 2009. Sequential polarization and imprinting of type 1 T helper lymphocytes by interferon-gamma and interleukin-12. *Immunity* 30: 673-683.
12. Kim, J. I., I. C. Ho, M. J. Grusby, and L. H. Glimcher. 1999. The transcription factor c-Maf controls the production of interleukin-4 but not other Th2 cytokines. *Immunity* 10: 745-751.
13. Ghoreschi, K., A. Laurence, X. P. Yang, K. Hirahara, and J. J. O'Shea. 2011. T helper 17 cell heterogeneity and pathogenicity in autoimmune disease. *Trends Immunol* 32: 395-401.
14. Zhou, L., J. E. Lopes, M. M. Chong, Ivanov, II, R. Min, G. D. Victora, Y. Shen, J. Du, Y. P. Rubtsov, A. Y. Rudensky, S. F. Ziegler, and D. R. Littman. 2008. TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgamma1 function. *Nature* 453: 236-240.
15. Zhu, J., and W. E. Paul. 2008. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 112: 1557-1569.
16. Kanno, Y., G. Vahedi, K. Hirahara, K. Singleton, and J. J. O'Shea. 2012. Transcriptional and epigenetic control of T helper cell specification: molecular mechanisms underlying commitment and plasticity. *Annu Rev Immunol* 30: 707-731.
17. Bird, A. 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 16: 6-21.
18. Bird, J. J., D. R. Brown, A. C. Mullen, N. H. Moskowitz, M. A. Mahowald, J. R. Sider, T. F. Gajewski, C. R. Wang, and S. L. Reiner. 1998. Helper T cell differentiation is controlled by the cell cycle. *Immunity* 9: 229-237.
19. Richter, A., M. Lohning, and A. Radbruch. 1999. Instruction for cytokine expression in T helper lymphocytes in relation to proliferation and cell cycle progression. *J Exp Med* 190: 1439-1450.
20. Ford, W. L., and J. L. Gowans. 1969. The traffic of lymphocytes. *Semin Hematol* 6: 67-83.

21. Butcher, E. C., and L. J. Picker. 1996. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 272: 60-66.
22. Vestweber, D., and J. E. Blanks. 1999. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol Rev* 79: 181-213.
23. Carlos, T. M., and J. M. Harlan. 1994. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 84: 2068-2101.
24. Ebnet, K., and D. Vestweber. 1999. Molecular mechanisms that control leukocyte extravasation: the selectins and the chemokines. *Histochem Cell Biol* 112: 1-23.
25. Mackay, C. R., W. L. Marston, and L. Dudler. 1990. Naive and memory T cells show distinct pathways of lymphocyte recirculation. *J. Exp. Med.* 171: 801-817.
26. Foerster, R., A. Schubel, D. Breitfeld, E. Kremmer, I. Renner-Muller, E. Wolf, and M. Lipp. 1999. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 99: 23-33.
27. Masopust, D., V. Vezys, A. L. Marzo, and L. Lefrancois. 2001. Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science* 291: 2413-2417.
28. Reinhardt, R. L., A. Khoruts, R. Merica, T. Zell, and M. K. Jenkins. 2001. Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body. *Nature* 410: 101-105.
29. Masopust, D., and L. J. Picker. 2012. Hidden memories: frontline memory T cells and early pathogen interception. *J Immunol* 188: 5811-5817.
30. Berg, E. L., L. M. McEvoy, C. Berlin, R. F. Bargatze, and E. C. Butcher. 1993. L-selectin-mediated lymphocyte rolling on MAdCAM-1 [see comments]. *Nature* 366: 695-698.
31. Gunn, M. D., K. Tangemann, C. Tam, J. G. Cyster, S. D. Rosen, and L. T. Williams. 1998. A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 258-263.
32. Baekkevold, E. S., T. Yamanaka, R. T. Palframan, H. S. Carlsen, F. P. Reinholt, U. H. von Andrian, P. Brandtzaeg, and G. Haraldsen. 2001. The CCR7 ligand elc (CCL19) is transcytosed in high endothelial venules and mediates T cell recruitment. *J Exp Med* 193: 1105-1112.
33. Oehen, S., and K. Brduscha Riem. 1998. Differentiation of naive CTL to effector and memory CTL: correlation of effector function with phenotype and cell division. *J Immunol* 161: 5338-5346.
34. Bromley, S. K., T. R. Mempel, and A. D. Luster. 2008. Orchestrating the orchestrators: chemokines in control of T cell traffic. *Nat Immunol* 9: 970-980.
35. Comerford, I., M. Bunting, K. Fenix, S. Haylock-Jacobs, W. Litchfield, Y. Harata-Lee, M. Turvey, J. Brazzatti, C. Gregor, P. Nguyen, E. Kara, and S. R. McColl. 2010. An immune paradox: how can the same chemokine axis regulate both immune tolerance and activation?: CCR6/CCL20: a chemokine axis balancing immunological tolerance and inflammation in autoimmune disease. *Bioessays* 32: 1067-1076.
36. Lord, G. M., R. M. Rao, H. Choe, B. M. Sullivan, A. H. Lichtman, F. W. Luscinskas, and L. H. Glimcher. 2005. T-bet is required for optimal proinflammatory CD4+ T-cell trafficking. *Blood* 106: 3432-3439.
37. Sundrud, M. S., S. M. Grill, D. Ni, K. Nagata, S. S. Alkan, A. Subramaniam, and D. Unutmaz. 2003. Genetic reprogramming of primary human T cells reveals functional plasticity in Th cell differentiation. *J Immunol* 171: 3542-3549.
38. Hirota, K., H. Yoshitomi, M. Hashimoto, S. Maeda, S. Teradaira, N. Sugimoto, T. Yamaguchi, T. Nomura, H. Ito, T. Nakamura, N. Sakaguchi, and S. Sakaguchi. 2007. Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model. *J Exp Med* 204: 2803-2812.
39. Islam, S. A., and A. D. Luster. 2012. T cell homing to epithelial barriers in allergic disease. *Nat Med* 18: 705-715.
40. Keelan, E. T., S. T. Licence, A. M. Peters, R. M. Binns, and D. O. Haskard. 1994. Characterization of E-selectin expression in vivo with use of a radiolabeled monoclonal antibody. *Am J. Physiol* 266: H278-290.

41. Sigmundsdottir, H., and E. C. Butcher. 2008. Environmental cues, dendritic cells and the programming of tissue-selective lymphocyte trafficking. *Nat Immunol* 9: 981-987.
42. Campbell, D. J., and E. C. Butcher. 2002. Rapid acquisition of tissue-specific homing phenotypes by CD4+ T cells activated in cutaneous or mucosal lymphoid tissues. *J Exp Med* 195: 135-141.
43. Sigmundsdottir, H., J. Pan, G. F. Debes, C. Alt, A. Habtezion, D. Soler, and E. C. Butcher. 2007. DCs metabolize sunlight-induced vitamin D3 to 'program' T cell attraction to the epidermal chemokine CCL27. *Nat Immunol* 8: 285-293.
44. Iwata, M., A. Hirakiyama, Y. Eshima, H. Kagechika, C. Kato, and S. Y. Song. 2004. Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity* 21: 527-538.
45. Huehn, J., K. Siegmund, J. Lehmann, C. Siewert, U. Haubold, M. Feuerer, G. F. Debes, J. Lauber, O. Frey, G. K. Przybylski, U. Niesner, M. d. I. Rosa, C. A. Schmidt, R. Bräuer, J. Buer, A. Scheffold, and A. Hamann. 2004. Developmental stage, phenotype and migration distinguish naive- and effector/memory-like CD4+ regulatory T cells. *J Exp Med* 199: 303-313.
46. Smithson, G., C. E. Rogers, P. L. Smith, E. P. Scheidegger, B. Petryniak, J. T. Myers, D. S. Kim, J. W. Homeister, and J. B. Lowe. 2001. Fuc-TVII is required for T helper 1 and T cytotoxic 1 lymphocyte selectin ligand expression and recruitment in inflammation, and together with Fuc-TIV regulates naive T cell trafficking to lymph nodes. *J Exp Med* 194: 601-614.
47. Catalina, M. D., P. Estess, and M. H. Siegelman. 1999. Selective requirements for leukocyte adhesion molecules in models of acute and chronic cutaneous inflammation: participation of E- and P- but not L-selectin. *Blood* 93: 580-589.
48. Erdmann, I., E. P. Scheidegger, F. K. Koch, L. Heinzerling, B. Odermatt, G. Burg, J. B. Lowe, and T. M. Kundig. 2002. Fucosyltransferase VII-deficient mice with defective E-, P-, and L- selectin ligands show impaired CD4+ and CD8+ T cell migration into the skin, but normal extravasation into visceral organs. *J Immunol* 168: 2139-2146.
49. Labow, M. A., C. R. Norton, J. M. Rumberger, K. M. Lombard Gillooly, D. J. Shuster, J. Hubbard, R. Bertko, P. A. Knaack, R. W. Terry, and M. L. Harbison. 1994. Characterization of E-selectin-deficient mice: demonstration of overlapping function of the endothelial selectins. *Immunity* 1: 709-720.
50. Fuhlbrigge, R. C., J. D. Kieffer, D. Armerding, and T. S. Kupper. 1997. Cutaneous lymphocyte antigen is a specialized form of PSGL-1 expressed on skin homing T cells. *Nature* 389: 978-981.
51. Thoma, S., K. Bonhagen, D. Vestweber, A. Hamann, and J. Reimann. 1998. Expression of selectin-binding epitopes and cytokines by CD4+ T cells repopulating scid mice with colitis. *Eur J Immunol* 28: 1785-1797.
52. Ley, K., and G. S. Kansas. 2004. Selectins in T-cell recruitment to non-lymphoid tissues and sites of inflammation. *Nat Rev Immunol* 4: 325-335.
53. Xia, L., M. Sperandio, T. Yago, J. M. McDaniel, R. D. Cummings, S. Pearson-White, K. Ley, and R. P. McEver. 2002. P-selectin glycoprotein ligand-1-deficient mice have impaired leukocyte tethering to E-selectin under flow. *J Clin Invest* 109: 939-950.
54. Yang, J., T. Hirata, K. Croce, G. Merrill-Skoloff, B. Tchernychev, E. Williams, R. Flaumenhaft, B. C. Furie, and B. Furie. 1999. Targeted gene disruption demonstrates that P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is required for P-selectin-mediated but not E-selectin-mediated neutrophil rolling and migration. *J Exp Med* 190: 1769-1782.
55. Moore, K. L. 1998. Structure and function of P-selectin glycoprotein ligand-1. *Leuk Lymphoma* 29: 1-15.
56. Ley, K. 2003. The role of selectins in inflammation and disease. *Trends Mol Med* 9: 263-268.
57. Wagers, A. J., C. M. Waters, L. M. Stoolman, and G. S. Kansas. 1998. Interleukin 12 and interleukin 4 control T cell adhesion to endothelial selectins through opposite effects on alpha1, 3-fucosyltransferase VII gene expression. *J Exp Med* 188: 2225-2231.

58. Lim, Y. C., L. Henault, A. J. Wagers, G. S. Kansas, F. W. Luscinskas, and A. H. Lichtman. 1999. Expression of functional selectin ligands on Th cells is differentially regulated by IL-12 and IL-4. *J Immunol* 162: 3193-3201.
59. Knibbs, R. N., R. A. Craig, P. Maly, P. L. Smith, F. M. Wolber, N. E. Faulkner, J. B. Lowe, and L. M. Stoolman. 1998. Alpha(1,3)-fucosyltransferase VII-dependent synthesis of P- and E-selectin ligands on cultured T lymphoblasts. *J Immunol* 161: 6305-6315.
60. Maly, P., A. Thall, B. Petryniak, C. E. Rogers, P. L. Smith, R. M. Marks, R. J. Kelly, K. M. Gersten, G. Cheng, T. L. Saunders, S. A. Camper, R. T. Camphausen, F. X. Sullivan, Y. Isogai, O. Hindsgaul, U. H. von Andrian, and J. B. Lowe. 1996. The alpha(1,3)fucosyltransferase Fuc-TVII controls leukocyte trafficking through an essential role in L-, E-, and P-selectin ligand biosynthesis. *Cell* 86: 643-653.
61. Snapp, K. R., C. E. Heitzig, L. G. Ellies, J. D. Marth, and G. S. Kansas. 2001. Differential requirements for the O-linked branching enzyme core 2 beta1-6-N-glucosaminyltransferase in biosynthesis of ligands for E- selectin and P-selectin. *Blood* 97: 3806-3811.
62. Austrup, F., D. Vestweber, E. Borges, M. Löhning, R. Bräuer, U. Herz, H. Renz, R. Hallmann, A. Scheffold, A. Radbruch, and A. Hamann. 1997. P-and E-selectin mediate recruitment of T helper 1 but not T helper 2 cells into inflamed tissues. *Nature* 385: 81-83.
63. Wagers, A. J., and G. S. Kansas. 2000. Potent induction of alpha(1,3)-fucosyltransferase VII in activated CD4+ T cells by TGF-beta 1 through a p38 mitogen-activated protein kinase- dependent pathway. *J Immunol* 165: 5011-5016.
64. Akdis, M., S. Klunker, M. Schliz, K. Blaser, and C. A. Akdis. 2000. Expression of cutaneous lymphocyte-associated antigen on human CD4(+) and CD8(+) Th2 cells. *Eur J Immunol* 30: 3533-3541.
65. Andrew, D. P., N. Ruffing, C. H. Kim, W. Miao, H. Heath, Y. Li, K. Murphy, J. J. Campbell, E. C. Butcher, and L. Wu. 2001. C-C chemokine receptor 4 expression defines a major subset of circulating nonintestinal memory T cells of both Th1 and Th2 potential [In Process Citation]. *J Immunol* 166: 103-111.
66. Teraki, Y., and L. J. Picker. 1997. Independent regulation of cutaneous lymphocyte-associated antigen expression and cytokine synthesis phenotype during human CD4+ memory T cell differentiation. *J Immunol* 159: 6018-6029.
67. Kretschmer, U., K. Bonhagen, G. F. Debes, H. W. Mittrucker, K. J. Erb, O. Liesenfeld, D. Zaiss, T. Kamradt, U. Syrbe, and A. Hamann. 2004. Expression of selectin ligands on murine effector and IL-10-producing CD4(+) T cells from non-infected and infected tissues. *Eur J Immunol* 34: 3070-3081.
68. Alcaide, P., E. Maganto-Garcia, G. Newton, R. Travers, K. J. Croce, D. X. Bu, F. W. Luscinskas, and A. H. Lichtman. 2012. Difference in Th1 and Th17 lymphocyte adhesion to endothelium. *J Immunol* 188: 1421-1430.
69. Dudda, J. C., A. Lembo, E. Bachtanian, J. Huehn, C. Siewert, A. Hamann, E. Kremmer, R. Forster, and S. F. Martin. 2005. Dendritic cells govern induction and reprogramming of polarized tissue-selective homing receptor patterns of T cells: important roles for soluble factors and tissue microenvironments. *Eur J Immunol* 35: 1056-1065.
70. Mora, J. R., G. Cheng, D. Picarella, M. Briskin, N. Buchanan, and U. H. von Andrian. 2005. Reciprocal and dynamic control of CD8 T cell homing by dendritic cells from skin- and gut-associated lymphoid tissues. *J Exp Med* 201: 303-316.
71. Edele, F., R. Molenaar, D. Gutle, J. C. Dudda, T. Jakob, B. Homey, R. Mebius, M. Hornef, and S. F. Martin. 2008. Cutting edge: instructive role of peripheral tissue cells in the imprinting of T cell homing receptor patterns. *J Immunol* 181: 3745-3749.
72. Haddad, W., C. J. Cooper, Z. Zhang, J. B. Brown, Y. Zhu, A. Issekutz, I. Fuss, H. O. Lee, G. S. Kansas, and T. A. Barrett. 2003. P-selectin and P-selectin glycoprotein ligand 1 are major determinants for Th1 cell recruitment to nonlymphoid effector sites in the intestinal lamina propria. *J Exp Med* 198: 369-377.

73. Rott, L. S., J. R. Rose, D. Bass, M. B. Williams, H. B. Greenberg, and E. C. Butcher. 1997. Expression of mucosal homing receptor alpha4beta7 by circulating CD4+ cells with memory for intestinal rotavirus. *J Clin Invest* 100: 1204-1208.
74. Xu, J., Y. Yang, J. Sun, Y. Ding, L. Su, C. Shao, and B. Jiang. 2006. Expression of Toll-like receptors and their association with cytokine responses in peripheral blood mononuclear cells of children with acute rotavirus diarrhoea. *Clin Exp Immunol* 144: 376-381.
75. Siewert, C., A. Menning, J. Dudda, K. Siegmund, U. Haubold, S. Floess, D. J. Campbell, A. Hamann, and J. Huehn. 2007. Induction of organ-selective CD4(+) regulatory T cell homing *Eur J Immunol* 37: 978-989.
76. Siewert, C., U. Lauer, S. Cording, T. Bopp, E. Schmitt, A. Hamann, and J. Huehn. 2008. Experience-Driven Development: Effector/Memory-Like alphaE+Foxp3+ Regulatory T Cells Originate from Both Naive T Cells and Naturally Occurring Naive-Like Regulatory T Cells. *J Immunol* 180: 146-155.
77. Koch, M. A., G. Tucker-Heard, N. R. Perdue, J. R. Killebrew, K. B. Urdahl, and D. J. Campbell. 2009. The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nat Immunol* 10: 595-602.
78. Zaph, C., and P. Scott. 2003. Th1 cell-mediated resistance to cutaneous infection with *Leishmania major* is independent of P- and E-selectins. *J Immunol* 171: 4726-4732.
79. Syrbe, U., U. Hoffmann, K. Schlawe, O. Liesenfeld, K. Erb, and A. Hamann. 2006. Microenvironment-dependent requirement of STAT4 for the induction of P-selectin ligands and effector cytokines on CD4+ T cells in healthy and parasite-infected mice. *J Immunol* 177: 7673-7679.
80. Carlow, D. A., M. J. Williams, and H. J. Ziltener. 2005. Inducing P-selectin ligand formation in CD8 T cells: IL-2 and IL-12 are active in vitro but not required in vivo. *J Immunol* 174: 3959-3966.
81. Finkelman, F. D., K. B. Madden, A. W. Cheever, I. M. Katona, S. C. Morris, M. K. Gately, B. R. Hubbard, W. C. Gause, and J. F. Urban, Jr. 1994. Effects of interleukin 12 on immune responses and host protection in mice infected with intestinal nematode parasites. *J Exp Med* 179: 1563-1572.
82. Ishikawa, N., P. K. Goyal, Y. R. Mahida, K. F. Li, and D. Wakelin. 1998. Early cytokine responses during intestinal parasitic infections. *Immunology* 93: 257-263.
83. Bocek, P., Jr., G. Foucras, and W. E. Paul. 2004. Interferon gamma enhances both in vitro and in vivo priming of CD4+ T cells for IL-4 production. *J Exp Med* 199: 1619-1630.
84. Raman, K., M. H. Kaplan, C. M. Hogaboam, A. Berlin, and N. W. Lukacs. 2003. STAT4 signal pathways regulate inflammation and airway physiology changes in allergic airway inflammation locally via alteration of chemokines. *J Immunol* 170: 3859-3865.
85. Schroeter, M. F., Ratsch, B. A., Lehmann J., Baumgrass, R., Hamann, A., Syrbe, U. . 2012. Differential regulation and impact of fucosyltransferase VII and core 2 (beta) 1,6-N-acetyl-glycosaminyltransferase for generation of E- and P-selectin ligands in murine CD4+ T cells *Immunology* in press.
86. Lim, Y., H. Xie, C. Come, S. Alexander, M. Grusby, A. Lichtman, and F. Luscinskas. 2001. IL-12, STAT4-dependent up-regulation of CD4(+) T cell core 2 beta-1,6-n-acetylglucosaminyltransferase, an enzyme essential for biosynthesis of P-selectin ligands. *J Immunol* 167: 4476-4484.
87. White, S. J., G. H. Underhill, M. H. Kaplan, and G. S. Kansas. 2001. Cutting edge: differential requirements for Stat4 in expression of glycosyltransferases responsible for selectin ligand formation in Th1 cells. *J Immunol* 167: 628-631.
88. Tietz, W., Y. Allemand, E. Borges, D. v. Laer, R. Hallmann, D. Vestweber, and A. Hamann. 1998. CD4+ T-cells only migrate into inflamed skin if they express ligands for E- and P-selectin. *J. Immunol.* 161: 963-970.
89. Reinhardt, R. L., D. C. Bullard, C. T. Weaver, and M. K. Jenkins. 2003. Preferential Accumulation of Antigen-specific Effector CD4 T Cells at an Antigen Injection Site

- Involves CD62E-dependent Migration but Not Local Proliferation. *J Exp Med* 197: 751-762.
90. Ghani, S., M. Feuerer, C. Doebis, U. Lauer, C. Loddenkemper, J. Huehn, A. Hamann, and U. Syrbe. 2009. T cells as pioneers: antigen-specific T cells condition inflamed sites for high-rate antigen-non-specific effector cell recruitment. *Immunology* 128: e870-e880.
 91. Doebis, C., K. Siegmund, C. Loddenkemper, J. B. Lowe, A. C. Issekutz, A. Hamann, J. Huehn, and U. Syrbe. 2008. Cellular players and role of selectin ligands in leukocyte recruitment in a T-cell-initiated delayed-type hypersensitivity reaction. *Am J Pathol* 173: 1067-1076.
 92. Gebhardt, T., P. G. Whitney, A. Zaid, L. K. Mackay, A. G. Brooks, W. R. Heath, F. R. Carbone, and S. N. Mueller. 2011. Different patterns of peripheral migration by memory CD4(+) and CD8(+) T cells. *Nature*.
 93. Kudo, C., T. Yamashita, M. Terashita, and F. Sendo. 1993. Modulation of in vivo immune response by selective depletion of neutrophils using a monoclonal antibody, RP-3. II. Inhibition by RP-3 treatment of mononuclear leukocyte recruitment in delayed-type hypersensitivity to sheep red blood cells in rats. *J Immunol* 150: 3739-3746.
 94. Terashita, M., C. Kudo, T. Yamashita, I. Gresser, and F. Sendo. 1996. Enhancement of delayed-type hypersensitivity to sheep red blood cells in mice by granulocyte colony-stimulating factor administration at the elicitation phase. *J Immunol* 156: 4638-4643.
 95. Tumpey, T. M., R. Fenton, S. Molesworth-Kenyon, J. E. Oakes, and R. N. Lausch. 2002. Role for macrophage inflammatory protein 2 (MIP-2), MIP-1alpha, and interleukin-1alpha in the delayed-type hypersensitivity response to viral antigen. *J Virol* 76: 8050-8057.
 96. Yoshimura, T., and M. Takahashi. 2007. IFN- γ -Mediated Survival Enables Human Neutrophils to Produce MCP-1/CCL2 in Response to Activation by TLR Ligands. *J Immunol* 179: 1942-1949.
 97. Wolber, F. M., J. L. Curtis, P. Maly, R. J. Kelly, P. Smith, T. A. Yednock, J. B. Lowe, and L. M. Stoolman. 1998. Endothelial selectins and alpha4 integrins regulate independent pathways of T lymphocyte recruitment in the pulmonary immune response. *J Immunol* 161: 4396-4403.
 98. Hamann, A., K. Klugewitz, F. Austrup, and D. Jablonski-Westrich. 2000. Activation induces rapid and profound alterations in the trafficking of T cells. *Eur J Imm* 30: 3207-3218.
 99. Cao, D., V. Malmstrom, C. Baecher-Allan, D. Hafler, L. Klareskog, and C. Trollmo. 2003. Isolation and functional characterization of regulatory CD25^{bright}CD4⁺ T cells from the target organ of patients with rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 33: 215-223.
 100. Appel, H., P. Wu, R. Scheer, C. Kedor, B. Sawitzki, A. Thiel, A. Radbruch, J. Sieper, and U. Syrbe. 2011. Synovial and peripheral blood CD4⁺FoxP3⁺ T cells in spondyloarthritis. *J Rheumatol* 38: 2445-2451.
 101. Woo, E. Y., H. Yeh, C. S. Chu, K. Schlienger, R. G. Carroll, J. L. Riley, L. R. Kaiser, and C. H. June. 2002. Cutting edge: Regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation. *J Immunol* 168: 4272-4276.
 102. Curiel, T. J., G. Coukos, L. Zou, X. Alvarez, P. Cheng, P. Mottram, M. Evdemon-Hogan, J. R. Conejo-Garcia, L. Zhang, M. Burow, Y. Zhu, S. Wei, I. Kryczek, B. Daniel, A. Gordon, L. Myers, A. Lackner, M. L. Disis, K. L. Knutson, L. Chen, and W. Zou. 2004. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 10: 942-949.
 103. Graca, L., S. P. Cobbold, and H. Waldmann. 2002. Identification of regulatory T cells in tolerated allografts. *J Exp Med* 195: 1641-1646.
 104. Lee, I., L. Wang, A. D. Wells, M. E. Dorf, E. Ozkaynak, and W. W. Hancock. 2005. Recruitment of Foxp3⁺ T regulatory cells mediating allograft tolerance depends on the CCR4 chemokine receptor. *J Exp Med* 201: 1037-1044.

105. Belkaid, Y., C. A. Piccirillo, S. Mendez, E. M. Shevach, and D. L. Sacks. 2002. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* 420: 502-507.
106. Hori, S., T. L. Carvalho, and J. Demengeot. 2002. CD25+CD4+ regulatory T cells suppress CD4+ T cell-mediated pulmonary hyperinflammation driven by *Pneumocystis carinii* in immunodeficient mice. *Eur J Immunol* 32: 1282-1291.
107. Lepault, F., and M. C. Gagnerault. 2000. Characterization of peripheral regulatory CD4+ T cells that prevent diabetes onset in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 164: 240-247.
108. Green, E. A., Y. Choi, and R. A. Flavell. 2002. Pancreatic lymph node-derived CD4(+)CD25(+) Treg cells: highly potent regulators of diabetes that require TRANCE-RANK signals. *Immunity* 16: 183-191.
109. Herman, A. E., G. J. Freeman, D. Mathis, and C. Benoist. 2004. CD4+CD25+ T regulatory cells dependent on ICOS promote regulation of effector cells in the prediabetic lesion. *J Exp Med* 199: 1479-1489.
110. Mottet, C., H. H. Uhlig, and F. Powrie. 2003. Cutting Edge: Cure of colitis by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 170: 3939-3943.
111. Siegmund, K., M. Feuerer, C. Siewert, S. Ghani, U. Haubold, A. Dankof, V. Krenn, M. P. Schön, A. Scheffold, J. Lowe, A. Hamann, U. Syrbe, and J. Huehn. 2005. Migration matters: regulatory T cell compartmentalization determines suppressive activity in vivo. *Blood* 106: 3097-3104.
112. Schwarz, A., A. Maeda, M. K. Wild, K. Kernebeck, N. Gross, Y. Aragane, S. Beissert, D. Vestweber, and T. Schwarz. 2004. Ultraviolet radiation-induced regulatory T cells not only inhibit the induction but can suppress the effector phase of contact hypersensitivity. *J Immunol* 172: 1036-1043.
113. Zhang, N., B. Schroppel, G. Lal, C. Jakubzick, X. Mao, D. Chen, N. Yin, R. Jessberger, J. C. Ochando, Y. Ding, and J. S. Bromberg. 2009. Regulatory T cells sequentially migrate from inflamed tissues to draining lymph nodes to suppress the alloimmune response. *Immunity* 30: 458-469.
114. Doebis, C., A. Menning, K. Neumann, S. Ghani, K. Schlawe, U. Lauer, A. Hamann, J. Huehn, and U. Syrbe. 2011. Accumulation and local proliferation of antigen-specific CD4(+) T cells in antigen-bearing tissue. *Immunol Cell Biol* 89: 566-572.
115. Tomura, M., T. Honda, H. Tanizaki, A. Otsuka, G. Egawa, Y. Tokura, H. Waldmann, S. Hori, J. G. Cyster, T. Watanabe, Y. Miyachi, O. Kanagawa, and K. Kabashima. 2010. Activated regulatory T cells are the major T cell type emigrating from the skin during a cutaneous immune response in mice. *J Clin Invest* 120: 883-893.
116. Menning, A., U. E. Höpken, K. Siegmund, M. Lipp, A. Hamann, and J. Huehn. 2007. CCR7 is crucial for the functional activity of both naïve- and effector/memory-like regulatory T cells subsets. *Eur J Imm* 37: 1575-1583.
117. Szanya, V., J. Ermann, C. Taylor, C. Holness, and C. G. Fathman. 2002. The subpopulation of CD4+CD25+ splenocytes that delays adoptive transfer of diabetes expresses L-selectin and high levels of CCR7. *J Immunol* 169: 2461-2465.
118. Lee, M. K. t., D. J. Moore, B. P. Jarrett, M. M. Lian, S. Deng, X. Huang, J. W. Markmann, M. Chiaccio, C. F. Barker, A. J. Caton, and J. F. Markmann. 2004. Promotion of allograft survival by CD4+CD25+ regulatory T cells: evidence for in vivo inhibition of effector cell proliferation. *J Immunol* 172: 6539-6544.
119. Taylor, P. A., A. Panoskaltis-Mortari, J. M. Swedin, P. J. Lucas, R. E. Gress, B. L. Levine, C. H. June, J. S. Serody, and B. R. Blazar. 2004. L-Selectinhi but not the L-selectinlo CD4+25+ T-regulatory cells are potent inhibitors of GVHD and BM graft rejection. *Blood* 104: 3804-3812.
120. Dudda, J. C., N. Perdue, E. Bachtanian, and D. J. Campbell. 2008. Foxp3+ regulatory T cells maintain immune homeostasis in the skin. *J Exp Med* 205: 1559-1565.
121. Mullen, A. C., A. S. Hutchins, A. V. Villarino, H. W. Lee, F. A. High, N. Cereb, S. Y. Yang, X. Hua, and S. L. Reiner. 2001. Cell cycle controlling the silencing and functioning of mammalian activators. *Curr Biol* 11: 1695-1699.

122. Lee, D. U., S. Agarwal, and A. Rao. 2002. Th2 lineage commitment and efficient IL-4 production involves extended demethylation of the IL-4 gene. *Immunity* 16: 649-660.
123. Agarwal, S., and A. Rao. 1998. Modulation of chromatin structure regulates cytokine gene expression during T cell differentiation. *Immunity* 9: 765-775.
124. Avni, O., D. Lee, F. Macian, S. J. Szabo, L. H. Glimcher, and A. Rao. 2002. T(H) cell differentiation is accompanied by dynamic changes in histone acetylation of cytokine genes. *Nat Immunol* 3: 643-651.
125. Wei, G., L. Wei, J. Zhu, C. Zang, J. Hu-Li, Z. Yao, K. Cui, Y. Kanno, T. Y. Roh, W. T. Watford, D. E. Schones, W. Peng, H. W. Sun, W. E. Paul, J. J. O'Shea, and K. Zhao. 2009. Global mapping of H3K4me3 and H3K27me3 reveals specificity and plasticity in lineage fate determination of differentiating CD4+ T cells. *Immunity* 30: 155-167.
126. Syrbe, U., J. Siveke, and A. Hamann. 1999. Th1/Th2 subsets: distinct differences in homing and chemokine receptor expression ? *Springer Semin Immunopathol* 21: 263-285.
127. Steinfelder, S., S. Floess, D. Engelbert, B. Haeringer, U. Baron, L. Rivino, B. Steckel, A. Gruetzkau, S. Olek, J. Geginat, J. Huehn, and A. Hamann. 2011. Epigenetic modification of the human CCR6 gene is associated with stable CCR6 expression in T cells. *Blood* 117: 2839-2846.
128. Santamaria Babi, L. F., L. J. Picker, M. T. Perez Soler, K. Drzimalla, P. Flohr, K. Blaser, and C. Hauser. 1995. Circulating allergen-reactive T cells from patients with atopic dermatitis and allergic contact dermatitis express the skin-selective homing receptor, the cutaneous lymphocyte-associated antigen. *J. Exp. Med.* 181: 1935-1940.
129. Jennrich, S., B. A. Ratsch, A. Hamann, and U. Syrbe. 2007. Long-term commitment to inflammation-seeking homing in CD4+ effector cells. *J Immunol* 178: 8073-8080.
130. Tutt Landolfi, M. M., R. Scollay, and J. R. Parnes. 1997. Specific demethylation of the CD4 gene during CD4 T lymphocyte differentiation. *Mol Immunol* 34: 53-61.
131. Chi, T. H., M. Wan, K. Zhao, I. Taniuchi, L. Chen, D. R. Littman, and G. R. Crabtree. 2002. Reciprocal regulation of CD4/CD8 expression by SWI/SNF-like BAF complexes. *Nature* 418: 195-199.
132. Lohning, M., A. Richter, and A. Radbruch. 2002. Cytokine memory of T helper lymphocytes. *Advances in immunology* 80: 115-181.
133. Hegazy, A. N., M. Peine, C. Helmstetter, I. Panse, A. Frohlich, A. Bergthaler, L. Flatz, D. D. Pinschewer, A. Radbruch, and M. Lohning. 2010. Interferons direct Th2 cell reprogramming to generate a stable GATA-3(+)T-bet(+) cell subset with combined Th2 and Th1 cell functions. *Immunity* 32: 116-128.

6. Danksagung

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Prof. Alf Hamann für die langjährige anregende und freundschaftliche Zusammenarbeit bedanken, die wir auch in Zeiten meiner klinischen Tätigkeit fortgeführt haben. Ohne seine Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Herrn Prof. Martin Zeitz möchte ich danken für die Aufnahme und Förderung in seiner Klinik, die es mir ermöglicht hat, neben der klinischen Tätigkeit meine wissenschaftlichen Arbeiten fortzusetzen.

Herrn Prof. Joachim Sieper danke ich für die, seit meinem Wechsel in den rheumatologischen Bereich bestehende, stets konstruktive und freundschaftliche Zusammenarbeit im klinischen und wissenschaftlichen Bereich.

Herr Prof. Hans-Dieter Volk weckte im Rahmen der Doktorarbeit mein Interesse für die Immunologie. Diese frühzeitige Inspiration hat mich nachhaltig geprägt und ich freue mich, dass mich nach wie vor Kooperationen mit Mitarbeitern seiner Abteilung verbinden.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Mitarbeitern der AG Hamann und der AG Sieper. Besonders erwähnen möchte ich Uta Lauer, Kerstin Schlawe, Sabine Sommer, Ute Hoffmann, Silke Jennrich, Boris Ratsch, Cornelia Doebis, Jochen Huehn, Saeed Ghani, Micha Schroeter und Matthias Pink aus der AG Hamann sowie Rebecca Scheer und Peihua Wu aus der AG Sieper.

Von Herzen danken möchte ich meiner Familie, besonders meinem Lebenspartner Frank Neumann und meinen Eltern, für ihr Verständnis und ihre Unterstützung während meiner gesamten klinischen und wissenschaftlichen Tätigkeit.

7. Erklärung

Nach § 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

erkläre ich, dass ich

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet habe.
- die vorliegende Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben habe.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin, den 26.09.2012

(Dr. med. Uta Syrbe)