



Technische Universität München
Fakultät für Medizin

Modulation des Effektorphänotyps humaner T-Zellen in Natriumchlorid-reichen Mikromilieus

Julia Matthias

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Lars Maegdefessel

Prüfende der Dissertation:

1. Prof. Dr. Christina Zielinski
2. Prof. Kathrin Schumann, Ph.D.
3. apl. Prof. Dr. Clarissa Prazeres da Costa

Die Dissertation wurde am 12.01.2021 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 13.07.2021 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

<u>1</u>	<u>KURZZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>4</u>
<u>2</u>	<u>EINLEITUNG</u>	<u>6</u>
2.1	EPIDEMIOLOGISCHE BETRACHTUNGEN ZUM ZUSAMMENSPIEL VON NATRIUMCHLORID MIT DEM IMMUNSYSTEM.....	6
2.2	AUFBAU DES IMMUNSYSTEMS UND DETERMINANTEN DER TH-ZELLDIFFERENZIERUNG	8
2.2.1	UNTERTEILUNG UND ABGRENZUNG DER T-HELPERZELLSUBTYPEN.....	10
2.2.2	DIE DETERMINANTEN DES TH-ZELLSCHICKSALS	12
2.2.3	DER EINFLUSS DES MIKROMILIEUS AUF DIE TH-ZELLEIGENSCHAFTEN	15
2.3	PHYSIOLOGIE UND VERTEILUNG VON NaCl IM MENSCHLICHEN KÖRPER.....	16
2.3.1	DIE SPEICHERUNG VON OSMOTISCH INAKTIVEM NATRIUM IM KÖRPER	17
2.3.2	DIE BETEILIGUNG DER HAUT ALS NaCl-SPEICHER AN DER NaCl-HOMÖOSTASE	18
2.4	DIE INTERAKTION VON NaCl MIT IMMUNZELLFUNKTIONEN	18
2.4.1	DIE IMMUNOLOGISCHE BEDEUTUNG DER HAUT – VERTEILUNG VON GEDÄCHTNISZELLEN IM MENSCHLICHEN KÖRPER.....	18
2.4.2	VERÄNDERUNG VON T-HELPERZELLEIGENSCHAFTEN IN SALZREICHEN MIKROMILIEUS	19
2.5	FRAGESTELLUNG.....	23
<u>3</u>	<u>MATERIAL UND METHODEN.....</u>	<u>25</u>
3.1	MATERIALLISTE	25
3.2	ZUSAMMENSETZUNG VON PUFFERN UND ZELLKULTURMEDIEN.....	30
3.3	VORBEREITUNG UND DURCHFÜHRUNG VON ZELLKULTUREXPERIMENTEN	30
3.3.1	ISOLIERUNG MONONUKLEÄRER ZELLEN AUS VOLLBLUT.....	30
3.3.2	MACS-ZELLSEPARATION	31
3.3.3	ZELLSORTIERUNG.....	31
3.3.4	GENERIERUNG VON CD4+ KLON-POPULATIONEN MITTELS GRENZVERDÜNNUNG	32
3.3.5	KULTIVIERUNG VON T-ZELLEN UNTER VERSCHIEDENEN NaCl-KONZENTRATIONEN	33
3.3.6	RESTIMULATION	33
3.4	VORBEREITUNG UND DURCHFÜHRUNG DER DURCHFLUSSZYTOMETRISCHEN ANALYSE.....	34

3.4.1	LEBEND-TOT-FÄRBUNG MITTELS ETHIDIUM MONOAZID BROMID (EMA).....	34
3.4.3	FÄRBUNG VON OBERFLÄCHENANTIGENEN.....	34
3.4.4	INTRAZELLULÄRE ZYTOKIN-FÄRBUNG UND FÄRBUNG VON TRANSKRIPTIONSFAKTOREN	35
3.4.5	AUSWERTUNG UND DARSTELLUNG DER DURCHFLUSSZYTOMETRIE-DATEN MITTELS FLOWJO™.....	35
3.5	MOLEKULARBIOLOGISCHE ANALYSE	36
3.5.1	RNA-ISOLIERUNG	36
3.5.2	REVERSE TRANSKRIPTION UND GENEXPRESSIONS-ANALYSE.....	37
3.6	ENZYM-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY	38
3.7	LENTIVIRALE GENEXPRESSIONS-SUPPRESSION MITTELS SHRNA-INTERFERENZ.....	40
3.8	EXTRAKTION VON T-ZELLEN AUS MENSCHLICHEM HAUTGEWEBE	40
3.9	ZULASSUNG DER STUDIE.....	41
3.10	STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	41
4	<u>ERGEBNISSE.....</u>	<u>43</u>
4.1	NATRIUMCHLORID IST EIN IONISCHER GEWEBEFAKTOR MIT TH2-IMMUNMODULATORISCHEN EIGENSCHAFTEN UND REICHERT SICH IN HAUTLÄSIONEN DER ATOPISCHEN DERMATITIS AN	43
4.1.1	ORIGINALPUBLIKATION - SODIUM CHLORIDE IS AN IONIC CHECKPOINT FOR HUMAN TH2 CELLS AND SHAPES THE ATOPIC SKIN MICROENVIRONMENT.....	43
4.1.2	HERVORHEBUNG INDIVIDUELLER LEISTUNGSBEITRÄGE	44
4.2	DIE INDUKTION ANTI-INFLAMMATORISCHER SOWIE PATHOGENER TH17-ZELLEN DURCH NATRIUMCHLORID IN ABHÄNGIGKEIT VOM ZYTOKINMILIEU	47
4.2.1	ORIGINALPUBLIKATION - SALT GENERATES ANTI-INFLAMMATORY TH17 CELLS BUT AMPLIFIES THEIR PATHOGENICITY IN PRO-INFLAMMATORY CYTOKINE MICROENVIRONMENTS	47
4.2.2	HERVORHEBUNG INDIVIDUELLER LEISTUNGSBEITRÄGE	48
4.3	STEIGERN HOHE NaCl-KONZENTRATIONEN IN TUMORGEWEBE DIE ABWEHRLAGE CD8+ ZYTOTOXISCHER T-GEDÄCHTNISZELLEN?	52
5	<u>DISKUSSION.....</u>	<u>55</u>
5.1	TH17-STIMULIERENDE SIGNALWEGE UNTER NORMOSMOTISCHEN UND HYPEROSMOTISCHEN BEDINGUNGEN.....	56
5.2	SGK1-ABHÄNGIGE REGULATIONSMECHANISMEN ZUR TH2-INDUKTION	58
5.3	PARALLELEN IN DER ENTWICKLUNG VON TH17- UND TH2-ZELLEN.....	59

5.4	IDENTIFIZIERUNG NFAT5-ABHÄNGIGER UND UNABHÄNGIGER NaCl-SIGNALWEGE	60
5.5	DIE ROLLE VON TGF- β FÜR DIE VERMITTLUNG ANTI-INFLAMMATORISCHER EIGENSCHAFTEN DURCH NaCl.....	61
5.6	DIE INTERAKTION DER SWITCH-FAKTOREN IL-1 β UND TGF- β IN NaCl-REICHEM MILIEU.....	63
5.7	DIE ROLLE VON NaCl IN DER PATHOGENESE DER ATOPISCHEN DERMATITIS	64
5.8	DIE ROLLE VON NaCl IN DER PATHOGENESE DER MULTIPLER SKLEROSE.....	69
5.9	WELCHE ROLLE SPIELT NUN DIE ERNÄHRUNG? – ZURÜCK ZUR EPIDEMIOLOGIE	73
5.10	EIN AUSBLICK ZUR ROLLE VON NaCl IM TUMORMIKROMILIEU.....	75
6	<u>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK</u>	78
7	<u>SCHRIFTENVERZEICHNIS</u>	81
7.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	81
7.2	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	83
7.3	LITERATURVERZEICHNIS.....	83
8	<u>DANKSAGUNG</u>	107
9	<u>ANHANG.....</u>	.108
9.1	ANHANG 1 – SODIUM CHLORIDE IS AN IONIC CHECKPOINT FOR HUMAN TH2 CELLS AND SHAPES THE ATOPIC SKIN MICROENVIRONMENT	
9.2	ANHANG 2 – SALT GENERATES ANTI-INFLAMMATORY TH17 CELLS BUT AMPLIFIES THEIR PATHOGENICITY IN PRO-INFLAMMATORY CYTOKINE MICROENVIRONMENTS	
9.3	ANHANG 3 – SHAPING THE DIVERSITY OF TH2 CELL RESPONSES IN EPITHELIAL TISSUES AND ITS POTENTIAL FOR ALLERGY TREATMENT	
9.4	ANHANG 4 – ALLERGISCHE ERKRANKUNGEN BEI ERWACHSENEN – PRÄVALENZ, BEDEUTUNG UND IMPLIKATIONEN FÜR DIE PRÄVENTION UND GESUNDHEITSFÖRDERUNG	

1 Kurzzusammenfassung

Unser Immunsystem ist einer Vielzahl an immunologischen Stimuli ausgesetzt, welche bekannterweise die Immunfunktion lenken, stimulieren, hemmen und hierdurch Induktion und Ergebnis physiologischer, aber auch pathologischer Entzündungsvorgänge erheblich mitbeeinflussen. Der Großteil immunologischer Vorgänge findet jedoch unter dem Einfluss der sehr variablen Umweltbedingungen peripherer Gewebe statt. Verschiedene Gewebefaktoren, Stoffwechselprodukte und physikalische Bedingungen wirken hier auf den Entzündungsvorgang ein und beeinflussen nachweislich die Funktion der Immunzellen. Die Relevanz dieser Gewebefaktoren für Physiologie und Pathophysiologie von Immunfunktionen wurde erst kürzlich erkannt, deren Ausmaße sind jedoch bisher kaum verstanden. An Immunreaktionen peripherer Gewebe sind vor allem ausdifferenzierte Immunzellen beteiligt.

Natriumchlorid ist für den menschlichen Organismus essentiell. Über die Nahrung aufgenommen ist es an der Regulation verschiedener Körperfunktionen beteiligt und hält durch seine osmotische Aktivität unsere Wasserbalance im Gleichgewicht. Kürzlich konnte jedoch, gegensätzlich der Annahme stabiler globaler Natriumchlorid- (NaCl-) Konzentrationen, osmotisch inaktive NaCl-Anreicherungen in peripheren Geweben beobachtet werden. Erste Anzeichen für immunmodulatorische Funktionen dieses ionischen Gewebefaktors bahnen sich an – beeinflussen diese erhöhten NaCl-Konzentrationen auch differenzierte Immunzellen unserer Immunabwehr, welche jene peripheren Gewebe durchkreuzen?

Um Phänotyp und Funktion differenzierter T-Zellen in NaCl-reichem Milieu zu untersuchen, stimulierten wir CD4⁺ und CD8⁺ T-Gedächtniszellen aus Blut- und Hautproben humaner Spender unter NaCl-Konzentrationen, welche physiologischerweise in Blut und peripheren Geweben detektiert werden können und verglichen den NaCl-Effekt anhand Genexpressionsanalysen, durchflusszytometrischer Proteinanalysen und Untersuchung der Sekretionsleistung mittels ELISA. Interessanterweise konnten wir eine Steigerung Th2- und Th17-typischer Eigenschaften in CD4⁺ Th-Gedächtniszellen feststellen. Vielmehr war NaCl in der Lage, in Abwesenheit von extrazellulärem IL-4, einem bis *dato* essentiellen Zytokin zur Differenzierung von Th2-Zellen, die *de novo* Entstehung von Th2-Zellen aus naiven CD4⁺ Th-Zellen zu induzieren. Als Mediatoren jenes NaCl-Effekts konnten wir mittels lentiviraler Gensuppression NFAT5 und SGK1 identifizieren. Bei Analyse läsionaler Hautproben von Patienten mit atopischer Dermatitis, einer allergischen Erkrankung mit übersteigter Th2-Immunantwort, beobachteten wir eine Anreicherung von NaCl im läsionalen Hautgewebe. NaCl zeigte sich jedoch nicht als statischer Gewebefaktor, sondern wies sich durch eine ausgeprägte Flexibilität in Hinblick auf den induzierten Phänotyp aus: So konnten wir die Begünstigung eines anti-inflammatorischen Th17-Phänotyps beobachten, wenn sich NaCl im Kontext eines anti-inflammatorischen Zytokinmilieus präsentierte, während im pro-inflammatorischem Zytokinmilieu ein pathogener Th17-Charakter gefördert wurde. Als Switch-Faktoren konnten wir TGF- β und IL-1 β aus dem Bereich der Zytokine identifizieren. Der

adoptive Transfer von TGF- β -induzierten Th17-Zellen ins EAE-Mausmodell führte in NaCl-reichem Milieu zur Abschwächung des Krankheitsverlaufs, während NaCl in IL-1 β -reichem Kontext sogar eine Aggravation des Krankheitsverlaufs induzierte. Die Analyse CD8+ T-Gedächtniszellen, welche wichtige Funktionen in der Abwehr und Kontrolle maligner Erkrankungen innehaben, ergab Hinweise auf Förderung IFN γ +Tc17-typischer Eigenschaften in NaCl-reichem Milieu mit potentiell zytotoxischem Charakter.

Wir konnten zeigen, dass NaCl als ionischer Gewebefaktor auch differenzierte CD4+ und CD8+ T-Gedächtniszellen immunmodulatorisch beeinflusst und sich hierdurch potentiell auf den Verlauf immundysregulierter Erkrankungen mit allergischem, autoimmunem und malignem Charakter auswirken kann. NaCl wirkt hierbei als kontextsensitiver Gewebefaktor, welcher in Phasen physiologischen Gleichgewichts Immuntoleranz vermittelt, vor dem Hintergrund einer Infektion oder autoimmuner Geschehen jedoch eine entzündungsfördernde Rolle einnimmt. Hierdurch trägt NaCl zum Erhalt von Flexibilität und Plastizität des Immunsystems bei. Die Erkenntnisse zur Lenkung des NaCl-Effektes durch die Beschaffenheit des Zytokin-Milieus könnten in Ergänzung moderner Antikörpertherapien zur Entwicklung neuer Behandlungsstrategien in der Therapie immundysregulierter Erkrankungen beitragen.

2 Einleitung

2.1 Epidemiologische Betrachtungen zum Zusammenspiel von Natriumchlorid mit dem Immunsystem

„So hoch hat Gott den Menschen getrieben und gezwungen, dass er nicht ohne Salz leben kann oder mag, sondern muss dasselbige haben.“

Paracelsus, Von den natürlichen Dingen, 1525

Bereits seit über einem halben Jahrtausend ist „Salz“ als wichtiger Bestandteil der menschlichen Ernährung bekannt und beschäftigt den Menschen bezüglich seiner Wirkung auf den menschlichen Körper, wie das Zitat von Paracelsus von 1525 vermuten lässt. Umgangssprachlich häufig als Koch- oder Speisesalz betitelt, besitzen beide Ionen des Natriumchlorids wichtige Eigenschaften für die Regulation verschiedener Körperfunktionen. Beide Elemente zählen zu den Makromineralien und sind für tierische Organismen essentiell (Püschel et al., 2011).

Lange Zeit war Salz aufgrund seiner aufwändigen Gewinnung ein kostbares Gut. Erst im Laufe des 19. und 20. Jahrhunderts entwickelte es sich zum billigen Alltagsprodukt. Im Zuge dessen stieg auch der Konsum. Mittlerweile übersteigt die durchschnittliche Salzaufnahme in entwickelten Industriestaaten den empfohlenen Verzehr um ein Vielfaches (Galea et al., 2013; Intersalt Cooperative Research Group, 1988). Dies ist vor allem auf vorgefertigte Speisen zurückzuführen, welche mit großen Mengen Salz zur Geschmacksverstärkung versetzt werden (Mattes und Donnelly, 1991).

Parallel zu Änderungen von Lebens- und Ernährungsbedingungen im Zuge der Industrialisierung, konnte ein steter Anstieg allergischer und autoimmuner Erkrankungen innerhalb der letzten 60 Jahre verzeichnet werden (Bach, 2002; Lerner et al., 2015). Bei den genannten Allergien handelt es sich insbesondere um allergische Atemwegserkrankungen, wie die allergische Rhinitis und das Asthma. Hiervon sind 400 Millionen, respektive 300 Millionen Menschen weltweit betroffen (Pawankar et al., 2013). Insbesondere Asthma trägt bedeutend zu Morbidität und Mortalität bei und stellt eine beträchtliche Belastung des Gesundheitssystems dar. Das atopische Ekzem ist eine allergische Erkrankung der Haut, welche vor allem Kinder und mittlerweile mit einer Lebenszeitprävalenz von 15-30% circa ein Viertel der heranwachsenden Bevölkerung betrifft (Pawankar et al., 2013). Innerhalb der letzten 30 Jahre ist die Inzidenz des atopischen Ekzems in Industriestaaten auf zwei- bis dreifache Fallzahlen drastisch gestiegen (Bach, 2002; Pawankar et al., 2013). Zudem gilt das atopische Ekzem als potentieller Startpunkt des atopischen Marsches, welcher eine Folge weiterer allergischer Erkrankungen nach sich zieht. Es ist deshalb von besonderem Interesse zur Entwicklung von Präventionsstrategien allergischer Erkrankungen (Lowe et al., 2018). Auch Autoimmunerkrankungen haben innerhalb der letzten Jahre einen gewaltigen Anstieg erfahren: Die Inzidenz der Multiplen Sklerose (MS), einer autoimmun-

entzündlichen Erkrankung des zentralen Nervensystems, hat sich in Niedersachsen innerhalb von nur 17 Jahren verdoppelt (Poser et al., 1989); die des Morbus Crohn, einer autoimmun-entzündlichen Darmerkrankung, verdreifachte sich sogar in Nordeuropa zwischen den 50er und 90er Jahren (F. Farrokhyar, 2001). Weltweit stiegen die Inzidenz und Prävalenz autoimmuner Erkrankungen innerhalb der letzten 30 Jahre im Schnitt um 19% respektive 13% an (Lerner et al., 2015).

Auch wenn die Erscheinungen verschiedener allergischer und autoimmuner Erkrankungen sehr unterschiedlich anmuten, basieren die pathogenetisch-immunologischen Fehlsteuerungen doch auf einer gemeinsamen Grundlage: einer pathologisch übersteigerten Immunantwort. Während das Immunsystem bei allergischen Erkrankungen auf normalerweise apathogene externe Umweltstoffe mit einer Immunantwort reagiert, greift es bei autoimmunen Reaktionen gesunde, körpereigene, interne Strukturen an. An der Ausbildung solcher immunologischen Fehlsteuerungen sind nachweislich genetische Faktoren beteiligt (Maier und Hafler, 2009; Ortiz und Barnes, 2015). Anpassungen unseres Erbgutes an veränderte Lebensbedingungen benötigen jedoch große Zeiträume - der starke Anstieg der Prävalenzen autoimmuner und allergischer Erkrankungen innerhalb von nur wenigen Jahren ist hiermit nicht ausreichend zu erklären. Das macht eine Mitbeteiligung äußerer Umweltfaktoren sehr wahrscheinlich.

Beobachtungsstudien konnten einen Zusammenhang zwischen erhöhter Salzaufnahme und der Inzidenz der rheumatoiden Arthritis feststellen (Salgado et al., 2015). Auch im Mausmodell zeigte sich eine stärkere Entzündungsaktivität in Gelenken salzreich ernährter Mäuse mit Kollagen-induzierter Arthritis, dem Tiermodell der rheumatoiden Arthritis (Jung et al., 2019). Des Weiteren konnte mehrfach im Mausmodell gezeigt werden, dass salzreich ernährte Tiere einen aggressiveren Verlauf der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), einem Tiermodell der MS, entwickeln als unter salzarmer Ernährung (Kleinewietfeld et al., 2013; Wu et al., 2013) und auch in Patienten mit MS scheint die Schubfrequenz mit einer erhöhten Salzaufnahme assoziiert zu sein (Farez et al., 2015). Ähnliches konnte für die experimentelle Kolitis, dem Mausmodell für entzündliche Darmerkrankungen, beobachtet werden (Wei et al., 2017). Jantsch et al. Beobachteten im Mausmodell, dass eine Salzakkumulation der Haut, bedingt durch salzreiche Ernährung, Makrophagen aktiviert und hierdurch deren proentzündliche Abwehrreaktion fördert (Jantsch et al., 2015). Und auch eine erhöhte Ekzemexazerbation bei Kindern mit atopischer Dermatitis (AD), einer allergischen Hauterkrankung, wurde als Folge eines erhöhten Salzkonsums diskutiert (Finkelstein, 1935).

Innerhalb der letzten Jahre haben wir einen rasanten Anstieg immundysregulierter Erkrankungen beobachten können. Einiges deutet darauf hin, dass die Anpassung unserer Lebensbedingungen der letzten Jahre an jenen Prozessen beteiligt ist. Könnte Speisesalz hierbei tatsächlich eine Rolle spielen?

2.2 Aufbau des Immunsystems und Determinanten der Th-Zelldifferenzierung

Das zelluläre Immunsystem lässt sich in zwei unterschiedliche Gruppen unterteilen: das innate Immunsystem und das adaptive Immunsystem. Beide Anteile arbeiten eng zusammen, lassen sich jedoch in Spezifität und Geschwindigkeit des Einsetzens der Immunreaktion unterscheiden (Davis und Bjorkman, 1988; Iwasaki und Medzhitov, 2015; Medzhitov et al., 1997; Petrie et al., 1993; Tonegawa, 1983).

Das innate Immunsystem ist für die initiale Phase einer Immunantwort verantwortlich. Es ist in der Lage, anhand hochkonservierter Strukturen Pathogene zu detektieren und sofort zu bekämpfen. Hierbei handelt es sich um eine schnelle, jedoch relativ unspezifische Immunantwort, da die Pathogen-erkennenden Rezeptoren im Genom festgelegt sind und im Sinne einer effektiveren Immunreaktion nicht an das Pathogen angepasst werden können (Iwasaki und Medzhitov, 2015; Medzhitov et al., 1997). Durch Antigenpräsentation ist es dem innaten Immunsystem jedoch möglich, das adaptive Immunsystem zu aktivieren, um eine gezielte Immunantwort einzuleiten (Medzhitov et al., 1997).

Im Unterschied zum innaten Immunsystem ist der antigenerkennende Rezeptorbesatz des adaptiven Immunsystems hochvariabel (Davis und Bjorkman, 1988; Petrie et al., 1993). Durch seine Anpassungsfähigkeit wird es möglich, ein Pathogen sehr spezifisch und effizient zu bekämpfen. Nach Kontakt mit einem unbekanntem Pathogen braucht das adaptive Immunsystem einige Tage, um aktiv zu werden. Hierfür benötigt es die Hilfe des innaten Immunsystems durch Antigenpräsentation professioneller Antigen-präsentierender Zellen (Cosenza et al., 1971; Mosier und Coppelson, 1968). Es ist jedoch durch Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses in der Lage, bei nochmaliger Infektion mit demselben Erreger eine stärkere und schnellere Immunantwort zu initiieren (Farber et al., 2014; Gowans und Uhr, 1966). Dies gelingt durch Ausbildung langlebiger CD45RA⁻ CD45RO⁺ T-Gedächtniszellen aus T-Effektorzellen, welche die aktive Phase der Immunabwehr leiten. Ein Teil dieser T-Gedächtniszellen verbleibt in den peripheren Geweben außerhalb des Lymphsystems. Hierbei handelt es sich um C-C Chemokin Rezeptor Typ 7- (CCR7-) negative T-Effektorgedächtniszellen (Teff), welche sich durch eine sehr schnelle spezifische Immunantwort innerhalb weniger Stunden auszeichnen. Zentrale T-Gedächtniszellen (T_{cm}) exprimieren CCR7 und verbleiben im Lymphgewebe oder begeben sich aus der Zirkulation dahin (Sallusto et al., 2004) (**Abb 1**).

In die Gruppe des innaten Immunsystems gehören B-Zell-Rezeptor exprimierende B-Lymphozyten und T-Zell-Rezeptor exprimierende T-Lymphozyten. Das Oberflächenprotein CD3 bildet den T-Zell-Corezeptor und ist somit auf allen T-Zellen zu finden. Die Gruppe der T-Zellen lässt sich abermals unterteilen in zytotoxische CD8⁺ T-Zellen und CD4⁺ T-Helferzellen (Th-Zellen) (Janeway, 1992; Reinherz et al., 1979) (**Abb 1**). Zytotoxische T-Zellen können erkrankte oder entartete Zellen durch Induktion von Apoptose (Rouvier et al., 1993) und weitere Mechanismen (Chávez-Galán et al., 2009) direkt eliminieren. Zusammen mit dem T-Zell-Rezeptor ist der CD8-Rezeptor in der Lage, an den major histocompatibility complex class I (MHC I) zu binden

(Norment et al., 1988), welches auf dem Großteil der Zellen im menschlichen Körper exprimiert wird. Gebunden an MHC I präsentiert die Zelle Proteasom-abhängig und -unabhängig Selbst-Antigene auf ihrer Oberfläche, inklusive intrazellulärer Erregerbestandteile, und gibt hierdurch einen Einblick in ihr Inneres (Antón et al., 1998; Reits et al., 2000). Bindet die CD8+ zytotoxische T-Zelle an ein körperfremdes Peptid an der Zelloberfläche, bekämpft sie die Zielzelle durch Mechanismen wie der Sekretion eines antiviralen, pro-inflammatorischen Zytokinmilieus (Lukens et al., 2006), mittels Fas-FasL-induzierter Apoptose (Kagi et al.,

Das zelluläre Immunsystem

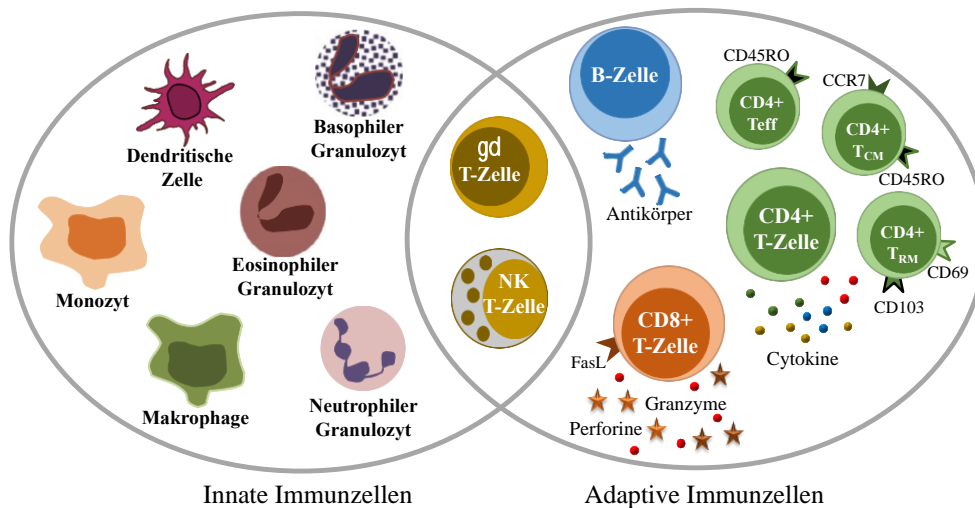


Abbildung 1: Das zelluläre Immunsystem

Das zelluläre Immunsystem lässt sich in innate und adaptive Immunzellen unterteilen. Während das innate Immunsystem mittels Mustererkennungsrezeptoren hochkonservierte Fremddantigene erkennt und eine sofortige Abwehrreaktion einleitet, benötigt das adaptive Immunsystem Zeit, um eine spezifische Abwehrreaktion zu initiieren. Es lässt sich in B-Zellen, welche zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen differenzieren können, und T-Zellen unterteilen. CD8+ T-Zellen besitzen zytotoxische Eigenschaften und exprimieren neben dem TCR das CD8-Oberflächenprotein. CD4-exprimierende T-Helferzellen unterstützen die adaptive und innate Immunreaktion durch Produktion von Zytokinen und lassen sich in eine Vielzahl an Subtypen unterteilen. Durch Entwicklung von Gedächtniszellen lässt sich bei abermaligem Kontakt mit demselben Antigen eine schnellere Immunabwehr einleiten, welche durch CD4+ CD45RO+ CD45RA- Effektorgedächtniszellen ausgeführt wird. Zentrale CCR7+ CD45RO+ CD45RA- Gedächtniszellen besiedeln die lymphatischen Organe, während sich CCR7- CD69+ CD103+ residente T-Gedächtniszellen in peripheren Geweben aufhalten. Manche Immunzellen, wie die $\gamma\delta$ -T-Zellen und die NK T-Zellen besitzen Eigenschaften sowohl des innaten als auch des adaptiven Immunsystems.

Quelle: Verwendet und angepasst aus (Ahmetshahic et al., 2018), Fig 1: *Schematic overview of human hematopoiesis of myeloid and lymphoid lineages.*

1994) sowie durch das Ausschütten zytotoxischer Granulae. Jene Granulae enthalten Granzyme, welche durch porenbildende Perforine in die maligne oder infizierte Targetzelle eindringen können und durch Aktivierung von Proteasen den Zelltod initiieren (Shi et al., 1992). Zytotoxische T-Zellen spielen hierdurch nicht nur eine wichtige Rolle zur Bekämpfung intrazellulärer Erreger, sondern bilden mitunter die wichtigste Abwehrlinie zur Detektion und Zerstörung maligne veränderter Tumorzellen (Melief, 1992).

Eine weitere wichtige Gruppe an T-Zellen bilden die CD4⁺ Th-Zellen. Sie unterstützen die Antikörperbildung von B-Zellen (Raff, 1970), wirken durch Zytokinexpression regulierend auf das innate und adaptive Immunsystem ein (Howard et al., 1982) und können gerichtete Immunreaktionen auf diverse Pathogene lenken und eingrenzen (Mempel et al., 2006). Ihnen kommt also eine übergeordnete leitende Funktion der Immunantwort zu. Ist diese Funktion gestört, kann es zu einer Dysregulation der Immunantwort kommen und infolgedessen zu Abwehrschwächen, Allergien oder Autoimmunität (Raphael et al., 2015; Sakaguchi et al., 1995).

2.2.1 Unterteilung und Abgrenzung der T-Helferzellsubtypen

Th-Zellen sind eine Gruppe von Lymphozyten des adaptiven Immunsystems, welche neben dem T-Zellrezeptor und dem T-Zellcorezeptor auch das Glykoprotein CD4 auf der Zelloberfläche exprimieren. Sie lassen sich in eine Vielzahl von spezialisierten Untergruppen einteilen, welche sich in ihrer Funktion, dem Zytokinexpressionsmuster, Oberflächenrezeptorbesatz und ihrer Transkriptionsfaktorausprägung unterscheiden. Die bahnbrechende Erkenntnis, dass es sich bei Th-Zellen nicht um eine einzige Zellgruppe, sondern um mindestens zwei Subtypen handelt, ermöglichten 1986 Mosmann & Coffman (Mosmann et al., 1986). Ihnen gelang erstmal die Differenzierung von Th1- und Th2-Zellen anhand des Zytokinprofils.

Th1-Zellen sind an der Bekämpfung intrazellulärer Bakterien, Viren und Parasiten beteiligt. Sie lassen sich funktionell anhand ihres Signaturzytokins Interferon- γ (IFN- γ) und ihres Mastertranskriptionsfaktors T-box transcription factor (Tbet) erkennen. Eine Dysregulation der Th1-Immunantwort kann die Entstehung verschiedener organspezifischer Autoimmunerkrankungen, wie Typ 1 Diabetes mellitus (Csorba et al., 2010) und Hashimoto Thyreoiditis (Antonelli et al., 2015), begünstigen. Auch an der Pathogenese der MS scheinen Th1-Zellen beteiligt zu sein, wie die EAE-Induktion durch Transfer von Th-Zellen mit Th1 Eigenschaften (Ando et al., 1989) sowie Beobachtungen einer hohen Expression des Th1-Signaturzytokins IFN- γ in humanen MS-Läsionen (Lock et al., 2002) vermuten lässt.

Th2-Zellen sind an der Bekämpfung von Helminthen beteiligt und spielen deshalb eine große Rolle bei Wurmerkrankungen. Neben ihrem Signaturzytokin Interleukin-4 (IL-4) produzieren sie typischerweise Interleukin-5 (IL-5) und Interleukin-13 (IL-13). Hierdurch rekrutieren sie Mastzellen, Eosinophile und Basophile. Diese Zelltypen sind auch am Ablauf allergischer Hyperreaktionen beteiligt. Eine überschießende

Aktivität von Th2-Zellen mit Stimulation von Mastzellen und Eosinophilen kann somit die Entstehung allergischer Erkrankungen, wie der AD, der allergischen Rhinitis oder dem allergischen Asthma, begünstigen. Die AD ist zwar als typische Th2-induzierte Erkrankung bekannt, wieso es jedoch im Krankheitsverlauf zu jener überschießenden Th2-Antwort kommt, ist bisher unzureichend erklärt. Th2-Zellen exprimieren den Mastertranskriptionsfaktor GATA-binding protein 3 (GATA3) (Matthias und Zielinski, 2019).

Die regulatorischen Treg-Zellen (Treg) besitzen immunsuppressive Eigenschaften und limitieren Immunreaktionen. Dies ist wichtig, um eine Schädigung des entzündeten Gewebes durch eine überschießende Immunantwort zu vermeiden. Tregs nehmen eine Schlüsselrolle bei der Vermittlung von Toleranz gegenüber Selbstantigenen ein und spielen somit eine wichtige Rolle zur Prävention autoreaktiver Immunreaktionen. Sie können, je nach ihrer Entstehung in Thymus oder der Peripherie nach Bindung an ein Autoantigen, in natürliche (nTreg) und induzierte Tregs (iTreg) unterschieden werden. Beide Treg-Typen exprimieren forkhead box P3 (FOXP3) als ihren Mastertranskriptionsfaktor, dieser besitzt bei den nTregs jedoch eine stabilere Expression durch epigenetische Demethylierung des CpG-reichen Areal seines *upstream-enhancers* (Lal et al., 2009). Ihre immunsuppressiven Eigenschaften vermitteln sie zellgebunden sowie durch Sekretion der anti-inflammatorischen Zytokine Interleukin-10 (IL-10) und transforming growth factor- β (TGF- β) sowie durch vielfältige weitere Mechanismen (Richards et al., 2015).

Vor etwa 15 Jahren konnten Th17 Zellen als eine eigenständige Th-Population abgegrenzt werden (Harrington et al., 2005; Steinman, 2007; Yang et al., 2007). Sie sind an der Bekämpfung extrazellulärer Bakterien und Pilzinfektionen beteiligt und wurden für die Entstehung entzündlicher, autoimmuner Erkrankungen, wie der MS, verantwortlich gemacht (Acosta-Rodriguez et al., 2007). 2012 konnten Zielinski et al. jedoch zeigen, dass Th17-Zellen nicht ausschließlich pro-inflammatorische Eigenschaften besitzen, sondern sich in zwei Subpopulationen unterteilen lassen: eine pro-inflammatorische Th17-Population, welche IFN- γ mit dem Th17-Signaturzytokin Interleukin-17 (IL-17) koexprimiert, und eine anti-inflammatorische Th17-Population, welche neben IL-17 das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 produziert (Noster et al., 2016; Zielinski et al., 2012). Sie entstehen abhängig vom Pathogen- und Zytokinmikromilieu während der Th-Zelldifferenzierung. Der Mastertranskriptionsfaktor beider Th17-Subtypen ist RAR-related orphan receptor-gamma t (ROR- γ t).

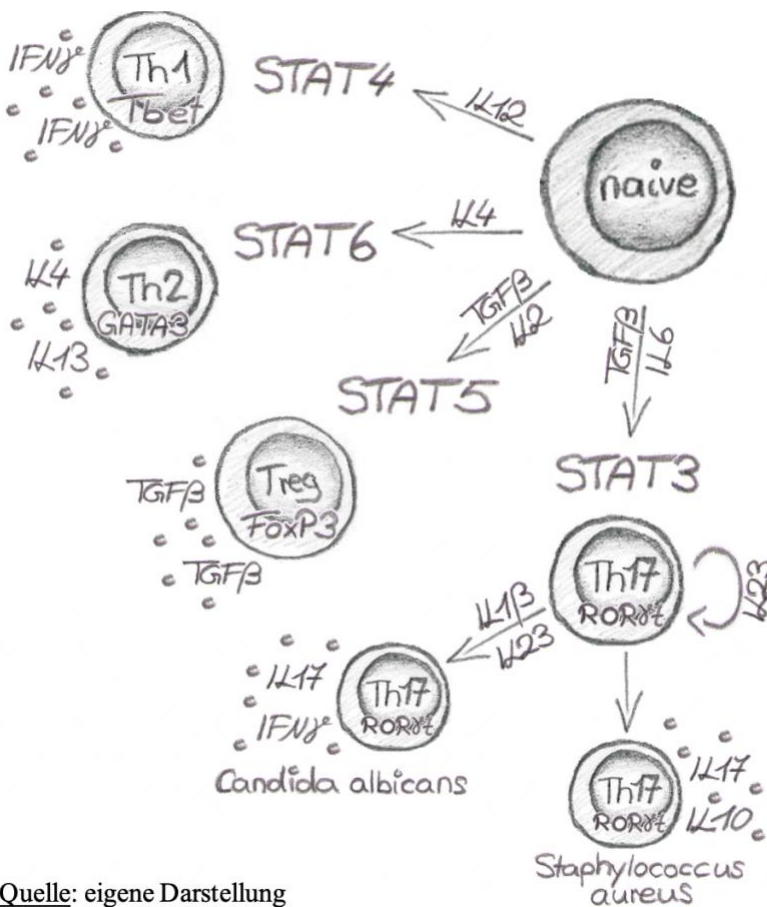
Neue technische Möglichkeiten, insbesondere durch hochdimensionale Einzelzellanalysen, und der Fortschritt der immunologischen Forschung erlauben eine zunehmend genauere Charakterisierung von Th-Zellen und somit auch die Entdeckung einer wachsenden Anzahl neuer Th-Subgruppen, wie Th9 (Veldhoen et al., 2008), Th22 (Duhon et al., 2009) oder ThGMCSF (Noster et al., 2014). Hierdurch verschwimmen die Grenzen zwischen den jeweiligen Th-Subtypen: so konnten beispielsweise IL-4 – IFN- γ (Peine et al., 2013) oder IL-4 – IL-17 (Cosmi et al., 2010) koexprimierende Zellen beobachtet werden. Ich beschränke mich hier auf die oben genannten Zelltypen.

2.2.2 Die Determinanten des Th-Zellschicksals

Die Gesamtheit der Th-Zellen setzt sich aus einer Vielzahl verschiedener Th-Subtypen zusammen. Diese entstehen alle aus derselben Vorläuferzelle: der naiven Th-Zelle. Die Entscheidung über das Th-Zellschicksal, in welche Art von Th-Zelle sich die naive Th-Zelle folglich entwickelt, hängt von der Beschaffenheit des Mikromilieus ab, in welchem die naive Zelle ihren ersten Antigenkontakt erfährt. Abhängig vom Zytokinmilieu kommt es zur Aktivierung von signal transducers and activators of transcription (STAT)-Proteinen (Ihle, 1996). Diese fungieren als Weichensteller für die nachfolgende Entwicklung in einen reifen Th-Subtyp. Zudem inhibiert die Aktivierung eines STAT-Signalweges die STAT-Signalwege anderer Th-Subtypen. Die STAT-Proteine sind also linienspezifisch und legen den Werdegang der Th-Zelle frühzeitig fest (Vahedi et al., 2012) (Abb 2).

Die Anwesenheit von Interferonen oder Interleukin-12 (IL-12), durch beispielsweise Makrophagen des innate Immunsystems, führt während der Th-Zellentwicklung zur Aktivierung des STAT4-Signalweges. Durch Hochexpression von Tbet wird die Entwicklung von Th1-Zellen initiiert. Eine Entwicklung in Richtung Th2-

Abbildung 2: Die Schicksalsentscheidung und Klassifikation der Th-Zellen



Quelle: eigene Darstellung

Das Zytokinmikromilieu führt während der Aktivierung einer naiven Th-Zelle zur Phosphorylierung von STAT-Proteinen, welche als Weichensteller das zukünftige Th-Zellschicksal bestimmen. Die Th-Zellen lassen sich daraufhin anhand charakteristischer Eigenschaften, wie Signaturtranskriptionsfaktoren und Th-zelltypischen Zytokinprofilen in verschiedene Th-Zellsubtypen einteilen. Der Th17-Subtyp unterteilt sich abermals in Th17-Zellen mit pro- und anti-inflammatorischen Eigenschaften, welche sich in Zytokinmuster und Pathogenität unterscheiden. Verschiedene Umfeld-faktoren, welche jene Th17-Differenzierung beeinflussen, sind bereits bekannt – dies begrenzt sich jedoch größtenteils auf Zytokine.

Identität wird durch STAT6 Aktivierung mit nachfolgender GATA3 Stimulation initiiert. Hierfür ist die Anwesenheit des Th2-Schlüsselzytokins IL-4 während der Th-Zellaktivierung notwendig (Murphy und Weaver, 2017). Initial nach Identifizierung der Th2-Zellen als ein abgrenzbarer Th-Subtyp nahm man an, die Th2-Zelle sei die einzige Zelle, die zur IL-4-Produktion in der Lage ist. Gleichzeitig hielt man IL-4 jedoch auch für einen unverzichtbaren Stimulus zur Th2-Induktion. Folglich musste man davon ausgehen, dass eine Th2-Induktion ausschließlich in Gegenwart bereits differenzierter Th2-Zellen als IL-4-Produzenten stattfinden konnte: doch was war nun als erstes da, die Th2-Zelle oder IL-4 – die Henne oder das Ei? Dieser Zusammenhang wurde als Th2-Paradox zusammengefasst (Maier et al., 2012). Auf der Suche nach Erklärungsansätzen für jenes Th2-Paradox wurde angenommen, die Th2-Entwicklung könnte ein vorgegebener Entwicklungsweg sein, welcher in Abwesenheit anderer Polarisationszytokine automatisch zur Entstehung von Th2-Zellen führt (Ouyang et al., 2000). IL-4 spielt noch immer eine Schlüsselrolle zur Induktion einer Th2-Immunantwort, mittlerweile sind jedoch weitere IL-4-Produzenten bekannt: hierzu gehören Basophile, Tfh, Mastzellen und Typ 2 innate lymphoid cells (ILC2). Diese könnten durch Aufbau einer Th2-förderlichen Umgebung zur Th2-Entstehung beitragen. Obwohl Basophile als potente IL-4 Produzenten gelten und folglich optimale Bedingungen zur Th2-Polarisierung bieten sollten, traten Basophile, vor allem auf Grund ihrer schwachen Expression kostimulatorischer Rezeptoren sowie ihres Unvermögens zur suffizienten Antigenpräsentation (Voskamp et al., 2013), als Th2-Induktoren vermehrt in den Hintergrund. Verschiedene Studien zeigten auf, dass auch in Abwesenheit von Basophilen noch eine Th2-Induktion möglich ist und durch dendritische Zellen (DC) induziert werden kann (Hammad et al., 2010; Kim et al., 2010). Antigenpräsentierende DCs stellen somit wichtige Th2-Induktoren dar, obwohl eine signifikante IL-4-Expression durch DCs bislang nicht beobachtet werden konnte (Hammad et al., 2010; Phythian-Adams et al., 2010). Dies macht deutlich, dass auch Faktoren jenseits von IL-4 zur Initiation einer Th2-Immunantwort in der Lage sein müssen. Hiermit im Einklang konnte beobachtet werden, dass die Aktivierung des Notch-Ligand- und OX40-Ligand-Signalweges durch DCs auch ohne IL-4-Expression eine Th2-Immunantwort in Th-Zellen ermöglicht (Fang et al., 2007; Huang et al., 2019). Ein weiterer Faktor, welcher ebenfalls Einfluss auf die Entscheidung von Th1-versus Th2-Schicksal zu nehmen scheint, ist die T-Zell-Rezeptor- (TCR-)Signalstärke (Tao et al., 1997). Anders als lange Zeit angenommen, scheinen folglich auch Signale neben IL-4 in der Lage zu sein, eine Th2-Immunantwort zu induzieren. Jene Entdeckung ist neu und die Identifikation weiterer Th2-Induktoren noch in ihren Anfängen. Die Reichweite jener Mediatoren mit Potenz zur Th2-Induktion – auch über typische Immunmediatoren wie Zytokinstimulation und Immunrezeptorbindungen hinaus – erfordern weitere Forschung. Interessanterweise fanden Morgan et al., dass ein Anstieg der Dichte N-Glykan-gebundener Glykosaminoglykane (GAG) am T-Zell-Rezeptor ebenfalls die TCR-Signalstärke abschwächt und die Entstehung eines Th2-Phänotyps begünstigt (Morgan et al., 2004). Da die TCR-gebundenen GAGs durch ihre positiv geladenen Seitenäste in der Lage sind, Anionen in direkter Nachbarschaft zur Th-Zelle anzureichern,

ist eine Beteiligung jener Anionen am beobachteten Th2-Shift nicht auszuschließen. Ionische Gewebefaktoren sollten folglich ebenfalls als Einflussfaktoren der Th2-Immunität diskutiert werden.

Interleukin-6 (IL-6) und TGF- β begünstigen durch Aktivierung des STAT3 Signalweges eine Hochregulation von ROR- γ t und hierdurch die Entstehung von Th17-Zellen (Bettelli et al., 2006; Veldhoen et al., 2006). Interleukin-23 (IL-23) trägt in späteren Abschnitten der Th17-Entwicklung zur Verstärkung des Th17-Programms bei (Langrish et al., 2005). Die Entwicklung in Richtung pro- oder anti-inflammatorischen Th17-Phänotyp wird nach unserem bisherigen Verständnis durch die Zusammensetzung des Th17-Zytokinmilieus kontrolliert. Interleukin-1 β (IL-1 β) konnte hier als wichtige Determinante im Bereich der Zytokine herausgestellt werden, welche die Expression von IL-10 durch Th17-Zellen blockiert und durch Stimulation einer IL-17-IFN- γ -Koexpression die Entstehung pro-inflammatorischer Th17-Zellen begünstigt (Noster et al., 2016; Zielinski et al., 2012). Während im humanen Modell die Anwesenheit von IL-1 β zur Entwicklung pro-inflammatorischer Th17-Zellen führt, ist im murinen Modell IL-23 die kritische Determinante, welche die Entstehung pro-inflammatorischer Th17-Zellen bewirkt (McGeachy et al., 2007; Zielinski et al., 2012). Die Stimulation naiver muriner Th-Zellen in Gegenwart von TGF- β und IL-6 induziert die Koexpression von IL-10 mit dem Th17-Signaturzytokin IL-17 und ist im Gegensatz zu ihrem IL-23-stimuliertem Pendant nicht mehr zur EAE-Induktion in der Lage (McGeachy et al., 2007). Die Expression des IL-23-Rezeptors wird Notch-induzierte über den Transkriptionsfaktor CBF1 reguliert, welcher zusammen mit ROR- γ t den IL-23-Promotor aktiviert und hierdurch eine IL-23-Rezeptorexpression induziert (Meyer zu Horste et al., 2016). Auch FOXP3-ROR- γ t-koexprimierende Th17-Zellen mit regulatorischen Eigenschaften in der Schleimhaut des Darms und der Lunge konnten identifiziert werden (Lochner et al., 2008; Ohnmacht et al., 2015; Yang et al., 2016). Ein weiterer Einflussfaktor auf die Pathogenität der Th17-Zellen ist die Beschaffenheit des in Kontakt tretenden Pathogens: Während *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) eine Induktion anti-inflammatorischer IL-10-produzierender Th17-Zellen stimuliert, exprimieren *Candida albicans*-spezifische Th17-Zellen IFN- γ und besitzen pro-inflammatorische Eigenschaften (Zielinski et al., 2012).

Einige Signalwege konnten bereits als wichtige Leitstrukturen für die funktionelle Dichotomie des Th17-Phänotyps herausgestellt werden, diese beschränken sich jedoch bisher größtenteils auf Zytokin-regulierte Prozesse. Interessanterweise entdeckten Wang et al., dass auch Differenzen im Fettsäureprofil der Th17-Zelle pro- beziehungsweise anti-inflammatorische Eigenschaften in Th17-Zellen induzieren können (Wang et al., 2015). Auch die Konstitution des Darmmikrobioms ist in der Lage, das dichotome Th17-Gleichgewicht zu beeinflussen (Ohnmacht et al., 2015). Hierdurch wird deutlich, dass Gewebefaktoren außerhalb des Zytokin-Bereiches ebenfalls in der Lage sind, die Th17-Dichotomie zu regulieren. Ein wichtiger immunologischer Einflussfaktor, dessen potentielle Bedeutung für die Th17-Dichotomie jedoch bislang vernachlässigt wurde, ist die ionische Konstitution peripherer Gewebe. Dies bedarf einer genaueren Klärung.

Während die meisten Polarisationszytokine linienspezifisch sind und die Signalwege anderer Th-Subtypen unterdrücken, wird TGF- β nicht nur zur Entstehung von Th17-Zellen, sondern auch zur Induktion von iTregs benötigt (Zheng et al., 2002). iTregs entstehen jedoch nur in Abwesenheit von IL-6, welches am Polarisationsprozess von Th17-Zellen beteiligt ist (Bettelli et al., 2006). TGF- β und Interleukin-2 (IL-2) führen zur Aktivierung des STAT5 Signalweges, welcher die Expression von FOXP3 erhöht und die immunregulatorischen Eigenschaften der Treg-Zelle weckt (Chen et al., 2011). nTregs entstehen nicht aus konventionellen T-Zellen, sondern stammen von CD4⁺ CD8⁺ Thymozyten ab (Nunes-Cabaço et al., 2011). Auch deren Entwicklung ist abhängig von IL-2-Stimulation (Malek et al., 2002). Durch epigenetisch regulierte Prozesse besitzen sie eine stabilere FOXP3 Expression als ihr peripher differenziertes iTreg-Pendant (Lal et al., 2009).

2.2.3 Der Einfluss des Mikromilieus auf die Th-Zelleigenschaften

Th-Zellen entwickeln sich, abhängig von den Stimuli ihrer Umgebung, aus einer naiven Vorläuferzelle heraus in eine Vielzahl unterschiedlicher Th-Zellsubtypen. Doch auch ausgereifte Th-Zellen sind in der Lage, auf die Ansprüche ihres Umfelds zu reagieren und können sich phänotypisch und funktionell anpassen (Ahmadzadeh und Farber, 2002; Hegazy et al., 2010; Lee et al., 2009). Unser Immunsystem zeichnet sich somit durch eine herausragende Flexibilität und Plastizität aus. Immunologische Faktoren, wie die Zytokinzusammensetzung des Mikroumfelds (Lee et al., 2009) oder variable TCR-Bindungsstärken (Snook et al., 2018), formen die Immunzelle und passen so ihre Funktion den neuen Gegebenheiten an.

Das Immunsystem ist jedoch nicht nur jenen typischen immunologischen Faktoren ausgesetzt: Die peripheren Gewebe außerhalb der Blutbahn, welche den größten Anteil an Immunzellen beherbergen, unterliegen im Gegensatz zum Blut erheblichen Konzentrationsschwankungen an Mineralien und Nährstoffen (Liu et al., 2018b; Nicholas et al., 2019; Ono et al., 2018; Titze et al., 2003). Auch physikalische Gegebenheiten, wie Temperatur oder Druck, unterscheiden sich abhängig vom Gewebe (Liu et al., 2018a; Solis et al., 2019). Sind jene Umweltbedingungen ebenfalls an der Modulation von Immunfunktionen beteiligt?

Innerhalb der letzten Jahre rückten die erweiterten Umweltfaktoren bei der Betrachtung der Immunzelle mehr und mehr ins Augenmerk. Die Inhalation kalter Luft zeigte im Mausmodell einen Anstieg der Th2 typischen Zytokine IL-4 und IL-13 in alveolaren und bronchialen Flüssigkeiten (Liu et al., 2018a). Unser Darmmikrobiom, dessen Spezieszusammensetzung sich unserer Ernährung anpasst, wirkt sich auf die Balance zwischen Tregs und Th17 Zellen aus. Eine geringe Artenvielfalt des Darmmikrobioms in früher Kindheit verlagert das Th1-Th2-Gleichgewicht in Richtung Th2 und könnte hierdurch die Entstehung von Allergien begünstigen (Bisgaard et al., 2011). Nährstoffe im Gewebe, wie Glucose (Macintyre et al., 2014; Ono et al., 2018), Fettsäuremetabolite (Nicholas et al., 2019), Steroidstoffwechselprodukte (Acharya et al., 2019), Mineralstoffe (Dünkelberg et al., 2020) oder das Sauerstoffangebot (Liu et al., 2018b) wirken sich nachweislich

auf Th-Zellfunktionen aus. Auch Schwankungen der Ionenzusammensetzungen haben einen Einfluss auf die T-Zellaktivität: Hohe Konzentrationen an Kalium in nekrotischem Tumorgewebe schränken T-Zell-Effektorfunktionen ein und schwächen die Immunabwehr von Tumorzellen (Eil et al., 2016). Und auch Natrium, das extrazellulär am stärksten vertretene Kation im menschlichen Körper, interagiert mit verschiedenen Zelltypen des innatem und adaptiven Immunsystems. Anders als Kalium befindet sich der größte Anteil des Natriums extrazellulär. Immunzellen im Extrazellularraum sind ständig von Natrium umspült – das macht Natrium zu einem interessanten Einflussfaktor auf das Immunsystem. Die allgemeine Lehrbuchmeinung vertritt jedoch die These einer stringenten Kontrolle des extrazellulären Natriums in engen Grenzen (Kurtz und Wagner, 2016; Schwab und Oberleithner, 2019). Natrium ist zudem, im Gegensatz zu Kalium, vor allem im Extrazellularraum präsent und liegt nur in geringen Mengen, zu 2%, intrazellulär vor (Müller-Plathe, 2019b). Kalium ist im Gegensatz hierzu zu nur 2% im Extrazellularraum und zu 90% intrazellulär zu finden (Müller-Plathe, 2019a). Bei der Lyse von Zellen mit Freigabe intrazellulärer Ionen müsste es folglich zu einem drastischen Anstieg des Kaliums, nicht jedoch des Natriums kommen. Tatsächlich konnten Kaliumanreicherungen in infektiösem und nichtinfektiösem nekrotischem Gewebe gefunden werden, die Natriumkonzentration des Extrazellularraums blieb von der Gewebsnekrose jedoch größtenteils unbeeinflusst (Zimmerli und Gallin, 1988). Bei pathologischen Prozessen mit Zelluntergang, wie beispielsweise im Tumorgewebe oder nach einer Gewebsverletzung, dürfte es folglich kaum zu Schwankungen des Natriums im Gewebe kommen. Ist der Einfluss hoher Natriumkonzentrationen auf das Immunsystem überhaupt klinisch relevant?

2.3 Physiologie und Verteilung von NaCl im menschlichen Körper

Natrium ist das wichtigste Kation des Extrazellularraums und macht hier mit einer durchschnittlichen Konzentration von 140 mM die Hälfte der Gesamtmolarität aus (Kurtz und Wagner, 2016). Es ist für die Aufrechterhaltung des Membranpotentials unersetzlich und spielt folglich durch die Initiation von Aktionspotentialen eine wichtige Rolle für die Nervenleitung und die Muskelkontraktion (Fatt und Katz, 1952). Natrium wird dem Körper hauptsächlich über den Verzehr von Kochsalz-versetzten Nahrungsmitteln zugeführt. Als Hauptausscheidungsorgan wird derzeit die Niere angesehen, ein Teil des Natriums verlässt den Körper jedoch auch über Stuhl oder Perspiration (Müller-Plathe, 2019b).

Die allgemeine Lehrbuchmeinung vertritt die Ansicht, die Natriumkonzentration werde im Plasma sowie im Interstitium von der Niere in sehr engen Grenzen konstant gehalten (Kurtz und Wagner, 2016; Schwab und Oberleithner, 2019). Hierdurch entstehe eine isotone Lösung, welche alle zellulären Strukturen umgibt. Von der jeweiligen Natriummenge, welche dem Körper zugeführt wird, verbleibe stets nur so viel im Körper, wie durch Verluste in Stuhl und Schweiß ausgeglichen werden muss (Gekle, 2015; Kurtz, 2014). Da Natrium osmotisch aktiv ist und das wichtigste Ion für die Regulation des Wasserhaushaltes darstellt, müsste, nach den

Regeln der Physik, jede Änderung der Natriumkonzentration des Extrazellularraums unverzüglich durch Retention von Wasser eine Volumenänderung nach sich ziehen (Schwab und Oberleithner, 2019).

Auf dieser Annahme einer balancierten Natriumaufnahme und -ausscheidung basiert auch die Natriumquantifizierung im 24h-Sammelurin – dem Goldstandard zur Bestimmung der Natriumzufuhr (Chen et al., 2018; Meier und Vogt, 2014; Wielgosz et al., 2016). Doch bereits Beobachtungen von vor mehr als 100 Jahren lassen Zweifel an dieser physiologischen Grundannahme laut werden – ist unser Körternatriumbestand tatsächlich so stabil wie bisher angenommen?

2.3.1 Die Speicherung von osmotisch inaktivem Natrium im Körper

Noch immer gilt die allgemeine Lehrbuchmeinung, die tägliche Natriumzufuhr mit der Nahrung entspräche der Menge an Natrium, welche über den Tag verteilt ausgeschieden wird (Meier und Vogt, 2014). Im Körper verbleibendes Salz würde hiernach zu einer Retention von Wasser mit Anstieg des Gesamtkörperwassers führen.

Diese Ansicht hält sich standhaft in den Lehrbüchern, obwohl bereits seit einigen Jahren begründete Zweifel hieran beschrieben werden. 2002 bemerkten Heer et al. während einer Studie zur Rolle des natriuretischen Peptids unter dem Einfluss verschiedener Mengen an diätetisch zugeführtem NaCl einen Anstieg des Plasmavolumens durch salzreiche Diät ohne Anstieg des extrazellulären Volumens. Nachfolgende Untersuchungen zeigten, dass im Kontrast zum intravaskulären Volumen das Gesamtkörperwasser, der Body Mass Index, sowie das totale extrazelluläre Volumen nach einem erhöhten Salzkonsum nicht anstiegen, auch wenn die Salzausscheidung die Salzaufnahme untertraf. Natrium schien folglich ohne Erhöhung des extrazellulären Körperwassers im Körper gespeichert zu werden (Heer et al., 2000). Hiermit im Einklang beobachteten Titze et al. eine Speicherung osmotisch-inaktiven Natriums in salzreich ernährten Ratten (Titze et al., 2002) und konnten die Haut als Ort jener NaCl-Speicherung identifizieren (Titze et al., 2003). Der Anstieg negativ geladener GAGs parallel zum Natriumanstieg in der Haut lässt einen aktiven Speicherprozess vermuten (Titze et al., 2004). Die Beobachtung des „Verschwindens“ wasserfreiem Natrium im extrazellulären Raum sowie der Unzuverlässigkeit des 24h-Sammelurins ist bereits häufig beschrieben worden (Baird und Haldane, 1922; Kirkendall et al., 1976; Klikowicz, 1886), jedoch regelmäßig mit fehlerhafter Diät durch unzureichende Compliance der Studienteilnehmer oder zu kurzem Studienzeitraum abgetan. 2009 konnten diese Beobachtungen jedoch im Rahmen einer Natrium-Langzeitbilanzierung während einer Weltraumflugsimulationen unter höchst kontrollierten Bedingungen abermals bestätigt werden. Nach Analyse von Natriumaufnahme und -exkretion in Urin und Stuhl beobachteten Rakova et al. rhythmische Schwankungen mit Phasen von Natriumretention und -exkretion, welche auch hier erneut nicht in Zusammenhang mit Blutdruck oder Gesamtkörperwasser standen (Rakova et al., 2013). NaCl scheint folglich

zeitweise ohne Einlagerung von Wasser im extrazellulären Raum zu akkumulieren. Die Frage, die sich hier nun als nächstes stellt ist: Wo wird das Natrium gespeichert?

2.3.2 Die Beteiligung der Haut als NaCl-Speicher an der NaCl-Homöostase

Das Gibbs-Donnan-Equilibrium wird häufig für die Kalkulation der Ionenkonzentrationen intra- und extravaskulärer Flüssigkeiten verwendet und beschreibt die Ionenverteilung zwischen zwei Räumen - intravaskulärem und interstitiellem Raum - über eine semipermeable Membran (Nguyen und Kurtz, 2006). Nach jenem Zwei-Kompartiment-Modell müsste im gesamten extravaskulären Raum überall dieselbe Ionenzusammensetzung zu messen sein. Messungen der Natriumkonzentration des Plasmas, der Lymphflüssigkeit sowie subkutaner Gewebeflüssigkeit im Kaninchen ergaben jedoch bereits 1982 höhere Natriumkonzentrationen in subkutaner Gewebeflüssigkeit als in der Lymphflüssigkeit regionaler Lymphknoten, welche sich mit dem Gibbs-Donnan-Equilibrium nicht erklären ließen (Szabo und Magyar, 1982). Szabo et al. blieben mit jener überraschenden Beobachtung nicht allein (Cannon, 1932; Ivanova et al., 1978). Das interstitielle Milieu der Haut scheint sich folglich in seiner Zusammensetzung von anderen extravaskulären Gebieten zu unterscheiden. Könnte die Haut als Speicherorgan überschüssiger Salzmengen im Körper fungieren?

Tatsächlich konnte beobachtet werden, dass die Haut durch Polymerisation und Änderung des Grades der Sulfatierung von GAGs in der Lage ist, durch den Anstieg positiver Ladungen hohe Mengen an NaCl in osmotisch inaktivem Zustand zu speichern (Machnik et al., 2009). Angelockt durch die NaCl-reiche Umgebung der Haut sind die kutanen Makrophagen hier in der Lage, die Struktur der Haut zu verändern und dadurch Einfluss auf die Natriumhomöostase zu nehmen. Dies wird durch eine verstärkte Expression des salzsensitiven Transkriptionsfaktors nuclear factor of activated T-cells 5 (NFAT5) vermittelt und induziert pro-inflammatorische Eigenschaften in Makrophagen (Jantsch et al., 2015). Hohe Salzkonzentrationen wirken sich hierdurch auf die Abwehrfunktion von Makrophagen aus. Doch was bedeutet das für das adaptive Immunsystem?

2.4 Die Interaktion von NaCl mit Immunzellfunktionen

2.4.1 Die immunologische Bedeutung der Haut – Verteilung von Gedächtniszellen im menschlichen Körper

Die Beobachtungen zu Funktionalität und Phänotyp von Makrophagen im salzreichen Mikromilieu der Haut machen deutlich, dass ionische Umweltfaktoren tatsächlich Einfluss auf unser Immunsystem nehmen (Jantsch et al., 2015; Machnik et al., 2009). Makrophagen besiedeln das Hautgewebe in großer Zahl, jedoch auch residente T-Gedächtniszellen (T_{RM}) des adaptiven Immunsystems sind hier reichlich vertreten (Clark et al., 2006) und hierdurch ebenfalls den hohen NaCl-Konzentrationen des Hautgewebes ausgesetzt. Die Th-Zellen

des Hautgewebes lassen sich in zwei Gruppen unterteilen: Während ein Teil der eingewanderten T-Zellen das entzündete Gewebe wieder in Richtung Blutbahn verlässt und rezirkuliert, verbleibt ein anderer Anteil dauerhaft im Gewebe der Haut (Clark et al., 2006; Clark et al., 2012). Den größten Anteil an kutanen residenten T-Zellen stellen mit über 95% die Gedächtniszellen, während naive T-Zellen vorwiegend die primären und sekundären lymphatischen Gewebe bewohnen (Gunn et al., 1998). Das Verbleiben kutaner residenter T-Gedächtniszellen im Hautgewebe bietet der Haut bei Reexposition mit demselben Erreger einen schnellen und effektiven Schutz vor Pathogenen. Da die Haut als umhüllende und abschließende Körperstruktur eine besonders exponierte Lage mit ständigem Kontakt zu potentiellen Pathogenen einnimmt, ist die kurze Reaktionszeit der residenten Haut-T_{RM}-Zellen nach Exposition mit einem bereits bekannten Erreger hier besonders wichtig.

Sieht man sich die Verteilung von T-Zellen im menschlichen Körper an, findet sich der Hauptteil der Gedächtniszellen nicht im Blut, sondern in den peripheren Geweben (Zielinski, 2017). Alleine in der Haut finden sich ungefähr eine Millionen T-Zellen pro cm², welche langlebig die Haut kolonisieren (Clark et al., 2006). Dies entspricht, auf die gesamte Körperoberfläche bezogen, ungefähr 20 Billionen dauerhaft das kutane Interstitium bewohnenden T-Zellen. Hiermit enthält allein die Haut bereits fast doppelt so viele T-Zellen, wie in der Blutzirkulation zu finden sind (Clark et al., 2006). Nur ein kleiner Anteil von 2,2% aller Lymphozyten im menschlichen Körper hält sich tatsächlich im Blutstrom auf, während mit 15% fast das Siebenfache in der Peripherie außerhalb von Blut und lymphatischen Geweben verteilt ist (Trepel, 1974). Ein beträchtlicher Anteil der Lymphozyten unseres adaptiven Immunsystems ist somit den äußeren Umweltbedingungen der peripheren Gewebe ausgesetzt. Da der NaCl-Gehalt der Körperperipherie außerhalb des Blutstroms Schwankungen unterliegt, ist ein Kontakt jener Gewebslymphozyten mit erhöhten NaCl-Konzentrationen wahrscheinlich und könnte potentiell Einfluss auf Immunfunktionen nehmen. Wie wirkt sich nun das NaCl-reiche Gewebemilieu auf die Funktionalität unseres adaptiven Immunsystems aus?

2.4.2 Veränderung von T-Helferzeleigenschaften in salzreichen Mikromilieu

Das NaCl-reiche kutane Interstitium der Haut ist in der Lage, Einfluss auf die immunologische Funktion von Komponenten des innate Immunsystems zu nehmen. Auch ein wesentlicher Anteil an residenten T-Zellen ist diesem NaCl-reichen Milieu ausgesetzt. Hat das natriumreiche Milieu auch hier einen Einfluss auf Phänotyp und Funktion der T-Zellen?

Tatsächlich konnte 2013 mehrmals unabhängig voneinander eine Verstärkung des Th17 Phänotyps mit Induktion pro-inflammatorischer Eigenschaften beobachtet werden (Kleinewietfeld et al., 2013; Wu et al., 2013). Eine Erhöhung der NaCl-Konzentration um 40 mM führte in der Zellkultur humaner und muriner naiver Th-Zellen in Gegenwart Th17-induzierender Zytokine zur erhöhten Expression des Th17-Signaturzytokins IL-17 und des Mastertranskriptionsfaktors ROR- γ t. Dies ging einher mit einem Anstieg pro-inflammatorischer

Zytokine, wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), IL-2 und granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). Vermittelt wurde die Induktion dieses pro-inflammatorischen Th17-Phänotyps durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT5 und der Serum-Glukokortikoid-regulierten Kinase 1 (SGK1) *downstream* von NFAT5 (Kleinewietfeld et al., 2013; Wu et al., 2013). Ferner konnte in der Maus nach salzreicher Diät eine Verstärkung der Krankheitsintensität der EAE, dem Tiermodell der MS, beobachtet werden. Dies ging einher mit vermehrten Th17-Zellinfiltraten im zentralen Nervensystem der salzreich ernährten Tiere (Kleinewietfeld et al., 2013). Die Anwesenheit erhöhter Natriumkonzentrationen während des Th17-Polarisationsprozesses scheint folglich zur Entstehung pro-inflammatorischer Th17-Zellen mit Begünstigung schwerer Verläufe von Autoimmunerkrankungen, wie der MS, beizutragen. Unklar ist jedoch, wie sich die peripher erhöhten NaCl-Konzentrationen auf bereits differenzierte Th17-Zellen auswirken.

Interessanterweise beeinflusst die salzsensitive Kinase SGK1, welche den pathologischen Th17-Phänotyp in salzreicher Umgebung vermittelt, auch das Th1-Th2-Schicksal: Heikamp et al. beobachteten die Unterdrückung der IL-4- und GATA3-Expression in naiven SGK1-deletierten murinen T-Zellen unter Th2-begünstigender Zytokinstimulation (Heikamp et al., 2014). Dies ging einher mit einem Anstieg Th1-typischer Eigenschaften, wie der Expression von IFN- γ und Tbet. Auch *in vivo* zeigte sich die SGK1-abhängige Abschwächung der Th2-Antwort anhand reduzierter Asthmasymptome im Mausmodell SGK1-deletierter Mäuse (Heikamp et al., 2014). Ob sich das Th1-Th2-Gleichgewicht auch durch NaCl-induzierte SGK1-Aktivierung beeinflussen lässt, ist bisher jedoch nicht ausreichend untersucht. Interessanterweise konnte jedoch eine Th2-Verschiebung in humanen PBMCs nach Inkubation mit dem Lebensmittelzusatzstoff Natriumbenzoat beobachtet werden (Rezaei et al., 2016). Da Natriumbenzoat in wässrigem Medium in seine ionischen Bestandteile zerfällt, ist eine Beteiligung von Natrium an der Hochexpression des Th2-Signaturzytokins IL-4 und Mindereexpression von IFN- γ nicht ausgeschlossen. Zudem konnte eine Beteiligung des Natrium-sensitiven Natriumkanals Na(x) an der Krankheitsausprägung der AD, einer allergischen Erkrankung mit dysregulierter Th2-Immunantwort, beobachtet werden: Inhibition von Na(x) führte im Tiermodell der AD nicht nur zur Besserung des Hautbefundes, sondern auch zu einer reduzierten Expression des Th2-Signaturzytokins IL-4 in der Dermis (Zhao et al., 2020). Weitere Forschung ist nötig, um den Effekt von NaCl auf die Th1-Th2-Balance tiefergehend zu klären.

Auch für Tregs wurde nach salzreicher Diät die Induktion eines pro-inflammatorischen Phänotyps beobachtet. In NaCl-reichem Zellkulturmedium kultivierte humane CD4⁺ CD25^{high} CD127^{low} Tregs verlieren *in vitro* ihre suppressiven Eigenschaften und entwickeln Th1-typische Eigenschaften (Hernandez et al., 2015). Zudem kann im Mausmodell nach NaCl-reicher Diät eine verstärkte Graft-versus-Host-Reaktion, eine immunologische Reaktion allogener T-Zellen nach Knochenmarktransplantation auf körpereigenes Gewebe, beobachtet werden (Hernandez et al., 2015). Kürzlich konnte jedoch gezeigt werden, dass sich diese pro-

inflammatorische Verlagerung von Tregs durch NaCl nur in natürlichen Tregs zeigt, während die suppressiven Eigenschaften induzierter Tregs erhalten bleiben (Luo et al., 2019).

Die Haut konnte als ein Organ mit hoher Salzspeicherkapazität identifiziert werden, doch auch bei malignen Prozessen wurde ein Anstieg der NaCl-Konzentration im Gewebe detektiert (Barrett et al., 2018; Ouwerkerk et al., 2003; Ouwerkerk et al., 2007). Der Einfluss jener erhöhten NaCl-Konzentrationen auf das Tumormikroumfeld ist bisher nicht ausreichend verstanden. Tatsächlich lässt sich jedoch ein Einfluss hoher NaCl-Konzentrationen auf die Funktionalität diverser Zelltypen des adaptiven Immunsystems, welche in NaCl-reichen peripheren Geweben zu finden sind, feststellen. Ein pro-inflammatorischer Effekt von NaCl während des Th17-Polarisationsprozesses konnte gezeigt werden (Kleinewietfeld et al., 2013; Wu et al., 2013). Unklar war jedoch bisher, wie sich die peripher erhöhten NaCl-Konzentrationen auf differenzierte Th17-Zellen in NaCl-reichen Mikromilieus auswirken. Wie am Beispiel des Treg-Subtyps beobachtet werden konnte, unterscheidet sich der Effekt von NaCl auf den Phänotyp natürlicher und induzierter Tregs erheblich. Auch Th17-Zellen lassen sich funktionell in einen pro- und anti-inflammatorischen Subtyp unterteilen. Ob von der beobachteten pro-inflammatorischen Th17-Verschiebung auch Th17-Gedächtniszellen betroffen sind und wie sich NaCl auf Th17-Zellen mit anti-inflammatorischen Eigenschaften auswirkt, ist noch nicht bekannt.

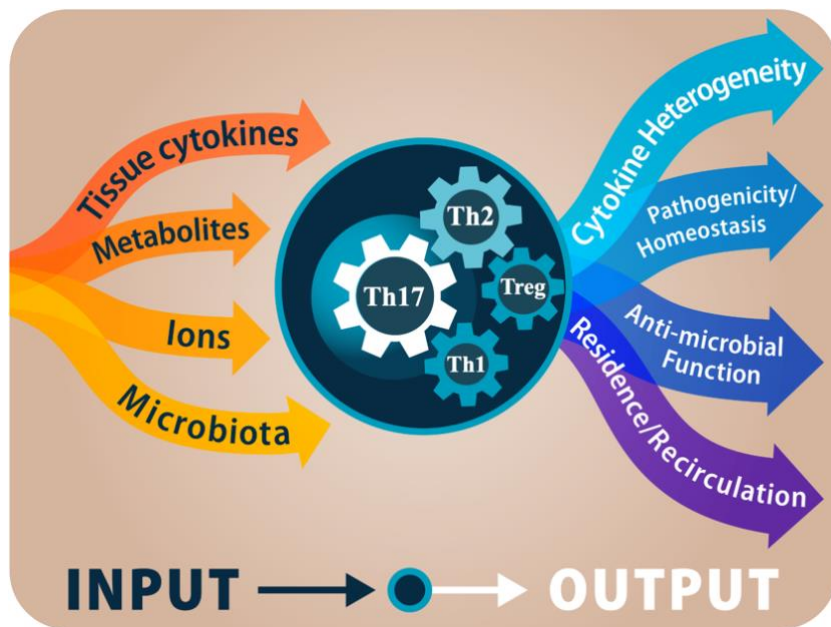


Abbildung 3: Multivariable Gewebemilieus determinieren die Heterogenität unseres Immunsystems

Neben typischen immunologischen Komponenten wie Zytokinen und Rezeptorinteraktionen wirken eine Vielzahl weiterer Umweltfaktoren, wie Stoffwechselprodukte, Mikroorganismen und differierende Ionenkonzentrationen, auf unser Immunsystem ein und formen es in Hinblick auf Phänotyp, Funktionalität und Pathogenität.

Quelle: Verwendet und angepasst aus (Matthias und Zielinski, 2019), Graphical Abstract

Insgesamt bahnen sich erste Anzeichen für immunmodulatorische Funktionen von NaCl an (Müller et al., 2019). Mehrere Hinweise deuten auf einen pro-inflammatorischen Effekt von NaCl auf Th17-Zellen – ob NaCl jedoch auf differenzierte Th17-Zellen oder den anti-inflammatorischen Th17-Subtyp in gleicher Weise wirkt, ist noch unklar. Auch eine Verbindung des NaCl-Stoffwechsel in der Haut mit dem Krankheitsverlauf der AD, welche durch eine überschießende Th2-Immunantwort unterhalten wird, konnte beobachtet werden. Ein potentieller Einfluss von NaCl auf den Th2-Subtyp erscheint somit ebenfalls möglich. Hier bedarf es somit unbedingt weitere Forschung, um die noch offenen Fragen um NaCl in seiner Rolle als immunmodulatorischer Gewebefaktor zu beantworten (**Abb 3**).

2.5 Fragestellung

Es mehren sich die Hinweise, dass NaCl als immunmodulatorischer Gewebefaktor Komponenten unseres Immunsystems beeinflusst. Im Folgenden soll nun der Einfluss von ionischen Signalen, speziell NaCl, auf die Funktionalität von humanen CD4+ T-Helferzellen und CD8+ zytotoxischen T-Zellen untersucht werden.

1. Hat NaCl eine immunmodulatorische Wirkung auf T-Gedächtniszellen?

➔ Vieles deutet darauf hin, dass NaCl die Immunfunktion auf Ebene naiver Th-Zellen moduliert. Periphere, NaCl-speichernde Gewebe, wie die Haut, werden jedoch zu einem großen Teil von differenzierten Effektor- und residenten Th-Gedächtniszellen besiedelt. Welchen Einfluss NaCl auf den differenzierten Th-Zellphänotyp nimmt, ist bisher ungewiss. Ich habe deshalb den Einfluss erhöhter NaCl-Konzentrationen auf den Phänotyp differenzierter T-Zellen untersucht.

2. Welche Eigenschaften induziert NaCl in differenzierten Th17-Zellen?

➔ Ich habe den Effekt NaCl-reicher Gewebemilieus auf die Th17-Schicksalsentscheidung zwischen pro-versus anti-inflammatorischem Phänotyp untersucht. Da im Gewebemilieu unterschiedliche Einflussfaktoren aufeinandertreffen, habe ich auch den Einfluss des variablen Zytokin-Hintergrundes auf den NaCl-induzierten Phänotyp berücksichtigt.

3. Nimmt NaCl Einfluss auf Th17-getriggerte Autoimmunerkrankungen, wie die Multiple Sklerose?

➔ Nach phänotypischer Charakterisierung des NaCl-Effekts, habe ich die funktionellen Auswirkungen NaCl-reicher Gewebemilieus auf die Th17-Immunität untersucht. Im Mausmodell der EAE haben wir unter Umgehung des Gastrointestinaltrakts durch adoptiven T-Zell-Transfer den Einfluss NaCl-stimulierter Th17-Zellen auf den Krankheitsverlauf untersuchen.

4. Wie wirkt sich NaCl auf Th2-typische Eigenschaften in Th-Zellen aus?

➔ Verschiedene Hinweise deuten eine mögliche Regulation von Th2-Eigenschaften in Gegenwart erhöhter NaCl-Konzentrationen an. Ich habe deshalb untersucht, ob NaCl tatsächlich in der Lage ist, naive und differenzierte Th-Zellen Th2-immunologisch zu beeinflussen.

5. Ist NaCl an der Pathogenese Th2-getriggelter allergischer Erkrankungen, wie der atopischen Dermatitis, beteiligt?

➔ Noch immer ist unklar, wieso es im Rahmen der AD zu jener ausgeprägten Th2-Antwort in der Haut kommt – die Haut ist jedoch bereits als Ort osmotisch-inaktiver NaCl-Speicherung bekannt. Durch Untersuchung der Natriumverhältnisse in der Haut von AD-Patienten erhofften wir uns tiefere Einblicke in die pathophysiologischen Hintergründe, welche jene überschießende Th2-Immunantwort im Rahmen der atopischen Dermatitis begünstigen könnten.

6. Könnte NaCl als Teil des Tumorumfeldes die Zytotoxizität CD8+ T-Zellen beeinflussen?

→ Ionische Faktoren, wie eine Hyperkaliämie im nekrotischen Tumorgewebe, haben sich als wichtige Einflussfaktoren auf die Aktivität von CD8+ zytotoxischen T-Zellen herausgestellt und auch NaCl kann in hohen Konzentrationen in Tumorgewebe angefounden werden. Ich habe deshalb den Einfluss NaCl-reicher Milieus auf den Phänotyp zytotoxischer CD8+T-Gedächtniszellen untersucht.

Durch Adressierung obengenannter Themenschwerpunkte zum phänotypischen und funktionellen Effekt von NaCl auf naive und differenzierte T-Zellen möchten wir die immunphysiologischen Auswirkungen NaCl-reicher Gewebemilieus auf immunologische Prozesse im Rahmen allergischer, autoimmuner und maligner Erkrankungen klären. Ein besseres Verständnis der immunmodulatorischen Kapazität von NaCl könnte hierdurch zur Entwicklung therapeutischer Angriffspunkte bei der Behandlung immundysregulierter allergischer, autoimmuner und maligner Erkrankungen im NaCl-reichen Gewebekontext beitragen.

3 Material und Methoden

3.1 Materialliste

Geräteliste

Gerät	Hersteller	Vorgang
autoMACS Pro Separator	Miltenyi Biotec	MACS-Zellseparation
BD FACSAria III	BD Biosciense	Zellsortierung
CytoFLEX	Beckman Coulter	Durchflusszytometrische Datenerhebung
MACSQuant Analyzer	Miltenyi Biotec	
Gamma-Irradiator, Cs137, Typ OB 29/902-1	Buchler GmbH, Braunschweig	Bestrahlung von Zellen
TECAN Microplate reader Infinite® 200 PRO	TECAN	Photometrische ELISA-Datenerhebung
NanoDrop 1000	Thermo Fisher Scientific	Spektrophotometer zur RNA-Quantifizierung
Biometra T3000 Thermocycler	LabRapCo	Reverse Transkription
Biorad Cyclers C1000Touch	Bio-Rad	qRT-PCR
FlowJo™-Dongle	Tree Star	Analyse durchflusszytometrischer Daten

Medien und Medienzusätze

Produkt	Hersteller	Produkt-Nr.
Dulbecco's phosphate-buffered salines (PBS), with Ca and Mg	Thermo Fisher Scientific	14040133
Dulbecco's phosphate-buffered salines, no calcium, no magnesium	Thermo Fisher Scientific	14190144
RPMI 1640 Medium, no HEPES, no glutamine	Thermo Fisher Scientific	21870076
RPMI 1640 Medium, HEPES, no glutamine	Thermo Fisher Scientific	42401018
MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100X)	Thermo Fisher Scientific	11140050
GlutaMAX™ Supplement	Thermo Fisher Scientific	35050061
Sodium Pyruvate (100 mM)	Thermo Fisher Scientific	11360070
Penicillin-Streptomycin (5,000 U/mL)	Thermo Fisher Scientific	15070063

2-Mercaptoethanol	Thermo Fisher Scientific	31350010
Fetal Bovine Serum	Biochrom; Sigma Aldrich Life Science	F7524
Human Serum	Charité Blood Bank, gesammelt von mehr als 100 Spendern	
EDTA, Pulver	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	E1644
NaCl, Pulver	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	S7653
IL-2 (500 IU/ml)	Isoliert aus einer IL-2T6 Hybridomzelllinie in unserem Labor	

Reagenzien zur Lymphozytenseparation

Produkt	Hersteller	Produkt-Nr.
Ficoll-Paque Plus	GE Healthcare	17-1440-02
CD4-specific microbeads	Miltenyi Biotec	130-045-101
MACS LS Columns	Miltenyi Biotec	130-042-401

Stimulationsreagenzien

Produkt	Hersteller	Produkt-Nr.
CD3 humaner monoklonaler Antikörper, 1 mg/ml, clone TR66	Enzo Life Sciences	ALX-804-822- C100
CD28 humaner monoklonaler Antikörper, 1 mg/ml, clone CD28.2	BD Biosciences	555725
Phorbol 12-myristate 13-acetate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	P8139
Ionomycin calcium salt from Streptomyces conglobatus	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	I0634
Brefeldin A	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	B7651
Thermo Scientific™ Remel™ Phytohaemagglutinin	Fisher Scientific	10082333
Phorbol 12,13-dibutyrate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	P 1269

Lebend-Tot- und Viabilitäts-Färbung

Produkt	Hersteller	Produkt-Nr.
Ethidium Monoazid Bromid	Invitrogen™	E1374
Zombie Aqua™ Fixable Viability Kit	Biologend	423101

Antikörper zur Oberflächenfärbung

Antikörper	Dye	Klon	Hersteller	Produkt-Nr.
Anti-human CD45-RA	FITC	ALB11	Beckman Coulter	IM0584U
Anti-human CD45-RO	PE	Antikörper des Deutschen Rheuma-Forschungszentrums (Eigenproduktion)		
Anti-human CD8	APC-Cy7	SK1	BD Bioscience	557834
Anti-human CCR6	PE	11A9	BD Bioscience	559562
Anti-human CCR4	Pe-Cy7	L291H4	Biolegend	BLD-335405
Anti-human CXCR3	APC	1C6/CXCR3	BD Biosciences	550967
Anti-human CD25	BV421	BC96	Biolegend	302629
Anti-CCR7	unkonjugiert	150503	R&D	MAB197-100
Goat Anti-Mouse IgG2a	biotinyliert	gesammelte Goat-antisera, hyperimmunisie rt mit Maus- IgG2a	SouthernBiotech	1080-08
Streptavidin	Pacific Blue	Isoliert aus Bakterien	ThermoFisher Scientific	S11222

Reagenzien und Antikörper für intrazelluläre Zytokinfärbungen und Färbung von Transkriptionsfaktoren

Produkt	Hersteller	Produkt-Nr.
BD Cytofix/Cytoperm™ solution	BD Biosciences	554722
BD Perm/Wash™ buffer	BD Biosciences	554723
eBioscience™ Foxp3 / Transcription Factor Fixation/Permeabilization Concentrate and Diluent	Thermo Fisher Scientific	00-5521
eBioscience™ Permeabilization Buffer (10X)	Thermo Fisher Scientific	00-8333

Antikörper	Dye	Klon	Hersteller	Produkt-Nr.
Anti-human FOXP3	FITC	PCH101	eBioscience	11-4776-42
Anti-human ROR- γ T	PE	AFKJS-9	eBioscience	126988-80
Anti-human GATA3	eFluor 660	TWAJ	eBioscience	50-9966-41
Anti-human Tbet	PE	4B10	Biolegend	644809
Anti-human IL-17A	APC-Cy7	BL168	Biolegend	512320

Anti-human TGF- β 1	BV-421	TW4-2F8	Biolegend	349613
Anti-human IL-4	FITC	MP4-25D2	Biolegend	500807
Anti-human IFN- γ	Pe-Cy7	4S.B3	Biolegend	502527

ELISA-Reagenzien

Produkt	Hersteller	Produkt-Nr.
Human DuoSet ELISA Kits (IL-4, IL-17, TGF- β 1)	R&D Systems	DY317 (IL-17) DY204 (IL-4) DY240 (TGF- β 1)
eBioscience™ ProcartaPlex Human IFN-gamma Simplex	Thermo Fisher Scientific	EPX01A-10228-901
Ziegen Serum	Thermo Fisher Scientific	31872
Tween 20 Detergenzlösung	Thermo Fisher Scientific	85113
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	A2153-100G
Tris-Base	Sigma-Aldrich	T1503
Substrate Solution	R&D Systems	DY999
Stop Solution	R&D Systems	DY994
Plate Sealers	R&D Systems	DY992

Reagenzien zur RNA-Isolation

Produkt	Hersteller	Produkt-Nr.
TRIzol Reagent	Invitrogen	15596026
1-Bromo-3-chloropropan	Sigma-Aldrich	B9673
Isopropanol	Apotheke MRI	
100% Ethanol	Apotheke MRI	

Reagenzien zur reversen Transkription und Genexpressions-Analyse

Produkt	Hersteller	Produkt-Nr.
Applied Biosystems™ High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems™	4368814
TaqMan™ Fast Universal PCR Master Mix (2X), no AmpErase™ UNG	Applied Biosystems™	4366072
SGK1, Hs00985033_g1	Thermo Fisher Scientific	4331182
NFAT5, Hs00232437_m1	Thermo Fisher Scientific	4331182

TBX21, Hs00203436_m1	Thermo Fisher Scientific	4331182
GATA3, Hs00231122_m1	Thermo Fisher Scientific	4331182
RORC2, Hs01076112_m1	Thermo Fisher Scientific	4331182
FOXP3, Hs01085834_m1	Thermo Fisher Scientific	4331182
IL-10, Hs00961622_m1	Thermo Fisher Scientific	4331182
18S, Hs03928985_g1	Thermo Fisher Scientific	4331182

Lentivirale Transduktion

Produkt	Hersteller	Produkt-Nr. / Klon-ID
Bakterienstock mit anti-NFAT5-shRNA-tragenden lentiviralen Vektoren TRCN0000437810 TRCN0000020021 TRCN0000020022 TRCN- 0000020023 TRCN0000020019	Millipore Sigma	SHCLNV-NM_006599 NM_006599.2-2352s21c1 NM_006599.2-4698s1c1 NM_006599.2-3470s1c1 NM_006599.2-1933s1c1 NM_006599.2-3933s1c1
Puromycin-dihydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	P9620
HEK293-Zellen	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Professor A. Verschoor, ISEF, Lübeck	

Sonstiges

Produkt	Hersteller	Produkt-Nr.
Nunc-Immuno™ MicroWell™ 96 well solid plates; MaxiSorp™ flat bottom plate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Nunc 442404
Greiner multiwell plate lids, 96-well plate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	656101
TPP® tissue culture plates, 96 well plate, round bottom, Polystyren	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	353077
Corning® 384 Well Clear Flat Bottom Polystyrene TC-Treated Microplates	Corning	3701
15 ml Falcon Tubes 50 ml Falcon Tubes	BD Biosciences	352096 (15ml) 352070 (50ml)
Corning™ 96-Well, High Binding, Flat-Bottom, Half-Area Microplate	Corning	10052511

25 ml Pipette	BD Biosciences	356525 (50ml)
15 ml Pipette		356551 (10ml)
5 ml Pipette		356543 (5ml)

3.2 Zusammensetzung von Puffern und Zellkulturmedien

<u>Zellkulturmedium für CD4+ Th-Zellen</u> RPMI 1640 Medium, no HEPES, no glutamine 2 mM L-Glutamin 1 mM Natrium-Pyruvat 1% Non-Essential Amino Acids Solution 14,3 mM 2-Mercaptoethanol 10% FCS	<u>Zellkulturmedium für CD8+ T-Zellen</u> RPMI 1640 Medium, no HEPES, no glutamine 2 mM L-Glutamin 1 mM Natrium-Pyruvat 1% Non-Essential Amino Acids Solution 14,3 mM 2-Mercaptoethanol 5% Humanserum 10% Klon-Medium
<u>Klon-Medium</u> RPMI 1640 Medium, HEPES, no glutamine 2 mM L-Glutamin 1 mM Natrium-Pyruvat 1% Non-Essential Amino Acids Solution 14,3 mM 2-Mercaptoethanol 5% Humanserum 500 Units IL-2	<u>Waschpuffer</u> RPMI 1640 Medium, HEPES, no glutamine 1% FCS <u>MACS-Puffer</u> Dulbecco's phosphate-buffered salines, no calcium, no magnesium 5% FCS 2 mM EDTA

3.3 Vorbereitung und Durchführung von Zellkulturexperimenten

3.3.1 Isolierung mononukleärer Zellen aus Vollblut

Zur Extraktion der mononukleären Zellen aus humanem Spendervollblut oder Filterblut wurde das Blut auf das doppelte Volumen mit PBS (-Ca, -Mg) aufgefüllt und in 50ml Falcon Tubes auf Ficoll geschichtet. Nach Zentrifugation (805 rcf, 30 min, Raumtemperatur) wurde der zwischen Blutserum und Ficoll befindliche mononukleäre Zellring vorsichtig unter Meidung des Ficolls abgesaugt und in ein weiteres Falcon Tube transferiert. Daraufhin wurden die Zellen durch drei Waschungen mit zunächst PBS (-Mg, -Ca) und mit Waschpuffer von möglichen Ficoll-Resten befreit. Zwischen den Waschschritten erfolgten Zentrifugationen mit 290 rcf für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Die mononukleären Zellen wurden daraufhin gezählt und in

Vorbereitung auf die Isolation CD4⁺ oder CD8⁺ Zellen mittels MACS-Separation in MACS-Puffer aufgenommen. Es konnte dann mit der MACS-Separation fortgefahren werden.

3.3.2 MACS-Zellseparation

Die MACS-Separation erfolgte manuell über LS-MACS-Columns oder maschinell mit Hilfe des autoMacS Pro Separators durch positive oder negative Selektion mit Hilfe von CD4-, CD8- oder CD14-bindenden Microbeads. Die peripheren mononukleären Zellen wurden auf Eis unter Meidung von Licht für 30 Minuten in unterschiedlich konzentrierter MACS-Puffer-Microbead-Lösung, abhängig von Zellzahl sowie der gewünschten Ausbeute, inkubiert. Darauf folgte eine Waschung mit MACS-Puffer bei 4 °C, 453 rcf, zur Entfernung nicht gebundener Microbeads. Nun konnte mit der Zellseparation am autoMacS Pro Separator gemäß des bereitgestellten Protokolls von Miltenyi Biotec oder der manuellen Separation begonnen werden.

In Vorbereitung der manuellen Zell-Separation wurden der Zellseparations-Magnet sowie die LS-MACS-Columns bei 4°C kühlgestellt. Die LS-MACS-Columns wurden vor Verwendung mit 3 ml MACS-Puffer gespült. Die zuvor mit Microbeads inkubierten mononukleären Zellen wurden daraufhin auf die LS-MACS-Columns gegeben. Die durchgeflossene Zelllösung wurde abermals auf die LS-MACS-Columns gegeben, um die Ausbeute an Microbeads-markierten Zellen zu erhöhen. Nun konnten die LS-MACS-Columns aus den Magneten entfernt und mittels Spülung mit MACS-Puffer die durch Microbeads markierte Zellfraktion aus den LS-MACS-Columns gelöst werden. Hierauf konnte mit der Färbung für die Zellsortierung begonnen werden. Der Microbead-negative Durchfluss wurde aufgefangen und entweder für eine weitere Microbead-Separation verwendet oder zur FACS-Sortierung vorbereitet.

3.3.3 Zellsortierung

Die CD4⁺ und CD8⁺ Zellfraktion wurde in Vorbereitung der Zellsortierung nach folgendem Schema gefärbt:

Separation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Gedächtniszellen oder naiven T-Zellen:

CD45RA FITC, CD8 APC-Cy7, CD45RO PE, anti-CCR7 (unkonjugiert), biotinylierter anti-IgG2a Antikörper, Streptavidin-Pacific Blue Konjugat

Separation von Th1, Th2, Th17 und Treg:

CD45RA FITC, CCR4 Pe-Cy7, CCR6 PE, CXCR3 APC, CD25 BV421

Die Zellen wurden daraufhin am BD FACSAria, BD FACSAria II oder am BD FACSAria III von BD Biosciences sortiert. Die Sortierung CD4⁺ oder CD8⁺ Gedächtniszellen erfolgte mit einer Reinheit von 99%, die der T-Helferzell-Subtypen mit einer Reinheit von 98%. Die Subtypen wurden wie folgt gemäß ihrer Färbung differenziert:

<u>Naive CD4+ Th-Zellen:</u>	CD4+ CD45RA+ CD45RO- CCR7+
<u>CD4+ Th-Gedächtniszellen:</u>	CD4+ CD45RA-
<u>CD4+ Th-Effektorgedächtniszellen:</u>	CD4+ CD45RA- CCR7-
<u>Naive CD8+ Th-Zellen:</u>	CD8+ CD45RA+
<u>CD8+ T-Gedächtniszellen:</u>	CD8+ CD45RA-
<u>Th1-Zellen:</u>	CD4+ CD45RA- CCR4- CCR6- CXCR3+; CD4+ CD14- CD45RA- CCR4- CCR6- CXCR3+; CD4+ CD14- CD45RA- CCR4- CCR6- CXCR3+ CD25-
<u>Th2-Zellen:</u>	CD4+ CD45RA- CCR4+ CCR6- CXCR3-; CD4+ CD14- CD45RA- CCR4+ CCR6- CXCR3-; CD4+ CD14- CD45RA- CCR4+ CCR6- CXCR3- CD25-
<u>Th17-Zellen:</u>	CD4+ CD45RA- CCR4+ CCR6+ CXCR3-; CD4+ CD14- CD45RA- CCR4+ CCR6+ CXCR3-; CD4+ CD14- CD45RA- CCR4+ CCR6+ CXCR3- CD25-
<u>Treg-Zellen:</u>	CD4+ CD25high; CD4+ CD14- CD25high

Wenn für parallele Experimente die Verwendung der CD14+ Zellfraktion von Nöten war, wurde jene durch positive Selektion mittels CD14-MACS-Microbeads separiert. Der CD14-negative Durchfluss wurde aufgefangen und es konnte mit der positiven MACS-Separation der CD4+ Zellfraktion fortgefahren werden. Die Exklusion CD25-hochexprimierender Th-Zellen erfolgte, um suppressive Th-Zellen auszuschließen, welche potentiell durch NaCl expandieren könnten. Zudem wurde bei paralleler Sortierung CD25-hochexprimierender Tregs mit weiteren Zellfraktionen die CD25-niedrigexprimierenden Zellen zur Sortierung von Th1, Th2 und Th17 verwendet. Im Vergleich verschieden sortierter Zellfraktionen zeigte sich kein Unterschied zwischen den unterschiedlichen Sortierungsstrategien. Nach der Zellsortierung wurden die sortierten Zell-Subtypen mit Waschpuffer gewaschen, in T-Zell-Medium aufgenommen und für mindestens zwei Stunden zum Ruhen in einer 24-Well-Platte in den Inkubator gestellt. Danach konnte mit der Zellkultivierung begonnen werden.

3.3.4 Generierung von CD4+ Klon-Populationen mittels Grenzverdünnung

In Vorbereitung zur Generierung monoklonaler Zellpopulationen wurden zur Herstellung von Nährzellen 50 Millionen periphere humane mononukleäre Zellen in Waschpuffer auf Eis mit 45 Gy bestrahlt. Es wurde darauf geachtet, dass Nährzellen und Zellklone nicht von demselben Donor stammten. Nach der Bestrahlung wurden die mononukleären Zellen vorerst für 30 Minuten bei 4°C im Waschpuffer belassen, daraufhin mit frischem

Waschpuffer gewaschen (5 Minuten, 4 °C, 453 rcf), erneut gezählt und zu einer Konzentration von 1 Mio. mononukleären Zellen pro 1 ml Klon-Medium verdünnt. Die Zellsuspension wurde mit Phytohaemagglutinin zu 1 µg/ml versetzt.

Die zu klonende Zellpopulation wurde gezählt und mit 200.000 Zellen pro ml in Klon-Medium aufgenommen. Hierauf folgte eine serielle Verdünnung bis zu einer Zellkonzentration von 200 Zellen pro ml. Diese 200 Zellen wurden mit 20 Mio. Nährzellen in einem Zielvolumen von 20 ml Klon-Medium aufgenommen, sodass sich stochastisch eine zu klonende Zelle in 100 µl Zellsuspension befand. Daraufhin wurden pro Well einer 384-Well-Zellkulturplatte 50 µl der Zellsuspension ausgesät. Die 384-Well-Zellkulturplatte wurde dann zum Schutz vor Evaporation locker in Frischhaltefolie gewickelt und für 10 Tage im Inkubator belassen. Hiernach wurde die Platte auf gewachsene Klon-Populationen untersucht, welche auf eine 96-Well-U-Bottom-Zellkulturplatte überführt, mit Klon-Medium aufgefüllt und für weitere drei Tage im Inkubator kultiviert wurden. Nach erfolgter Proliferation der Klonpopulationen konnte jeweils ein Anteil der Populationen mittels einer Probefärbung phänotypisiert werden.

3.3.5 Kultivierung von T-Zellen unter verschiedenen NaCl-Konzentrationen

In Vorbereitung der Stimulation humaner T-Zellen wurden am Vortag die für die Stimulation benötigten Wells einer 96-Well-Flat-Bottom-Zellkulturplatte mit jeweils 50 µl PBS (+Ca, +Mg) + 1 µg/ml anti-CD3 Antikörper + 0,5 µg/ml anti-CD28 Antikörper beschichtet. Die Platte wurde in Frischhaltefolie gewickelt für mindestens 12 Stunden bei 4°C inkubiert. Daraufhin wurde die Antikörper-beschichtete Zellkulturplatte mit Waschpuffer gespült und die zu stimulierenden Zellen zu 50.000 pro Well in Zellkulturmedium ausgesät. Zum Erreichen einer NaCl-Zielkonzentration von 140 mM wurden die Zellen in T-Zell-Kulturmedium inkubiert. Für die Stimulation unter erhöhten NaCl-Konzentrationen wurde das T-Zell-Kulturmedium mit in PBS (-Ca, -Mg) gelöstem NaCl versetzt und auf 185 mM NaCl erhöht. Jede Versuchsbedingung wurde in Duplikaten durchgeführt. Die Zellen wurden daraufhin für zwei Tage bei 37°C, 5% CO₂, 95% Luftfeuchte inkubiert.

Nach zwei Tagen wurden die Zellen unter dem Mikroskop auf morphologische Zeichen der Zellstimulation überprüft und nach erfolgreicher Stimulation auf eine 96-Well-U-Bottom-Zellkulturplatte transferiert. Die Zellen wurden hierauf für weitere drei Tage bis Tag fünf der Zellkultur ohne weitere Stimulation im Inkubator bei 37°C, 5% CO₂, 95% Luftfeuchte kultiviert.

3.3.6 Restimulation

Humane CD4⁺ CD45RA⁻ Th-Gedächtniszellen und Th17 Zellen wurden wie oben beschrieben für zwei Tage mittels plattengebundener monoklonaler anti-CD3 und anti-CD28 Antikörper unter 140 mM oder 185 mM NaCl stimuliert und für drei weitere Tage im Inkubator ohne weitere Stimulation kultiviert. Für die gesamte Dauer des Experiments wurde T-Zellkultur-Medium mit 50 Units IL-2 pro ml verwendet. Am Tag fünf wurde

eine Zellprobe je Duplikat jeder Versuchsbedingung auf eine 96-Well-U-Bottom-Zellkulturplatte transferiert, intrazellulär gefärbt und mittels Durchflusszytometrie (MACS-QUANT oder CYTOFLEX) analysiert.

Das Zellkulturmedium der in Zellkultur verbliebenen Zellen wurde mit frischem Zellkulturmedium (50 Units/ml IL-2, 135 mM NaCl) ersetzt und zwei weitere Tage im Inkubator kultiviert. Die Duplikate jeder Versuchsbedingung wurden daraufhin für die erste Restimulation gesammelt und abermals, wie oben beschrieben, als Duplikate auf einer anti-CD3 anti-CD28 beschichtete 96-Well-Flat-Bottom-Zellkulturplatte in Zellkulturmedium (50 Units IL-2, 135mM NaCl) ausgesät.

Die achttägigen Versuchszyklen wurden bis zur dritten Restimulation wiederholt. An Tag fünf jedes Versuchszyklus wurde ein Teil der Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert (MACS-QUANT, CYTOFLEX).

3.4 Vorbereitung und Durchführung der durchflusszytometrischen Analyse

3.4.1 Lebend-Tot-Färbung mittels Ethidium Monoazid Bromid (EMA)

Für Markierung und Ausschluss avitaler Zellen von der Datenauswertung wurde eine Lebend-Tot-Färbung mittels EMA verwendet. EMA bindet kovalent an Nukleinsäuren, welche durch perforierte Zellwände sterbender Zellen dem Farbstoff zugänglich werden.

Vor Beginn der intrazellulären oder Oberflächenfärbung wurden die Zellen in MACS-Puffer mit 2 mg/ml EMA resuspendiert und bei 4°C für 20 min photoaktiviert. Daraufhin wurden die Zellen in MACS-Puffer gewaschen. Es wurde mit dem Protokoll für Oberflächenfärbung oder intrazelluläre Färbung fortgefahren.

Für die durchflusszytometrische Analyse wurden alle EMA gefärbten Zellen ausgeschlossen.

Im Rahmen weiterer Validierungsexperimente wurde diese Lebend-Tot-Färbung mittels EMA von Studienkollegen durch weitere Lebend-Tot-Marker, wie dem Zombie Aqua™ Fixable Viability Kit, ersetzt.

3.4.3 Färbung von Oberflächenantigenen

Die zu färbenden Zellen wurden mit MACS-Puffer gewaschen und auf einer 96-Well-U-Bottom-Zellkulturplatte ausgesät. Die zu verwendende Konzentration der Antikörper ist zuvor mittels Titrierung bestimmt worden. Die Zellen wurden in der Färbelösung, welche gemäß der Titrierung in MACS-Puffer angesetzt wurde, resuspendiert und daraufhin abgedeckt auf Eis inkubiert. Die Zellen, welche als ungefärbte Kontrolle dienen sollten, wurden in MACS-Puffer ohne Antikörper resuspendiert. Nach 15 Minuten wurden die überschüssigen, nicht gebundenen Antikörper durch zweimalige Zugabe von MACS-Puffer und Zentrifugation bei 4°C für 2 min bei 367 rcf von den Zellen entfernt. Daraufhin wurden die Zellen in MACS-Puffer aufgenommen und ihre Fluoreszenz am MACS-QUANT oder am CYTOFLEX gemessen.

Die CCR7-Oberflächenfärbung mittels unkonjugiertem anti-CCR7 Antikörper, biotinyliertem anti-IgG2a Antikörper und Streptavidin-Pacific Blue Konjugat erfolgte in drei Schritten in genannter Reihenfolge. Jeder Antikörper wurde individuell wie oben beschrieben inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden daraufhin durch zweimaliges Waschen der Zellen entfernt. Der letzte Färbeschritt mit Streptavidin-Pacific Blue Konjugat wurde, sofern nötig, mit weiteren Antikörpern zur Oberflächenfärbung kombiniert.

3.4.4 Intrazelluläre Zytokin-Färbung und Färbung von Transkriptionsfaktoren

Die zu färbenden Zellen wurden mit Waschpuffer gewaschen und in Zellkulturmedium + 0,2 µM Phorbol 12-myristate 13-acetate + 1 µg/ml Ionomycin für 2,5 Stunden im Inkubator stimuliert. Hiernach wurden die Zellen unter dem Mikroskop auf Zeichen der Stimulation untersucht. Es erfolgte eine weitere 2,5-stündige Inkubation (37°C, 5% CO₂, 95% Luftfeuchte) nach Zugabe von 10 µg/ml Brefeldin A. Daraufhin wurden die Zellen zwei Mal in MACS-Puffer gewaschen (2 Minuten, 4°C, 367 rcf). Alle nachfolgenden Schritte erfolgten bei 4°C.

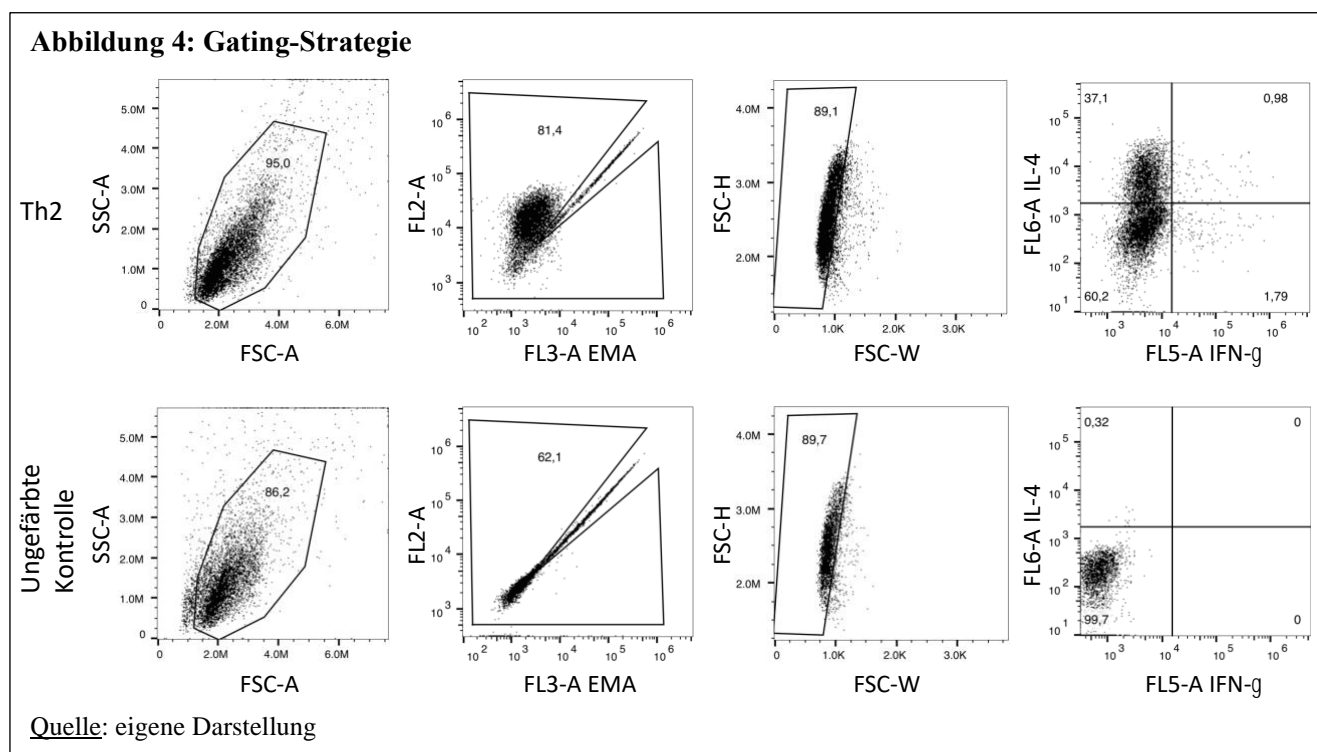
Die Zellen wurden zur Fixierung unter Ausschluss von Licht in BD Cytotfix/Cytoperm™ solution inkubiert (20 min, 4°C). Bei Färbung von Transkriptionsfaktoren wurde zur Fixierung der eBioscience™ Foxp3 / Transcription Factor Fixation/Permeabilization Concentrate and Diluent verwendet. Daraufhin wurden die Zellen zentrifugiert (2 Minuten, 4°C, 367 rcf) und zum Permeabilisieren zweimal in BD Perm/Wash™ buffer (eBioscience™ Permeabilization Buffer zur Färbung von Transkriptionsfaktoren) resuspendiert und abermals zentrifugiert (2 Minuten, 4°C, 367 rcf).

Die Konzentration der zu verwendenden Antikörper wurde zuvor mittels Titrierung bestimmt und die Antikörperlösung gemäß der Titrierung in BD Perm/Wash™ buffer angesetzt. Die Zellen wurden in der angesetzten Antikörperlösung resuspendiert und unter Ausschluss von Licht inkubiert (30 min, 4°C). Die Zellen, welche als ungefärbte Kontrolle dienen sollten, wurden in BD Perm/Wash™ buffer ohne Antikörper resuspendiert. Zum Entfernen ungebundener Antikörper wurden die Zellen daraufhin einmal in BD Perm/Wash™ buffer und daraufhin in MACS-Puffer resuspendiert und zentrifugiert (2 Minuten, 4°C, 367 rcf). Daraufhin wurden die Zellen in MACS-Puffer aufgenommen und am MACS-QUANT oder CYTOFLEX analysiert.

3.4.5 Auswertung und Darstellung der Durchflusszytometrie-Daten mittels FlowJo™

Zur Analyse und graphischen Darstellung der Durchflusszytometrie-Daten wurde die FlowJo™ Software V8 bis V10 von BD Bioscience verwendet. Die Gating-Strategie wird in Abbildung 4 verdeutlicht (**Abb 4**).

Zunächst wurde der Forward Scatter gegen den Side Scatter dargestellt und die Lymphozytenpopulation eingegrenzt. Da die Zellen bereits durch MACS-Separation und Zellsortierung angereichert sind, stellt sich hier nur eine Population dar. Daraufhin wurden mittels EMA-Färbung die toten Zellen von der Analyse ausgeschlossen. Tote Zellen stellen sich hier durch einen linearen Zusammenhang der Kanäle FL2 und FL3 dar. Zur Diskrimination der Doublets wurde daraufhin die Width und Height des Forward Scatters gegenübergestellt. Da sich der Doublet Pulse mit einer größeren Weite darstellt als der Single Particle Pulse, wurden die einzelnen, großen, sich rechts auf dem FSC-W befindlichen Signale wie in dem Beispiel gezeigt aus der Analyse ausgeschlossen. Daraufhin konnten die gewünschten Fluoreszenzen zur Analyse ausgewertet werden. Es wurde stets eine ungefärbte Zellprobe parallel ausgewertet, um die Zellen auf Autofluoreszenz zu überprüfen.



3.5 Molekularbiologische Analyse

3.5.1 RNA-Isolierung

Die Zellen wurden zur Entfernung von Zellkulturmedium zentrifugiert (2 Minuten, 4°C, 367 rcf), in TRIzol Reagent resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur RNA-Isolierung wurde dem Protokoll des Herstellers gefolgt. Anstatt 200 µl Chloroform wurden zur Phasenseparation 100 µl 1-Bromo-3-chloropropan verwendet. 1-Bromo-3-chloropropan zeichnet sich durch geringere Toxizität als Chloroform bei vergleichbarer Qualität der RNA-Extraktion aus (Chomczynski und Mackey, 1995).

Die RNA wurde in 20 µl RNase-freiem Wasser gelöst und die RNA-Konzentration mit dem NanoDrop Spektrophotometer bestimmt. RNA-Proben wurden bei -80°C aufbewahrt.

3.5.2 Reverse Transkription und Genexpressions-Analyse

Die reverse Transkription wurde mit dem Applied Biosystems™ High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit gemäß dem beiliegenden Protokoll des Herstellers durchgeführt. Je Reaktion wurde 1 µl RNase-Inhibitor zugefügt. Eine Probe mit Mastermix ohne Zugabe von RNA wurde als Kontrolle verwendet. Diese wurde in der nachfolgenden qPCR auf das Referenzgen S18 überprüft, um RNA-Verunreinigungen im Mastermix auszuschließen.

Folgendes Protokoll wurde am Thermozykler zur cDNA-Synthese verwendet:

	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4
Temperatur (°C)	25°C	37°C	85°C	4°C
Zeit	10 min	120 min	5 min	∞

Die cDNA-Produkte wurden dann zur qRT-PCR-Analyse verwendet und bei -20°C aufbewahrt.

Die quantitative RT-PCR Analyse wurde mit Hilfe von vorgefertigten TaqMan Genexpressions-Assays durchgeführt. Jede cDNA-Probe wurde in Triplikaten gemessen. Die qRT-PCR wurde in einem Volumen von 10 µl je Reaktion durchgeführt, welches sich wie folgt zusammensetzte:

Komponente	Volumen
TaqMan Probe	0,5 µl
TaqMan™ Fast Universal PCR Master Mix	5 µl
RNase-freies H2O	3,5 µl
cDNA-Probe	1 µl
Endvolumen	10 µl

Die qRT-PCR wurde am BioRad thermal cycler C1000Touch mit folgendem Programm durchgeführt:

	Aktivierung der Polymerase	PCR (49 Zyklen)	
		Denaturierung	Primer-Anlagerung
Zeit	10 min (2°C/min)	10 sec	11 sec
Temperatur	95°C	95°C	60°C

Das konstitutiv exprimierte Gen S18 wurde als Referenzgen zur Quantifizierung der Transkriptexpression verwendet. Eine Wasserprobe und eine Mastermixprobe ohne Zugabe von cDNA wurden als Kontrollen zum Ausschluss von Verunreinigungen verwendet.

Für die Analyse der relative Genexpression wurde zunächst der Δ CT-Wert, die absolute Expressionsdifferenz zwischen Referenz- und Target-Gen, bestimmt. Hierfür wurde der CT-Wert des Target-Gens vom CT-Wert des Referenz-Gens derselben Probe subtrahiert. Zur Berechnung der relativen Genexpression wurde Δ CT in den Exponenten von 2 gesetzt: $2^{-(\Delta CT)}$.

3.6 Enzyme-linked immunosorbent Assay

Zur Analyse der kumulativen Sekretion über den gesamten Zeitraum der NaCl-Exposition wurde der Zellkulturüberstand nach Zentrifugation vorsichtig abpipettiert, um Verunreinigung durch Zelldebris zu vermeiden, und direkt zur ELISA-Analyse verwendet oder bei -80°C aufbewahrt. Gefrorene Zellkulturüberstände wurden so langsam wie möglich auf Eis aufgetaut.

Zur Quantifizierung der Sekretionsleistung am Ende der NaCl-Exposition wurden die Zellen gewaschen, gezählt und 50.000 Zellen Pro Well auf einer mit anti-CD3-Antikörpern beschichteten Zellkulturplatte (1 $\mu\text{g/ml}$) in CD4-Zellkulturmedium mit 50 nM PDBU ausgesät (siehe Abschnitt 2.3.5 *Kultivierung von T-Zellen unter verschiedenen NaCl-Konzentrationen* für Details zum Beschichtungsvorgang). Nach achtstündiger Bebrütung im Inkubator wurde der Zellkulturüberstand zentrifugiert und vorsichtig abpipettiert.

Vorbereitung benötigter Reagenzien:

Reagent Diluent: 0.1% BSA, 0.05% Tween 20 in Tris-Puffer (20 mM Trizma base, 150 mM NaCl), pH 7,2-7,4

Waschpuffer: 0.05% Tween 20 in PBS, pH 7,2-7,4

Block Puffer: 1% BSA in PBS, pH 7.2-7.4, gefiltert

Substrat Solution: Color Reagent A und B zu gleichen Anteilen vermengen, direkt vor Verwendung angesetzt

Der ELISA wurde gemäß des Herstellerprotokolls durchgeführt. Die Vorbereitung der Corning™ 96-Well Platte (High Binding, Flat-Bottom, Half-Area Microplate) durch Beschichtung mit dem Capture Antibody erfolgte am Vorabend gemäß folgender Verdünnung: IL-17 (1:180), IFN- γ (1:180), TGF- β (1:120). Es wurden 30 μl Capture-Antibody-Verdünnung pro Well aufgetragen und durch vorsichtiges Schwenken der Platte eine vollständige Benetzung des Bodens sichergestellt. Am nächsten Tag wurde die Platte gemäß dem Protokoll viermalig mit Waschpuffer (200 μl /Well) gewaschen und mit 90 μl Block Puffer pro Well eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem abermaligen Waschvorgang (viermalig) wurden 30 μl verdünnter Zellkulturüberstand und Standard-Verdünnungsreihe pro Well in die beschichtete ELISA-Platte übertragen und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die gewonnenen Zellkulturüberstände wurden zuvor wie folgt mit

Reagent Diluent verdünnt: IL-17-ELISA (Th17-Zellkulturüberstand 1:3; Zellkulturüberstände anderer Zellpopulationen unverdünnt), IFN- γ -ELISA (1:5), TGF- β -ELISA (1:5). Es erfolgte abermals ein Waschvorgang (viermalig). Daraufhin wurden 50 μ l des Detektionsantikörpers in nachfolgender Verdünnung aufgetragen: IL-17-ELISA (1:180), IFN- γ -ELISA (1:180), TGF- β -ELISA (1:60). Nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Platte gewaschen (viermalig). Streptavidin-HRP wurde zuvor gemäß der aufgedruckten Empfehlung der jeweiligen Charge in Reagent Diluent verdünnt und 50 μ l Streptavidin-HRP-Verdünnung pro Well aufgetragen. Nach zwanzigminütiger Inkubation bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Licht wurde die Platte gewaschen (viermalig), 50 μ l Substrat Solution aufgetragen und für weitere 20 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurden 25 μ l der dem Kit beiliegenden Stop Solution pro Well dazugegeben, durch vorsichtiges Schwenken vermischt und die Nachweisreaktion hierdurch abgestoppt. Es folgte die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 450 nm am Mikroplattenleser Infinite 200 PRO. Die Referenzmessung zur Extinktion des unspezifischen Hintergrundes erfolgte bei einer Wellenlänge von 540 nm. Die Proteinkonzentration im Zellkulturüberstand wurde anhand der Verdünnungsreihe des Standards berechnet.

Assayspezifische Besonderheiten:

IFN- γ -ELISA:

Zur Verdünnung des Detektionsantikörpers wurde der Reagent Diluent mit 2% Ziegen Serum versetzt.

IL-17-ELISA:

Anstelle des Reagent Diluents wurde Block Puffer verwendet.

TGF- β -ELISA:

Block Puffer: 5% Tween 20 in PBS, pH 7,2-7,4.

Da der TGF- β 1-ELISA-Kit nur das aktive TGF- β 1 detektiert, musste vor Durchführung des ELISAs das latente TGF- β 1 im Zellkulturüberstand aktiviert werden. Der TGF- β 1-ELISA wurde deshalb in einer Nunc-Immuno™ MicroWell™ 96-Well-Zellkulturplatte (MaxiSorp™, flat bottom) mit 100 μ l Reaktionsvolumen (Zellkulturüberstand, Detection Antibody, Streptavidin-HRP, Substrat Solution) und 50 μ l Stop Solution durchgeführt. Vor Auftragen des verdünnten Zellkulturüberstandes wurde das latente TGF- β 1 mit 20 μ l 1 N HCL für 10 Minuten bei Raumtemperatur aktiviert und daraufhin der pH durch 20 μ l 1.2 N NaOH/0.5 M HEPES in einen Bereich zwischen 7,2 und 7,6 gebracht. 100 μ l des aktivierten Zellkulturüberstandes wurden daraufhin auf die geblockte ELISA-Platte aufgetragen. Es wurde weiterverfahren wie oben beschrieben.

3.7 Lentivirale Genexpressions-Suppression mittels shRNA-Interferenz

Zur Suppression der Expression des salzsensitiven Transkriptionsfaktors NFAT5 wurden Th-Gedächtniszellen mit lentiviralen Retroviren infiziert, welche die Geninformation zur Expression einer mit NFAT5-interferierenden shRNA in die Zielzellen einbringen. Hierdurch soll die Transkription von NFAT5 gestört und somit dessen Expression verhindert werden. Die lentiviralen Partikel transduzieren auch ein Resistenz-Gen gegen Puromycin, sodass nicht-transduzierte Zellen durch Puromycin ausselektiert werden können.

Die lentiviralen Vektoren wurden durch Studienkollegen mittels MaxiPrep oder MidiPrep gemäß dem Herstellerprotokoll amplifiziert und aufgereinigt. Die lentiviralen Partikel wurden durch Transfektion gentragender Plasmide in virusreplizierenden HEK293-Zellen hergestellt und amplifiziert. Der virustragende Zellkulturüberstand wurde abgenommen und bis zur Transduktion bei -80°C aufbewahrt.

In Vorbereitung der Transduktion taute ich den lentiviralen Zellkulturüberstand möglichst langsam auf Eis auf. Daraufhin säte ich 50.000 humane Th-Gedächtniszellen pro Well in einer mit anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern beschichteten 96-Well Zellkulturplatte mit flachem Boden (siehe 2.3.5 *Kultivierung von T-Zellen unter verschiedenen NaCl-Konzentrationen*) in Gegenwart verschiedener NaCl-Konzentrationen aus. Nach 12-stündiger Inkubation fügte ich den lentiviralen Zellkulturüberstand unter Anpassung der NaCl-Konzentration hinzu. Einige Wells wurden als nicht-transduzierte Kontrollen belassen. Nach 48 Stunden wurden die Zellen auf eine Zellkulturplatte mit rundem Boden übertragen, der Zellkulturüberstand entfernt, die Zellen gewaschen und die NaCl-Konzentrationen wieder angepasst. Zur Selektion der erfolgreich transduzierten Zellen wurden daraufhin 0,7 mg/ml des Antibiotikums Puromycin zugefügt.

Nach weiteren 72 Stunden Inkubation wurde ein Teil der Zellen abgenommen und die NFAT5-Expression mittels qRT-PCR überprüft. Die nicht-transduzierte Zellkontrolle zeigte unter Puromycin-Behandlung noch wenige vitale Zellen als Zeichen einer unvollständigen Elimination nicht-transduzierter Zellen. Die Puromycin-Konzentration musste deshalb im weiteren Verlauf durch Studienkollegen angepasst werden.

Die restliche Zellfraktion wurde gewaschen, fixiert und zur weiteren Färbung für eine durchflusszytometrische Analyse vorbereitet.

3.8 Extraktion von T-Zellen aus menschlichem Hautgewebe

Für die Isolation von T-Zellen aus der Haut wurden menschliche Hautreste von Abdominoplastiken verwendet. Das Gewebe wurde so schnell wie möglich nach der chirurgischen Entfernung verarbeitet.

Vor Entfernung der oberen Hautschicht wurden das Gewebe mit PBS (-Ca, -Mg) gespült. Daraufhin wurden die Epidermis und Teile der Dermis mithilfe eines Dermatoms vom restlichen Gewebe abgehoben und in Petrischalen mit vorgewärmtem sterilem Klonmedium (1% Clotrimazol) platziert. Die Epidermis wies nach

oben, sodass die Immunzellen aus der unterseitigen Schnittfläche austreten konnten. Die Haut wurde in Stücken mit einem Durchmesser von mindestens 2 cm abgetragen, um ein Aufrollen der Schnittränder mit Bedeckung der unterseitigen Schnittfläche zu verhindern. Die Petrischalen wurden dann für 8 Tage im Inkubator belassen und regelmäßig unter dem Mikroskop auf auswandernde Zellen überprüft. Nach zwei bis drei Tagen wurde bei beginnender Gelbverfärbung des Klonmediums die Hälfte des Mediums vorsichtig abgenommen und durch frisches, vorgewärmtes Klonmedium ersetzt. Das abgenommene Klonmedium wurde zentrifugiert und die abzentrifugierten Zellen zurück in die Petrischale überführt.

Am achten Tag wurde das Klonmedium in der Petrischale resuspendiert, die Hautreste mit Klonmedium gespült, um möglichst viele Immunzellen der Haut zu gewinnen, und das gesamte Medium abzentrifugiert. Der Kulturüberstand wurde verworfen und die abzentrifugierten Zellen in PBS (-Ca, -Mg) gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen für die Zellsortierung CD3⁺ Th-Zellen auf eine Oberflächenfärbung vorbereitet.

Das Protokoll zur Extraktion hautständiger Immunzellen wurde von Studienkollegen weiterentwickelt, sodass die Hautimmunzellen mittels enzymatischer Verdauung des Hautgewebes gewonnen werden konnten.

3.9 Zulassung der Studie

Der Ethikantrag zur Bewilligung der Verwendung humaner Blutproben wurde von der Ethikkommission der TU München (195/15s, 146/17s, 491/16s) und der Charité (EA1/221/11) bewilligt. Alle Experimente mit humanem Gewebe und Blutprodukten wurden gemäß den ethischen Grundsätzen der Deklaration von Helsinki durchgeführt.

3.10 Statistische Auswertung

Jedes Experiment wurde mindestens dreimal unabhängig voneinander wiederholt. Die statistische Analyse und graphische Darstellung erfolgte mit Graphpad Prism 6 bis 8.

Aus den erhobenen Daten wurde das arithmetische Mittel und dessen Standardabweichung als Streuungsmaß berechnet und in der nachfolgenden Analyse miteinander verglichen.

Der zweiseitig getestete gepaarte oder ungepaarte t-Test wurde zum Vergleich zweier Gruppen gleicher Varianz verwendet. Der gepaarte t-Test wurde angewandt, wenn eine Abhängigkeit zwischen zwei untersuchten Gruppen bestand (zum parallelen Vergleich desselben Testparameters, derselben Zellpopulation und desselben Donors unter zwei unterschiedlichen Ausprägungen einer Variablen). Zuvor wurde sichergestellt, dass die Differenz der Paare normalverteilt ist. Der ungepaarte t-Test wurde zum Vergleich zweier Gruppen verwendet, zwischen denen keine ausreichende Abhängigkeit bestand. Als Nullhypothese wurde angenommen, dass sich beide Testgruppen nicht unterscheiden und somit die Differenz der Mittelwerte

Null gleich. Die Alternativhypothese nahm an, dass ein Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen besteht und die Differenz der Mittelwerte ungleich Null ist.

Zum Vergleich von mehr als zwei unabhängigen Testgruppen wurden eine einfache Varianzanalyse oder der Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Die einfache Varianzanalyse wurde zur Analyse normalverteilter Testgruppen mit homogener Varianz verwendet. Traf dies nicht zu, wurde der Kruskal-Wallis-Test zur Analyse herangezogen. Die Nullhypothese nahm an, dass alle Testgruppen von einer identischen Population ausgehen. Die Alternativhypothese nahm an, dass mindestens eine der Testgruppen von einer anderen Population als die zu vergleichenden Testgruppen stammt. Zur Detektion der sich signifikant unterscheidenden Testgruppe wurde der Dunn's post-hoc Test zum multiplen Mittelwertvergleich nach Durchführung der Varianzanalyse oder des Kruskal Wallis Test angewandt.

Zur Bestimmung der Signifikanz wurde der p-Wert berechnet. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5% ($p\text{-Wert} < 0,05$) wurde die Nullhypothese verworfen und ein signifikanter Unterschied zwischen den Testgruppen angenommen.

4 Ergebnisse

4.1 Natriumchlorid ist ein ionischer Gewebefaktor mit Th2-immunmodulatorischen Eigenschaften und reichert sich in Hautläsionen der atopischen Dermatitis an

4.1.1 Originalpublikation - Sodium chloride is an ionic checkpoint for human TH2 cells and shapes the atopic skin microenvironment

SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE | RESEARCH ARTICLE

ALLERGY

Sodium chloride is an ionic checkpoint for human T_H2 cells and shapes the atopic skin microenvironment

Julia Matthias^{1,2,3}, Julia Maul⁴, Rebecca Noster³, Hanna Meinl^{1,2,5}, Ying-Yin Chao^{1,2,5}, Heiko Gerstenberg⁶, Florian Jeschke⁶, Gilles Gasparoni⁷, Anna Welle⁷, Jörn Walter⁷, Karl Nordström⁷, Klaus Eberhardt⁸, Dennis Renisch⁸, Sainitin Donakonda^{2,9}, Percy Knolle^{2,9}, Dominik Soll^{1,2}, Stephan Grabbe¹⁰, Natalie Garzorz-Stark¹¹, Kilian Eyerich¹¹, Tilo Biedermann¹¹, Dirk Baumjohann⁴, Christina E. Zielinski^{1,2,3,5*}

The incidence of allergic diseases has increased over the past 50 years, likely due to environmental factors. However, the nature of these factors and the mode of action by which they induce the type 2 immune deviation characteristic of atopic diseases remain unclear. It has previously been reported that dietary sodium chloride promotes the polarization of T helper 17 (T_H17) cells with implications for autoimmune diseases such as multiple sclerosis. Here, we demonstrate that sodium chloride also potently promotes T_H2 cell responses on multiple regulatory levels. Sodium chloride enhanced interleukin-4 (IL-4) and IL-13 production while suppressing interferon- γ (IFN- γ) production in memory T cells. It diverted alternative T cell fates into the T_H2 cell phenotype and also induced de novo T_H2 cell polarization from naïve T cell precursors. Mechanistically, sodium chloride exerted its effects via the osmosensitive transcription factor NFAT5 and the kinase SGK-1, which regulated T_H2 signature cytokines and master transcription factors in hyperosmolar salt conditions. The skin of patients suffering from atopic dermatitis contained elevated sodium compared to nonlesional atopic and healthy skin. These results suggest that sodium chloride represents a so far overlooked cutaneous microenvironmental checkpoint in atopic dermatitis that can induce T_H2 cell responses, the orchestrators of atopic diseases.

Science Translational Medicine, Februar 2019, 11(480)

PMID: 30787167, DOI: 10.1126/scitranslmed.aau0683

Originalpublikation – Siehe Anhang 1.

Der Graphikverweis (**Fig**) bezieht sich im folgenden Textabschnitt auf die Graphiken aus der Originalpublikation „*Sodium chloride is an ionic checkpoint for human TH2 cells and shapes the atopic skin microenvironment*“.

4.1.2 Hervorhebung individueller Leistungsbeiträge

Anders, als lange Zeit angenommen, sind periphere Gewebe außerhalb des Blutkreislaufes in der Lage, große Mengen NaCl einzulagern. Diese werden von einer Vielzahl differenzierter Th-Zellen durchwandert. Um herauszufinden, ob NaCl jene differenzierten Th-Gedächtniszellen phänotypisch beeinflusst, stimulierte ich humane CD4⁺ CD45RA⁻ Th-Gedächtniszellen in Gegenwart von 140 mM NaCl, entsprechend der Konzentration des menschlichen Blutes.

>> *NaCl induziert Th2-typische Eigenschaften in verschiedenen Th-Subtypen*

Um peripheren, physiologisch erhöhten NaCl-Konzentrationen zu entsprechen, wie sie beispielsweise in dermalen Geweben gefunden werden können, erhöhte ich die NaCl-Konzentration im Zellkulturmedium auf 185 mM. Hier zeigte sich nicht nur ein Anstieg der Th17-typischen Merkmale (**Fig S2A**), sondern überraschenderweise eine Verstärkung von Th2-Eigenschaften (**Fig 1A, B**). Auch hinsichtlich der transkriptionellen Regulation ließ sich ein Th2-Shift nachvollziehen. Hier ergab sich eine verstärkte Expression von GATA3 bei leichter Reduktion des Th1-Mastertranskriptionsfaktors Tbet (**Fig 2A**). Dies bestätigte sich mittels Durchflusszytometrie und qPCR. Die Begünstigung des Th2-Phänotyps ließ sich nicht beobachten, wenn die Th-Gedächtniszellen unter nicht-ionischen hypertonen oder hyperosmolaren Bedingungen, verursacht durch Harnstoff und Mannitol, stimuliert wurden (**Fig S6A**). Um auszuschließen, dass dieser Th2-Shift durch Wachstumsbegünstigung einzelner Subpopulationen der polyklonalen Th-Gedächtniszellen entsteht, generierte ich Th-Gedächtniszellklone und untersuchte den Salzeffekt in monoklonalen Zellpopulationen. Auch hier zeigte sich ein Anstieg von IL-4, GATA3, IL-17 und ROR- γ t bei Reduktion von IFN- γ und Tbet (**Fig 2B**). Um den Salzeffekt auf die verschiedenen Th-Subtypen weiter einzugrenzen, sortierte ich Th1-, Th2- und Th17-Zellen gemäß ihres Chemokinrezeptorbesatzes und stimulierte sie in Gegenwart von 140 mM oder 185 mM NaCl. Es ließ sich ein Anstieg von IL-4 und IL-17 in Th2 und Th17-Zellen unter erhöhten NaCl-Konzentrationen beobachten (**Fig 3A, B**). Dies ließ sich auch in den monoklonalen Zellpopulationen nachvollziehen (**Fig 3C**). Hier zeigte sich auf Einzelzellebene eine vermehrte Koexpression von IL-17 und IL-4 (**Fig S4**). Dies ging mit einer verminderten Expression von IFN- γ in Th2- und Th17-Zellen einher. Auch in Th1 Zellen zeigte sich eine Minderung der IFN- γ -Expression (**Fig 3A, B**). Dies zeigt, dass NaCl als ionischer Gewebefaktor in der Lage ist, Th2 Eigenschaften in differenzierten Th-Gedächtniszellen sowie verschiedenen Th-Subtypen zu induzieren und zu stärken.

Ein immunologisch sehr aktives Kompartiment, welches in der Lage ist, hohe Mengen an NaCl zu speichern, ist die Haut (Kopp et al., 2013; Titze et al., 2003). Ich fragte mich deshalb, ob residente T-Zellen der Haut ebenfalls jene phänotypische Stärkung der Th2-immunität in NaCl-reichem Milieu zeigten. Tatsächlich bestätigte sich ein robuster Anstieg von IL-4 mit Senkung von IFN- γ in humanen residenten kutanen CD3⁺ T-Zellen (**Fig S8**) unter ansteigenden NaCl-Konzentrationen (**Fig 1E**). In nachfolgenden Experimenten der

Arbeitsgruppe bestätigte sich jener Anstieg auch in Th-Gedächtniszellen des Blutes in Koexpression typischer Marker residenter T-Zellen der Haut (**Fig S9**).

>> NaCl beeinflusst den Th2-Phänotyp kurzfristig über die Dauer der NaCl-Exposition

Um die Nachhaltigkeit dieses Th2-Shifts zu untersuchen, transferierte ich Th-Gedächtniszellen, welche zuvor unter hohen oder niedrigen NaCl-Konzentrationen stimuliert wurden, in Zellkulturmedium mit wiederum unterschiedlich hohen NaCl-Konzentrationen und führte Restimulationsexperimente mit den Zellpopulationen durch. Hier zeigte sich bei Restimulation unter gleichen NaCl-Konzentrationen kein signifikanter Unterschied zwischen Zellpopulationen, welche primär unter unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen vorstimuliert wurden (**Fig 3D**). NaCl scheint folglich nur kurzfristige Anpassungen des Phänotyps zu induzieren und hierdurch die Flexibilität des Immunsystems zu stärken, es aber nicht plastisch nachhaltig zu verändern.

>> NaCl induziert de novo Th2-Zellen in Abwesenheit von Th2-Polarisationszytokinen

Bisher gilt IL-4 als einer der wichtigsten Th2-Induktoren im Polarisationsprozess während der Stimulation naiver Th-Zellen. Aufgrund des beobachteten Th2-Shifts in differenzierten Th-Zellen, habe ich daraufhin die Fähigkeit von NaCl zur Th2-Induktion in naiven Th-Zellen untersucht. Hier beobachtete ich in Abwesenheit zuzüglicher Th2-Polarisationszytokine einen signifikanten Anstieg von IL-4, IL-13 und GATA3 bei verminderter Expression von IFN- γ . Auch die IL-17-Expression erfuhr einen signifikanten Anstieg unter hohen NaCl-Konzentrationen (**Fig 4A, C**). Dies zeigt, dass NaCl als ionischer Gewebefaktor auch in Abwesenheit Th2-induzierender Zytokine in der Lage ist, eine Th2-Immunantwort zu initiieren.

>> Der NaCl-induzierte Th2-Phänotyp wird durch SGK1 und NFAT5 vermittelt

Zuletzt untersuchte ich den Mechanismus des NaCl-induzierten Phänotyps. Um herauszufinden, ob SGK1 und NFAT5 den beobachteten Anstieg von IL-4 und IFN- γ in Th-Gedächtniszellen vermitteln, unterdrückte ich die Expression von NFAT5 (durch mich) und SGK1 (durch Studienkollegen der Arbeitsgruppe) durch sh-RNA-vermittelte Interferenz. Tatsächlich zeigte sich in diesem kollaborativen Experiment unter Hemmung der NFAT5- und SGK1-Expression eine signifikante Unterdrückung der NaCl-vermittelten Effekte auf die Expression Th1- und Th2-typischer Marker (**Fig 5**).

Die Experimente zur sh-RNA-vermittelten Unterdrückung der SGK1- und NFAT5-Expression wurden im weiteren Verlauf durch weitere Mitglieder der Arbeitsgruppe validiert und die Protokolle optimiert.

>> Läsionales atopisches Hautgewebe reichert 30-mal höhere Natriumkonzentrationen an als nicht-läsionale Hautareale

Die atopische Dermatitis ist eine allergische Erkrankung der Haut mit überschießender Th2-Immunität. Wie es zu jener starken Th2-Aktivierung im Rahmen der AD kommt, ist bisher völlig unklar. Da die Haut als NaCl-

Speicherorgan bereits bekannt ist, fragten wir uns, ob NaCl potentiell eine regulatorische Rolle im Rahmen der immunpathophysiologischen Th2-betonten Fehlregulierung in AD-Patienten einnehmen könnte. In Kollaboration mit Herrn Gerstenberg und Herrn Jeschke sowie klinischer Unterstützung von Seiten des dermatologischen Ärzteteams bestimmten wir deshalb mittels Neutronenaktivierungsanalysen den Natriumgehalt läsionaler und nicht-läsionaler Hautproben von AD-Patienten sowie gesunder Kontrollen. Hierdurch konnte aufgedeckt werden, dass AD-Läsionen im Vergleich zu nicht-läsionaler sowie gesunder Haut 30-fach erhöhte Mengen Natrium einlagern (**Fig 6**). Ein solcher Natriumanstieg ließ sich nicht in läsionaler Haut von Psoriasis-Patienten nachweisen und macht somit eine unspezifische entzündungsbedingte Natriumakkumulation unwahrscheinlich.

Der Einfluss NaCl-reicher Mikromilieus im Gewebe wurde in seiner immunmodulatorischen Kapazität in Hinblick auf die Th2-Immunität lange Zeit vernachlässigt. Zusammenfassend konnten wir NaCl als einen flexiblen, Th2-immunmodulatorischen Gewebefaktor herausstellen. Des Weiteren konnten wir Natriumanreicherungen im Rahmen der atopischen Dermatitis, einer allergischen Hauterkrankung mit überschießender Th2-Immunität, beobachten. Eine pathogenetische Kausalität zur gesteigerten Th2-Immunantwort konnten wir hierdurch zwar nicht herstellen, zusammen mit den von uns beobachteten Th2-immunmodulatorischen Eigenschaften von NaCl könnte dies jedoch als Grundlage zu weiterer Forschung und besserem Verständnis der pathophysiologischen Th2-Immunfehlfregulation in atopischer Haut beitragen.

Weiterhin wurden die Erkenntnisse unserer Originalarbeit „*Sodium chloride is an ionic checkpoint for human TH2 cells and shapes the atopic skin microenvironment*“ auch in folgenden Review- und Buch-Artikeln diskutiert, welche meiner Arbeit anbei liegen:

Matthias, J., Zielinski, CE. (2019) *Shaping the diversity of Th2 cell responses in epithelial tissues and its potential for allergy treatment*. European journal of immunology. 49(9): 1321-1333.

– Siehe Anhang 3.

Zielinski, CE., Matthias, J. (2020) *Allergische Erkrankungen bei Erwachsenen – Prävalenz, Bedeutung und Implikationen für die Prävention und Gesundheitsförderung*. In M. Tiemann und M. Mohokum (eds.), *Prävention und Gesundheitsförderung* (pp. 1-6.) Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

– Siehe Anhang 4.

4.2 Die Induktion anti-inflammatorischer sowie pathogener Th17-Zellen durch Natriumchlorid in Abhängigkeit vom Zytokinmilieu

4.2.1 Originalpublikation - Salt generates anti-inflammatory Th17 cells but amplifies their pathogenicity in pro-inflammatory cytokine microenvironments

The Journal of Clinical Investigation RESEARCH ARTICLE

Salt generates antiinflammatory Th17 cells but amplifies pathogenicity in proinflammatory cytokine microenvironments

Julia Matthias,^{1,2,3} Sylvia Heink,^{4,5} Felix Picard,⁶ Julia Zeitrüg,⁷ Anna Kolz,⁸ Ying-Yin Chao,^{1,2,9} Dominik Soll,^{1,2} Gustavo P. de Almeida,^{1,2,9} Elke Glasmacher,¹⁰ Ilse D. Jacobsen,^{11,12} Thomas Riedel,¹³ Anneli Peters,⁸ Stefan Floess,¹⁴ Jochen Huehn,¹⁴ Dirk Baumjohann,⁷ Magdalena Huber,⁶ Thomas Korn,^{4,5} and Christina E. Zielinski^{1,2,3,9}

¹Institute of Virology, Technical University of Munich, Munich, Germany. ²German Center for Infection Research, Partner Site Munich, Munich, Germany. ³Department of Cellular Immunoregulation, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany. ⁴Klinikum rechts der Isar, Department of Experimental Neuroimmunology, Technical University of Munich, Munich, Germany. ⁵Munich Cluster for Systems Neurology (SyNergy), Munich, Germany. ⁶Institute for Medical Microbiology and Hygiene, University of Marburg, Marburg, Germany. ⁷Institute for Immunology, Biomedical Center, Faculty of Medicine, Ludwig Maximilian University of Munich (LMU Munich), Planegg-Martinsried, Germany. ⁸Institute of Clinical Neuroimmunology, Hospital and Biomedical Center of LMU Munich, Planegg-Martinsried, Germany. ⁹TranslaTUM, Technical University of Munich, Munich, Germany. ¹⁰Roche Innovation Center Munich, pRED, Large Molecule Research, Penzberg, Germany. ¹¹Research Group Microbial Immunology, Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology – Hans Knöll Institute, Jena, Germany. ¹²Institute of Microbiology, Friedrich Schiller University, Jena, Germany. ¹³Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig and German Center for Infection Research, Partner Site Hannover-Braunschweig, Hannover-Braunschweig, Germany. ¹⁴Department of Experimental Immunology, Helmholtz Centre for Infection Research, Braunschweig, Germany.

Th cells integrate signals from their microenvironment to acquire distinct specialization programs for efficient clearance of diverse pathogens or for immunotolerance. Ionic signals have recently been demonstrated to affect T cell polarization and function. Sodium chloride (NaCl) was proposed to accumulate in peripheral tissues upon dietary intake and to promote autoimmunity via the Th17 cell axis. Here, we demonstrate that high-NaCl conditions induced a stable, pathogen-specific, antiinflammatory Th17 cell fate in human T cells in vitro. The p38/MAPK pathway, involving NFAT5 and SGK1, regulated FoxP3 and IL-17A expression in high-NaCl conditions. The NaCl-induced acquisition of an antiinflammatory Th17 cell fate was confirmed in vivo in an experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) mouse model, which demonstrated strongly reduced disease symptoms upon transfer of T cells polarized in high-NaCl conditions. However, NaCl was coopted to promote murine and human Th17 cell pathogenicity, if T cell stimulation occurred in a proinflammatory and TGF-β-low cytokine microenvironment. Taken together, our findings reveal a context-dependent, dichotomous role for NaCl in shaping Th17 cell pathogenicity. NaCl might therefore prove beneficial for the treatment of chronic inflammatory diseases in combination with cytokine-blocking drugs.

The Journal of Clinical Investigation, September 2020, 130(9)

PMID: 32484796, DOI: 10.1172/JCI137786

Originalpublikation – Siehe Anhang 2.

Der Graphikverweis (**Fig**) bezieht sich im folgenden Textabschnitt auf die Graphiken aus der Originalpublikation „Salt generates anti-inflammatory Th17 cells but amplifies their pathogenicity in pro-inflammatory cytokine microenvironments“.

4.2.2 Hervorhebung individueller Leistungsbeiträge

Einiges deutet bereits auf eine immunmodulatorische Funktion von NaCl hin. Interessanterweise sind periphere Gewebe im Gegensatz zu Blut in der Lage, hohe Konzentrationen an NaCl einzulagern (Kopp et al., 2012; Titze et al., 2004). Jene werden vor allem durch differenzierte Gedächtniszellen besiedelt, welche durch die Körperperipherie patrouillieren und bei Kontakt mit einem Pathogen eine Immunantwort initiieren können. Der Effekt NaCl-reicher Milieus auf Phänotyp und Funktionalität von differenzierten Gedächtniszellen ist deshalb von besonderer Relevanz.

>> NaCl induziert Th17-typische Merkmale in verschiedenen differenzierten Th-Gedächtniszellen

Um den Effekt NaCl-reicher Milieus auf Th-Gedächtniszellen zu untersuchen, welche im Gegensatz zu zentralen T-Gedächtniszellen und naiven Th-Zellen jene NaCl-reichen Gewebemilieus durchwandern, stimulierte ich CD4⁺ CD45RA⁻ CCR7⁻ Th-Effektorgedächtniszellen in Gegenwart von 140 oder 185 mM NaCl. Hier zeigte sich eine deutlich erhöhte Expression Th17-typischer Charakteristika wie IL-17 (Th17-Signaturzytokin) und ROR- γ t (Th17-Mastertranskriptionsfaktor) unter erhöhten NaCl-Konzentrationen in der Durchflusszytometrie und ELISA (**Fig 1A, B**). Auch weitere Th17-typische Merkmale, wie IL-22 und CCR6, zeigten sich unter erhöhten NaCl-Bedingungen erhöht exprimiert. Dies bestätigte sich auch in extrahierten T-Zellen humanen Hautgewebes, welches für seine NaCl-Speicherkapazität bekannt ist (**Fig 1D**). Stimulation in Gegenwart typischer Th17-Polarisationszytokine verstärkte den Th17-Phänotyp in ähnlichem Ausmaß wie erhöhte NaCl-Konzentrationen; die Kombination mit NaCl führte jedoch zu keiner weiteren IL-17A Erhöhung, sodass die Th17-Priming-Zytokine den NaCl-Effekt maskierten (**Fig 1E**). Interessanterweise zeigte sich jener Th17-begünstigende Effekt nicht nur in Th17-Zellen (**Fig 2A, B**), sondern auch in anderen Th-Subtypen, wie Th2 (**Fig 3A** (Matthias et al., 2019)), Tregs (**Fig S4**) sowie monoklonalen Th-Gedächtniszellen (**Fig 2E, S1**).

>> Regulatorische Eigenschaften werden in NaCl-reicher Umgebung verstärkt

Wenn auch häufig mit pro-inflammatorischen Eigenschaften assoziiert, konnten kürzlich Th17-Zellen mit anti-inflammatorischen Eigenschaften identifiziert werden. Um herauszufinden, ob es sich bei dem durch NaCl vermittelten Th17-Phänotyp um Th17-Zellen mit pro- oder anti-inflammatorischen Eigenschaften handelt, stimulierte ich humane Th17-Zellen und monoklonale Th-Zellpopulationen unter hohen und niedrigen NaCl-Konzentrationen. Hierbei beobachtete ich einen Anstieg anti-inflammatorischer Marker, wie des Treg-Mastertranskriptionsfaktor FOXP3 und des anti-inflammatorischen Gewebefaktors TGF- β , auf Proteinebene sowie in der Genexpressionsanalyse (**Fig 2A-C**). Es zeigte sich ein dosisabhängiger Anstieg von TGF- β und FOXP3 in Th17-Zellen unter steigenden NaCl-Konzentrationen, während die IL-17-Expression schon frühzeitig ein Plateau erreichte (**Fig S2**). Interessanterweise zeigte sich nicht nur in Th17-Zellen, sondern auch im Th1-, Th2- und Treg-Subtyp sowie in monoklonalen Th-Zellpopulationen eine Induktion anti-

inflammatorischer Eigenschaften in NaCl-reichem Milieu (**Fig S1A, B; S3; S4**). In monoklonalen Zellpopulationen zeigte sich ein Anstieg von IL-17 bei gleichzeitiger Senkung der Koexpression mit IFN- γ , einem wichtigen Zytokin des pro-inflammatorischen Th17-Subtyps (**Fig 2E**). Eine Genexpressionsanalyse Treg-typischer Gene mittels *Gene Set Enrichment Analysis* durch die Bioinformatik bestätigte die Begünstigung eines anti-inflammatorischen regulatorischen Phänotyps in Th17-Zellen durch NaCl (**Fig 2D**). Dies zeigt, dass NaCl-reiche Milieus die Induktion eines anti-inflammatorischen Th17-Phänotyps in Th-Effektorgedächtniszellen sowie verschiedenen differenzierten Th-Subtypen vermitteln.

>> *NaCl nimmt auch nach Verlassen NaCl-reicher Milieus nachhaltig anti-inflammatorisch Einfluss auf Th-Gedächtniszellen*

Während residente Th-Gedächtniszellen im peripheren Gewebe verbleiben, zirkulieren Th-Effektorgedächtniszellen und durchqueren hierbei Gewebe unterschiedlicher NaCl-Konzentrationen. Ich wollte deshalb herausfinden, ob dieser durch NaCl-induzierte anti-inflammatorische Phänotyp auch noch nach Verlassen der NaCl-reichen Umgebung bestehen bleibt. Hierfür restimulierte ich Th17-Zellen nach vorangegangener Stimulation unter hohen NaCl-Konzentrationen in NaCl-armem Milieu. Während die IL-17- und TGF β -Expression in NaCl-armer Umgebung sofort auf Werte der Kontrollpopulation absank, zeigte sich FOXP3 selbst nach zweifacher Restimulation in NaCl-armer Umgebung deutlich erhöht (**Fig 3A-C**). NaCl scheint folglich anti-inflammatorische Eigenschaften, wie FOXP3, auch nach Verlassen der NaCl-reichen Umgebung entscheidend zu beeinflussen. NaCl könnte hierdurch auch außerhalb NaCl-reicher Milieus einen nachhaltigen, anti-inflammatorischen Effekt auf das Immunsystem ausüben.

>> *Der anti-inflammatorische NaCl-induzierte Phänotyp wird durch NFAT5 und SGK1 vermittelt*

Als nächstes wollte ich herauszufinden, ob der salzsensitive Transkriptionsfaktor NFAT5 und die salzsensitive Kinase SGK1, welche an der Vermittlung des Th17-Phänotyps in naiven Th-Zellen beteiligt sind, auch in Th-Gedächtniszellen den Th17-Phänotyp sowie die beobachteten anti-inflammatorischen Eigenschaften vermitteln. Hierfür bestimmte ich die Genexpression von NFAT5 und SGK1 in Th17-Zellen nach Stimulation in NaCl-reichem Milieu: in der Tat bestätigte sich ein Anstieg sowohl von NFAT5 als auch von SGK1 (**Fig 4B**). Um zu untersuchen, ob die beobachteten anti-inflammatorischen Eigenschaften durch jenen NFAT5- und SGK1-Anstieg vermittelt werden, unterdrückte ich deren Expression mittels sh-RNA-vermittelter Interferenz. Tatsächlich zeigte sich unter Hemmung von NFAT5 eine Unterdrückung des NaCl-vermittelten anti-inflammatorischen Phänotyps. In Kollaboration mit einem Kollegen der Arbeitsgruppe zeigte sich dies auch bei Unterdrückung von SGK1 (**Fig 4C**). Mit der pharmakologischen Hemmung des MAP-Kinase-Signalweges in NaCl-stimulierten humanen Th17-Zellen bestätigte er zudem eine Beteiligung der MAP-Kinasen an der NaCl-induzierten Vermittlung der Th17- als auch der beobachteten anti-inflammatorischen Eigenschaften (**Fig**

4). Diese Protokolle zur sh-RNA-vermittelten Unterdrückung der SGK1- und NFAT5-Expression wurden im weiteren Verlauf durch Mitglieder der Arbeitsgruppe optimiert und validiert.

Ich konnte zeigen, dass NaCl auch in differenzierten Th-Gedächtniszellen einen Th17-Phänotyp induziert und stärkt. Dies wird begleitet von einem Anstieg anti-inflammatorischer, immunregulatorischer Eigenschaften, welche nachhaltig, auch bei mehrfacher Stimulation außerhalb NaCl-reicher Mikromilieus, bestehen bleiben und somit eine globale, langfristige Beeinflussung des Immunsystems möglich machen.

>> NaCl beeinflusst, abhängig vom Zytokinmilieu, die Pathogenität von Th17-Zellen im EAE-Mausmodell

Die Induktion eines anti-inflammatorischen Th17-Phänotyps überrascht, wurde doch bisher NaCl als pro-inflammatorischer Gewebefaktor angesehen (Jantsch et al., 2015; Kleinewietfeld et al., 2013). Da die Induktion des Th17-Phänotyps in unterschiedlichen Zytokinmilieus erfolgen kann, welche teilweise bereits als Induktoren pro-inflammatorischer Eigenschaften in Th17-Zellen identifiziert wurden, untersuchten wir als nächstes den Einfluss differierender Zytokinmilieus auf den anti-inflammatorischen Effekt von NaCl. Interessanterweise ließen sich TGF- β und IL-1 β als wichtige Switch-Faktoren für den Effekt von NaCl auf die Pathogenität von Th17-Zellen herausstellen (**Abb 5**). Dieses Konzept wurde auch nach Transfer unserer Ergebnisse ins

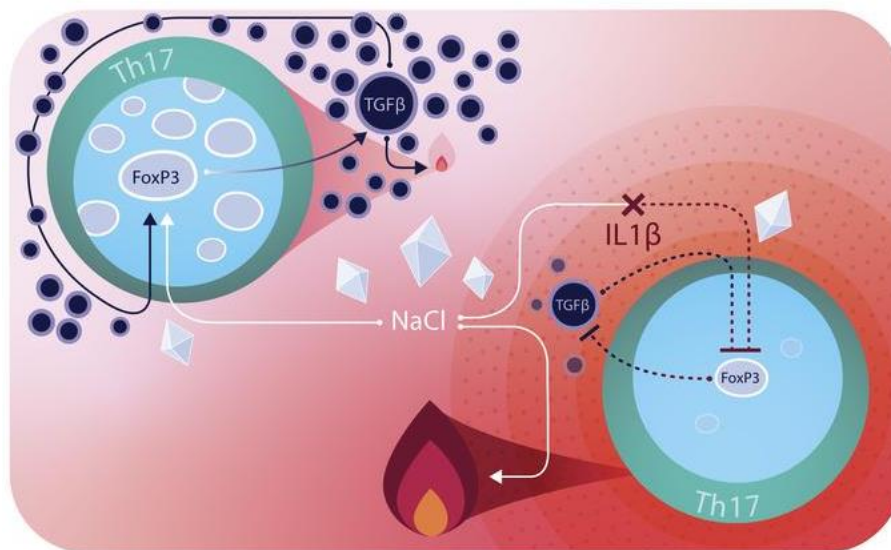


Abbildung 5: NaCl in Wechselwirkung mit dem Zytokinmilieu

Abhängig vom Zytokinmilieu induziert NaCl pro- oder anti-inflammatorische Eigenschaften in Th17-Zellen. Als Switch-Faktoren konnten wir IL-1 β und TGF- β identifizieren.

Während NaCl in TGF- β -reichem Milieu einen anti-inflammatorischen Phänotyp vermittelt, werden in Gegenwart von IL-1 β durch Blockierung des TGF- β -Signalweges pro-inflammatorische Eigenschaften induziert.

Quelle: Verwendet aus (Matthias et al., 2020), Graphical Abstract

Mausmodell der Multiplen Sklerose durch unsere Studienkollektoren an mehreren externen Standorten (AG Korn, AG Huber, AG Peters) bestätigt: So führte der adoptive T-Zell-Transfer von Th17-Zellen zur Abschwächung des Krankheitsverlaufes, wenn die Th17-Polarisation unter hohen NaCl-Konzentrationen UND in Gegenwart eines TGF- β -reichen anti-inflammatorischen Zytokinmilieus erfolgte. Fand die Th17-Polarisation hingegen in einem IL-1 β -reichen, pro-inflammatorischen Zytokinmilieu statt, induzierte NaCl sogar eine Aggravation des Krankheitsverlaufes.

Zusammengefasst konnten wir zeigen, dass NaCl dichotome Effekte auf den Phänotyp differenzierter Th-Zellen erzielt, welche durch das umgebende Zytokinmilieu gelenkt werden. NaCl ist somit ein flexibler, kontextsensitiver Gewebefaktor, welcher in Phasen physiologischen Gleichgewichts Immuntoleranz vermittelt, vor dem Hintergrund einer Infektion oder autoimmuner Geschehen jedoch eine entzündungsfördernde Rolle einnimmt.

4.3 Steigern hohe NaCl-Konzentrationen in Tumorgewebe die Abwehrlage CD8+ zytotoxischer T-Gedächtniszellen?

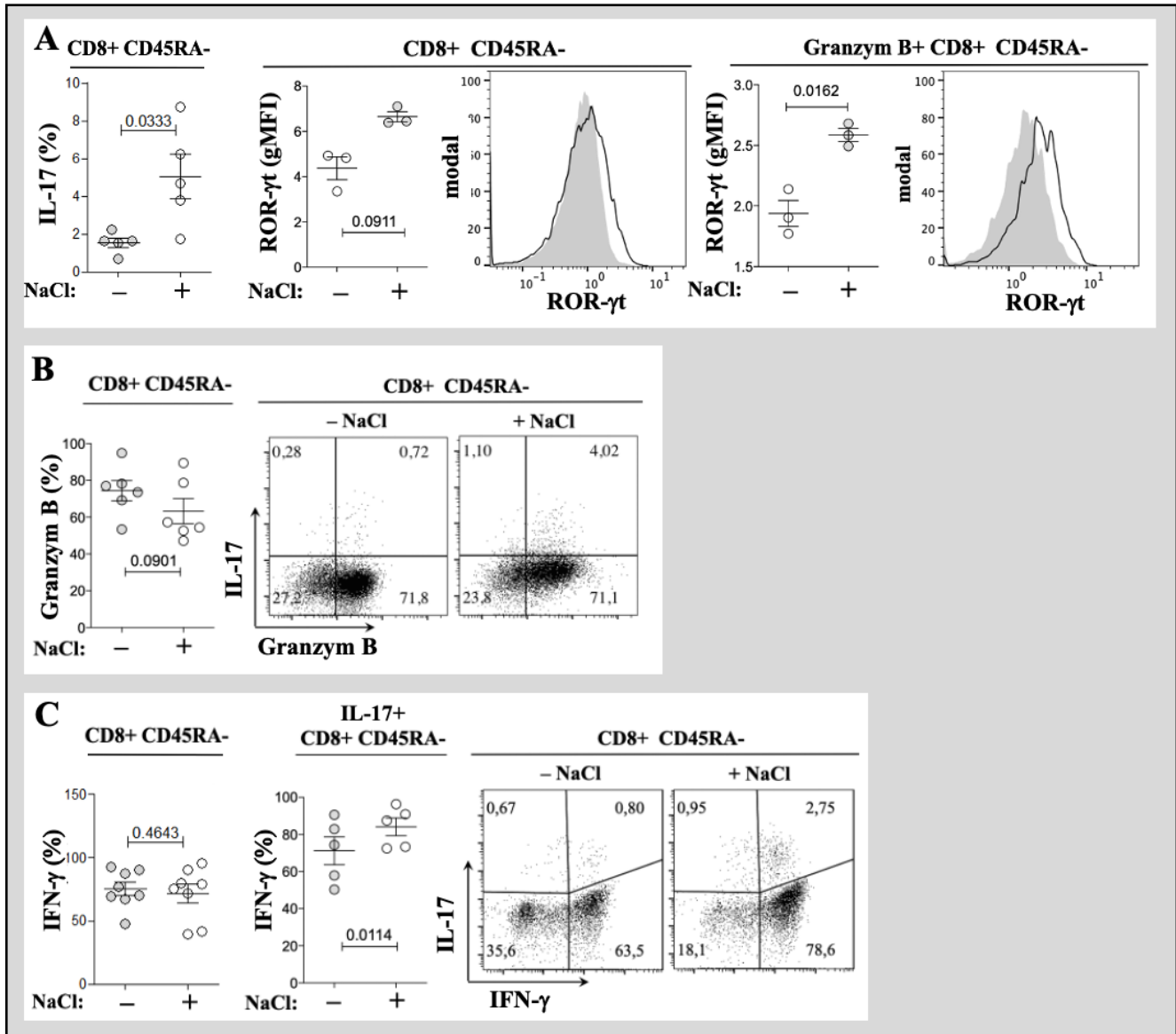


Abbildung 6: NaCl induziert zytotoxische Tc17-Eigenschaften in CD8+ T-Gedächtniszellen

Humane CD8+ T-Gedächtniszellen wurden isoliert und 48 Stunden in NaCl-armem oder -reichem CD8-T-Zellkulturmedium mittels plattengebundener anti-CD3 und anti-CD28-Antikörper stimuliert. An Tag 5 wurden die Zellen gewaschen, fixiert und für die intrazelluläre Färbung der Zytokine IL-17 (A, B, C), Granzym B (B) und IFN- γ (C) und des Transkriptionsfaktors ROR- γ t (A) vorbereitet. Die Datenerhebung erfolgte mittels durchflusszytometrischer Analyse. Zur statistischen Auswertung wurde der gepaarte t-Test herangezogen. $p < 0,05$ gilt als signifikant.

Quelle: Unpublizierte Daten – In Vorbereitung zur Publikation

Ich habe zeigen können, dass NaCl als flexibler Gewebefaktor einen bedeutenden immunmodulatorischen Einfluss auf die Funktionalität und Pathogenität von Th-Zellen nimmt und hierdurch als potentieller Einflussfaktor autoimmune und allergische Prozesse steuern könnte. Eine weitere wichtige Aufgabe unseres Immunsystems, welchen ich im Kontext immundysregulierter Erkrankungen bisher noch nicht diskutiert habe, ist die Detektion und Abwehr von Krebszellen. Interessanterweise konnte Kalium bereits als ionischer Immunmodulator in malignem Gewebe identifiziert werden: Es konnte gezeigt werden, dass hohe Kaliumkonzentrationen in nekrotischem Tumorgewebe die T-Zell-Effektorfunktion zytotoxischer T-Zellen beeinträchtigen (Eil et al., 2016). Dies macht erstmalig die Bedeutung hochionischer Umweltfaktoren im Kontext maligner Erkrankungen deutlich. Welchen Einfluss NaCl auf die Tumorummunologie und die Funktion CD8⁺ T-Zellen nimmt, ist bisher noch ungewiss – eine Anreicherung von Natrium in verschiedenen Tumorentitäten konnte jedoch bereits beobachtet werden (Barrett et al., 2018; Ouwerkerk et al., 2003; Ouwerkerk et al., 2007). Ich konzentrierte mich deshalb im Folgenden auf den Einfluss NaCl-reicher Gewebemilieus auf den Phänotyp CD8⁺ T-Zellen, welche zur Abwehr maligner sowie virusinfizierter Zellen von großer Bedeutung sind.

Um den Effekt erhöhter NaCl-Konzentrationen auf differenzierte CD8⁺ T-Zellen zu untersuchen, stimulierte ich CD8⁺ T-Gedächtniszellen in Gegenwart von 140 oder 185 mM NaCl. Hier zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression des Th17-Signaturzytokins IL-17 (**Abb 6A**). Im Einklang mit der beobachteten NaCl-induzierten IL-17-Expression beobachtete ich auch einen Anstieg des Th17-Mastertranskriptionsfaktors ROR- γ t in Gegenwart hoher NaCl-Konzentrationen – dieser zeigte sich jedoch interessanterweise nur in dem Anteil Granzym B produzierender CD8⁺ T-Gedächtniszellen (**Abb 6A**). Granzym B ist eine Apoptose-induzierende Serinprotease, welche als Bestandteil der zytotoxischen Granulae von zytotoxischen T-Zellen produziert wird. Es stellte sich folglich die Frage, ob NaCl zytotoxische Eigenschaften in CD8⁺ T-Zellen stimuliert. Wenngleich ich keinen signifikanten Anstieg der Granzym B-Expression unter erhöhten NaCl-Konzentrationen detektieren konnte (**Abb 6B**), fiel bei genauer Betrachtung jedoch auf, dass Granzym B in NaCl-reichem Milieu zunehmend mit IL-17 koexprimiert wird (**Abb 6B**). Weiterhin konnte von Kollegen der Arbeitsgruppe ein Anstieg des Lysosomen-assoziierten Membranproteins 1 (LAMP1) unter hohen NaCl-Konzentrationen detektiert werden, welches auf eine Zunahme der Degranulation deutet und somit auf eine gesteigerte zytotoxische Aktivität der CD8⁺ T-Gedächtniszelle hinweist.

Um den Verdacht der Entstehung einer NaCl-stimulierten zytolytischen CD8⁺ T-Zellfraktion zu erhärten, untersuchte ich die Zellen auf Produktion von IFN- γ , welches wichtige zytotoxische Funktionen in der Tumorabwehr übernimmt. Die Expression von IFN- γ schien auf den ersten Blick unbeeinflusst durch das NaCl-reiche Milieu, bei genauerer Betrachtung der IL-17-exprimierenden CD8⁺ Fraktion zeigte sich jedoch eine deutliche IFN- γ -Induktion in den IL-17-positiven Zellen (**Abb 6C**). NaCl scheint folglich nicht nur die

Expression der Th17-typischen Merkmale IL-17 und ROR- γ t in CD8⁺ T-Zellen zu induzieren, sondern stimuliert zugleich die Produktion der zytotoxischen Mediatoren IFN- γ und Granzym B in jener IL-17-exprimierenden CD8⁺ T-Zellfraktion. Da sowohl IFN- γ als auch Granzym B zur Zytotoxizität der CD8⁺ T-Zellen beitragen, könnte dies auf eine Steigerung der Abwehrfunktion CD8⁺ T-Gedächtniszellen in NaCl-reichen Tumorgewebe hindeuten.

Zusammengefasst konnten wir feststellen, dass einiges auf eine mögliche Induktion CD8⁺ IL-17-exprimierender Tc17-Zellen mit Anstieg der Degranulation potentiell zytolytischer Granulae und Entwicklung eines zytotoxischen Phänotyps in NaCl-reichen Gewebemilieus, wie sie bereits in einigen Tumoren beobachtet werden konnten, hinweist. Hierdurch könnte NaCl als peripherer immunmodulatorischer Gewebefaktor eine zytotoxische Abwehrfunktion CD8⁺ T-Gedächtniszellen induzieren und lokal eine Stärkung der Tumorabwehr im Tumorgewebe begünstigen. Die von mir gewonnenen Daten müssen dennoch weiter validiert werden, da sie noch preliminären Charakter haben, und waren nicht Gegenstand dieser Doktorarbeit.

5 Diskussion

Lange Zeit wurde angenommen, dass extrazelluläre NaCl-Konzentrationen von der Niere im gesamten Körper stabil in engen Grenzen gehalten werden. Kürzlich konnte jedoch gezeigt werden, dass sich die NaCl-Konzentrationen in verschiedenen Geweben unterscheiden (Kopp et al., 2013) und nicht zuletzt erheblichen Einfluss auf das Immunsystem nehmen. Makrophagen des innate Immunsystems (Jantsch et al., 2015) und auch naive Th-Zellen des adaptiven Immunsystems passen sich funktionell dem extrazellulären NaCl-Milieu an: die *de novo* Entstehung von Th17-Zellen aus naiven Th-Zellen mit pathologischen pro-inflammatorischen Eigenschaften (Kleinewietfeld et al., 2013; Wu et al., 2013), sowie Beeinträchtigung suppressiver Eigenschaften natürlicher Tregs in NaCl-reichem Milieu (Hernandez et al., 2015) wurden beobachtet. Ein Zusammenhang des neuerlichen massiven Anstiegs immundysregulierter autoimmuner Erkrankungen, wie der MS, mit salzreichen Ernährungsgewohnheiten wird spekuliert.

Wir konnten zeigen, dass NaCl nicht nur naive T Zellen, sondern auch differenzierte Th-Zellen funktionell beeinflusst und sowohl Th17- als auch Th2-Eigenschaften stärkt. Die Expression Th2- und Th17-typischer Merkmale, wie die Signaturzytokine IL-17 und IL-4, sowie die Mastertranskriptionsfaktoren ROR- γ t und GATA3, zeigten während der Exposition erhöhter NaCl-Konzentrationen einen signifikanten Anstieg. Die Ausprägung beider Th-Phänotypen war abhängig von einem Anstieg des salzsensitiven Transkriptionsfaktors NFAT5 und der salzsensitiven Kinase SGK1, welche auf erhöhte NaCl-Konzentrationen mit einer Expressionssteigerung reagierten. Im Gegensatz zur bisher vorwiegend berichteten Induktion pro-inflammatorischer Eigenschaften in Th-Zellen durch NaCl konnten wir die Induktion eines anti-inflammatorischen Th17-Phänotyps mit Anstieg von FOXP3 und TGF- β beobachten. Diese waren auch in weiteren Th-Subtypen nachweisbar und abhängig von SGK1 und NFAT5. Wir konnten zeigen, dass die Schicksalsentscheidung zwischen pro- und anti-inflammatorischem Th17-Phänotyp von dem vorliegenden Zytokinmilieu im NaCl-reichen Mikromilieu determiniert wurde. Als Switch-Faktoren ließen sich IL-1 β und TGF- β identifizieren. Der adoptive Transfer NaCl-stimulierter muriner Th-Zellen induzierte im Kontext eines anti-inflammatorischen Zytokinmilieus eine Abschwächung des Krankheitsverlaufes der MS im Mausmodell, während ein pro-inflammatorisches Zytokinmilieu ohne TGF- β zu einem aggravierten Krankheitsverlauf durch NaCl führte. Untersuchungen läsionaler Hautproben von Patienten mit atopischer Dermatitis offenbarten eine starke Anreicherung von Natrium im Vergleich zu nichtläsionaler Haut. Auch CD8-T-Gedächtniszellen ließen sich durch NaCl-reiche Milieus beeinflussen und entwickelten einen Tc17-ähnlichen Phänotyp mit potentiell zytotoxischen Eigenschaften.

Im Folgenden möchte ich mögliche Signalwege und Mechanismen, welche an dem beobachteten NaCl-induzierten Phänotyp und der Vermittlung von sowohl Th2- als auch Th17-Eigenschaften beteiligt sind, diskutieren. Zudem werde ich auf die Bedeutung der Zusammensetzung des Zytokin-Mikromilieus als

Determinante des kontextsensitiven NaCl-Effekts eingehen und die Konsequenzen der Verwendung verschiedener Spezies-Modelle auf Ausgang und Interpretation humaner und muriner Experimente kritisch reflektieren. Auch die Rolle von NaCl vor dem klinischen Hintergrund autoimmuner, allergischer und maligner Erkrankungen möchte ich diskutieren. Hier werde ich auch den klinischen Zusammenhang unserer modernen, salzreichen Ernährungsgewohnheiten mit dem Anstieg allergischer und autoimmuner Erkrankungen hinterfragen und Thesen zu Möglichkeiten der therapeutischen Nutzung unserer Ergebnisse entwickeln. Zum Schluss werde ich einen Ausblick auf mögliche Implikationen von NaCl in der Tumorummunologie geben und Ansatzpunkte zur Klärung bislang weiterhin unzureichend verstandener Zusammenhänge für die zukünftige Forschung aufweisen.

5.1 Th17-stimulierende Signalwege unter normosmotischen und hyperosmotischen Bedingungen

Die Signalwege, welche die Ausbildung des NaCl-induzierten Phänotyps in Th-Zellen induzieren, sind komplex und die beteiligten Strukturen *upstream* und *downstream* von NFAT5 und SGK1 bisher nur lückenhaft erforscht. Kleinewietfeld et al. beobachteten, dass die p38-mitogenaktivierte Proteinkinase (p38 MAPK) an der NaCl-abhängigen Hochexpression von NFAT5 beteiligt ist und den pro-inflammatorischen NaCl-Phänotyp vermittelt (Kleinewietfeld et al., 2013). Auch wir konnten eine Reduzierung des NaCl-Effekts unter Hemmung von SGK1 oder NFAT5 mit unterdrücktem IL-17-, IL-4-, GATA3- und FOXP3-Anstieg sowie ausbleibender Senkung von IFN- γ unter NaCl-Einfluss feststellen. Hemmung von p38 MAPK führte zum Ausbleiben des IL-17- und FOXP3-Anstiegs. Die Inhibition der Ausbildung des Th2- und Th17-Phänotyps zeigte sich jedoch nur bei NaCl-abhängiger Induktion. Zu einer Hemmung des Th2- und Th17-Phänotyps unter normotoner SGK1- oder NFAT5-Inhibition kam es nicht. Dies verdeutlicht, dass andere Signaltransduktionsvorgänge unter veränderten Osmolaritätsbedingungen relevant für die Regulation von Th2- und Th17-Funktionen sind.

Es konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) zu einer Abschwächung der IL-17-Expression in PBMCs von Patienten mit Rheumatoider Arthritis führt (Kim et al., 2005). PI3K ist ein Aktivator von SGK1, kann jedoch auch unter Umgehung von SGK1 durch Aktivierung des SGK1-Homologs Proteinkinase B (AKT) eine Stimulation des Th17-Phänotyps induzieren. Ein weiterer Proteinkomplex, welcher Teil der Th17-Induktionskaskaden ist, ist der mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1), welcher sich *downstream* von AKT befindet (Kurebayashi et al., 2012; Lee et al., 2010). Interessanterweise kann SGK1 jedoch auch als direkter Aktivator von mTORC1 agieren (Castel et al., 2016) und hierdurch unter Umgehung des PI3K–Akt–mTORC1-Signalweges den Th17-Phänotyp bahnen. Verschiedene Th17-Signalwege scheinen folglich parallel zueinander an der Induktion von Th17-Eigenschaften beteiligt zu sein und hierdurch auch nach Abschalten hyperosmotischer Th17-Signalwege die Bahnung von Th17-Eigenschaften zu gewährleisten.

Ein weiterer metabolischer Regulator, welcher an der Induktion des Th17-Phänotyps beteiligt ist, ist der Hypoxie-induzierte Faktor 1 α (HIF1 α). Shi et al. konnten beobachten, dass eine Mindereexpression von HIF1 α zu einer starken Hemmung der Th17-Induktion in murinen naiven T-Zellen führt und im Mausmodell des Reizdarms eine Abschwächung der Krankheitsausprägung begünstigt. Jener Th17-induzierende HIF1 α -Signalweg befand sich *downstream* von mTORC1, wie anhand einer abgeschwächten HIF1 α - und Th17-Induktion nach mTORC1-Inhibition beobachtet werden konnte (Shi et al., 2011). Da NFAT5 ein bekannter Aktivator von SGK1 ist und Castel et al. SGK1 als mTORC1-Stimulator identifizieren konnten, macht dies eine NFAT5-abhängige HIF1 α -Regulation wahrscheinlich. Tatsächlich konnte unabhängig hiervon NFAT5 kürzlich als ein *upstream*-Regulator von HIF1 α in Makrophagen identifiziert werden (Neubert et al., 2019). Während Jantsch et al. bereits 2015 NaCl-induziert eine gesteigerte antimikrobielle Abwehr in Makrophagen beobachteten (Jantsch et al., 2015), identifizierten Neubert et al. die Induktion von Autophagie in NaCl-stimulierten Makrophagen als Grund für jene gesteigerte antimikrobielle Abwehr in NaCl-reichem Milieu (Neubert et al., 2019). Dieser Mechanismus wurde durch Steigerung der HIF1 α -Expression, *downstream* von NFAT5, vermittelt. Eine Depletion von NFAT5 führte zwar zum Ausbleiben des Anstiegs von HIF1 α unter NaCl-Stimulation, senkte unter isotonen Bedingungen die HIF1 α -Expression jedoch nicht weiter ab (Neubert et al., 2019). Ob NFAT5 auch in Th-Zellen die Expression von HIF1 α reguliert, ist bisher noch nicht geklärt. Ähnlich der Regulation von HIF1 α durch NFAT5 haben auch wir beobachtet, dass die Einflussnahme auf den Th17-Phänotyp durch NFAT5 nur in NaCl-reichem Milieu erfolgte, während NFAT5-Stillegung nicht zu einer Abnahme des Th17-Phänotyps führte. Spannend zu erwähnen ist, dass dendritische Zellen hingegen nach HIF1 α Induktion vermehrt zur Th2-Polarisation neigen und somit auf indirektem Wege eine Th2-Immunantwort begünstigen (Xiong et al., 2016). Ob sich jene diskutierten NaCl- und NFAT5-abhängigen HIF1 α -Signalwege tatsächlich auch in dendritischen Zellen finden lassen, unterliegt jedoch bisher der Spekulation.

Ein weiterer, kürzlich entdeckter *upstream* Regulator von NFAT5 ist die Serin/Threonin Protein Phosphatase Kalzineurin (Trama et al., 2000). Trama et al. konnten eine NFATc-unabhängige Expressionssteigerung von NFAT5, vermittelt durch Kalzium-Kalzineurin-abhängige Signalwege, beobachten. Die Hemmung von Kalzineurin durch den Kalzineurin-Inhibitor Cyclosporin A resultierte in einer fast vollständigen Unterdrückung der NFAT5-Hocheexpression nach TCR-Stimulation (Trama et al., 2000). Interessanterweise war die NaCl-induzierte NFAT5-Stimulation hiervon jedoch unbeeinträchtigt und zeigte auch unter Hemmung von Kalzineurin durch Cyclosporin A einen Anstieg der NFAT5-Expression.

Unterschiedliche Signalwege sind an der Stimulation des Th17-Phänotyps unter normosmotischen und hyperosmotischen Bedingungen beteiligt. Ein Wegfall der hyperosmotischen Th17-Stimulation kann hierdurch

auch unter normosmotischen Bedingungen die Bahnung von Th17-Eigenschaften gewährleisten und verhindert somit eine Th17-Hemmung außerhalb NaCl-reicher Mikromilieus.

5.2 SGK1-abhängige Regulationsmechanismen zur Th2-Induktion

Neben mTORC1 ist auch das mammalian target of rapamycin complex 2 (mTORC2) an der Schicksalsentscheidung von Th-Zellen beteiligt. Es konnte gezeigt werden, dass eine Mindereexpression des rapamycin-insensitive companion of mammalian target of rapamycin (Rictor), einer regulatorischen Untereinheit von mTORC2, zu einer beeinträchtigten Entwicklung naiver Th-Zellen in Richtung Th1- und Th2-Zellen führt (Lee et al., 2010). Die Entstehung von Th17-Zellen blieb hiervon unbeeinträchtigt. Die konstitutive Aktivierung der Proteinkinase C theta (PKC θ) *downstream* von mTORC2 war in der Lage, die Entwicklung eines Th2-Phänotyps, nicht jedoch des Th1-Phänotyps, wiederherzustellen (Lee et al., 2010). mTORC2 scheint folglich über den PKC θ -Signalweg die Entstehung von Th2-Zellen mit Hochexpression von GATA3 und IL-4 zu begünstigen. Ein weiterer Transkriptionsfaktor aus der Gruppe der Aktivator Protein 1 (AP1)-Transkriptionsfaktorfamilie, JunB, ist ebenfalls an der Entwicklung von Th2-Zellen beteiligt (Li et al., 1999). JunB bindet zusammen mit dem Transkriptionsfaktor cMaf an die IL-4-Promotor-Region und begünstigt hierdurch die Entwicklung eines Th2-Phänotyps (Li et al., 1999).

Interessanterweise ist der Th2-Induktor mTORC2 nicht nur in der Lage, PKC θ zu aktivieren, sondern kann über eine SGK1-Bindungsdomäne auch SGK1 phosphorylieren und hierdurch aktivieren (García-Martínez und Alessi, 2008). Heikamp et al. beobachteten, dass auch über jene mTORC2-SGK1-Verbindung die Th2-Schicksalsentscheidung reguliert werden kann (Heikamp et al., 2014): Die JunB-Expression, welche an der Induktion eines Th2-Phänotyps beteiligt ist, unterliegt der Kontrolle des Proteins neural precursor cell expressed developmentally downregulated gene 4-like (NEDD4L), einer E3 Ubiquitin Ligase, welche Targetproteine ubiquitinyliert und hierdurch dem Abbau durch das Proteasom zuführt. NEDD4L ist somit durch Abbau von JunB zur Hemmung des Th2-Phänotyps in der Lage (Heikamp et al., 2014). Heikamp et al. konnten eine SGK1-abhängige Regulation von NEDD4L beobachten. Phosphorylierung von NEDD4L durch SGK1 verhindert hierdurch dessen Bindung an JunB und sichert somit die Induktion einer Th2-Immunantwort (Heikamp et al., 2014). Dies konnte auch *in vivo* beobachtet werden: So zeigten SGK1-defiziente Mäuse im Asthma-Tiermodell einen abgeschwächten Krankheitsverlauf des allergischen Asthmas sowie eine gestörte Produktion von IL-4 (Heikamp et al., 2014).

Auch wir konnten eine SGK1-abhängige Th2-Induktion in naiven T-Zellen sowie die Stärkung des Th2-Phänotyps in Th-Gedächtniszellen beobachten. Diese konnte durch hohe NaCl-Konzentrationen provoziert werden. Ob der von uns beobachtete Th2-begünstigende NaCl-Effekt ebenfalls durch mTORC2 *upstream* von SGK1 reguliert werden könnte, ist bisher ungewiss und bedarf weiterer Klärung.

5.3 Parallelen in der Entwicklung von Th17- und Th2-Zellen

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, erfüllen die STAT-Proteine als „Torhüter des Th-Schicksals“ wichtige Funktion als Weichensteller für die Schicksalsentscheidung der Th-Zellen. Während die Phosphorylierung von STAT3 den Th17-Werdegang ebnet, induziert die Phosphorylierung von STAT6 eine Entwicklung in Richtung Th2 (Kaplan et al., 1996; Yang et al., 2007). Die STAT-Proteine gelten als linienspezifisch und hemmen durch Induktion eines Th-spezifischen Zytokin- und Transkriptionsfaktorprofils die Signalwege anderer Th-Subtypen (Harrington et al., 2005; Hwang et al., 2005; Usui et al., 2003). Der parallele Anstieg sowohl von pSTAT3 als auch von pSTAT6 mit Induktion von Th17 und Th2-Eigenschaften mag deshalb zunächst kontraintuitiv erscheinen. Interessanterweise ist STAT3 jedoch auch ausschlaggebend an der Th2-Entwicklung beteiligt: Stritesky et al. konnten einen signifikanten Abfall der IL-4- und GATA3-Expression in STAT3-defizienten Th2-Zellen beobachten (Stritesky et al., 2011). pSTAT3 initiiert hier den Th2-Phänotyp durch Vermittlung der Bindung von STAT6 an die für die Th2-Entwicklung essentiellen Target-Transkriptionsfaktoren, wie GATA3. Die Unterdrückung von STAT3 in CD4+ T-Zellen zeigte eine Abnahme Ovalbumin-induzierter allergischer pulmonaler Infiltrate im Mausmodell und eine Abnahme von Th2 und Th17-Zytokinen in der bronchoalveolären Lavage (Stritesky et al., 2011). Ein NaCl-induzierter Anstieg der Phosphorylierung von STAT3 parallel zu STAT6 schließt folglich die Induktion einer Th2-Immunantwort nicht aus, sondern ist für deren Entwicklung sogar notwendig. pSTAT3 bindet jedoch im Zuge der Th2-Induktion nicht nur an Th2-, sondern auch an Th17-regulierende Gene. Eine solche Beteiligung von Th17-Signalwegen an der Entwicklung von Th2-Zellen ist keine gänzlich neue Erkenntnis: Yang et al. beobachteten 2005 die Steigerung der IL-4-Produktion nach IL-6-stimulierter STAT3 Induktion mit Bindung an den cMaf-Promotor, einem wichtigen Induktor der Th2-Zellen (Yang et al., 2005). Stritesky et al. fanden im Umkehrschluss eine reduzierte cMaf-Induktion in STAT3-defizienten Th-Zellen, was mit einer Störung der Ausbildung von Th2-Eigenschaften einherging (Stritesky et al., 2011). Interessanterweise ist eine STAT3-induzierte cMaf-Expression auch an der Induktion von ROR- γ t in Th17-Zellen (Tanaka et al., 2014) und im Besonderen an der IL-10-Induktion in Th17-Zellen, einem wichtigen Kennzeichen anti-inflammatorischer Th17-Zellen, beteiligt (Xu et al., 2009; Zielinski et al., 2012). Bemerkenswert ist auch, dass Alberdi et al. trotz Induktion eines Th17-Phänotyps in CD4+ T-Zellen unter erhöhten NaCl-Konzentrationen eine Suppression von STAT3-beobachteten (Alberdi et al., 2017). Auch unter Umgehung von STAT3 scheint die Th17-Induktion durch NaCl über alternative Signalwege initiiert werden zu können. Wir beobachteten einen signifikanten Anstieg von pSTAT3 in NaCl-reichem Milieu, jene Unterschiede mögen jedoch durch alternierende STAT3-Expression zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit späterem STAT3-Anstieg, eventuell verstärkt durch autokrine Signalwege, zu erklären sein.

Die Signalwege zur Entwicklung von Th2 und Th17-Zellen überkreuzen sich an einigen Knotenpunkten und tragen zu beiden Phänotypen bei. Vieles spricht folglich dafür, dass gemeinsame Signalwege zur Induktion von

Th2- und Th17-Immunität auch durch eine NaCl-reiche Umgebung gebahnt werden und somit zur Induktion von sowohl Th2- als auch Th17-Eigenschaften beitragen.

5.4 Identifizierung NFAT5-abhängiger und unabhängiger NaCl-Signalwege

Wir konnten beobachten, dass eine Stimulation von Th-Gedächtniszellen in einem NaCl-reichen Mikromilieu in einer Begünstigung des Th2-Phänotyps mit Expressionssteigerung von IL-4 und GATA3 bei Senkung von IFN- γ und Tbet resultiert. Des Weiteren konnten wir die Induktion eines anti-inflammatorischen Th17-Phänotyps beobachten, welcher ebenfalls mit einer Senkung der IFN- γ -Expression einherging. Interessanterweise entdeckten Lang et al. unter ähnlichen Bedingungen, dass osmotisch-induzierte Änderungen des Zellvolumens in einer hypertonen Umgebung, verursacht durch NaCl oder Urea, zur Senkung der IFN- γ -Expression führen. Die von uns beobachtete IFN- γ -Senkung in Th17-Zellen sowie der Th2-Shift durch NaCl könnten möglicherweise ebenfalls durch Änderung des Zellvolumens induziert sein.

NFAT5 wurde bereits mehrfach als ein wichtiger Transmitter des NaCl-induzierten Th17-Phänotyps beschrieben (Kleinewietfeld et al., 2013; Wu et al., 2013). Bemerkenswerterweise konnte jedoch auch in NFAT5-defizienten PBMCs eine Induktion von Th17-Eigenschaften in NaCl-reichem Milieu gezeigt werden: Mit unseren Ergebnissen übereinstimmend, beobachteten auch Alberdi et al. die Begünstigung eines anti-inflammatorischen Th17-Phänotyps in murinen CD4⁺ PBMCs, sowie eine signifikante Steigerung der Expression von IL-2, ROR- γ t und FOXP3 unter erhöhten NaCl-Konzentrationen (Alberdi et al., 2017). NFAT5-defiziente Zellen waren zwar ebenfalls zur IL-17-Hochexpression in der Lage, dies ging jedoch mit einer gesteigerten IFN- γ -Produktion, einem wichtigen Kennzeichen pro-inflammatorischer Th17-Zellen (Noster et al., 2016; Zielinski et al., 2012), einher. Auch die zuvor beobachtete NaCl-abhängige Steigerung der FOXP3-Expression blieb in NFAT5-defizienten Zellen aus. Nicht nur *in vitro* sondern auch *in vivo* beobachteten Alberdi et al. die Entwicklung pro-inflammatorischer Th17-Eigenschaften durch Anstieg der NaCl-Konzentration in NFAT5-defizienten T-Zellen: So zeigten Tiere mit NFAT5-defizienten T-Zellen im Mausmodell der experimentellen Dextran-Natriumsulfat-induzierten Kolitis einen schwereren Krankheitsverlauf mit erhöhter IFN- γ -Expression im Kolon (Alberdi et al., 2017).

Die NaCl stimulierte NFAT5-Expression scheint folglich einen tendenziell anti-inflammatorischen Effekt auf den Th-Zellphänotyp zu haben, wie im Kolitis-Mausmodell und *in vitro* anhand der NaCl-abhängigen FOXP3-Expression in murinen NFAT5-kompetenten Th-Zellen beobachtet werden konnte (Alberdi et al., 2017). Dies ist im Einklang mit unseren Beobachtungen zur Entstehung eines anti-inflammatorischen Phänotyps in verschiedenen Th-Subtypen mit Anstieg von FOXP3 und TGF- β . Wir konnten zeigen, dass NaCl abhängig vom Zytokinmilieu die Entstehung pro- oder anti-inflammatorischer Th17-Zellen begünstigen kann. Als kritische Switch-Faktoren ließen sich TGF- β und IL-1 β herausstellen. Wie an NFAT5-defizienten Th-Zellen

beobachtet werden konnte, sind auch jene in der Lage, auf Steigerung der extrazellulären NaCl-Konzentration mit einem Anstieg pro-inflammatorischer Th17-typischer Eigenschaften zu reagieren. Wie die von Alberdi et al. beobachtete NFAT5-unabhängige Induktion pro-inflammatorischer Th17-Zellen vermittelt wird und ob der von uns beobachtete Zytokinkontext hier eine Rolle spielen könnte, ist noch nicht ausreichend erforscht.

Wir konnten eine Induktion und Festigung von Th17- und Th2-Eigenschaften in NaCl-reichem Milieu zeigen, welche durch eine NaCl-induzierte NFAT5-Expressionssteigerung vermittelt wurde. Trotzdem deutet einiges darauf hin, dass auch unabhängig von NFAT5 NaCl in der Lage ist, eine Stärkung von Th17-Eigenschaften zu induzieren. Die Expression von NFAT5 scheint jedoch eine wichtige Rolle in der Vermittlung anti-inflammatorischer NaCl-Effekte zu spielen (Alberdi et al., 2017). Ob jene NFAT5-unabhängigen Signalwege eventuell auch in NFAT5-kompetenten Zellen zur Induktion des pro-inflammatorischen Th17-Phänotyps beitragen und an der Bahnung des pro- versus anti-inflammatorischen NaCl-Effekts durch das Zytokinmilieu beteiligt sein könnten, ist bisher ungewiss und bedarf weiterer Klärung.

5.5 Die Rolle von TGF- β für die Vermittlung anti-inflammatorischer Eigenschaften durch NaCl

Wir konnten einen signifikanten Anstieg der TGF- β -Expression in Th17, Th1, Th2 und Tregs unter Einfluss hoher NaCl-Konzentrationen beobachten. TGF- β ist ein wichtiger anti-inflammatorischer Gewebefaktor, welcher durch Bindung an den TGF- β -Rezeptor den Zellzyklus inhibiert, die Proliferation von Immunzellen senkt und die Schicksalsentscheidung naiver T-Zellen in Richtung Th17- und Treg-Zellen lenkt (Chen et al., 2003; Ivanov et al., 2006; Kretzschmar und Massagué, 1998). Die Signalweiterleitung von TGF- β über den TGF- β -Rezeptor ins Innere der Immunzelle wird durch die SMAD-Proteine vermittelt. Sie leiten das extrazelluläre TGF- β -Signal in den Zellkern weiter, wo das Signal an Proteine des Zellzyklus und an Transkriptionsfaktoren fortgeleitet wird (Kretzschmar und Massagué, 1998). SMAD2/3 unterliegen jedoch, ähnlich dem oben erwähnten Th2-begünstigenden Transkriptionsfaktor JunB, ebenfalls der Kontrolle von NEDD4L (Gao et al., 2009). Durch Ubiquitylierung von SMAD2/3 und dessen Abbau wird der TGF- β -Signalweg inhibiert und die Signalweiterleitung in den Zellkern gebremst. Wie bereits oben erwähnt, ist SGK1 jedoch in der Lage, NEDD4L durch Phosphorylierung zu inhibieren (Heikamp et al., 2014). Hierdurch verhindert SGK1 die Bindung von NEDD4L an SMAD2/3 und sichert somit die TGF- β -Signalweiterleitung in den Zellkern. Neben der von uns gezeigten SGK1-abhängigen Expressionssteigerung von FOXP3 in NaCl-reichem Milieu mit Induktion anti-inflammatorischer Eigenschaften, bahnt SGK1 zudem die Weiterleitung des TGF- β -Signals in den Zellkern und unterstützt somit die Vermittlung anti-inflammatorischer Signale. Des Weiteren wird hierdurch verdeutlicht, dass sowohl die Th2-Bahnung sowie die Förderung anti-inflammatorischer Eigenschaften durch SGK1 reguliert werden und ähnliche Signalwege nutzen. Dies stimmt

überein mit unserer Beobachtung eines Anstieges Th2-typischer Eigenschaften parallel zur Induktion von TGF- β und FOXP3 in verschiedenen Th-Subtypen durch NaCl.

Interessanterweise ist TGF- β selbst ebenfalls in der Lage, die Expression von SGK1 zu erhöhen (Wu et al., 2013) und könnte hierdurch autokrin eine Signalverstärkung induzieren. Dies wird unterstützt durch die von uns beobachtete Dämpfung des FOXP3-Anstiegs unter hohen NaCl-Konzentration in Gegenwart eines anti-TGF- β -Antikörpers und deutet auf autokrine Stimulation der FOXP3-Expression durch eine NaCl-induzierte TGF- β -Expression hin.

Ein weiterer Effekt von TGF- β auf Th-Zellen ist die Senkung der Expression von Interleukin-2 (McKarns et al., 2004). Auch jener TGF- β -Effekt wird durch den SMAD2/3-Signalweg vermittelt (McKarns et al., 2004). Hiermit im Einklang beobachteten Loomis et al. eine TGF- β -induzierte Senkung der IL-2 Expression um 40% in humanen PBMCs (Loomis et al., 2001). Überraschenderweise zeigte sich jedoch der gegensätzliche Effekt mit einem drastischen Anstieg der IL-2 Expression, wenn die TGF- β -Stimulation in NaCl-reicher Umgebung erfolgte (Loomis et al., 2001). NaCl scheint folglich den IL-2-senkenden Effekt von TGF- β auf PBMCs zu verhindern und in Kombination mit TGF- β sogar als effizienter IL-2-Stimulus zu agieren. Tatsächlich konnten auch Kleinewietfeld et al. einen erheblichen IL-2-Anstieg humaner Th17-Zellen in Gegenwart hoher NaCl-Konzentrationen feststellen (Kleinewietfeld et al., 2013). Auch Alberdi et al. beobachteten einen IL-2-Anstieg unter NaCl-reichen Bedingungen in murinen CD4+ T-Zellen, welcher sich als NFAT5-abhängig herausstellte (Alberdi et al., 2017). Interessanterweise sind sowohl TGF- β als auch IL-2, deren beider Expression in NaCl-reicher Umgebung ansteigt, wichtige Induktoren anti-inflammatorischer iTregs und erwirken synergistisch eine signifikante Expansion CD4+ FOXP3+ Th-Zellen (Zheng et al., 2007). Jener Treg-induzierende Effekt scheint durch NaCl sogar verstärkt zu werden: Luo et al. beobachteten eine signifikante Expansion CD4+ FOXP3+ Zellen sowie eine Steigerung der Expression von CD25, wenn IL-2 und TGF- β in Gegenwart hoher NaCl-Konzentrationen angeboten wurden (Luo et al., 2019). Dies ist im Einklang mit dem von uns beobachteten Anstieg von TGF- β und FOXP3 in NaCl-reichem Mikromilieu. Unsere Beobachtungen zeigten, dass die Induktion jener anti-inflammatorischen Eigenschaften über den p38 MAPK-Signalweg vermittelt wurde. Auch Loomis et al. konnten den NaCl-abhängigen, TGF- β -stimulierten IL-2-Anstieg als Zeichen der Vermittlung durch p38 MAPK in Anwesenheit eines p38-Inhibitors nicht mehr nachweisen (Loomis et al., 2001). Des Weiteren konnten Luo et al. trotz des Erhalts der suppressiven Treg-Eigenschaften und der Steigerung von FOXP3 und TGF- β in NaCl-reichem Milieu einen Anstieg von typischen Th17-Eigenschaften beobachten, wenn die T-Zellen in Gegenwart eines TGF- β + IL-6+ NaCl-reichen Milieus stimuliert wurden. Die Induktion von Th17-Eigenschaften bei gleichzeitiger Induktion der anti-inflammatorischen Mediatoren FOXP3 und TGF-

β schließen sich folglich nicht gegenseitig aus und können nebeneinander in derselben Zellpopulation beobachtet werden.

Vieles deutet darauf hin, dass sowohl die Stimulation der TGF- β -Expression durch NaCl, als auch eine NaCl-abhängige Bahnung des TGF- β -Signalweges bedeutend zur Induktion anti-inflammatorischer Th-Zell-Eigenschaften in NaCl-reichem Milieu beitragen. Trotz einer Stärkung der Th17-Immunität kann NaCl anti-inflammatorische Eigenschaften vermitteln und nutzt hierfür potentiell ähnliche Signalwege, welche auch an der Induktion von Th2-Immunität beteiligt sind. Das umgebende Zytokinmilieu trägt zwar zur Vermittlung von Antiinflammation durch NaCl bei, NaCl ist zur gleichen Zeit jedoch auch in der Lage, das Zytokinmilieu zu beeinflussen und somit seine anti-inflammatorische Kapazität zu verstärken. Hierdurch kann NaCl im Zusammenspiel mit dem Zytokinmilieu durch Erhalt immunologischer Plastizität und Flexibilität eine funktionelle und phänotypische Anpassung des Immunsystems auf Änderung des Gewebemilieus ermöglichen.

5.6 Die Interaktion der Switch-Faktoren IL-1 β und TGF- β in NaCl-reichem Milieu

Wir konnten IL-1 β und TGF- β als Switch-Faktoren für den kontextabhängigen pro- oder anti-inflammatorischen NaCl-Effekt identifizieren. Die FOXP3-Expression humaner Th17-Zellen wurde in Anwesenheit eines pro-inflammatorischen Mikromilieus, bestehend aus IL-23+IL-6+IL-1 β , unterdrückt und konnte auch in Gegenwart hoher NaCl-Konzentrationen nicht induziert werden. Auch die Senkung von autokrin produziertem TGF- β durch neutralisierende anti-TGF- β -Antikörper führte zur signifikanten Reduktion des NaCl-Effekts auf die FOXP3-Expression. Die Integrität des TGF- β -Signalweges scheint folglich für die Induktion anti-inflammatorischer T-Zelleigenschaften in NaCl-reichem Mikromilieu eine besondere Rolle zu spielen.

Wie zuvor diskutiert, leitet TGF- β durch Aktivierung von SMAD2/3 sein Signal in den Zellkern fort und kann hierdurch eine Expressionssteigerung von FOXP3 vermitteln. Interessanterweise konnte auch SMAD7 als wichtiger Einflussfaktor auf den TGF- β -Signalweg identifiziert werden. Monteleone et al. konnten zeigen, dass SMAD7 in CD3⁺ T-Lymphozyten aus Darmgewebeproben von Patienten mit chronisch-entzündlicher Darmerkrankung einen stabilen Komplex mit dem aktivierten TGF- β 1-Rezeptor bildet und hierdurch die Signaltransduktion durch Ausbleiben der Phosphorylierung von SMAD2/3 hemmt (Monteleone et al., 2001). Durch Inhibition von SMAD7 konnte eine Wiederherstellung des TGF- β -Signalweges erreicht werden (Monteleone et al., 2001). Ergänzend hierzu stellten Garo et al. einen Anstieg der SMAD2/3-Phosphorylierung in CD4⁺ murinen T-Zellen mit fehlender SMAD7-Expression fest (Garo et al., 2019). Der T-Zelltransfer jener SMAD7-negativen CD4⁺ T-Zellen führte wiederum zu einer Zunahme FOXP3-exprimierender Zellen im murinen Lymph- und Milzgewebe (Garo et al., 2019). SMAD7 scheint folglich die TGF- β -Signalübertragung und somit die Induktion anti-inflammatorischer Faktoren wie FOXP3 durch Einschränkung der SMAD2/3-

Phosphorylierung zu beeinflussen. Jener TGF- β -Signalweg unterliegt jedoch auch dem Einfluss des pro-inflammatorischen Zytokins IL-1 β . Lim et al. konnten beobachten, dass IL-1 β den Tumornekrosefaktor-Rezeptor 6 aktiviert und durch Interaktion mit dem aktivierten TGF- β -Rezeptor den anti-inflammatorischen TGF- β -Signalweg unterbindet (Lim et al., 2012). In humanen Chondrozyten sowie murinen Fibroblasten konnten zudem eine IL-1 β -abhängige Induktion von SMAD7 beobachtet werden, welche über den NF- κ B-Signalweg stimuliert wurde und die Reaktionsfähigkeit der Chondrozyten auf TGF- β signifikant senkte (Baugé et al., 2008; Bitzer et al., 2000). Ob jene Signalwege tatsächlich auch für die IL-1 β -induzierte Unterdrückung des anti-inflammatorischen T-Zellcharakters in NaCl-reichem, TGF- β -reichem Zytokinmilieu verantwortlich sind bleibt Gegenstand weiterer Forschung.

Interessanterweise konnten Mailer et al. die Induktion eines alternativen Spleißproduktes von FOXP3 (FOXP3 Δ 2 Δ 7) identifizieren, welches durch IL-1 β induziert wird und, am ehesten durch Verdrängung suppressiver FOXP3-Isoformen am FOXP3-Lokus, anti-inflammatorische FOXP3-Signale hemmt (Mailer et al., 2015; Ziegler, 2006). Jene alternativ gespleißten Varianten des FOXP3-Transkripts entstehen zwar in humanen, nicht jedoch in murinen Th-Zellen (Ziegler, 2006), und könnten folglich zu Spezies-spezifischen Abweichungen bezüglich des Einflusses von Zytokinmilieus auf T-Zellen führen. Tatsächlich konnten wir leichte Unterschiede zwischen den Spezies im Ansprechen auf die Switch-Faktoren TGF- β und IL-1 β in NaCl-reichem Milieu beobachten: Sowohl im murinen als auch im humanen System stärkt ein Anstieg der NaCl-Konzentration in TGF- β -reichem Milieu anti-inflammatorische Eigenschaften, während NaCl in Anwesenheit von IL-1 β durch Hemmung der TGF- β -Signaltransduktion pro-inflammatorische Eigenschaften vermittelt. Murine T-Zellen sind jedoch im Gegensatz zu humanen T-Zellen auch im pro-inflammatorischen IL-1 β -Milieu noch eingeschränkt zur NaCl-abhängigen FOXP3-Expression in der Lage, während der inhibitorische Einfluss von IL-1 β in humane T-Zellen jegliche NaCl-induzierte FOXP3-Expression unterdrückt. Dies könnte darauf hinweisen, dass die TGF- β -Signaltransduktion humaner T-Zellen in IL-1 β -reichem Milieu stärker unterbunden wird als in murinen T-Zellen. Eine stärkere Hemmung des TGF- β -Signalweges humaner T-Zellen durch Faktoren wie der IL-1 β -abhängigen Induktion alternativer FOXP3-Spleißprodukte könnte jene speziesspezifischen Unterschiede im Zusammenspiel ionischer und zytokinischer Umweltfaktoren erklären. Weitere Untersuchungen sind für ein besseres Verständnis der Zytokin-bedingten Lenkung NaCl-induzierter Signalwege nötig.

5.7 Die Rolle von NaCl in der Pathogenese der atopischen Dermatitis

Die atopische Dermatitis (AD) ist eine entzündliche Hauterkrankung des atopischen Formenkreises, welche durch eine überschießende Th2 Immunantwort charakterisiert ist. Unsere Untersuchungen läsionaler Hautproben von Patienten mit atopischer Dermatitis (AD-Patienten) ergaben signifikant höhere Natriumwerte

im Vergleich zu nichtläsionalen Hautproben desselben Patienten. Vor dem Hintergrund der *in vitro* beobachteten Begünstigung und Stabilisierung von Th2-Eigenschaften in Gegenwart hoher NaCl-Konzentrationen ist jene Natriumspeicherung in der Haut von AD-Patienten besonders interessant und könnte auf eine Beteiligung von NaCl an der Pathogenese der AD hinweisen. Es konnte zwar beobachtet werden, dass Entzündungen in Haut- und Muskelgewebe zu einer vermehrten NaCl-Speicherung im Gewebe führen (Jantsch et al., 2015), Biopsien läsionaler Hautareale von Psoriasis-Patienten zeigten jedoch im Gegensatz zu AD-Patienten keine Natriumspeicherung in entzündeten Hautbereichen. Dies macht eine unspezifische, entzündungsbedingte Natriumakkumulation unwahrscheinlicher.

Wie bereits zuvor erwähnt, kann NaCl an GAGs der Haut gebunden osmotisch inaktiv gespeichert werden (Jantsch et al., 2015). Interessanterweise konnte man eine erhöhte GAG-Dichte und somit ein erhöhtes Potential zur NaCl-Speicherung in der Epidermis von AD-Patienten beobachten (Malaisse et al., 2014). Genexpressionsanalysen bestätigten eine signifikante Zunahme der Expression von Hyaluronan Synthase 2 (HAS2) in Keratinozyten eines Großteils der AD-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Park et al., 2006). HAS2 ist ein Membran-gebundenes Enzym, welches aus UDP- α -N-Acetyl-D-Glucosamin und UDP- α -D-Glucuronat GAGs herstellt und in den Extrazellularraum abgibt. Der von Malaisse et al. gemessene GAG-Anstieg in AD-Patienten könnte folglich durch jene Expressionsänderungen der HAS2 zu erklären sein. Auch Anreicherungen von Syndecan-4, einem Proteoglykan (PG), welches GAGs bindet und vor allem in Fibroblasten exprimiert wird, konnte in der Epidermis entzündeter Areale von AD-Patienten gemessen werden (Nakao et al., 2016). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass NFAT5 die Promotoraktivität der β 1,3-Glucuronosyltransferase-I (GlcAT-I), einem Schlüsselenzym der GAG-Synthese in der Bandscheibe, positiv beeinflusst (Hiyama et al., 2009). Ähnliche Ergebnisse, welche auf eine Steuerung der PG-Expression durch NFAT5 hinweisen, konnten in Leiomyon-Zellen erzielt werden: Britten et al. beobachteten eine Abnahme der NFAT5-Expression durch Ulipristal in der Leiomyom-Zellkultur, welche mit einer Abnahme der PG-Expression korrelierte (Britten et al., 2019).

Mehrere Hinweise deuten auf eine Anreicherung von PGs und GAGs in läsionaler Haut von AD-Patienten hin. Auch *vice versa* konnte überdies eine Abnahme der Syndecan-4-Dichte in ehemals läsionaler Haut nach topischer Behandlung mit Kortikosteroiden oder Klazineurinhibitoren beobachtet werden (Nakao et al., 2016). Särnstrand et al. entdeckten zudem eine Abnahme von GAGs im Zellkulturmedium und an der Zelloberfläche von Keratinozyten-Zellkulturen unter Einfluss von Glukokortikoiden (Särnstrand et al., 1982). Ob jene Abnahme der GAG-Dichte und somit des NaCl-Speicherpotentials zur anti-inflammatorischen Wirkung der Kortikosteroide durch Änderung der NaCl-Verhältnisse im entzündeten Hautgewebe beitragen könnte, ist jedoch bisher ungewiss und bedarf weiterer Klärung.

Unsere Ergebnisse zeigen erhöhte Natriumwerte in läsionalen Hautarealen von AD-Patienten. Einen kausalen Zusammenhang zwischen den NFAT5- und SGK1-vermittelten Th2-stärkenden Eigenschaften durch NaCl und der Natriumelevation in den entzündlichen Hautproben von AD-Patienten stellen unsere Erkenntnisse zwar nicht her – frühere Beobachtungen zur Regulierung der PG- und GAG-Dichte in AD-Patienten, unter anderem durch den NaCl-sensitiven Transkriptionsfaktor NFAT5, sowie eine Abnahme der GAG-Dichte nach topischer AD-Behandlung könnten jedoch auf eine Rolle von NaCl in der Pathogenese der AD hinweisen.

Spannend ist auch die Korrelation endokrinologischer Einflussfaktoren des NaCl-Stoffwechsels mit der Krankheitsausprägung der AD: Van de Kerkhof et al. beobachteten zum Beispiel einen Anstieg des Plasma-Aldosterons in AD- und Psoriasis-Patienten (van de Kerkhof, 1982). Aldosteron ist ein Mineralkortikoid der Nebennierenrinde, welches die Natriumrückresorption steigert und hierdurch den Gesamt-NaCl-Bestand des Körpers beeinflusst (Faulkner et al., 2018). Auch die Haut weist erhöhte Natriumwerte bei Anstieg von Aldosteron auf, wie in Patienten mit primärem Hyperaldosteronismus beobachtet werden konnte (Christa et al., 2019). Ob ein Aldosteron-induzierter NaCl-Anstieg in der Haut, hervorgerufen durch erhöhte Aldosteronwerte in AD-Patienten, tatsächlich von klinischer Relevanz sein könnte, ist noch nicht ausreichend geklärt.

Auch die Expression verschiedener Natriumkanäle scheint auf den Krankheitsverlauf der AD Einfluss zu nehmen: Wie bereits erwähnt, konnten Zhao et al. durch Inhibition des Natriumkanals Na(x) eine Reduzierung der AD-Krankheitsaktivität im Tiermodell feststellen. Dies ging mit einer signifikanten Minderung der IL-4-Expression in der Dermis einher (Zhao et al., 2020). Auch Tanaka et al. beobachteten eine Reduktion Th2-typischer Merkmale nach pharmakologischer Natriumkanalblockade in T-Zellen. So konnten sie durch Blockade spannungssensitiver Natriumkanäle mit Hilfe von Lidocain eine Senkung der IL-4- und IL-5-Expression in Allergen-stimulierten PBMCs von Patienten mit allergischem Asthma nachweisen (Tanaka et al., 2002). Ein weiterer Natriumkanal, dessen Blockade in einer Besserung entzündlicher Hautbefunde resultiert, ist der epitheliale Natriumkanal ENaC, welcher auf Keratinozyten der Haut exprimiert wird. Xu et al. konnten zeigen, dass eine Störung der Hautbarriere die Natriumleitfähigkeit des ENaC auf Keratinozyten der Haut erhöht (Xu et al., 2015). Jener Natriumeinstrom resultiert COX2-abhängig in einem Anstieg der Prostaglandin E₂- (PGE₂-) Produktion und induziert hierdurch ein pro-inflammatorisches Hautmilieu. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass PGE₂ die Expression des OX40 Liganden (OX40L) auf dendritischen Zellen erhöht und hierdurch die Induktion von Th2-Zellen durch dendritische Zellen begünstigt (Kaiser et al., 2018). Jener Mechanismus spiegelt zwar keine direkte Interaktion von NaCl mit der Th-Zelle wider, zeigt jedoch, dass NaCl potentiell auch indirekt über Förderung eines Th2-permissiven Mikromilieus die Entstehung von Th2-Immunität begünstigen kann.

Wir konnten nicht nur die Förderung des Th2-Phänotyps, sondern auch eine Stärkung Th17-typischer Eigenschaften unter erhöhten NaCl-Konzentrationen feststellen. Zudem zeigte sich ein Anstieg von IL-4+ IL-

IL-17⁺ doppelpositiven Th-Zellen nach Stimulation von Th-Gedächtniszellen in NaCl-reichem Zellkulturmedium. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass auch IL-17, das Signaturzytokin der Th17-Zellen, an der Pathogenese allergischer, Th2-getriggelter Erkrankungen beteiligt ist. Cosmi et al. entdeckten 2010 einen IL-4⁺ IL-17⁺ koexprimierenden Th-Subtyp, welcher sowohl Th2- als auch Th17-Eigenschaften in derselben Zelle vereint und vermehrt im Blut von Patienten mit chronischem Asthma gefunden werden kann (Cosmi et al., 2010). Das Auftreten jener Th2-Zellen mit Th17-Eigenschaften geht mit vermehrter Infiltration eosinophiler und neutrophiler Granulozyten im peribronchialen Gewebe einher (Raymond et al., 2011). Auch an der Pathogenese der AD scheinen Immunzellen mit Th17-Eigenschaften beteiligt zu sein. Suárez-Fariñas et al. fanden eine erhöhte Expression des Th17-typischen CC-Chemokin Liganden 20 (CCL20) und des Th17-Signaturzytokins IL-17 in läSIONALEM Hautgewebe von Patienten mit intrinsischer AD, verglichen mit nicht-läsionalen Hautproben desselben Patienten (Suárez-Fariñas et al., 2013). Zudem zeigte sich eine positive Korrelation von CCL20 mit dem SCORAD-Score, einem dermatologischen Bewertungsinstrument zur klinischen Beurteilung der AD-Krankheitsaktivität. Koga et al. beobachteten eine Infiltration IL-17-exprimierender Zellen vor allem in akuten Läsionen mit starker Ausprägung der AD (Koga et al., 2008). Chronische Läsionen zeigten hingegen eine geringere Dichte an IL-17⁺ Th-Zellen. Die hohen IL-17-Konzentrationen in den läSIONALEN Arealen unterhalten die entzündliche Hauterkrankung durch Zerstörung von Adhäsionsmolekülen der Keratinozyten (Koga et al., 2008). Dies hat eine Beeinträchtigung der Hautbarrierefunktion zur Folge, einem typischen klinischen Merkmal der AD (Gutowska-Owsiak et al., 2012).

Es häufen sich die Beobachtungen, dass nicht nur Th2- sondern auch Th17-Eigenschaften an der Pathogenese der AD beteiligt sind. Interessanterweise ist auch die Dichte an FOXP3⁺ Th-Zellen in läSIONALER Haut von AD-Patienten erhöht und korreliert mit einer stärkeren Krankheitsausprägung (Caproni et al., 2007). Die von uns beobachtete Stärkung von Th17- und Th2-Eigenschaften in Kombination mit einem Anstieg der FOXP3-Expression durch Th-Zellen in NaCl-reichem Mikromilieu könnte somit zur Stärke der Krankheitsausprägung in NaCl-reichen läSIONALEN Hautarealen von AD-Patienten beitragen.

Typische Charakteristika der AD sind neben der bereits erwähnten Barrierestörung der Haut und der überschießenden Th2-Immunantwort auch die überdurchschnittliche Besiedlung der Haut mit dem Bakterienstamm *S. aureus*. Der Grund für jene *S. aureus* dominierte Dysbiose im Rahmen der AD ist noch immer nicht vollständig verstanden. Während nur 5 bis 25 % der gesunden, nicht an AD erkrankten Bevölkerung mit *S. aureus* besiedelt ist, kann *S. aureus* bei bis zu 90% erwachsener AD-Patienten in akuten HautläSIONEN sowie bei 50% der chronischen Hautveränderungen nachgewiesen werden (Higaki et al., 1999; Park et al., 2013; Williams et al., 1990). Vor allem in läSIONALEN Hautarealen steigt die *S. aureus* Dichte an und korreliert mit der Krankheitsaktivität der AD (Alsterholm et al., 2017). Zudem konnte eine positive Korrelation zwischen dem Anstieg der IL-4-Expression in läSIONALEM Gewebe und einem *S. aureus* Befall in Hautproben

von AD-Patienten gezeigt werden (Nakatsuji et al., 2016). Eine gestörte Hautbarriere aufgrund einer epidermalen Ceramiddefizienz oder Mutationen im Filaggrin-Gen als Ursache der Begünstigung von *S. aureus* auf der Haut von AD-Patienten werden diskutiert (Arikawa et al., 2002; Feuillie et al., 2018), die genauen Hintergründe der *S. aureus*-Dominanz auf AD-Läsionen sind bisher jedoch nicht ausreichend geklärt. Interessanterweise ist *S. aureus* ausgesprochen NaCl-resistent (Parfentjev und Catelli, 1964). Dies bietet *S. aureus* einen Überlebensvorteil in Gebieten mit hohen NaCl-Konzentrationen, welche andere Bakterienspezies bereits in ihrem Wachstum inhibieren. Jene Eigenschaft wird auch in der mikrobiologischen Diagnostik zum Nachweis von *S. aureus* verwendet, indem man sich sein selektives Wachstum in 7,5% Mannit-Kochsalz-Agar zunutze macht (Missiakas und Schneewind, 2013). Sogar NaCl-Konzentrationen von 15% bis zu 20% sind für *S. aureus*-Stämme noch tolerabel (Missiakas und Schneewind, 2013). Die Natriumkonzentrationen, welche wir in läSIONalen Hautproben von AD-Patienten nachweisen konnten, entsprechen derselben Konzentration, wie sie in 11,2 prozentigem Mannit-Kochsalz-Agar gefunden werden kann und befindet sich somit in jenem Bereich des selektiven Wachstums. Die von uns entdeckte Speicherung hoher Natriumkonzentrationen in läSIONalen AD-Hautbereichen könnte somit ein potentieller Auslöser für die *S. aureus* betonte Dysbiose sein, welche typischerweise auf der Haut von AD-Patienten beobachtet werden kann. In Zusammenschau mit seinem *in vitro* bestätigten Th2-immunmodulatorischen Potential sollte NaCl als eine potentielle Triebfeder in der Pathogenese der AD diskutiert werden.

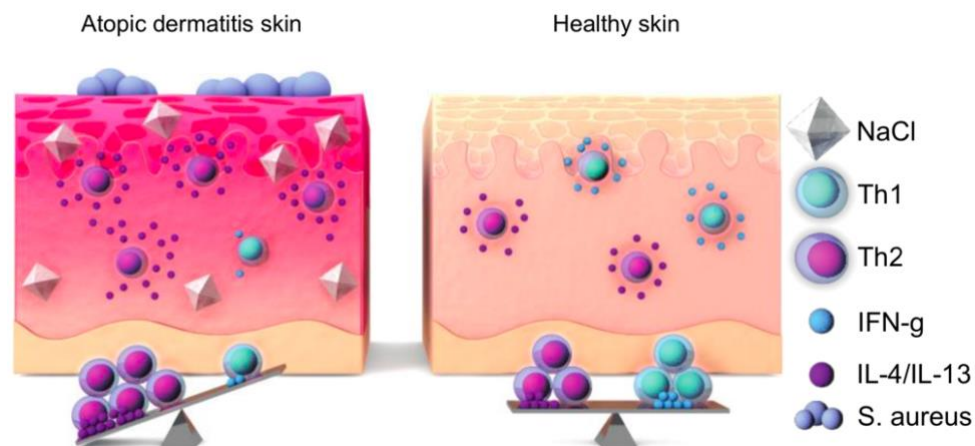


Abbildung 7: NaCl im atopischen Hautmilieu

Die AD zeichnet sich durch eine gestörte Hautbarriere, überschießende Th2-Immunantwort sowie eine *S. aureus*-betonte Dysbiose aus. Wir konnten zeigen, dass läSIONale Hautareale von AD-Patienten Natrium in 30-fach höherer Konzentration anreichern als nicht-läSIONale oder gesunde Hautbereiche. Einen kausalen Zusammenhang zur Th2- betonten Immunlage sowie der Neigung zur *S. aureus*-Besiedlung konnten wir zwar nicht herstellen, NaCl sollte jedoch als weiterer potentieller Einflussfaktor auf die Pathogenese der AD diskutiert werden.

Quelle: Verwendet aus (Matthias et al., 2019), Fig S16: *Model*

Einiges deutet darauf hin, dass eine Störung des NaCl-Stoffwechsel, ob verursacht durch hormonelle Einflüsse, Medikamenten-induziert oder bedingt durch strukturelle Gewebeanpassungen, auf die Pathogenese allergischer, Th2-gesteuerter Erkrankungen Einfluss nimmt. Auch weitere Eigenschaften des von uns beobachteten NaCl-induzierten Phänotyps, wie die Stärkung von Th17-Immunität und die Induktion von FOXP3, zeigen Parallelen zu immunologischen und histologischen Beobachtungen der AD. Die veränderte NaCl-Speicherkapazität der atopischen Haut sollte somit neben den bereits etablierten Determinanten Hautbarrierestörung, Dysbiose und überschießender Th2-Immunität als ein weiterer Einflussfaktor auf die Pathogenese der AD diskutiert werden (**Abb 7**).

5.8 Die Rolle von NaCl in der Pathogenese der Multiplen Sklerose

Die Multiple Sklerose ist eine autoimmune neurodegenerative entzündliche Erkrankung, welche zum Verlust neuronaler Myelinscheiden im zentralen Nervensystem (ZNS) führt und hierdurch axonale und neuronale Schäden mit gliösen Vernarbungen induziert (Compston und Coles, 2008). Jene Entzündungsreaktionen können schubförmig oder progredient verlaufen und werden zum großen Teil durch autoreaktive T-Zellen vermittelt (Compston und Coles, 2008). Eine große Rolle in der Pathogenese der MS spielt eine überschießende pro-inflammatorische Th17-Immunantwort (Komiyama et al., 2006).

Wir konnten zeigen, dass NaCl abhängig vom Zytokinmilieu den Phänotyp von Th17-Zellen mit pro- oder anti-inflammatorischem Effekt beeinflusst. Während NaCl in Gegenwart eines anti-inflammatorischen Zytokinprofils zur Begünstigung anti-inflammatorischer Th17-Eigenschaften durch Induktion von TGF- β und FOXP3 beiträgt, induziert NaCl in Gegenwart pro-inflammatorischer Zytokine pro-inflammatorische IL-17-IFN- γ -koexprimierende Th17-Zellen. Als Switch-Faktoren für jene gegensätzlichen NaCl-induzierten Phänotypen ließen sich TGF- β und IL-1 β identifizieren. Der adoptive T-Zelltransfer NaCl-induzierter Th17-Zellen führte zur Abschwächung des Krankheitsverlaufes der EAE, wenn die Th17-Polarisation in Gegenwart von TGF- β erfolgte. In Abwesenheit von TGF- β und in einem pro-inflammatorischen Zytokinmilieu zeigte NaCl jedoch den gegensätzlichen Effekt und führte sogar zur Aggravation des Krankheitsverlaufes der EAE.

Nicht nur in läsionaler Haut von AD-Patienten, sondern auch in Gewebsläsionen des ZNS von MS-Patienten konnten erhöhte NaCl-Konzentrationen festgestellt werden (Paling et al., 2013). Die genauen Vorgänge der intrazerebralen NaCl-Anreicherung sind noch nicht vollständig verstanden. Verschiedene Ursachen für den intrazellulären Natriumanstieg im ZNS, wie eine mitochondriale Dysfunktion der Neurone sowie Umverteilung von Natriumkanälen in den demyelinisierten Bereichen werden diskutiert (Alrashdi et al., 2019; Witte et al., 2013). Eine hierdurch begünstigte intraneuronale Natriumakkumulation könnte dann durch Verschiebung des Gleichgewichts intra- und extrazellulären Natriums eine Flussumkehr über den Natrium-Kalzium-Austauscher bewirken und somit durch zelltoxischen Kalziueinstrom neurodegenerative Prozesse verstärken (Stys et al.,

1992). Vor allem akute MS-Läsionen zeigen im Natrium-MRT einen Natriumanstieg im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden, welcher mit dem Grad der Behinderung und der Schubfrequenz des MS-Patienten korreliert (Paling et al., 2013). Vieles spricht folglich dafür, dass eine Verschiebung des Natrium-Gleichgewichts im ZNS zu den pathophysiologischen Vorgängen der MS beiträgt.

Interessanterweise konnten Back et al. einen Anstieg freier GAGs im läsionalen Hirngewebe von MS-Patienten finden (Back et al., 2005). Jene fanden sich sowohl in frühen als auch in späten Läsionen und wurden von T-Zellen, Mikroglia und Astrozyten synthetisiert. Auch die Dichte an Chondroitinsulfat-PGs nimmt in läsionalem Gewebe der EAE zu (Stephenson et al., 2018). Ähnlich den GAGs in der Haut könnten auch freie oder an PGs gebundene GAGs im Hirngewebe durch ihre negative Ladung die Kationen des NaCl anziehen und zu einer osmotisch inaktiven NaCl-Akkumulation in den MS-Läsionen führen. Spannend ist auch die Beobachtung von Warford et al., nach welcher die Gabe von Aminochinurid, einem positiv geladenen Harnstoffderivat, zu einer Abschwächung des Krankheitsverlaufes der EAE im Tiermodell führt (Warford et al., 2018). Aminochinurid ist höchstwahrscheinlich dank seiner positiv geladener Quinolinringe in der Lage, negativ geladene Sulfat- und Carboxylgruppen der GAG-Seitenketten von PGs im Hirngewebe zu besetzen und könnte hierdurch potentiell die NaCl-Speicherkapazität der GAGs senken (Schuksz et al., 2008). Ob die im läsionalen Gewebe der MS detektierten GAGs tatsächlich eine Akkumulation osmotisch inaktiven NaCl induzieren und die Abnahme der EAE-Krankheitsaktivität durch Aminochinurid durch einem Shift der NaCl-Speicherkapazität im Gewebe induziert wird, ist jedoch noch nicht ausreichend geklärt und bedarf weiterer Forschung.

Wie bereits oben diskutiert, konnte ein Anstieg von Aldosteron im Blut von AD-Patienten festgestellt werden (van de Kerkhof, 1982). Da ein Hyperaldosteronismus nachweislich zu einem Anstieg der NaCl-Speicherkapazität im Gewebe führt (Christa et al., 2019), könnte jener Aldosteronanstieg in AD-Patienten durch NaCl-Retention zur Pathogenese der AD beitragen. Interessanterweise scheint das Auftreten eines Hyperaldosteronismus auch mit der Entstehung pathologischer Th17-Zellen in der MS assoziiert zu sein: Herrada et al. beobachteten eine Verschlechterung der Krankheitsaktivität der EAE in Mäusen mit hoher Expression eines Aldosteron-ähnlichen Mineralkortikoid-Analogons (Herrada et al., 2010). Dies war begleitet von einer Zunahme der ZNS-Infiltration IL-17-exprimierender Th-Zellen und ließ sich durch den Aldosteronrezeptorantagonisten Spironolacton unterdrücken. Aldosteron scheint folglich die Entstehung von Th17-Zellen zu begünstigen und hierdurch den Krankheitsverlauf der EAE negativ zu beeinflussen. Ob an jenen Mechanismen auch die Aldosteron-induzierte NaCl-Retention im peripheren Gewebe beteiligt ist (Christa et al., 2019), ist jedoch nicht überprüft worden und bedarf einer weiteren Abklärung.

Wir konnten einen Anstieg sowohl der Th17-Immunität als auch von Th2-Eigenschaften in NaCl-reichem Mikromilieu feststellen. Eine eingehende Literaturrecherche brachte zum Vorschein, dass ein Anstieg der IL-

IL-17-Expression mit einem stärkeren MS-Krankheitsverlauf assoziiert zu sein scheint und vor allem in akuten Entzündungsstadien zu finden ist. Doch was für eine Rolle spielt IL-4 für die Multiple Sklerose?

Söderström et al. verfolgten in verschiedenen Stadien der Erkrankung die Expression von IL-4, TGF- β und IFN- γ in MS-Patienten mit dem Haplotyp Dw2, einem Kandidatengen, dessen Expression mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer MS vergesellschaftet ist (Söderström et al., 1995). Interessanterweise fand die Arbeitsgruppe eine signifikant höhere Expression von IL-4 und TGF- β in PBMCs von MS-Patienten mit geringerer körperlicher Behinderung sowie einem kürzeren Krankheitsverlauf. Auch Patienten mit einer benigneren schubförmig-remittierenden Verlaufsform zeigten eine höhere IL-4-Expression im Vergleich zu Patienten mit chronisch progressiver MS, welche mit einem schlechteren Outcome einhergeht (Söderström et al., 1995). Hiermit im Einklang zeigten Studien an GATA3-transgenen Mäusen, welche GATA3 und IL-4 erhöht exprimieren, einen verzögerten Krankheitsbeginn sowie eine Abschwächung des Krankheitsverlaufes der EAE mit stärkerer Rückbildung der neurologischen Defizite im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (Fernando et al., 2014). Mäuse mit IL-4-Defizienz zeigten im Umkehrschluss einen aggravierten Krankheitsverlauf mit erhöhter EAE-Inzidenz und stärkerer Expression der pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 β und IL-6 im ZNS (Falcone et al., 1998). Interessanterweise konnte auch unter einigen erprobten Medikamenten zur verlaufsmodifizierenden Therapie der MS eine Beeinflussung der Th2-Immunantwort gezeigt werden: CD4+ T-Zellen von MS-Patienten unter Mitoxantron-Therapie, einem Immunmodulator erster Wahl zur Behandlung der sekundär progredienten MS (DGN/KKNMS, 2014a), zeigten eine erhöhte Sekretion der Th2-Zytokine IL-4 und IL-5 bei unveränderter Expression von IL-17 und IFN- γ und unveränderter Zellproliferation (Vogelgesang et al., 2010). Auch Patienten unter Behandlung mit Glatirameracetat, einem Immunmodulator zur Behandlung des klinisch isolierten Syndroms und des schubförmig-remittierenden Verlaufs (DGN/KKNMS, 2014b), zeigen eine erhöhte Frequenz an Th2-Zellen, bedingt durch verstärkte Th2-Induktion Glatirameracetat-behandelter dendritischer Zellen (Vieira et al., 2003). Bemerkenswert ist auch der Einfluss des Lebensmittelzusatzstoffes Natriumbenzoat auf Th2 Eigenschaften in humanen PBMCs: Rezaei et al. beobachteten einen signifikanten Anstieg der Frequenz IL-4-exprimierender CD4+ T-Zellen in Patienten mit schubförmig-remittierender MS sowie gesunden Kontrollen (Rezaei et al., 2016). Ob der vermehrte Konsum des Lebensmittelzusatzstoffes tatsächlich auch den Krankheitsverlauf der MS beeinflussen kann, bedarf jedoch weiterer Forschung.

Wie anhand bereits erprobter Immunmodulatoren zur verlaufsmodifizierenden Therapie der MS, an Studien zur Zytokinexpression in unterschiedlichen MS-Stadien, sowie IL-4-überexprimierenden Mäusen im Tiermodell beobachtet werden konnte, scheint eine Stärkung der Th2-Immunität und eine erhöhte TGF- β -Expression protektive Effekte auf den Verlauf der MS zu nehmen. Ob jene von uns beobachteten Th2-

immunmodulatorischen Effekte durch NaCl eine therapeutische Relevanz haben und zur Begünstigung des Krankheitsverlaufes in der MS-Immuntherapie in der Lage sein könnten, gilt es noch herauszufinden.

TGF- β und IL-1 β zeigten als Switch-Faktoren einen bedeutenden Einfluss auf die Schicksalsentscheidung des pro- und anti-inflammatorischen Th17-Phänotyps: Während NaCl in TGF- β -reichem Zytokinmilieu einen anti-inflammatorischen Phänotyp begünstigte, induzierte NaCl in IL-1 β -reicher Umgebung pro-inflammatorische Th17-Zellen und bewirkte einen erschwerten Krankheitsverlauf der EAE im Mausmodell. Eine eingehende Literaturrecherche erhärtet den Verdacht einer Verschlechterung der neuroinflammatorischen Krankheitsprozesse durch IL-1 β : Canella et al. beobachteten eine Anreicherung von IL-1 β in akuten MS-Läsionen humanen Nervengewebes (Cannella und Raine, 1995). Auch gut etablierte Immunmodulatoren zur verlaufsmodulierenden Therapie der MS greifen an einer Hemmung des IL-1 β -Signalweges an. So konnte gezeigt werden, dass Glatirameracetat eine Abnahme der IL-1 β -Expression in Monozyten nach Stimulation mit Zellfragmenten aktivierter humaner T-Zellen bewirkt (Burger et al., 2009). Des Weiteren konnte eine verstärkte Sekretion des physiologischen IL1-Rezeptor-Blockers sIL1-Ra in Glatirameracetat-behandelten Monozyten und im Serum Glatirameracetat-behandelter MS-Patienten detektiert werden (Burger et al., 2009). Hiermit im Einklang beobachteten Furlan et al. einen verzögerten Krankheitsbeginn, eine Krankheitsabschwächung und Reduktion inflammatorischer ZNS-Infiltrate im EAE-Mausmodell nach intrazisternaler Applikation eines IL1-Ra produzierenden HSV-1-Vektors (Herpes Simplex Virus 1) (Furlan et al., 2007).

Läsionale ZNS-Bereiche im Rahmen der MS sind gezeichnet von einer Dysbalance des Zytokin- und NaCl-Milieus. Darüber hinaus sind jene MS-Läsionen von einer starken Infiltration IL-17+ IFN- γ + positiver pathogener Th17-Zellen geprägt. Die in das ZNS einwandernden Th17-Zellen treffen folglich auf hohe Konzentrationen an Natrium und IL-1 β – einem Mikromilieu mit der Fähigkeit zur potenten Induktion pro-inflammatorischer Th17-Eigenschaften. Wir konnten zeigen, dass IL-1 β als maßgeblicher Switch-Faktor die Pathogenität des NaCl-reichen Milieus determiniert und durch Blockierung des TGF- β -Signalweges die anti-inflammatorischen Eigenschaften von NaCl unterbindet. Eine Reduktion der IL-1 β -Konzentration in NaCl-reichen ZNS-Bereichen könnte folglich durch die Enthemmung des Switch-Faktors TGF- β die anti-inflammatorischen NaCl-Signalwege zum Vorschein bringen und neuroinflammatorische Vorgänge im Rahmen der MS positiv beeinflussen. Dank jener funktionellen Dichotomie von NaCl könnte eine Beeinflussung des Zytokinmilieus mittels moderner Antikörpertherapien in die immunologischen neurodegenerativen Vorgänge eingreifen und ein anti-inflammatorisches Gewebemilieu induzieren. Die pathologische NaCl-Akkumulation im ZNS könnte somit zur Etablierung eines apathogenen, anti-inflammatorischen Gewebemilieus therapeutisch ausgenutzt werden und potentiell eine Abschwächung des Krankheitsverlaufes der MS begünstigen. Eine günstige Wirkung der Blockade des IL-1 β -Signalweges auf den

Verlauf der EAE im Mausmodell konnte bereits vielfach gezeigt werden. Drei Pharmaka zur Hemmung des IL-1 β -Signalweges durch IL1-Ra- oder IL-1 β -Blockade sind bereits in Deutschland verfügbar (Dinarello et al., 2012), bisher jedoch nicht zur Behandlung der MS zugelassen (DGN/KKNMS, 2014c). Klinische Studien zur Verwendung des humanen rekombinanten IL1-Rezeptor Antagonisten Anakinra in der Behandlung von MS-Patienten (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04025554) dürften in nächster Zeit zu einem besseren Verständnis der Implikation einer therapeutischen IL-1 β -Blockade als Behandlungsstrategie der MS beitragen. Inwiefern die NaCl-Akkumulation in Kombination mit einer therapeutisch induzierten Verschiebung des Zytokinmilieus tatsächlich in der Behandlung der MS ausgenutzt werden kann, bedarf unbedingt weiterer Klärung und könnte hierdurch neue therapeutische Möglichkeiten in der Behandlung der MS eröffnen.

5.9 Welche Rolle spielt nun die Ernährung? – Zurück zur Epidemiologie

In der Einleitung haben wir die Korrelation zwischen den veränderten Ernährungsbedingungen und dem drastischen Anstieg immundysregulierter Erkrankungen bereits kurz umrissen. Vieles spricht dafür, dass ein Anstieg im Salzkonsum mit einer erhöhten pathologischen Immunantwort im Rahmen autoimmuner und allergischer Erkrankungen in Zusammenhang steht: so konnte von mehreren Arbeitsgruppen eine gesteigerte pro-inflammatorische Th17-Immunantwort in NaCl-reich ernährten Mäusen mit Aggravation des EAE-Krankheitsverlaufes beobachtet werden (Kleinewietfeld et al., 2013; Wu et al., 2013). Auch die Induktion pathogener Th17-Zellen im Tiermodell der Kollagen-induzierten Arthritis nach NaCl-reicher Diät (Jung et al., 2019), sowie die Einschränkung der suppressiven Kapazität von Tregs im Mausmodell der T-Zell-induzierten experimentellen Kolitis (Hernandez et al., 2015), lassen auf einen Zusammenhang unserer veränderten Ernährungsgewohnheiten mit Induktion einer pathologischen Th17-Immunantwort und eingeschränkter Treg-Aktivität schließen. Ein Zusammenhang zwischen der Krankheitsaktivität der AD im Kindesalter und der Salzzufuhr wurde diskutiert (Finkelstein, 1935). Diese Beobachtungen verlocken zur Annahme, hohe diätetisch zugeführte NaCl-Mengen finden sich im peripheren Gewebe wieder und induzieren dort eine pathologische Immunantwort. Auf dem Weg in den Körper muss NaCl jedoch zunächst den Darm passieren, wo es spannenderweise über Beeinflussung des Darmmikrobioms indirekt Einfluss auf das Immunsystem nehmen kann.

Interessanterweise konnte die Ernährung und hiermit auch die Menge an Salz, die wir täglich zu uns nehmen, als ein wichtiger Einflussfaktor auf die Zusammensetzung unseres Mikrobioms aufgefunden werden. So konnte eine Reduzierung verschiedener salzsensitiver Bakterienspezies, wie Klostridien und Laktobazillen, und ein Anstieg von *Parasutterella* und *Akkermansia* unter NaCl-reicher Diät im Mausmodell beobachtet werden (Wilck et al., 2017). Auch Butyrat, eine kurzkettige Fettsäure, welche durch bakterielle Fermentation unverdaulicher Kohlenhydrate entsteht, wird durch salzreiche Ernährung reduziert.

Das Darmmikrobiom selbst hat erheblichen Einfluss auf die Konstitution unseres Immunsystems und hierdurch auf die individuelle Empfänglichkeit für autoimmune und allergische Erkrankungen. Es konnte gezeigt werden, dass Klostridien zu Erhalt und Dichtigkeit der Darmbarriere beitragen und hierdurch das Risiko der Entwicklung von Allergien reduzieren (Stefka et al., 2014). Überdies ist eine höhere Klostridien-Frequenz mit einer geringeren Rate an Eosinophilen im Blut und einem späteren Krankheitsbeginn der AD assoziiert (Lee et al., 2016). Auch in MS-Patienten konnte eine Reduzierung der Klostridien-Dichte im Darm nachgewiesen werden (Miyake et al., 2015). Zudem spielen Klostridien eine bedeutende Rolle für die Entstehung von Tregs im Darm und haben somit eine wichtige Funktion zum Erhalt der Immunhomöostase (Atarashi et al., 2011). Ohnmacht et al. beobachteten sogar, dass Klostridien-Spezies im Darm die Entstehung ROR- γ t-FOXP3-koexprimierender Th-Zellen induzieren, welche bedeutend zum Erhalt des Immungleichgewichts zwischen Th-Zellen mit regulatorischen und Th2-immunologischen Eigenschaften beitragen (Ohnmacht et al., 2015). Eine geringere Klostridien-Dichte könnte somit auch über Störung des Gleichgewichts immunstimulatorischer und -hemmender Faktoren die Entstehung immundysregulierter Erkrankungen begünstigen. Eine weitere Auffälligkeit des Darmmikrobioms salzreich ernährter Mäuse ist die Abnahme der kurzkettigen Fettsäure Butyrat (Miranda et al., 2018), an deren Produktion unter anderem auch Klostridien beteiligt sind. Chen et al. konnten beobachten, dass eine hohe Dichte an Butyrat im Darm die Entstehung von Th17-Zellen hemmt und an der Induktion suppressiver Tregs beteiligt ist (Chen et al., 2019). Eine Reduktion von Butyrat unter salzreicher Ernährung könnte hierdurch die Entstehung Th17-getriggelter Erkrankungen, wie der MS, begünstigen und durch verminderte Induktion von Tregs die Entwicklung autoimmuner Prozesse erleichtern. Auch in Bezug auf den Krankheitsverlauf der AD zeigt Butyrat protektive Effekte: Kim et al. konnten zeigen, dass die Gabe Butyrat- und Laktobazillen-reicher Probiotika zu einer Besserung des Hautbefundes im Tiermodell der AD mit verminderter Anzahl an Th2-Zellen und Anstieg der Tregs im Milzgewebe der Tiere führt (Kim et al., 2018).

Auch Laktobazillen gehören zu den Bakterienspezies, welche durch eine salzreiche Ernährung reduziert werden (Miranda et al., 2018): Wilck et al. beobachteten die Abnahme der Dichte von *Lactobacillus paracasei* im Darm salzreich ernährter Mäuse. Jene Abnahme ging einher mit einem signifikanten Anstieg ROR- γ t-positiver Th17-Zellen in der Lamina propria des Dünndarms, welche bemerkenswerterweise durch Gabe *Lactobacillus paracasei*-haltiger Probiotika trotz anhaltender salzreicher Diät unterdrückt werden konnte (Wilck et al., 2017). Hieran lässt sich verdeutlichen, dass die Förderung von pathologischen Th17-Zellen durch Veränderung der Spezieszusammensetzung im Darm, nicht jedoch über direkten Kontakt des Darmimmunsystems mit diätetisch erhöhten NaCl-Konzentration an der Darmschleimhaut, verursacht wird.

Eine salzreiche Kost ist assoziiert mit einer Umstrukturierung der Zusammensetzung verschiedener Bakterienspezies im Darm. Jene begünstigt zwar die Entwicklung allergischer und autoimmuner Erkrankungen

– dies geschieht jedoch indirekt über Umstrukturierung des Darmmikrobioms. Potentiell anti-inflammatorische Effekte von NaCl, wie wir anhand einer EAE-Krankheitsabschwächung durch Transfer (NaCl+TGF- β)-induzierter Th17-Zellen haben zeigen können, könnten durch den pro-inflammatorischen Einfluss des Darmmikrobioms nach NaCl-reicher Diät unterdrückt werden. Der beobachtete Anstieg autoimmuner und allergischer Erkrankungen in den letzten 60 Jahren (Bach, 2002) mag folglich tatsächlich durch Änderungen unserer Ernährungsgewohnheiten bedingt worden sein – die eigentlich entzündungshemmende Wirkung von NaCl im peripheren Gewebe durch direkten Kontakt mit Th17-Zellen in anti-inflammatorischem Zytokinmilieu könnte hierdurch jedoch verschleiert werden und den Blick auf NaCl als flexiblen Gewebefaktor mit sowohl pro- als auch anti-inflammatorischer Potenz verzerren.

5.10 Ein Ausblick zur Rolle von NaCl im Tumormikromilieu

Ein weiteres großes Erkrankungsspektrum, welches im Rahmen immundysregulierter Erkrankungen diskutiert werden muss, sind die Tumorerkrankungen. Hier kommt es durch fehlerhafte Detektion und Vernichtung veränderter Zellen durch das Immunsystem, im Rahmen von chronischer Entzündung, Immunsuppression oder tumorinduziert, zu einer Ausbreitung pathologischen malignen Gewebes – Tumorerkrankungen gehen somit, ähnlich autoimmuner und allergischer Erkrankungen, mit einer Dysregulation des Immunsystems einher (Shurin, 2012). An der Bekämpfung von Tumorzellen ist zwar ein Verbund verschiedener Immunzellen beteiligt, die CD8+ T-Zellen und die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) nehmen aufgrund ihrer zytotoxischen Funktion jedoch eine besondere Rolle in der Tumorbekämpfung ein (Nabholz und MacDonald, 1983; Robertson und Ritz, 1990). Zudem konnte, als wichtiger Hinweis auf die bedeutende Rolle von CD8+ T-Zellen in der Tumorbekämpfung, eine bessere Prognose mit längerem Überleben in verschiedenen Tumorerkrankungen beobachtet werden, wenn CD8+ T-Zellen in hoher Dichte im Tumorgewebe vorhanden waren (Kmieciak et al., 2013; Piersma et al., 2007). CD8+ T Zellen und NK-Zellen sind in der Lage, den Körper auf Anomalien in den Zellen abzusuchen – werden Tumorzellen jedoch übersehen, kann es durch Wachstum, Infiltration und Verdrängung gesunden Gewebes zu desaströsen Verläufen kommen. Eine effektive Detektion und Vernichtung maligner Zellen durch unser Immunsystem ist deshalb von großer Wichtigkeit.

Ein bedeutender Regulator, welcher an der Lenkung der immunologischen Vorgänge im Tumorgewebe beteiligt ist, ist das unmittelbare Umfeld des malignen Gewebes – das Tumormikromilieu (Binnewies et al., 2018). Interessanterweise konnte die Ionenzusammensetzung im Tumorgewebe als wichtiger Einflussfaktor auf die immunologische Bekämpfung des Tumorgewebes und hierdurch auf das Tumorstadium identifiziert werden. So beobachteten Eil et al., dass hohe Kaliumkonzentrationen im Tumormikromilieu, unter anderem verursacht durch Nekrosen im Tumorgewebe, die TCR-induzierte Effektorfunktion CD8+ T-Zellen hemmt, die IFN- γ -Expression senkt und hierdurch die Tumorkontrolle negativ beeinflusst (Eil et al., 2016). Kalzium reguliert zum einen die zytotoxische Aktivität von CD8+ T-Zellen (Kim et al., 2017), kann jedoch auch die

Migration und somit Metastasierung maligner Zellen begünstigen (Boire et al., 2005). Ein niedriger pH-Wert induziert CD8⁺ T-Zell-Anergie, welche bei Anheben des pHs reversibel ist (Calcinotto et al., 2012). Einiges weist also darauf hin, dass die ionische Zusammensetzung im Kontext maligner Erkrankungen Einfluss auf die Effektivität der zytotoxischen Abwehr durch CD8⁺ T-Zellen nimmt.

Bemerkenswerterweise konnte mehrfach beobachtet werden, dass auch die Natriumkonzentrationen im Tumorgewebe, verglichen zum umgebenden Gewebe, verändert sind (Barrett et al., 2018; Ouwerkerk et al., 2003; Ouwerkerk et al., 2007). Weiterhin konnte in mehreren Fällen eine Erhöhung der Expression des salzsensitiven Transkriptionsfaktors NFAT5 und der Kinase SGK1 im Tumorgewebe, möglicherweise auch als Folge jenes NaCl-reichen Tumormilieus, detektiert werden (Jiang et al., 2019; Lee et al., 2019; Liang et al., 2017; Pan et al., 2019). Welchen Einfluss die erhöhten NaCl-Konzentrationen des Tumormikromilieus auf die Tumorabwehr des Immunsystems nehmen, ist jedoch bisher unzureichend verstanden.

Wir konnten beobachten, dass hohe Konzentrationen von NaCl die Expression von IL-17 und ROR- γ t in CD8⁺ T-Zellen induzieren. Sowohl IL-17 als auch ROR- γ t werden üblicherweise mit CD4⁺ Th17-Zellen in Verbindung gebracht, es konnte jedoch gezeigt werden, dass auch CD8⁺ T Zellen zur IL-17-Expression in der Lage sind. Eine Beteiligung jener CD8⁺ IL-17⁺ Tc17-Zellen an der Pathogenese autoimmuner (Huber et al., 2013), allergischer (Chen et al., 2016) und infektiös-viraler Erkrankungen (Hamada et al., 2009) wurde zwar beobachtet, die zytotoxische Funktion, wie sie für eine effiziente Tumorabwehr benötigt wird, scheint in Tc17-Zellen jedoch nur schwach ausgeprägt zu sein (Hamada et al., 2009; Huber et al., 2009).

Granzym B wird vor allem von CD8⁺ T Zellen und NK-Zellen produziert und ist als effizienter Apoptose-Induktor ein wichtiges zytotoxisches Werkzeug in der Tumorabwehr (Heusel et al., 1994; Shi et al., 1992). Sowohl Granzym B als auch Perforin zeigten sich in Tc17-Zellen nur gering exprimiert – eine mögliche Erklärung für die beobachtete reduzierte Zytotoxizität in jenem T-Zellsubtyp (Hamada et al., 2009; Huber et al., 2009). Interessanterweise konnten Tajima et al. jedoch beobachten, dass Tc17-Zellen in IL-12-reichem Milieu hohe Mengen an IFN- γ produzieren und zytotoxische Fähigkeiten entwickeln (Tajima et al., 2011). Sie beobachteten weiterhin eine gesteigerte anti-Tumor-Aktivität mit Tumorregress nach adoptivem Transfer von IFN- γ ⁺ Tc17-Zellen ins Tumormausmodell. Dies unterstreicht die Flexibilität und Plastizität des Tc17-Zell-Subtyps, welcher in der Lage ist, in differenzierten nicht-zytotoxischen Tc17-Zellen nach Exposition IL-12-reicher Milieus zytotoxische Eigenschaften zu entwickeln. Als Induktoren des Tc17- und IFN- γ ⁺ Tc17-Phänotyps wurden bisher jedoch nur Regulatoren im Bereich der Zytokine identifiziert.

Wir konnten beobachten, dass NaCl als ionischer Gewebefaktor differenzierte CD8⁺ T-Zellen zur Expression wichtiger Merkmale des Tc17-Subtyps, IL-17 und ROR- γ t, stimuliert. Doch welchen Einfluss hat NaCl auf die Zytotoxizität jenes Zelltyps? Interessanterweise konnten wir beobachten, dass NaCl die Koexpression von IL-

17 mit IFN- γ induziert. Dies erinnert an die Beobachtungen von Tajima et al. zur Induktion von IFN- γ durch IL-12 mit Stimulation zytotoxischer Eigenschaften in Tc17-Zellen (Tajima et al., 2011). IFN- γ konnte mehrfach als ein wichtiges Zytokin in der Bekämpfung maligner Zellen identifiziert werden (Bhat et al., 2017; Lu et al., 2019). Die Produktion von IFN- γ durch IFN- γ ⁺ Tc17-Zellen könnte somit ein möglicher Weg sein, auf welchem Tc17-Zellen ihre Zytotoxizität vermitteln. Yeh et al. beobachteten zudem eine FasL-abhängige Zytolyse von Target-Zellen durch Tc17-Zellen (Yeh et al., 2010). Bemerkenswerterweise beobachteten sie zudem, dass Tc17-Zellen in bestimmten Zytokinmilieus zur Granzym B Expression in der Lage sind. Während wir lediglich eine Tendenz zur ROR- γ t-Induktion ohne statistische Signifikanz in der Gesamtheit NaCl-stimulierter CD8⁺ Gedächtniszellen beobachten konnten, zeigte sich ein signifikanter ROR- γ t-Anstieg in der Granzym B-exprimierenden Zellpopulation. Zudem zeigte Granzym B eine starke Koexpression mit IL-17 unter erhöhten NaCl-Konzentrationen, was auf eine Zunahme der Zytotoxizität in jener IL-17-ROR- γ t-exprimierenden, Tc17-ähnlichen Subpopulation hinweisen könnte. Jener selektive Anstieg könnte weiterhin auf CD8-Subtyp-spezifische Unterschiede im NaCl-Effekte hinweisen, wie wir bereits in CD4⁺ Th-Zellen haben beobachten können. Der NaCl-induzierte CD8-Phänotyp mit Anstieg Th17-typischer Marker in Koexpression mit IFN- γ und Granzym B deutet auf einen potentiellen Erhalt zytotoxischer Eigenschaften hin und könnte möglicherweise sogar eine Effektivitätssteigerung in der Bekämpfung maligner Zellen bedeuten.

Betrachtet man den Einfluss von NaCl auf die CD8-Immunität, den Tc17-Subtyp, Zytotoxizität und somit auch die Rolle von NaCl im Tumormilieu bei der Tumorbekämpfung durch unser Immunsystem, ist einiges noch nicht ausreichend geklärt. Wir konnten jedoch zeigen, dass NaCl auch CD8⁺ T-Gedächtniszellen phänotypisch beeinflusst und einen IFN- γ ⁺ Tc17-ähnlichen Phänotyp induziert. Zytotoxizitätsassays, Evaluation der Expression weiterer zytolytischer Marker, wie des Fas-Liganden, und Transfer NaCl-stimulierter CD8⁺ T-Zellen ins Tumortiermodell könnten zu einem besseren Verständnis des funktionellen Einflusses von NaCl auf die zytotoxische T-Zell-Funktion im Kontext von Tumorerkrankungen beitragen. Dies könnte den Blickwinkel auf NaCl als ionischen flexiblen Immunmodulator im peripheren Gewebe mit potentiellen Implikationen in der Onkologie erweitern und neue therapeutische Möglichkeiten bei der Entwicklung immunmodulierender Behandlungsstrategien maligner Erkrankungen eröffnen.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Auf dem Weg durch den Körper durchkreuzen unsere Immunzellen eine Vielzahl verschiedener Gewebe mit einem unterschiedlichen Angebot an Zytokinen, Stoffwechselmetaboliten, physikalischen Gegebenheiten und ionischen Stimuli. Während die Umfeldbedingungen im Blutkreislauf in sehr engen Grenzen konstant gehalten werden, besteht das Mikromilieu peripherer Gewebe in direkter Nachbarschaft der Immunzelle aus einem komplexen Zusammenspiel vieler verschiedener immunologischer und nicht-immunologischer Komponenten. Obwohl sich nur ein marginaler Teil der Immunzellen im Blutkreislauf befindet, wurde dieses hochvariable Gewebemilieu als Einflussfaktor der Immunantwort lange Zeit vernachlässigt.

Eine Gruppe von Gewebefaktoren mit immunmodulatorischer Kapazität, welche erst kürzlich in den Fokus rückte, sind die ionischen Gewebefaktoren, und hiermit auch das Natriumchlorid. Während lange Zeit angenommen wurde, die NaCl-Konzentration sei im gesamten Körper stabil, konnte kürzlich festgestellt werden, dass einige periphere Gewebe zu hohen osmotisch-inaktiven NaCl-Einlagerungen in der Lage sind. Ein Einfluss jener NaCl-reichen Gewebemilieus auf innate sowie naive adaptive Immunzellen konnte nachgewiesen werden. Der Großteil der Immunzellen, welcher periphere NaCl-reiche Gewebe durchkreuzt und dort Immunreaktionen vermittelt, ist jedoch nicht naiv, sondern setzt sich aus differenzierten Gedächtniszellen zusammen.

Tatsächlich konnten wir zeigen, dass sich auch differenzierte T-Gedächtniszellen phänotypisch durch hohe NaCl-Konzentrationen beeinflussen lassen. Die Stimulation CD4⁺ Th-Gedächtniszellen in NaCl-reichem Milieu resultierte in einem Anstieg Th2-typischer Merkmale, wie des Signaturzytokins IL-4 und des Th2-Mastertranskriptionsfaktors GATA3. Weiterhin konnten wir die Induktion eines Th2-Phänotyps nach Stimulation naiver Th-Zellen in NaCl-reichem Milieu beobachten. Bisher galt IL-4 zur Induktion einer Th2-Immunantwort als ein essentieller Bestandteil des direkten Mikromilieus. Wir konnten jedoch zeigen, dass selbst in Abwesenheit von autokrin produziertem IL-4 NaCl zur potenten Th2-Induktion in der Lage ist. Damit konnten wir zur weiteren Klärung des Th2-Paradoxes beitragen und NaCl erstmals als ionischen Gewebefaktor mit Th2-immunmodulatorischer Kapazität identifizieren. Als Mediatoren des NaCl-Effekts auf den Th2-Phänotyp konnten wir SGK1 und NFAT5 ermitteln.

Die atopische Dermatitis ist eine allergische Hauterkrankung mit pathologisch übersteigerter Th2-Immunität, welche entzündliche Veränderungen in der Haut induziert. Wieso es im Rahmen der AD zu jener Th2-Aktivierung kommt, ist bisher ungewiss. Kürzlich konnte jedoch gezeigt werden, dass die Haut in der Lage ist, große Mengen NaCl osmotisch inaktiv zu speichern. Wir fragten uns deshalb, ob NaCl an der Pathogenese der AD beteiligt sein könnte. Tatsächlich konnten wir stark erhöhte Natriumkonzentrationen in läsionalen Hautproben von AD-Patienten feststellen. Spannenderweise kann bei einer Vielzahl der AD-Patienten eine überdurchschnittliche Besiedlung der Haut mit dem Bakterienstamm *S. aureus* entdeckt werden. Die Ursache

jener Dysbiose ist noch immer nicht vollständig verstanden. Interessant ist jedoch, dass *S. aureus* durch eine ausgeprägte Toleranz gegenüber hohen NaCl-Konzentrationen auffällt. Zusammengefasst konnten wir zwar keinen kausalen Zusammenhang zwischen den erhöhten Natriumkonzentrationen in läsionaler AD-Haut und der *in vitro* beobachteten Th2-immunmodulatorischen Kapazität von NaCl feststellen – die Korrelation der pathologisch übersteigerten Th2-Immunantwort im Rahmen der AD, hoher Natriumkonzentrationen läsionaler Haut, der Dysbiose eines NaCl-toleranten Bakterienstammes und der *in vitro* beobachtete NaCl-induzierten Th2-Induktion fallen jedoch ins Auge. NaCl sollte deshalb als potentielle Triebfeder in dem Circulus vitiosus der AD „Barrierestörung – Th2-Immunität – *S. aureus* Dysbiose“ diskutiert werden. Die Bestätigung eines kausalen Zusammenhangs bedarf unbedingt weiterer Forschung.

Tatsächlich konnten wir neben der Induktion Th2-typischer Merkmale auch eine Stärkung von Th17-Charakteristika, wie einen Anstieg des Signaturzytokins IL-17 und des Mastertranskriptionsfaktors ROR- γ t, in CD4+ Th-Gedächtniszellen feststellen. Während Th17-Zellen häufig mit pro-inflammatorischen Eigenschaften und der Begünstigung autoimmuner entzündlicher Prozesse in Zusammenhang gebracht werden, konnten wir überraschenderweise eine Steigerung anti-inflammatorischer Mediatoren, wie FOXP3 und TGF- β , durch erhöhte NaCl-Konzentrationen beobachten. Interessanterweise zeigte sich jener anti-inflammatorische Phänotyp jedoch abhängig vom Zytokinkontext: Während NaCl in Gegenwart eines anti-inflammatorischen Zytokinmilieus eine starke Expression von TGF- β und FOXP3 induzierte, wurde jener anti-inflammatorische NaCl-Effekt im Kontext eines pro-inflammatorischen Zytokinmilieus gehemmt. Als Switch-Faktoren ließen sich TGF- β und IL-1 β herausstellen. Jene Abhängigkeit des NaCl-Effekts vom Zytokinmilieu konnten wir auch funktionell bestätigen: Während der adoptive Transfer TGF- β -induzierter Th17-Zellen ins Mausmodell der MS zu einer Abschwächung des Krankheitsverlaufes führte, wenn die Th17-Induktion in NaCl-reicher Umgebung stattfand, induzierte NaCl in einem pro-inflammatorischen IL-1 β -reichen Zytokinmilieu sogar eine Verstärkung der Krankheitsaktivität. Wir konnten hierdurch zeigen, dass NaCl als kontextsensitiver Gewebefaktor agiert, welcher im physiologischen Gleichgewicht Immuntoleranz vermitteln, im Kontext einer entzündlichen Immunaktivierung jedoch die Entzündungsantwort fördern und hierdurch potentiell eine effektivere Pathogenabwehr durch das Immunsystem begünstigen kann. Des Weiteren konnten wir erstmal einen nicht-zytokinischen ionischen Gewebefaktor als Determinante für die Schicksalsentscheidung pro-versus anti-inflammatorischer Th17-Zellen herausstellen.

Wir haben bestätigen können, dass der adoptive Transfer *in vitro* NaCl-stimulierter, anti-inflammatorisch induzierter Th17-Zellen eine Senkung der EAE-Krankheitsaktivität im Mausmodell induziert. Tatsächlich konnte in menschlichen MS-Läsionen ein Überangebot an NaCl und IL-1 β festgestellt werden. Könnte jene pathologische NaCl-Akkumulation im ZNS sogar *in vivo* ausgenutzt werden, um mit Hilfe moderner Antikörpertherapien den pro-inflammatorischen NaCl-Effekt IL-1 β -reicher ZNS-Läsionen zu inhibieren und

therapeutisch in ein apathogenes anti-inflammatorisches Gewebemilieu umzukehren? Die klinische Erprobung von anti-IL-1 β -Antikörpertherapien in MS-Patienten könnte hier bald Licht ins Dunkle bringen.

Das Tumormikromilieu ist ein wichtiger Regulator der Anti-Tumor-Aktivität durch das Immunsystem und nimmt somit einen bedeutenden Einfluss auf den Verlauf maligner Erkrankungen. Interessanterweise konnten stark erhöhte NaCl-Konzentrationen in vielen Tumoren beobachtet werden. Wir fragten uns deshalb, ob jene NaCl-Akkumulation maligner Gewebe auch die Immunfunktion zytotoxischer CD8⁺ T-Gedächtniszellen, welche wichtige Funktionen in der Detektion und Bekämpfung von Tumorzellen übernehmen, beeinflussen könnte. Tatsächlich konnten wir eine Induktion der Tc17-typischen Eigenschaften IL-17 und ROR- γ t in CD8⁺ T-Gedächtniszellen in NaCl-reichen Milieus feststellen. Jene zeigten sich interessanterweise koexprimiert mit IFN- γ und Granzym B. Während sich Tc17-Zellen eigentlich durch Verlust zytotoxischer Eigenschaften auszeichnen, sind IFN- γ -exprimierende Tc17-Zellen hingegen effektiv zur Zytolyse in der Lage. Unsere phänotypischen Beobachtungen weisen somit auf eine NaCl-abhängige Induktion eines Tc17-ähnlichen Phänotyps in CD8⁺ T-Gedächtniszellen mit Stärkung zytotoxischer Eigenschaften hin. Jene phänotypischen Beobachtungen müssen jedoch unbedingt funktionell durch Zytotoxizitätsassays und Transfer ins Tumor-Tiermodell überprüft und bestätigt werden.

Zusammenfassend konnten wir NaCl als einen ionischen Gewebefaktor mit globalem immunmodulatorischem Einfluss auf verschiedene naive und differenzierte T-Zellsubtypen des adaptiven Immunsystems identifizieren. NaCl zeigte sich als kontextsensitiver Gewebefaktor, welcher abhängig vom Zytokinmilieu sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Eigenschaften vermitteln kann. NaCl unterstützt durch kurzfristige vorübergehende Anpassungen des Phänotyps die Flexibilität und Plastizität des Immunsystems, kann jedoch auch langfristige Änderungen in der T-Zellfunktionalität vornehmen und hierdurch auch nach Verlassen des NaCl-reichen Milieus die globale Immunfunktion nachhaltig beeinflussen. Durch unsere Erkenntnisse zur immunmodulatorischen Kapazität NaCl-reicher Gewebemilieus mit Regulation differenzierter T-Zellen haben wir zu einem besseren Verständnis der Bedeutung nicht-immunologischer peripherer Gewebefaktoren auf unsere Immunfunktion beigetragen, welche als Grundlage die Entwicklung neuer therapeutischer Möglichkeiten in der Behandlung immundysregulierter autoimmuner, allergischer und maligner Erkrankungen unterstützen kann.

7 Schriftenverzeichnis

7.1 Abkürzungsverzeichnis

A

AD	<i>atopische Dermatitis</i>
AD-Patient	<i>an atopischer Dermatitis erkrankter Patient</i>
AKT	<i>Proteinkinase B</i>
API	<i>Aktivator Protein 1</i>

C

CCL20	<i>CC-Chemokin Ligand 20</i>
CCR7	<i>C-C Chemokin Rezeptor Typ 7</i>

D

DC	<i>dendritische Zelle</i>
----------	---------------------------

E

EAE	<i>experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis</i>
ENaC	<i>epithelialer Natriumkanal</i>

F

FOXP3	<i>forkhead box P3</i>
-------------	------------------------

G

GAG	<i>Glykosaminoglykan</i>
GATA3	<i>GATA-binding protein 3</i>
GlcAT-I	<i>beta1,3-Glucuronosyltransferase-I</i>
GMCSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>

H

HAS2	<i>Hyaluronan Synthase 2</i>
HIF1 α	<i>Hypoxie-induzierter Faktor 1alpha</i>

I

IFN- γ	<i>Interferon-gamma</i>
IL-10	<i>Interleukin-10</i>
IL-12	<i>Interleukin-12</i>
IL-13	<i>Interleukin-13</i>
IL-17	<i>Interleukin-17</i>
IL-1 β	<i>Interleukin-1beta</i>
IL-2	<i>Interleukin-2, Interleukin-2</i>
IL-23	<i>Interleukin-23</i>
IL-4	<i>Interleukin-4</i>
IL-5	<i>Interleukin-5</i>
IL-6	<i>Interleukin-6</i>
ILC2	<i>Typ 2 innate lymphoid cell</i>
iTreg	<i>induzierte CD4⁺ regulatorische T-Zelle</i>

M

MHC I.....	major histocompatibility complex class I
MS	Multiple Sklerose
mTORC1	mammalian target of rapamycin complex 1
mTORC2	mammalian target of rapamycin complex 2

N

Na(x).....	Natrium-sensitiver Natriumkanal
NaCl.....	Natriumchlorid
NEDD4L.....	neural precursor cell expressed developmentally downregulated gene 4-like
NFAT5.....	nuclear factor of activated T-cells 5
NK-Zelle.....	natürliche Killerzelle
nTreg.....	natürliche CD4+ regulatorische T-Zelle

O

OX40L.....	OX40 Ligand
------------	-------------

P

p38 MAPK.....	p38-mitogenaktivierte Proteinkinase
PBS	Dulbecco's phosphate-buffered salines
PG	Proteoglykan
PGE2.....	Prostaglandin E2
PI3K.....	Phosphoinositid-3-Kinase
PKC θ	Proteinkinase C theta

R

Rictor	rapamycin-insensitive companion of mammalian target of rapamycin
ROR- γ t.....	RAR-related orphan receptor gamma t

S

SGK1	Serum-Glukokortikoid-regulierte Kinase 1
sIL1-Ra	physiologischer IL1-Rezeptor-Blocker
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
STAT	signal transducers and activators of transcription

T

Tbet.....	T-box transcription factor
Tcm.....	zentrale T-Gedächtniszellen
TCR	T-Zell-Rezeptor
Teff	T-Effektorgedächtniszellen
TGF- β	transforming growth factor-beta
Th-Zellen	CD4+ T-Helfer-Zellen
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
Treg.....	CD4+ regulatorische T-Zelle
T _{RM}	residente T-Gedächtniszelle

Z

ZNS.....	zentrales Nervensystem
----------	------------------------

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Das zelluläre Immunsystem (verwendet und angepasst aus: Ahmetspahic et al., 2018, Fig 1).....	Seite 9
Abbildung 2: Der Einfluss des Mikromilieus auf die Th-Zelleigenschaften (eigene Darstellung).....	Seite 12
Abbildung 3: Multivariable Gewebemilieus determinieren die Heterogenität unseres Immunsystems (verwendet und angepasst aus: Matthias and Zielinski, 2019, Graphical Abstract).....	Seite 21
Abbildung 4: Gating-Strategie (eigene Darstellung).....	Seite 36
Abbildung 5: NaCl in Wechselwirkung mit dem Zytokinmilieu (verwendet aus: Matthias et al., 2020, Graphical Abstract).....	Seite 50
Abbildung 6: NaCl induziert zytotoxische Tc17-Eigenschaften in CD8+ T-Gedächtniszellen (unpublizierte Daten – In Vorbereitung zur Publikation).....	Seite 52
Abbildung 7: NaCl im atopischen Hautmilieu (verwendet aus: Matthias et al., 2019, Fig S16).....	Seite 68

7.3 Literaturverzeichnis

- Acharya, S., Timilshina, M. und Chang, J.H. (2019). Mevalonate promotes differentiation of regulatory T cells. *J Mol Med (Berl)*, **97**(7): 927-936. doi:10.1007/s00109-019-01784-y
- Acosta-Rodriguez, E.V., Rivino, L., Geginat, J., Jarrossay, D., Gattorno, M., Lanzavecchia, A., Sallusto, F. und Napolitani, G. (2007). Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nature immunology*, **8**(6): 639-646. doi:10.1038/ni1467
- Ahmadzadeh, M. und Farber, D.L. (2002). Functional plasticity of an antigen-specific memory CD4 T cell population. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **99**(18): 11802-11807. doi:10.1073/pnas.192263099
- Ahmetspahic, D., Brinker, D. und Alferink, J. (2018). Chapter 1 - Depression-Associated Cellular Components of the Innate and Adaptive Immune System. In B.T. Baune (ed.), *Inflammation and Immunity in Depression* (pp. 1-16.) New York: Garland Science.
- Alberdi, M., Iglesias, M., Tejedor, S., Merino, R., López-Rodríguez, C. und Aramburu, J. (2017). Context-dependent regulation of Th17-associated genes and IFN γ expression by the transcription factor NFAT5. *Immunology & Cell Biology*, **95**(1): 56-67. doi:10.1038/icb.2016.69

- Alrashdi, B., Dawod, B., Schampel, A., Tacke, S., Kuerten, S., Marshall, J.S. und Côté, P.D. (2019). Nav1.6 promotes inflammation and neuronal degeneration in a mouse model of multiple sclerosis. *Journal of Neuroinflammation*, **16**(1): 215. doi:10.1186/s12974-019-1622-1
- Alsterholm, M., Strömbeck, L., Ljung, A., Karami, N., Widjestam, J., Gillstedt, M., Åhren, C. und Faergemann, J. (2017). Variation in Staphylococcus aureus Colonization in Relation to Disease Severity in Adults with Atopic Dermatitis during a Five-month Follow-up. *Acta Derm Venereol*, **97**(7): 802-807. doi:10.2340/00015555-2667
- Ando, D.G., Clayton, J., Kono, D., Urban, J.L. und Sercarz, E.E. (1989). Encephalitogenic T cells in the B10.PL model of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) are of the Th-1 lymphokine subtype. *Cellular Immunology*, **124**(1): 132-143. doi:10.1016/0008-8749(89)90117-2
- Antón, L.C., Snyder, H.L., Bennink, J.R., Vinitsky, A., Orłowski, M., Porgador, A. und Yewdell, J.W. (1998). Dissociation of Proteasomal Degradation of Biosynthesized Viral Proteins from Generation of MHC Class I-Associated Antigenic Peptides. *The Journal of Immunology*, **160**(10): 4859-4868.
- Antonelli, A., Ferrari, S.M., Corrado, A., Di Domenicantonio, A. und Fallahi, P. (2015). Autoimmune thyroid disorders. *Autoimmun Rev*, **14**(2): 174-180. doi:10.1016/j.autrev.2014.10.016
- Arikawa, J., Ishibashi, M., Kawashima, M., Takagi, Y., Ichikawa, Y. und Imokawa, G. (2002). Decreased levels of sphingosine, a natural antimicrobial agent, may be associated with vulnerability of the stratum corneum from patients with atopic dermatitis to colonization by Staphylococcus aureus. *J Invest Dermatol*, **119**(2): 433-439. doi:10.1046/j.1523-1747.2002.01846.x
- Atarashi, K., Tanoue, T., Shima, T., Imaoka, A., Kuwahara, T., Momose, Y., Cheng, G., Yamasaki, S., Saito, T., Ohba, Y., Taniguchi, T., Takeda, K., Hori, S., Ivanov, I.I., Umesaki, Y., Itoh, K. und Honda, K. (2011). Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species. *Science (New York, N.Y.)*, **331**(6015): 337-341. doi:10.1126/science.1198469
- Bach, J.-F. (2002). The Effect of Infections on Susceptibility to Autoimmune and Allergic Diseases. *New England Journal of Medicine*, **347**(12): 911-920. doi:10.1056/NEJMra020100
- Back, S.A., Tuohy, T.M., Chen, H., Wallingford, N., Craig, A., Struve, J., Luo, N.L., Banine, F., Liu, Y., Chang, A., Trapp, B.D., Bebo, B.F., Jr., Rao, M.S. und Sherman, L.S. (2005). Hyaluronan accumulates in demyelinated lesions and inhibits oligodendrocyte progenitor maturation. *Nature medicine*, **11**(9): 966-972. doi:10.1038/nm1279
- Baird, M.M. und Haldane, J.B. (1922). Salt and water elimination in man. *The Journal of physiology*, **56**(3-4): 259-262.
- Barrett, T., Riemer, F., McLean, M.A., Kaggie, J., Robb, F., Tropp, J.S., Warren, A., Bratt, O., Shah, N., Gnanapragasam, V.J., Gilbert, F.J., Graves, M.J. und Gallagher, F.A. (2018). Quantification of Total and Intracellular Sodium Concentration in Primary Prostate Cancer and Adjacent Normal Prostate Tissue With Magnetic Resonance Imaging. *Investigative Radiology*, **53**(8). doi:10.1097/RLI.0000000000000470

- Baugé, C., Attia, J., Leclercq, S., Pujol, J.P., Galéra, P. und Boumédiène, K. (2008). Interleukin-1beta up-regulation of Smad7 via NF-kappaB activation in human chondrocytes. *Arthritis Rheum*, **58**(1): 221-226. doi:10.1002/art.23154
- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., Weiner, H.L. und Kuchroo, V.K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, **441**(7090): 235-238. doi:10.1038/nature04753
- Bhat, P., Leggatt, G., Waterhouse, N. und Frazer, I.H. (2017). Interferon- γ derived from cytotoxic lymphocytes directly enhances their motility and cytotoxicity. *Cell Death Dis*, **8**(6): e2836-e2836. doi:10.1038/cddis.2017.67
- Binnewies, M., Roberts, E.W., Kersten, K., Chan, V., Fearon, D.F., Merad, M., Coussens, L.M., Gaborit, D.I., Ostrand-Rosenberg, S., Hedrick, C.C., Vonderheide, R.H., Pittet, M.J., Jain, R.K., Zou, W., Howcroft, T.K., Woodhouse, E.C., Weinberg, R.A. und Krummel, M.F. (2018). Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nature medicine*, **24**(5): 541-550. doi:10.1038/s41591-018-0014-x
- Bisgaard, H., Li, N., Bonnelykke, K., Chawes, B.L., Skov, T., Paludan-Müller, G., Stokholm, J., Smith, B. und Krogh, K.A. (2011). Reduced diversity of the intestinal microbiota during infancy is associated with increased risk of allergic disease at school age. *J Allergy Clin Immunol*, **128**(3): 646-652.e641-645. doi:10.1016/j.jaci.2011.04.060
- Bitzer, M., von Gersdorff, G., Liang, D., Dominguez-Rosales, A., Beg, A.A., Rojkind, M. und Böttinger, E.P. (2000). A mechanism of suppression of TGF-beta/SMAD signaling by NF-kappa B/RelA. *Genes Dev*, **14**(2): 187-197. doi:10.1101/gad.14.2.187 Genes & Dev. 2000. 14: 187-197
- Boire, A., Covic, L., Agarwal, A., Jacques, S., Sherifi, S. und Kuliopulos, A. (2005). PAR1 Is a Matrix Metalloprotease-1 Receptor that Promotes Invasion and Tumorigenesis of Breast Cancer Cells. *Cell*, **120**(3): 303-313. doi:10.1016/j.cell.2004.12.018
- Britten, J.L., Malik, M., Lewis, T.D. und Catherino, W.H. (2019). Ulipristal Acetate Mediates Decreased Proteoglycan Expression Through Regulation of Nuclear Factor of Activated T-Cells (NFAT5). *Reprod Sci*, **26**(2): 184-197. doi:10.1177/1933719118816836
- Burger, D., Molnarfi, N., Weber, M.S., Brandt, K.J., Benkhoucha, M., Gruaz, L., Chofflon, M., Zamvil, S.S. und Lalive, P.H. (2009). Glatiramer acetate increases IL-1 receptor antagonist but decreases T cell-induced IL-1 β in human monocytes and multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**(11): 4355-4359. doi:10.1073/pnas.0812183106
- Calcinotto, A., Filipazzi, P., Grioni, M., Iero, M., De Mito, A., Ricupito, A., Cova, A., Canese, R., Jachetti, E., Rossetti, M., Huber, V., Parmiani, G., Generoso, L., Santinami, M., Borghi, M., Fais, S., Bellone, M. und Rivoltini, L. (2012). Modulation of microenvironment acidity reverses anergy in human and murine tumor-infiltrating T lymphocytes. *Cancer Res*, **72**(11): 2746-2756. doi:10.1158/0008-5472.Can-11-1272

- Cannella, B. und Raine, C.S. (1995). The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol*, **37**(4): 424-435. doi:10.1002/ana.410370404
- Cannon, W. (1932). The constancy of the salt content of the blood. In W. Cannon (ed.), *The wisdom of the body* (pp. 91–97.) New York: W.W. Norton & Co.
- Caproni, M., Antiga, E., Torchia, D., Volpi, W., Barletta, E., Gitti, G., De Campora, E. und Fabbri, P. (2007). FoxP3-expressing T regulatory cells in atopic dermatitis lesions. *Allergy Asthma Proc*, **28**(5): 525-528. doi:10.2500/aap2007.28.3043
- Castel, P., Ellis, H., Bago, R., Toska, E., Razavi, P., Carmona, F.J., Kannan, S., Verma, C.S., Dickler, M., Chandarlapaty, S., Brogi, E., Alessi, D.R., Baselga, J. und Scaltriti, M. (2016). PDK1-SGK1 Signaling Sustains AKT-Independent mTORC1 Activation and Confers Resistance to PI3K α Inhibition. *Cancer Cell*, **30**(2): 229-242. doi:10.1016/j.ccell.2016.06.004
- Chávez-Galán, L., Arenas-Del Angel, M.C., Zenteno, E., Chávez, R. und Lascurain, R. (2009). Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell Mol Immunol*, **6**(1): 15-25. doi:10.1038/cmi.2009.3
- Chen, H., Xu, X., Teng, J., Cheng, S., Bunjhoo, H., Cao, Y., Liu, J., Xie, J., Wang, C., Xu, Y. und Xiong, W. (2016). CXCR4 inhibitor attenuates ovalbumin-induced airway inflammation and hyperresponsiveness by inhibiting Th17 and Tc17 cell immune response. *Exp Ther Med*, **11**(5): 1865-1870. doi:10.3892/etm.2016.3141
- Chen, L., Sun, M., Wu, W., Yang, W., Huang, X., Xiao, Y., Ma, C., Xu, L., Yao, S., Liu, Z. und Cong, Y. (2019). Microbiota Metabolite Butyrate Differentially Regulates Th1 and Th17 Cells' Differentiation and Function in Induction of Colitis. *Inflammatory Bowel Diseases*, **25**(9): 1450-1461. doi:10.1093/ibd/izz046
- Chen, Q., Kim, Y.C., Laurence, A., Punkosdy, G.A. und Shevach, E.M. (2011). IL-2 controls the stability of Foxp3 expression in TGF-beta-induced Foxp3+ T cells in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, **186**(11): 6329-6337. doi:10.4049/jimmunol.1100061
- Chen, S.L., Dahl, C., Meyer, H.E. und Madar, A.A. (2018). Estimation of Salt Intake Assessed by 24-Hour Urinary Sodium Excretion among Somali Adults in Oslo, Norway. *Nutrients*, **10**(7): 900. doi:10.3390/nu10070900
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.-J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G. und Wahl, S.M. (2003). Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med*, **198**(12): 1875-1886. doi:10.1084/jem.20030152
- Chomczynski, P. und Mackey, K. (1995). Substitution of chloroform by bromo-chloropropane in the single-step method of RNA isolation. *Anal Biochem*, **225**(1): 163-164. doi:10.1006/abio.1995.1126
- Christa, M., Weng, A.M., Geier, B., Wörmann, C., Scheffler, A., Lehmann, L., Oberberger, J., Kraus, B.J., Hahner, S., Störk, S., Klink, T., Bauer, W.R., Hammer, F. und Köstler, H. (2019). Increased myocardial sodium signal intensity in Conn's syndrome detected by ²³Na magnetic resonance imaging. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*, **20**(3): 263-270. doi:10.1093/ehjci/jej134

Clark, R.A., Chong, B., Mirchandani, N., Brinster, N.K., Yamanaka, K., Dowgiert, R.K. und Kupper, T.S. (2006). The vast majority of CLA+ T cells are resident in normal skin. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, **176**(7): 4431-4439. doi:10.4049/jimmunol.176.7.4431

Clark, R.A., Watanabe, R., Teague, J.E., Schlapbach, C., Tawa, M.C., Adams, N., Dorosario, A.A., Chaney, K.S., Cutler, C.S., Leboeuf, N.R., Carter, J.B., Fisher, D.C. und Kupper, T.S. (2012). Skin effector memory T cells do not recirculate and provide immune protection in alemtuzumab-treated CTCL patients. *Sci Transl Med*, **4**(117): 117ra117. doi:10.1126/scitranslmed.3003008

Compston, A. und Coles, A. (2008). Multiple sclerosis. *The Lancet*, **372**(9648): 1502-1517. doi:10.1016/S0140-6736(08)61620-7

Cosenza, H., Leserman, L.D. und Rowley, D.A. (1971). The Third Cell Type Required for the Immune Response of Spleen Cells in vitro. *The Journal of Immunology*, **107**(2): 414-421.

Cosmi, L., Maggi, L., Santarlasci, V., Capone, M., Cardilicchia, E., Frosali, F., Querci, V., Angeli, R., Matucci, A., Fambrini, M., Liotta, F., Parronchi, P., Maggi, E., Romagnani, S. und Annunziato, F. (2010). Identification of a novel subset of human circulating memory CD4(+) T cells that produce both IL-17A and IL-4. *J Allergy Clin Immunol*, **125**(1): 222-230.e221-224. doi:10.1016/j.jaci.2009.10.012

Csorba, T.R., Lyon, A.W. und Hollenberg, M.D. (2010). Autoimmunity and the pathogenesis of type 1 diabetes. *Crit Rev Clin Lab Sci*, **47**(2): 51-71. doi:10.3109/10408361003787171

Davis, M.M. und Bjorkman, P.J. (1988). T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature*, **334**(6181): 395-402. doi:10.1038/334395a0

DGN/KKNMS (2014a). Mitoxantron. *DGN / KKNMS Leitlinie zur Diagnose und Therapie der MS (13/08/2014)* (p. 33.): Deutsche Gesellschaft für Neurologie, Kompetenznetz Multiple Sklerose.

DGN/KKNMS (2014b). Praktische Aspekte der Therapie mit Glatirameracetat. *DGN / KKNMS Leitlinie zur Diagnose und Therapie der MS (13/08/2014)* (p. 21.): Deutsche Gesellschaft für Neurologie, Kompetenznetz Multiple Sklerose.

DGN/KKNMS (2014c). Verfügbare klinische Daten und Einsatzmöglichkeiten therapeutischer Antikörper. *DGN / KKNMS Leitlinie zur Diagnose und Therapie der MS (13/08/2014)* (pp. 39-43.): Deutsche Gesellschaft für Neurologie, Kompetenznetz Multiple Sklerose.

Dinarello, C.A., Simon, A. und van der Meer, J.W.M. (2012). Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nat Rev Drug Discov*, **11**(8): 633-652. doi:10.1038/nrd3800

Duhen, T., Geiger, R., Jarrossay, D., Lanzavecchia, A. und Sallusto, F. (2009). Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nature immunology*, **10**(8): 857-863. doi:10.1038/ni.1767

- Dünkelberg, S., Maywald, M., Schmitt, A.K., Schwerdtle, T., Meyer, S. und Rink, L. (2020). The Interaction of Sodium and Zinc in the Priming of T Cell Subpopulations Regarding Th17 and Treg Cells. *Mol Nutr Food Res*, **64**(2): e1900245. doi:10.1002/mnfr.201900245
- Eil, R., Vodnala, S.K., Clever, D., Klebanoff, C.A., Sukumar, M., Pan, J.H., Palmer, D.C., Gros, A., Yamamoto, T.N., Patel, S.J., Guittard, G.C., Yu, Z., Carbonaro, V., Okkenhaug, K., Schrumpp, D.S., Linehan, W.M., Roychoudhuri, R. und Restifo, N.P. (2016). Ionic immune suppression within the tumour microenvironment limits T cell effector function. *Nature*, **537**(7621): 539-543. doi:10.1038/nature19364
- F. Farrokhyar, E.T.S.E.J.I. (2001). A Critical Review of Epidemiological Studies in Inflammatory Bowel Disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, **36**(1): 2-15. doi:10.1080/00365520120310
- Falcone, M., Rajan, A.J., Bloom, B.R. und Brosnan, C.F. (1998). A critical role for IL-4 in regulating disease severity in experimental allergic encephalomyelitis as demonstrated in IL-4-deficient C57BL/6 mice and BALB/c mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, **160**(10): 4822-4830.
- Fang, T.C., Yashiro-Ohtani, Y., Del Bianco, C., Knoblock, D.M., Blacklow, S.C. und Pear, W.S. (2007). Notch directly regulates Gata3 expression during T helper 2 cell differentiation. *Immunity*, **27**(1): 100-110. doi:10.1016/j.immuni.2007.04.018
- Farber, D.L., Yudanin, N.A. und Restifo, N.P. (2014). Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. *Nature Reviews Immunology*, **14**(1): 24-35. doi:10.1038/nri3567
- Farez, M.F., Fiol, M.P., Gaitan, M.I., Quintana, F.J. und Correale, J. (2015). Sodium intake is associated with increased disease activity in multiple sclerosis. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, **86**(1): 26-31. doi:10.1136/jnnp-2014-307928
- Fatt, P. und Katz, B. (1952). The effect of sodium ions on neuromuscular transmission. *The Journal of physiology*, **118**(1): 73-87. doi:10.1113/jphysiol.1952.sp004773
- Faulkner, J.L., Harwood, D., Bender, L., Shrestha, L., Brands, M.W., Morwitzer, M.J., Kennard, S., Antonova, G. und Belin de Chantemèle, E.J. (2018). Lack of Suppression of Aldosterone Production Leads to Salt-Sensitive Hypertension in Female but Not Male Balb/C Mice. *Hypertension*, **72**(6): 1397-1406. doi:10.1161/hypertensionaha.118.11303
- Fernando, V., Omura, S., Sato, F., Kawai, E., Martinez, N.E., Elliott, S.F., Yoh, K., Takahashi, S. und Tsunoda, I. (2014). Regulation of an autoimmune model for multiple sclerosis in Th2-biased GATA3 transgenic mice. *Int J Mol Sci*, **15**(2): 1700-1718. doi:10.3390/ijms15021700
- Feuillie, C., Vitry, P., McAleer, M.A., Kezic, S., Irvine, A.D., Geoghegan, J.A. und Dufrêne, Y.F. (2018). Adhesion of Staphylococcus aureus to Corneocytes from Atopic Dermatitis Patients Is Controlled by Natural Moisturizing Factor Levels. *mBio*, **9**(4): e01184-01118. doi:10.1128/mBio.01184-18
- Finkelstein, H. (1935). Ekzem und ekzemähnliche Dermatosen. In M. Pfaundler und A. Schlossmann (eds.), *Die Hautkrankheiten des Kindesalters. Handbuch der Kinderheilkunde (Ein Buch für den Praktischen Arzt.)* Berlin Heidelberg: Springer.

Furlan, R., Bergami, A., Brambilla, E., Butti, E., De Simoni, M.G., Campagnoli, M., Marconi, P., Comi, G. und Martino, G. (2007). HSV-1-mediated IL-1 receptor antagonist gene therapy ameliorates MOG35–55-induced experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *Gene Therapy*, **14**(1): 93-98. doi:10.1038/sj.gt.3302805

Galea, G., Bollars, C., Breda, J.o., Cappuccio, F., Raaij, J.V., Fernandez, R.-R., Siopa, M. und Xuereb, G. (2013). *Mapping salt reduction initiatives in the WHO European Region*. Copenhagen, Denmark: WHO Regional Office for Europe.

Gao, S., Alarcón, C., Sapkota, G., Rahman, S., Chen, P.-Y., Goerner, N., Macias, M.J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. und Massagué, J. (2009). Ubiquitin ligase Nedd4L targets activated Smad2/3 to limit TGF-beta signaling. *Molecular cell*, **36**(3): 457-468. doi:10.1016/j.molcel.2009.09.043

García-Martínez, J.M. und Alessi, D.R. (2008). mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1). *Biochem J*, **416**(3): 375-385. doi:10.1042/bj20081668

Garo, L.P., Ajay, A.K., Fujiwara, M., Beynon, V., Kuhn, C., Gabriely, G., Sadhukan, S., Raheja, R., Rubino, S., Weiner, H.L. und Murugaiyan, G. (2019). Smad7 Controls Immunoregulatory PDL2/1-PD1 Signaling in Intestinal Inflammation and Autoimmunity. *Cell Rep*, **28**(13): 3353-3366.e3355. doi:10.1016/j.celrep.2019.07.065

Gekle, M. (2015). Renaler Transport und Regulation von NaCl. In M. Gekle, E. Wischmeyer, S. Gründer, M. Petersen, A. Schwab, F. Markwardt, N. Klöcker, R. Baumann und H. Marti (eds.), *Taschenlehrbuch Physiologie* (pp. 353-355.) Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

Gowans, J.L. und Uhr, J.W. (1966). The carriage of immunological memory by small lymphocytes in the rat. *Journal of Experimental Medicine*, **124**(5): 1017-1030. doi:10.1084/jem.124.5.1017

Gunn, M.D., Tangemann, K., Tam, C., Cyster, J.G., Rosen, S.D. und Williams, L.T. (1998). A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**(1): 258-263. doi:10.1073/pnas.95.1.258

Gutowska-Owsiak, D., Schaupp, A.L., Salimi, M., Selvakumar, T.A., McPherson, T., Taylor, S. und Ogg, G.S. (2012). IL-17 downregulates filaggrin and affects keratinocyte expression of genes associated with cellular adhesion. *Exp Dermatol*, **21**(2): 104-110. doi:10.1111/j.1600-0625.2011.01412.x

Hamada, H., Garcia-Hernandez, M.d.l.L., Reome, J.B., Misra, S.K., Strutt, T.M., McKinstry, K.K., Cooper, A.M., Swain, S.L. und Dutton, R.W. (2009). Tc17, a unique subset of CD8 T cells that can protect against lethal influenza challenge. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, **182**(6): 3469-3481. doi:10.4049/jimmunol.0801814

Hammad, H., Plantinga, M., Deswarte, K., Pouliot, P., Willart, M.A.M., Kool, M., Muskens, F. und Lambrecht, B.N. (2010). Inflammatory dendritic cells--not basophils--are necessary and sufficient for induction of Th2 immunity to inhaled house dust mite allergen. *J Exp Med*, **207**(10): 2097-2111. doi:10.1084/jem.20101563

- Harrington, L.E., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Turner, H., Murphy, T.L., Murphy, K.M. und Weaver, C.T. (2005). Interleukin 17–producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature immunology*, **6**(11): 1123-1132. doi:10.1038/ni1254
- Heer, M., Baisch, F., Kropp, J., Gerzer, R. und Drummer, C. (2000). High dietary sodium chloride consumption may not induce body fluid retention in humans. *American journal of physiology. Renal physiology*, **278**(4): F585-595. doi:10.1152/ajprenal.2000.278.4.F585
- Hegazy, A.N., Peine, M., Helmstetter, C., Panse, I., Fröhlich, A., Bergthaler, A., Flatz, L., Pinschewer, D.D., Radbruch, A. und Löhning, M. (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**(1): 116-128. doi:10.1016/j.immuni.2009.12.004
- Heikamp, E.B., Patel, C.H., Collins, S., Waickman, A., Oh, M.-H., Sun, I.-H., Illei, P., Sharma, A., Naray-Fejes-Toth, A., Fejes-Toth, G., Misra-Sen, J., Horton, M.R. und Powell, J.D. (2014). The AGC kinase SGK1 regulates TH1 and TH2 differentiation downstream of the mTORC2 complex. *Nature immunology*, **15**(5): 457-464. doi:10.1038/ni.2867
- Hernandez, A.L., Kitz, A., Wu, C., Lowther, D.E., Rodriguez, D.M., Vudattu, N., Deng, S., Herold, K.C., Kuchroo, V.K., Kleinewietfeld, M. und Hafler, D.A. (2015). Sodium chloride inhibits the suppressive function of FOXP3+ regulatory T cells. *The Journal of clinical investigation*, **125**(11): 4212-4222. doi:10.1172/jci81151
- Herrada, A.A., Contreras, F.J., Marini, N.P., Amador, C.A., González, P.A., Cortés, C.M., Riedel, C.A., Carvajal, C.A., Figueroa, F., Michea, L.F., Fardella, C.E. und Kalergis, A.M. (2010). Aldosterone Promotes Autoimmune Damage by Enhancing Th17-Mediated Immunity. *The Journal of Immunology*, **184**(1): 191-202. doi:10.4049/jimmunol.0802886
- Heusel, J.W., Wesselschmidt, R.L., Shresta, S., Russell, J.H. und Ley, T.J. (1994). Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. *Cell*, **76**(6): 977-987. doi:10.1016/0092-8674(94)90376-x
- Higaki, S., Morohashi, M., Yamagishi, T. und Hasegawa, Y. (1999). Comparative study of staphylococci from the skin of atopic dermatitis patients and from healthy subjects. *Int J Dermatol*, **38**(4): 265-269. doi:10.1046/j.1365-4362.1999.00686.x
- Hiyama, A., Gajghate, S., Sakai, D., Mochida, J., Shapiro, I.M. und Risbud, M.V. (2009). Activation of TonEBP by calcium controls β 1,3-glucuronosyltransferase-I expression, a key regulator of glycosaminoglycan synthesis in cells of the intervertebral disc. *The Journal of biological chemistry*, **284**(15): 9824-9834. doi:10.1074/jbc.M807081200
- Howard, M., Farrar, J., Hilfiker, M., Johnson, B., Takatsu, K., Hamaoka, T. und Paul, W.E. (1982). Identification of a T cell-derived b cell growth factor distinct from interleukin 2. *J Exp Med*, **155**(3): 914-923. doi:10.1084/jem.155.3.914

- Huang, L., Zhang, X., Wang, M., Chen, Z., Yan, Y., Gu, W., Tan, J., Jiang, W. und Ji, W. (2019). Exosomes from Thymic Stromal Lymphopoietin-Activated Dendritic Cells Promote Th2 Differentiation through the OX40 Ligand. *Pathobiology*, **86**(2-3): 111-117. doi:10.1159/000493013
- Huber, M., Heink, S., Grothe, H., Guralnik, A., Reinhard, K., Elflein, K., Hünig, T., Mittrücker, H.W., Brüstle, A., Kamradt, T. und Lohoff, M. (2009). A Th17-like developmental process leads to CD8(+) Tc17 cells with reduced cytotoxic activity. *European journal of immunology*, **39**(7): 1716-1725. doi:10.1002/eji.200939412
- Huber, M., Heink, S., Pagenstecher, A., Reinhard, K., Ritter, J., Visekruna, A., Guralnik, A., Bollig, N., Jeltsch, K., Heinemann, C., Wittmann, E., Buch, T., Prazeres da Costa, O., Brüstle, A., Brenner, D., Mak, T.W., Mittrücker, H.W., Tackenberg, B., Kamradt, T. und Lohoff, M. (2013). IL-17A secretion by CD8+ T cells supports Th17-mediated autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of clinical investigation*, **123**(1): 247-260. doi:10.1172/jci63681
- Hwang, E.S., Szabo, S.J., Schwartzberg, P.L. und Glimcher, L.H. (2005). T helper cell fate specified by kinase-mediated interaction of T-bet with GATA-3. *Science (New York, N.Y.)*, **307**(5708): 430-433. doi:10.1126/science.1103336
- Ihle, J.N. (1996). STATs: Signal Transducers and Activators of Transcription. *Cell*, **84**(3): 331-334. doi:10.1016/S0092-8674(00)81277-5
- Intersalt Cooperative Research Group (1988). Intersalt: an international study of electrolyte excretion and blood pressure. Results for 24 hour urinary sodium and potassium excretion. Intersalt Cooperative Research Group. *BMJ*, **297**(6644): 319-328. doi:10.1136/bmj.297.6644.319
- Ivanov, I., McKenzie, B.S., Zhou, L., Tadokoro, C.E., Lepelley, A., Lafaille, J.J., Cua, D.J. und Littman, D.R. (2006). The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell*, **126**(6): 1121-1133. doi:10.1016/j.cell.2006.07.035
- Ivanova, L.N., Archibasova, V.K. und Shterental, I. (1978). Sodium-depositing function of the skin in white rats. *Fiziol Zh SSSR Im IM Sechenova*, **64**(3): 358-363.
- Iwasaki, A. und Medzhitov, R. (2015). Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nature immunology*, **16**(4): 343-353. doi:10.1038/ni.3123
- Janeway, C.A., Jr. (1992). The T cell receptor as a multicomponent signalling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation. *Annu Rev Immunol*, **10**: 645-674. doi:10.1146/annurev.iy.10.040192.003241
- Jantsch, J., Schatz, V., Friedrich, D., Schroder, A., Kopp, C., Siegert, I., Maronna, A., Wendelborn, D., Linz, P., Binger, K.J., Gebhardt, M., Heinig, M., Neubert, P., Fischer, F., Teufel, S., David, J.P., Neufert, C., Cavallaro, A., Rakova, N., Kuper, C., Beck, F.X., Neuhofer, W., Muller, D.N., Schuler, G., Uder, M., Bogdan, C., Luft, F.C. und Titze, J. (2015). Cutaneous Na⁺ storage strengthens the antimicrobial barrier function of the skin and boosts macrophage-driven host defense. *Cell metabolism*, **21**(3): 493-501. doi:10.1016/j.cmet.2015.02.003

- Jiang, Y., He, R., Jiang, Y., Liu, D., Tao, L., Yang, M., Lin, C., Shen, Y., Fu, X., Yang, J., Li, J., Huo, Y., Hua, R., Liu, W., Zhang, J., Shen, B., Zhang, Z. und Sun, Y. (2019). Transcription factor NFAT5 contributes to the glycolytic phenotype rewiring and pancreatic cancer progression via transcription of PGK1. *Cell Death Dis*, **10**(12): 948. doi:10.1038/s41419-019-2072-5
- Jung, S.M., Kim, Y., Kim, J., Jung, H., Yi, H., Rim, Y.A., Park, N., Kwok, S.K., Park, S.H. und Ju, J.H. (2019). Sodium Chloride Aggravates Arthritis via Th17 Polarization. *Yonsei Med J*, **60**(1): 88-97. doi:10.3349/ymj.2019.60.1.88
- Kagi, D., Vignaux, F., Ledermann, B., Burki, K., Depraetere, V., Nagata, S., Hengartner, H. und Golstein, P. (1994). Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science (New York, N.Y.)*, **265**(5171): 528-530. doi:10.1126/science.7518614
- Kaisar, M.M.M., Ritter, M., Del Fresno, C., Jónasdóttir, H.S., van der Ham, A.J., Pelgrom, L.R., Schramm, G., Layland, L.E., Sancho, D., Prazeres da Costa, C., Giera, M., Yazdanbakhsh, M. und Everts, B. (2018). Dectin-1/2-induced autocrine PGE2 signaling licenses dendritic cells to prime Th2 responses. *PLoS biology*, **16**(4): e2005504-e2005504. doi:10.1371/journal.pbio.2005504
- Kaplan, M.H., Schindler, U., Smiley, S.T. und Grusby, M.J. (1996). Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity*, **4**(3): 313-319. doi:10.1016/s1074-7613(00)80439-2
- Kim, J.A., Kim, S.H., Kim, I.S., Yu, D.Y., Kim, S.C., Lee, S.H., Lee, S.S., Yun, C.H., Choi, I.S. und Cho, K.K. (2018). Anti-Inflammatory Effects of a Mixture of Lactic Acid Bacteria and Sodium Butyrate in Atopic Dermatitis Murine Model. *J Med Food*, **21**(7): 716-725. doi:10.1089/jmf.2017.4116
- Kim, K.-D., Bae, S., Capece, T., Nedelkovska, H., de Rubio, R.G., Smrcka, A.V., Jun, C.-D., Jung, W., Park, B., Kim, T.-I. und Kim, M. (2017). Targeted calcium influx boosts cytotoxic T lymphocyte function in the tumour microenvironment. *Nature communications*, **8**: 15365-15365. doi:10.1038/ncomms15365
- Kim, K.W., Cho, M.L., Park, M.K., Yoon, C.H., Park, S.H., Lee, S.H. und Kim, H.Y. (2005). Increased interleukin-17 production via a phosphoinositide 3-kinase/Akt and nuclear factor kappaB-dependent pathway in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, **7**(1): R139-148. doi:10.1186/ar1470
- Kim, S., Prout, M., Ramshaw, H., Lopez, A.F., LeGros, G. und Min, B. (2010). Cutting edge: basophils are transiently recruited into the draining lymph nodes during helminth infection via IL-3, but infection-induced Th2 immunity can develop without basophil lymph node recruitment or IL-3. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, **184**(3): 1143-1147. doi:10.4049/jimmunol.0902447
- Kirkendall, A.M., Connor, W.E., Abboud, F., Rastogi, S.P., Anderson, T.A. und Fry, M. (1976). The effect of dietary sodium chloride on blood pressure, body fluids, electrolytes, renal function, and serum lipids of normotensive man. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, **87**(3): 411-434. doi:10.5555/uri:pii:0022214376904947
- Kleinewietfeld, M., Manzel, A., Titze, J., Kvakana, H., Yosef, N., Linker, R.A., Muller, D.N. und Hafler, D.A. (2013). Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH17 cells. *Nature*, **496**(7446): 518-522. doi:10.1038/nature11868

Klikowicz, S. (1886). Die Regelung der Salzmengen des Blutes. *Naturwissenschaftliche Rundschau - Archiv für Physiologie* (pp. 447-448.) Braunschweig: Friedrich Vieweg und Sohn.

Kmiecik, J., Poli, A., Brons, N.H., Waha, A., Eide, G.E., Enger, P., Zimmer, J. und Chekenya, M. (2013). Elevated CD3+ and CD8+ tumor-infiltrating immune cells correlate with prolonged survival in glioblastoma patients despite integrated immunosuppressive mechanisms in the tumor microenvironment and at the systemic level. *J Neuroimmunol*, **264**(1-2): 71-83. doi:10.1016/j.jneuroim.2013.08.013

Koga, C., Kabashima, K., Shiraishi, N., Kobayashi, M. und Tokura, Y. (2008). Possible pathogenic role of Th17 cells for atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*, **128**(11): 2625-2630. doi:10.1038/jid.2008.111

Komiyama, Y., Nakae, S., Matsuki, T., Nambu, A., Ishigame, H., Kakuta, S., Sudo, K. und Iwakura, Y. (2006). IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, **177**(1): 566-573. doi:10.4049/jimmunol.177.1.566

Kopp, C., Linz, P., Dahlmann, A., Hammon, M., Jantsch, J., Muller, D.N., Schmieder, R.E., Cavallaro, A., Eckardt, K.U., Uder, M., Luft, F.C. und Titze, J. (2013). ²³Na magnetic resonance imaging-determined tissue sodium in healthy subjects and hypertensive patients. *Hypertension*, **61**(3): 635-640. doi:10.1161/hypertensionaha.111.00566

Kopp, C., Linz, P., Wachsmuth, L., Dahlmann, A., Horbach, T., Schofl, C., Renz, W., Santoro, D., Niendorf, T., Muller, D.N., Neining, M., Cavallaro, A., Eckardt, K.U., Schmieder, R.E., Luft, F.C., Uder, M. und Titze, J. (2012). ²³Na magnetic resonance imaging of tissue sodium. *Hypertension*, **59**(1): 167-172. doi:10.1161/hypertensionaha.111.183517

Kretschmar, M. und Massagué, J. (1998). SMADs: mediators and regulators of TGF- β signaling. *Current Opinion in Genetics & Development*, **8**(1): 103-111. doi:10.1016/S0959-437X(98)80069-5

Kurebayashi, Y., Nagai, S., Ikejiri, A., Ohtani, M., Ichiyama, K., Baba, Y., Yamada, T., Egami, S., Hoshii, T., Hirao, A., Matsuda, S. und Koyasu, S. (2012). PI3K-Akt-mTORC1-S6K1/2 Axis Controls Th17 Differentiation by Regulating Gfi1 Expression and Nuclear Translocation of ROR γ . *Cell Reports*, **1**(4): 360-373. doi:10.1016/j.celrep.2012.02.007

Kurtz, A. (2014). Natriumbilanz. In P.C. Heinrich, M. Müller und L. Graeve (eds.), *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie* (pp. 822-823.) Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.

Kurtz, A. und Wagner, C. (2016). Regulation des Wasser- und Elektrolythaushalts. In J. Behrends, J. Bischofberger, R. Deutzmann, H. Ehmke, S. Frings, S. Grissmer, M. Hoth, A. Kurtz, J. Leipziger, F. Müller, C. Pedain, J. Rettig, C. Wagner und E. Wischmeyer (eds.), *Duale Reihe Physiologie* (pp. 321-326.) Stuttgart: Thieme.

Lal, G., Zhang, N., van der Touw, W., Ding, Y., Ju, W., Bottinger, E.P., Reid, S.P., Levy, D.E. und Bromberg, J.S. (2009). Epigenetic regulation of Foxp3 expression in regulatory T cells by DNA methylation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, **182**(1): 259-273. doi:10.4049/jimmunol.182.1.259

- Langrish, C.L., Chen, Y., Blumenschein, W.M., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J.D., McClanahan, T., Kastelein, R.A. und Cua, D.J. (2005). IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med*, **201**(2): 233-240. doi:10.1084/jem.20041257
- Lee, E., Lee, S.-Y., Kang, M.-J., Kim, K., Won, S., Kim, B.-J., Choi, K.Y., Kim, B.-S., Cho, H.-J., Kim, Y., Yang, S.I. und Hong, S.-J. (2016). Clostridia in the gut and onset of atopic dermatitis via eosinophilic inflammation. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, **117**(1): 91-92.e91. doi:10.1016/j.anai.2016.04.019
- Lee, J.H., Suh, J.H., Choi, S.Y., Kang, H.J., Lee, H.H., Ye, B.J., Lee, G.R., Jung, S.W., Kim, C.J., Lee-Kwon, W., Park, J., Myung, K., Park, N.H. und Kwon, H.M. (2019). Tonicity-responsive enhancer-binding protein promotes hepatocellular carcinogenesis, recurrence and metastasis. *Gut*, **68**(2): 347-358. doi:10.1136/gutjnl-2017-315348
- Lee, K., Gudapati, P., Dragovic, S., Spencer, C., Joyce, S., Killeen, N., Magnuson, M.A. und Boothby, M. (2010). Mammalian target of rapamycin protein complex 2 regulates differentiation of Th1 and Th2 cell subsets via distinct signaling pathways. *Immunity*, **32**(6): 743-753. doi:10.1016/j.immuni.2010.06.002
- Lee, Y.K., Turner, H., Maynard, C.L., Oliver, J.R., Chen, D., Elson, C.O. und Weaver, C.T. (2009). Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage. *Immunity*, **30**(1): 92-107. doi:10.1016/j.immuni.2008.11.005
- Lerner, A., Jeremias, P. und Matthias, T. (2015). The World Incidence and Prevalence of Autoimmune Diseases is Increasing. *International Journal of Celiac Disease*, **3**(4): 151-155. doi:10.12691/ijcd-3-4-8
- Li, B., Tournier, C., Davis, R.J. und Flavell, R.A. (1999). Regulation of IL-4 expression by the transcription factor JunB during T helper cell differentiation. *The EMBO journal*, **18**(2): 420-432. doi:10.1093/emboj/18.2.420
- Liang, X., Lan, C., Jiao, G., Fu, W., Long, X., An, Y., Wang, K., Zhou, J., Chen, T., Li, Y., Xu, J., Huang, Q., Xu, B. und Xiao, J. (2017). Therapeutic inhibition of SGK1 suppresses colorectal cancer. *Exp Mol Med*, **49**(11): e399-e399. doi:10.1038/emm.2017.184
- Lim, S., Bae, E., Kim, H.S., Kim, T.A., Byun, K., Kim, B., Hong, S., Im, J.P., Yun, C., Lee, B., Lee, B., Park, S.H., Letterio, J. und Kim, S.J. (2012). TRAF6 mediates IL-1 β /LPS-induced suppression of TGF- β signaling through its interaction with the type III TGF- β receptor. *PloS one*, **7**(3): e32705. doi:10.1371/journal.pone.0032705
- Liu, H., Liu, Q., Hua, L. und Pan, J. (2018a). Inhibition of transient receptor potential melastatin 8 alleviates airway inflammation and remodeling in a murine model of asthma with cold air stimulus. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, **50**(5): 499-506. doi:10.1093/abbs/gmy033
- Liu, J., Li, W., Zhu, W., He, W., Zhao, H., Xiang, Y., Liu, C. und Wu, W. (2018b). Chronic intermittent hypoxia promotes the development of experimental non-alcoholic steatohepatitis by modulating Treg/Th17 differentiation. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, **50**(12): 1200-1210. doi:10.1093/abbs/gmy131

- Lochner, M., Peduto, L., Cherrier, M., Sawa, S., Langa, F., Varona, R., Riethmacher, D., Si-Tahar, M., Di Santo, J.P. und Eberl, G. (2008). In vivo equilibrium of proinflammatory IL-17+ and regulatory IL-10+ Foxp3+ RORgamma t+ T cells. *J Exp Med*, **205**(6): 1381-1393. doi:10.1084/jem.20080034
- Lock, C., Hermans, G., Pedotti, R., Brendolan, A., Schadt, E., Garren, H., Langer-Gould, A., Strober, S., Cannella, B., Allard, J., Klonowski, P., Austin, A., Lad, N., Kaminski, N., Galli, S.J., Oksenberg, J.R., Raine, C.S., Heller, R. und Steinman, L. (2002). Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nature medicine*, **8**(5): 500-508. doi:10.1038/nm0502-500
- Loomis, W.H., Namiki, S., Hoyt, D.B. und Junger, W.G. (2001). Hypertonicity rescues T cells from suppression by trauma-induced anti-inflammatory mediators. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, **281**(3): C840-C848. doi:10.1152/ajpcell.2001.281.3.C840
- Lowe, A.J., Leung, D.Y.M., Tang, M.L.K., Su, J.C. und Allen, K.J. (2018). The skin as a target for prevention of the atopic march. *Ann Allergy Asthma Immunol*, **120**(2): 145-151. doi:10.1016/j.anai.2017.11.023
- Lu, C., Klement, J.D., Ibrahim, M.L., Xiao, W., Redd, P.S., Nayak-Kapoor, A., Zhou, G. und Liu, K. (2019). Type I interferon suppresses tumor growth through activating the STAT3-granzyme B pathway in tumor-infiltrating cytotoxic T lymphocytes. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, **7**(1): 157. doi:10.1186/s40425-019-0635-8
- Lukens, M.V., Claassen, E.A.W., de Graaff, P.M.A., van Dijk, M.E.A., Hoogerhout, P., Toebes, M., Schumacher, T.N., van der Most, R.G., Kimpen, J.L.L. und van Bleek, G.M. (2006). Characterization of the CD8+ T cell responses directed against respiratory syncytial virus during primary and secondary infection in C57BL/6 mice. *Virology*, **352**(1): 157-168. doi:10.1016/j.virol.2006.04.023
- Luo, Y., Xue, Y., Wang, J., Dang, J., Fang, Q., Huang, G., Olsen, N. und Zheng, S.G. (2019). Negligible Effect of Sodium Chloride on the Development and Function of TGF- β -Induced CD4(+) Foxp3(+) Regulatory T Cells. *Cell Rep*, **26**(7): 1869-1879.e1863. doi:10.1016/j.celrep.2019.01.066
- Machnik, A., Neuhofer, W., Jantsch, J., Dahlmann, A., Tammela, T., Machura, K., Park, J.K., Beck, F.X., Muller, D.N., Derer, W., Goss, J., Ziomber, A., Dietsch, P., Wagner, H., van Rooijen, N., Kurtz, A., Hilgers, K.F., Alitalo, K., Eckardt, K.U., Luft, F.C., Kerjaschki, D. und Titze, J. (2009). Macrophages regulate salt-dependent volume and blood pressure by a vascular endothelial growth factor-C-dependent buffering mechanism. *Nature medicine*, **15**(5): 545-552. doi:10.1038/nm.1960
- Macintyre, A.N., Gerriets, V.A., Nichols, A.G., Michalek, R.D., Rudolph, M.C., Deoliveira, D., Anderson, S.M., Abel, E.D., Chen, B.J., Hale, L.P. und Rathmell, J.C. (2014). The glucose transporter Glut1 is selectively essential for CD4 T cell activation and effector function. *Cell metabolism*, **20**(1): 61-72. doi:10.1016/j.cmet.2014.05.004
- Maier, E., Duschl, A. und Horejs-Hoeck, J. (2012). STAT6-dependent and -independent mechanisms in Th2 polarization. *European journal of immunology*, **42**(11): 2827-2833. doi:10.1002/eji.201242433
- Maier, L.M. und Hafler, D.A. (2009). Autoimmunity risk alleles in costimulation pathways. *Immunological Reviews*, **229**(1): 322-336. doi:10.1111/j.1600-065X.2009.00777.x

- Mailer, R.K.W., Joly, A.-L., Liu, S., Elias, S., Tegner, J. und Andersson, J. (2015). IL-1 β promotes Th17 differentiation by inducing alternative splicing of FOXP3. *Scientific reports*, **5**: 14674-14674. doi:10.1038/srep14674
- Malaisse, J., Bourguignon, V., De Vuyst, E., Lambert de Rouvroit, C., Nikkels, A.F., Flamion, B. und Poumay, Y. (2014). Hyaluronan metabolism in human keratinocytes and atopic dermatitis skin is driven by a balance of hyaluronan synthases 1 and 3. *J Invest Dermatol*, **134**(8): 2174-2182. doi:10.1038/jid.2014.147
- Malek, T.R., Yu, A., Vincek, V., Scibelli, P. und Kong, L. (2002). CD4 Regulatory T Cells Prevent Lethal Autoimmunity in IL-2R β -Deficient Mice: Implications for the Nonredundant Function of IL-2. *Immunity*, **17**(2): 167-178. doi:10.1016/S1074-7613(02)00367-9
- Mattes, R.D. und Donnelly, D. (1991). Relative contributions of dietary sodium sources. *J Am Coll Nutr*, **10**(4): 383-393. doi:10.1080/07315724.1991.10718167
- Matthias, J., Heink, S., Picard, F., Zeiträg, J., Kolz, A., Chao, Y.-Y., Soll, D., de Almeida, G.P., Glasmacher, E., Jacobsen, I.D., Riedel, T., Peters, A., Floess, S., Huehn, J., Baumjohann, D., Huber, M., Korn, T. und Zielinski, C.E. (2020). Salt generates antiinflammatory Th17 cells but amplifies pathogenicity in proinflammatory cytokine microenvironments. *The Journal of clinical investigation*, **130**(9). doi:10.1172/JCI137786
- Matthias, J., Maul, J., Noster, R., Meinl, H., Chao, Y.Y., Gerstenberg, H., Jeschke, F., Gasparoni, G., Welle, A., Walter, J., Nordstrom, K., Eberhardt, K., Renisch, D., Donakonda, S., Knolle, P., Soll, D., Grabbe, S., Garzorz-Stark, N., Eyerich, K., Biedermann, T., Baumjohann, D. und Zielinski, C.E. (2019). Sodium chloride is an ionic checkpoint for human TH2 cells and shapes the atopic skin microenvironment. *Sci Transl Med*, **11**(480). doi:10.1126/scitranslmed.aau0683
- Matthias, J. und Zielinski, C.E. (2019). Shaping the diversity of Th2 cell responses in epithelial tissues and its potential for allergy treatment. *European journal of immunology*, **49**(9): 1321-1333. doi:10.1002/eji.201848011
- McGeachy, M.J., Bak-Jensen, K.S., Chen, Y., Tato, C.M., Blumenschein, W., McClanahan, T. und Cua, D.J. (2007). TGF- β and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain TH-17 cell-mediated pathology. *Nature immunology*, **8**(12): 1390-1397. doi:10.1038/ni1539
- McKarns, S.C., Schwartz, R.H. und Kaminski, N.E. (2004). Smad3 Is Essential for TGF- β 1 to Suppress IL-2 Production and TCR-Induced Proliferation, but Not IL-2-Induced Proliferation. *The Journal of Immunology*, **172**(7): 4275-4284. doi:10.4049/jimmunol.172.7.4275
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. und Janeway, C.A., Jr. (1997). A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, **388**(6640): 394-397. doi:10.1038/41131
- Meier, P. und Vogt, B. (2014). Salz und Niereninsuffizienz. *Swiss Medical Forum*, **14**(04): 50-53.
- Melief, C.J. (1992). Tumor eradication by adoptive transfer of cytotoxic T lymphocytes. *Adv Cancer Res*, **58**: 143-175. doi:10.1016/s0065-230x(08)60294-8

- Mempel, T.R., Pittet, M.J., Khazaie, K., Weninger, W., Weissleder, R., von Boehmer, H. und von Andrian, U.H. (2006). Regulatory T cells reversibly suppress cytotoxic T cell function independent of effector differentiation. *Immunity*, **25**(1): 129-141. doi:10.1016/j.immuni.2006.04.015
- Meyer zu Horste, G., Wu, C., Wang, C., Cong, L., Pawlak, M., Lee, Y., Elyaman, W., Xiao, S., Regev, A. und Kuchroo, V.K. (2016). RBPJ Controls Development of Pathogenic Th17 Cells by Regulating IL-23 Receptor Expression. *Cell Reports*, **16**(2): 392-404. doi:10.1016/j.celrep.2016.05.088
- Miranda, P.M., De Palma, G., Serkis, V., Lu, J., Louis-Auguste, M.P., McCarville, J.L., Verdu, E.F., Collins, S.M. und Bercik, P. (2018). High salt diet exacerbates colitis in mice by decreasing Lactobacillus levels and butyrate production. *Microbiome*, **6**(1): 57. doi:10.1186/s40168-018-0433-4
- Missiakas, D.M. und Schneewind, O. (2013). Growth and laboratory maintenance of Staphylococcus aureus. *Curr Protoc Microbiol*, **Chapter 9**: Unit-9C.1. doi:10.1002/9780471729259.mc09c01s28
- Miyake, S., Kim, S., Suda, W., Oshima, K., Nakamura, M., Matsuoka, T., Chihara, N., Tomita, A., Sato, W., Kim, S.W., Morita, H., Hattori, M. und Yamamura, T. (2015). Dysbiosis in the Gut Microbiota of Patients with Multiple Sclerosis, with a Striking Depletion of Species Belonging to Clostridia XIVa and IV Clusters. *PloS one*, **10**(9): e0137429. doi:10.1371/journal.pone.0137429
- Monteleone, G., Kumberova, A., Croft, N.M., McKenzie, C., Steer, H.W. und MacDonald, T.T. (2001). Blocking Smad7 restores TGF-beta1 signaling in chronic inflammatory bowel disease. *The Journal of clinical investigation*, **108**(4): 601-609. doi:10.1172/jci12821
- Mosier, D.E. und Coppelson, L.W. (1968). A three-cell interaction required for the induction of the primary immune response in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **61**(2): 542-547. doi:10.1073/pnas.61.2.542
- Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A. und Coffman, R.L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, **136**(7): 2348-2357.
- Müller, D.N., Wilck, N., Haase, S., Kleinewietfeld, M. und Linker, R.A. (2019). Sodium in the microenvironment regulates immune responses and tissue homeostasis. *Nature Reviews Immunology*, **19**(4): 243-254. doi:10.1038/s41577-018-0113-4
- Müller-Plathe, O. (2019a). Kalium. In A.M. Gressner und T. Arndt (eds.), *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik* (pp. 1306-1308.) Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Müller-Plathe, O. (2019b). Natrium. In A.M. Gressner und T. Arndt (eds.), *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik* (pp. 1724-1727.) Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Murphy, K. und Weaver, C. (2017). Cytokines induce the differentiation of naive CD4 T cells down distinct effector pathways. In K. Murphy und C. Weaver (eds.), *Janeway's immunobiology* (pp. 375-277.) New York: Garland Science.

Nabholz, M. und MacDonald, H.R. (1983). Cytolytic T lymphocytes. *Annu Rev Immunol*, **1**: 273-306. doi:10.1146/annurev.iy.01.040183.001421

Nakao, M., Sugaya, M., Takahashi, N., Otobe, S., Nakajima, R., Oka, T., Kabasawa, M., Suga, H., Morimura, S., Miyagaki, T., Fujita, H., Asano, Y. und Sato, S. (2016). Increased syndecan-4 expression in sera and skin of patients with atopic dermatitis. *Arch Dermatol Res*, **308**(9): 655-660. doi:10.1007/s00403-016-1683-2

Nakatsuji, T., Chen, T.H., Two, A.M., Chun, K.A., Narala, S., Geha, R.S., Hata, T.R. und Gallo, R.L. (2016). Staphylococcus aureus Exploits Epidermal Barrier Defects in Atopic Dermatitis to Trigger Cytokine Expression. *The Journal of investigative dermatology*, **136**(11): 2192-2200. doi:10.1016/j.jid.2016.05.127

Neubert, P., Weichselbaum, A., Reitingger, C., Schatz, V., Schröder, A., Ferdinand, J.R., Simon, M., Bär, A.L., Brochhausen, C., Gerlach, R.G., Tomiuk, S., Hammer, K., Wagner, S., van Zandbergen, G., Binger, K.J., Müller, D.N., Kitada, K., Clatworthy, M.R., Kurts, C., Titze, J., Abdullah, Z. und Jantsch, J. (2019). HIF1A and NFAT5 coordinate Na(+)-boosted antibacterial defense via enhanced autophagy and autolysosomal targeting. *Autophagy*, **15**(11): 1899-1916. doi:10.1080/15548627.2019.1596483

Nguyen, M.K. und Kurtz, I. (2006). Quantitative interrelationship between Gibbs-Donnan equilibrium, osmolality of body fluid compartments, and plasma water sodium concentration. *Journal of Applied Physiology*, **100**(4): 1293-1300. doi:10.1152/jappphysiol.01274.2005

Nicholas, D.A., Proctor, E.A., Agrawal, M., Belkina, A.C., Van Nostrand, S.C., Panneerseelan-Bharath, L., Jones, A.R.t., Raval, F., Ip, B.C., Zhu, M., Cacicedo, J.M., Habib, C., Sainz-Rueda, N., Persky, L., Sullivan, P.G., Corkey, B.E., Apovian, C.M., Kern, P.A., Lauffenburger, D.A. und Nikolajczyk, B.S. (2019). Fatty Acid Metabolites Combine with Reduced β Oxidation to Activate Th17 Inflammation in Human Type 2 Diabetes. *Cell metabolism*, **30**(3): 447-461.e445. doi:10.1016/j.cmet.2019.07.004

Norment, A.M., Salter, R.D., Parham, P., Engelhard, V.H. und Littman, D.R. (1988). Cell-cell adhesion mediated by CD8 and MHC class I molecules. *Nature*, **336**(6194): 79-81. doi:10.1038/336079a0

Noster, R., de Koning, H.D., Maier, E., Prelog, M., Lainka, E. und Zielinski, C.E. (2016). Dysregulation of proinflammatory versus anti-inflammatory human T(H)17 cell functionalities in the autoinflammatory Schnitzler syndrome. *J Allergy Clin Immunol*, **138**(4): 1161-1169.e1166. doi:10.1016/j.jaci.2015.12.1338

Noster, R., Riedel, R., Mashreghi, M.F., Radbruch, H., Harms, L., Haftmann, C., Chang, H.D., Radbruch, A. und Zielinski, C.E. (2014). IL-17 and GM-CSF expression are antagonistically regulated by human T helper cells. *Sci Transl Med*, **6**(241): 241ra280. doi:10.1126/scitranslmed.3008706

Nunes-Cabaço, H., Caramalho, I., Sepúlveda, N. und Sousa, A.E. (2011). Differentiation of human thymic regulatory T cells at the double positive stage. *European journal of immunology*, **41**(12): 3604-3614. doi:10.1002/eji.201141614

Ohnmacht, C., Park, J.H., Cording, S., Wing, J.B., Atarashi, K., Obata, Y., Gaboriau-Routhiau, V., Marques, R., Dulauroy, S., Fedoseeva, M., Busslinger, M., Cerf-Bensussan, N., Boneca, I.G., Voehringer, D., Hase, K., Honda, K., Sakaguchi, S. und Eberl, G. (2015). The microbiota regulates type 2 immunity through ROR γ t⁺ T cells. *Science (New York, N.Y.)*, **349**(6251): 989-993. doi:10.1126/science.aac4263

Ono, E., Murota, H., Mori, Y., Yoshioka, Y., Nomura, Y., Munetsugu, T., Yokozeki, H. und Katayama, I. (2018). Sweat glucose and GLUT2 expression in atopic dermatitis: Implication for clinical manifestation and treatment. *PLoS one*, **13**(4): e0195960-e0195960. doi:10.1371/journal.pone.0195960

Ortiz, R.A. und Barnes, K.C. (2015). Genetics of allergic diseases. *Immunol Allergy Clin North Am*, **35**(1): 19-44. doi:10.1016/j.iac.2014.09.014

Ouwerkerk, R., Bleich, K.B., Gillen, J.S., Pomper, M.G. und Bottomley, P.A. (2003). Tissue Sodium Concentration in Human Brain Tumors as Measured with ²³Na MR Imaging. *Radiology*, **227**(2): 529-537. doi:10.1148/radiol.2272020483

Ouwerkerk, R., Jacobs, M.A., Macura, K.J., Wolff, A.C., Stearns, V., Mezban, S.D., Khouri, N.F., Bluemke, D.A. und Bottomley, P.A. (2007). Elevated tissue sodium concentration in malignant breast lesions detected with non-invasive ²³Na MRI. *Breast Cancer Research and Treatment*, **106**(2): 151-160. doi:10.1007/s10549-006-9485-4

Ouyang, W., Löhning, M., Gao, Z., Assenmacher, M., Ranganath, S., Radbruch, A. und Murphy, K.M. (2000). Stat6-independent GATA-3 autoactivation directs IL-4-independent Th2 development and commitment. *Immunity*, **12**(1): 27-37. doi:10.1016/s1074-7613(00)80156-9

Paling, D., Solanky, B.S., Riemer, F., Tozer, D.J., Wheeler-Kingshott, C.A.M., Kapoor, R., Golay, X. und Miller, D.H. (2013). Sodium accumulation is associated with disability and a progressive course in multiple sclerosis. *Brain*, **136**(7): 2305-2317. doi:10.1093/brain/awt149

Pan, H., Lv, W., Li, Z. und Han, W. (2019). SGK1 protein expression is a prognostic factor of lung adenocarcinoma that regulates cell proliferation and survival. *Int J Clin Exp Pathol*, **12**(2): 391-408.

Parfentjev, I.A. und Catelli, A.R. (1964). Tolerance of Staphylococcus aureus to Sodium Chloride. *Journal of bacteriology*, **88**: 1-3.

Park, H.-Y., Kim, C.-R., Huh, I.-S., Jung, M.-Y., Seo, E.-Y., Park, J.-H., Lee, D.-Y. und Yang, J.-M. (2013). Staphylococcus aureus Colonization in Acute and Chronic Skin Lesions of Patients with Atopic Dermatitis. *Ann Dermatol*, **25**(4): 410-416. doi:10.5021/ad.2013.25.4.410

Park, Y.D., Lyou, Y.J., Lee, K.J., Lee, D.Y. und Yang, J.M. (2006). Towards profiling the gene expression of fibroblasts from atopic dermatitis patients: human 8K complementary DNA microarray. *Clin Exp Allergy*, **36**(5): 649-657. doi:10.1111/j.1365-2222.2006.02480.x

Pawankar, R.S., Sánchez-Borges, M., Bonini, S. und Kaliner, M.A. (2013). Allergic Rhinitis. In R. Pawankar, G.W. Canonica, S.T. Holgate, R.F. Lockey und M.S. Blaiss (eds.), *WAO White Book on Allergy: Update 2013* (p. 27.) Milwaukee, Wisconsin: World Allergy Organization.

Peine, M., Rausch, S., Helmstetter, C., Fröhlich, A., Hegazy, A.N., Kühl, A.A., Grevelding, C.G., Höfer, T., Hartmann, S. und Löhning, M. (2013). Stable T-bet(+)/GATA-3(+) Th1/Th2 hybrid cells arise in vivo, can develop directly from naive precursors, and limit immunopathologic inflammation. *PLoS Biol*, **11**(8): e1001633. doi:10.1371/journal.pbio.1001633

- Petrie, H.T., Livak, F., Schatz, D.G., Strasser, A., Crispe, I.N. und Shortman, K. (1993). Multiple rearrangements in T cell receptor alpha chain genes maximize the production of useful thymocytes. *J Exp Med*, **178**(2): 615-622. doi:10.1084/jem.178.2.615
- Phythian-Adams, A.T., Cook, P.C., Lundie, R.J., Jones, L.H., Smith, K.A., Barr, T.A., Hochweller, K., Anderton, S.M., Hämmerling, G.J., Maizels, R.M. und MacDonald, A.S. (2010). CD11c depletion severely disrupts Th2 induction and development in vivo. *J Exp Med*, **207**(10): 2089-2096. doi:10.1084/jem.20100734
- Piersma, S.J., Jordanova, E.S., van Poelgeest, M.I., Kwappenberg, K.M., van der Hulst, J.M., Drijfhout, J.W., Melief, C.J., Kenter, G.G., Fleuren, G.J., Offringa, R. und van der Burg, S.H. (2007). High number of intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes is associated with the absence of lymph node metastases in patients with large early-stage cervical cancer. *Cancer Res*, **67**(1): 354-361. doi:10.1158/0008-5472.Can-06-3388
- Poser, S., Stickel, B., Krtsch, U., Burckhardt, D. und Nordman, B. (1989). Increasing Incidence of Multiple Sclerosis in South Lower Saxony, Germany. *Neuroepidemiology*, **8**(4): 207-213. doi:10.1159/000110184
- Raff, M.C. (1970). Role of Thymus-derived Lymphocytes in the Secondary Humoral Immune Response in Mice. *Nature*, **226**(5252): 1257-1258. doi:10.1038/2261257a0
- Rakova, N., Juttner, K., Dahlmann, A., Schroder, A., Linz, P., Kopp, C., Rauh, M., Goller, U., Beck, L., Agureev, A., Vassilieva, G., Lenkova, L., Johannes, B., Wabel, P., Moissl, U., Vienken, J., Gerzer, R., Eckardt, K.U., Muller, D.N., Kirsch, K., Morukov, B., Luft, F.C. und Titze, J. (2013). Long-term space flight simulation reveals infradian rhythmicity in human Na(+) balance. *Cell metabolism*, **17**(1): 125-131. doi:10.1016/j.cmet.2012.11.013
- Raphael, I., Nalawade, S., Eagar, T.N. und Forsthuber, T.G. (2015). T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine*, **74**(1): 5-17. doi:10.1016/j.cyto.2014.09.011
- Raymond, M., Van, V.Q., Wakahara, K., Rubio, M. und Sarfati, M. (2011). Lung dendritic cells induce T(H)17 cells that produce T(H)2 cytokines, express GATA-3, and promote airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol*, **128**(1): 192-201.e196. doi:10.1016/j.jaci.2011.04.029
- Reinherz, E.L., Kung, P.C., Goldstein, G. und Schlossman, S.F. (1979). Separation of functional subsets of human T cells by a monoclonal antibody. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **76**(8): 4061-4065. doi:10.1073/pnas.76.8.4061
- Reits, E.A.J., Vos, J.C., Grommé, M. und Neefjes, J. (2000). The major substrates for TAP in vivo are derived from newly synthesized proteins. *Nature*, **404**(6779): 774-778. doi:10.1038/35008103
- Rezaei, N., Amirghofran, Z., Nikseresht, A., Ashjzade, N., Zoghi, S., Tahvili, S. und Kamali-Sarvestani, E. (2016). In Vitro Effects of Sodium Benzoate on Th1/Th2 Deviation in Patients with Multiple Sclerosis. *Immunological Investigations*, **45**(7): 679-691. doi:10.1080/08820139.2016.1208216

Richards, D.M., Delacher, M., Goldfarb, Y., Kägebein, D., Hofer, A.-C., Abramson, J. und Feuerer, M. (2015). Chapter Eight - Treg Cell Differentiation: From Thymus to Peripheral Tissue. In A. Liston (ed.), *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (pp. 175-205.): Academic Press.

Robertson, M.J. und Ritz, J. (1990). Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood*, **76**(12): 2421-2438. doi:10.1182/blood.V76.12.2421.2421

Rouvier, E., Luciani, M.F. und Golstein, P. (1993). Fas involvement in Ca²⁺-independent T cell-mediated cytotoxicity. *J Exp Med*, **177**(1): 195-200. doi:10.1084/jem.177.1.195

Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. und Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, **155**(3): 1151-1164.

Salgado, E., Bes-Rastrollo, M., de Irala, J., Carmona, L. und Gómez-Reino, J.J. (2015). High Sodium Intake Is Associated With Self-Reported Rheumatoid Arthritis: A Cross Sectional and Case Control Analysis Within the SUN Cohort. *Medicine (Baltimore)*, **94**(37): e924. doi:10.1097/md.0000000000000924

Sallusto, F., Geginat, J. und Lanzavecchia, A. (2004). Central Memory and Effector Memory T Cell Subsets: Function, Generation, and Maintenance. *Annu Rev Immunol*, **22**(1): 745-763. doi:10.1146/annurev.immunol.22.012703.104702

Särnstrand, B., Brattsand, R. und Malmström, A. (1982). Effect of Glucocorticoids on Glycosaminoglycan Metabolism in Cultured Human Skin Fibroblasts. *Journal of Investigative Dermatology*, **79**(6): 412-417. doi:10.1111/1523-1747.ep12530360

Schuksz, M., Fuster, M.M., Brown, J.R., Crawford, B.E., Ditto, D.P., Lawrence, R., Glass, C.A., Wang, L., Tor, Y. und Esko, J.D. (2008). Surfen, a small molecule antagonist of heparan sulfate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105**(35): 13075-13080. doi:10.1073/pnas.0805862105

Schwab, A. und Oberleithner, H. (2019). Die Natriumbilanz. In H.-C. Pape, A. Kurtz und S. Silbernagl (eds.), *Physiologie* (pp. 447-455.) Stuttgart: Thieme.

Shi, L., Kam, C.M., Powers, J.C., Aebersold, R. und Greenberg, A.H. (1992). Purification of three cytotoxic lymphocyte granule serine proteases that induce apoptosis through distinct substrate and target cell interactions. *J Exp Med*, **176**(6): 1521-1529. doi:10.1084/jem.176.6.1521

Shi, L.Z., Wang, R., Huang, G., Vogel, P., Neale, G., Green, D.R. und Chi, H. (2011). HIF1alpha-dependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of TH17 and Treg cells. *J Exp Med*, **208**(7): 1367-1376. doi:10.1084/jem.20110278

Shurin, M.R. (2012). Cancer as an immune-mediated disease. *Immunotargets Ther*, **1**: 1-6. doi:10.2147/itt.S29834

- Snook, J.P., Kim, C. und Williams, M.A. (2018). TCR signal strength controls the differentiation of CD4(+) effector and memory T cells. *Sci Immunol*, **3**(25): eaas9103. doi:10.1126/sciimmunol.aas9103
- Söderström, M., Hillert, J., Link, J., Navikas, V., Fredrikson, S. und Link, H. (1995). Expression of IFN-gamma, IL-4, and TGF-beta in multiple sclerosis in relation to HLA-Dw2 phenotype and stage of disease. *Mult Scler*, **1**(3): 173-180. doi:10.1177/135245859500100308
- Solis, A.G., Bielecki, P., Steach, H.R., Sharma, L., Harman, C.C.D., Yun, S., de Zoete, M.R., Warnock, J.N., To, S.D.F., York, A.G., Mack, M., Schwartz, M.A., Dela Cruz, C.S., Palm, N.W., Jackson, R. und Flavell, R.A. (2019). Mechanosensation of cyclical force by PIEZO1 is essential for innate immunity. *Nature*, **573**(7772): 69-74. doi:10.1038/s41586-019-1485-8
- Stefka, A.T., Feehley, T., Tripathi, P., Qiu, J., McCoy, K., Mazmanian, S.K., Tjota, M.Y., Seo, G.-Y., Cao, S., Theriault, B.R., Antonopoulos, D.A., Zhou, L., Chang, E.B., Fu, Y.-X. und Nagler, C.R. (2014). Commensal bacteria protect against food allergen sensitization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **111**(36): 13145-13150. doi:10.1073/pnas.1412008111
- Steinman, L. (2007). A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nature medicine*, **13**(2): 139-145. doi:10.1038/nm1551
- Stephenson, E.L., Mishra, M.K., Moussienko, D., Laflamme, N., Rivest, S., Ling, C.C. und Yong, V.W. (2018). Chondroitin sulfate proteoglycans as novel drivers of leucocyte infiltration in multiple sclerosis. *Brain*, **141**(4): 1094-1110. doi:10.1093/brain/awy033
- Stritesky, G.L., Muthukrishnan, R., Sehra, S., Goswami, R., Pham, D., Travers, J., Nguyen, E.T., Levy, D.E. und Kaplan, M.H. (2011). The Transcription Factor STAT3 Is Required for T Helper 2 Cell Development. *Immunity*, **34**(1): 39-49. doi:10.1016/j.immuni.2010.12.013
- Stys, P.K., Waxman, S.G. und Ransom, B.R. (1992). Ionic mechanisms of anoxic injury in mammalian CNS white matter: role of Na⁺ channels and Na⁽⁺⁾-Ca²⁺ exchanger. *J Neurosci*, **12**(2): 430-439. doi:10.1523/jneurosci.12-02-00430.1992
- Suárez-Fariñas, M., Dhingra, N., Gittler, J., Shemer, A., Cardinale, I., de Guzman Strong, C., Krueger, J.G. und Guttman-Yassky, E. (2013). Intrinsic atopic dermatitis shows similar TH2 and higher TH17 immune activation compared with extrinsic atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*, **132**(2): 361-370. doi:10.1016/j.jaci.2013.04.046
- Szabo, G. und Magyar, Z. (1982). Electrolyte concentrations in subcutaneous tissue fluid and lymph. *Lymphology*, **15**(4): 174-177.
- Tajima, M., Wakita, D., Satoh, T., Kitamura, H. und Nishimura, T. (2011). IL-17/IFN- γ double producing CD8⁺ T (Tc17/IFN- γ) cells: A novel cytotoxic T-cell subset converted from Tc17 cells by IL-12. *International immunology*, **23**(12): 751-759. doi:10.1093/intimm/dxr086

- Tanaka, A., Minoguchi, K., Oda, N., Yokoe, T., Matsuo, H., Okada, S., Tasaki, T. und Adachi, M. (2002). Inhibitory effect of lidocaine on T cells from patients with allergic asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **109**(3): 485-490. doi:10.1067/mai.2002.122155
- Tanaka, S., Suto, A., Iwamoto, T., Kashiwakuma, D., Kagami, S., Suzuki, K., Takatori, H., Tamachi, T., Hirose, K., Onodera, A., Suzuki, J., Ohara, O., Yamashita, M., Nakayama, T. und Nakajima, H. (2014). Sox5 and c-Maf cooperatively induce Th17 cell differentiation via ROR γ t induction as downstream targets of Stat3. *J Exp Med*, **211**(9): 1857-1874. doi:10.1084/jem.20130791
- Tao, X., Constant, S., Jorritsma, P. und Bottomly, K. (1997). Strength of TCR signal determines the costimulatory requirements for Th1 and Th2 CD4+ T cell differentiation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, **159**(12): 5956-5963.
- Titze, J., Krause, H., Hecht, H., Dietsch, P., Rittweger, J., Lang, R., Kirsch, K.A. und Hilgers, K.F. (2002). Reduced osmotically inactive Na storage capacity and hypertension in the Dahl model. *American journal of physiology. Renal physiology*, **283**(1): F134-141. doi:10.1152/ajprenal.00323.2001
- Titze, J., Lang, R., Ilies, C., Schwind, K.H., Kirsch, K.A., Dietsch, P., Luft, F.C. und Hilgers, K.F. (2003). Osmotically inactive skin Na+ storage in rats. *American journal of physiology. Renal physiology*, **285**(6): F1108-1117. doi:10.1152/ajprenal.00200.2003
- Titze, J., Shakibaei, M., Schafflhuber, M., Schulze-Tanzil, G., Porst, M., Schwind, K.H., Dietsch, P. und Hilgers, K.F. (2004). Glycosaminoglycan polymerization may enable osmotically inactive Na+ storage in the skin. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, **287**(1): H203-208. doi:10.1152/ajpheart.01237.2003
- Tonegawa, S. (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature*, **302**(5909): 575-581. doi:10.1038/302575a0
- Trama, J., Lu, Q., Hawley, R.G. und Ho, S.N. (2000). The NFAT-related protein NFATL1 (TonEBP/NFAT5) is induced upon T cell activation in a calcineurin-dependent manner. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, **165**(9): 4884-4894. doi:10.4049/jimmunol.165.9.4884
- Trepel, F. (1974). Number and distribution of lymphocytes in man. A critical analysis. *Klinische Wochenschrift*, **52**(11): 511-515. doi:10.1007/BF01468720
- Usui, T., Nishikomori, R., Kitani, A. und Strober, W. (2003). GATA-3 suppresses Th1 development by downregulation of Stat4 and not through effects on IL-12Rbeta2 chain or T-bet. *Immunity*, **18**(3): 415-428. doi:10.1016/s1074-7613(03)00057-8
- Vahedi, G., Takahashi, H., Nakayamada, S., Sun, H.-W., Sartorelli, V., Kanno, Y. und O'Shea, J.J. (2012). STATs shape the active enhancer landscape of T cell populations. *Cell*, **151**(5): 981-993. doi:10.1016/j.cell.2012.09.044
- van de Kerkhof, P.C. (1982). Plasma aldosterone and cortisol levels in psoriasis and atopic dermatitis. *Br J Dermatol*, **106**(4): 423-427. doi:10.1111/j.1365-2133.1982.tb04535.x

- Veldhoen, M., Hocking, R.J., Atkins, C.J., Locksley, R.M. und Stockinger, B. (2006). TGF β in the Context of an Inflammatory Cytokine Milieu Supports De Novo Differentiation of IL-17-Producing T Cells. *Immunity*, **24**(2): 179-189. doi:10.1016/j.immuni.2006.01.001
- Veldhoen, M., Uyttenhove, C., van Snick, J., Helmby, H., Westendorf, A., Buer, J., Martin, B., Wilhelm, C. und Stockinger, B. (2008). Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nature immunology*, **9**(12): 1341-1346. doi:10.1038/ni.1659
- Vieira, P.L., Heystek, H.C., Wormmeester, J., Wierenga, E.A. und Kapsenberg, M.L. (2003). Glatiramer Acetate (Copolymer-1, Copaxone) Promotes Th2 Cell Development and Increased IL-10 Production Through Modulation of Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*, **170**(9): 4483-4488. doi:10.4049/jimmunol.170.9.4483
- Vogelgesang, A., Rosenberg, S., Skrzipek, S., Bröker, B.M. und Dressel, A. (2010). Mitoxantrone treatment in multiple sclerosis induces TH2-type cytokines. *Acta Neurol Scand*, **122**(4): 237-243. doi:10.1111/j.1600-0404.2009.01295.x
- Voskamp, A.L., Prickett, S.R., Mackay, F., Rolland, J.M. und O'Hehir, R.E. (2013). MHC class II expression in human basophils: induction and lack of functional significance. *PloS one*, **8**(12): e81777-e81777. doi:10.1371/journal.pone.0081777
- Wang, C., Yosef, N., Gaublot, J., Wu, C., Lee, Y., Clish, C.B., Kaminski, J., Xiao, S., Meyer Zu Horste, G., Pawlak, M., Kishi, Y., Joller, N., Karwacz, K., Zhu, C., Ordovas-Montanes, M., Madi, A., Wortman, I., Miyazaki, T., Sobel, R.A., Park, H., Regev, A. und Kuchroo, V.K. (2015). CD5L/AIM Regulates Lipid Biosynthesis and Restrains Th17 Cell Pathogenicity. *Cell*, **163**(6): 1413-1427. doi:10.1016/j.cell.2015.10.068
- Warford, J.R., Lamport, A.-C., Clements, D.R., Malone, A., Kennedy, B.E., Kim, Y., Gujar, S.A., Hoskin, D.W. und Easton, A.S. (2018). Surfen, a proteoglycan binding agent, reduces inflammation but inhibits remyelination in murine models of Multiple Sclerosis. *Acta Neuropathologica Communications*, **6**(1): 4. doi:10.1186/s40478-017-0506-9
- Wei, Y., Lu, C., Chen, J., Cui, G., Wang, L., Yu, T., Yang, Y., Wu, W., Ding, Y., Li, L., Uede, T., Chen, Z. und Diao, H. (2017). High salt diet stimulates gut Th17 response and exacerbates TNBS-induced colitis in mice. *Oncotarget*, **8**(1): 70-82. doi:10.18632/oncotarget.13783
- Wielgosz, A., Robinson, C., Mao, Y., Jiang, Y., Campbell, N.R.C., Muthuri, S. und Morrison, H. (2016). The Impact of Using Different Methods to Assess Completeness of 24-Hour Urine Collection on Estimating Dietary Sodium. *The Journal of Clinical Hypertension*, **18**(6): 581-584. doi:10.1111/jch.12716
- Wilck, N., Matus, M.G., Kearney, S.M., Olesen, S.W., Forslund, K., Bartolomaeus, H., Haase, S., Mähler, A., Balogh, A., Markó, L., Vvedenskaya, O., Kleiner, F.H., Tsvetkov, D., Klug, L., Costea, P.I., Sunagawa, S., Maier, L., Rakova, N., Schatz, V., Neubert, P., Frätzer, C., Krannich, A., Gollasch, M., Grohme, D.A., Côte-Real, B.F., Gerlach, R.G., Basic, M., Typas, A., Wu, C., et al. (2017). Salt-responsive gut commensal modulates T(H)17 axis and disease. *Nature*, **551**(7682): 585-589. doi:10.1038/nature24628

- Williams, R.E., Gibson, A.G., Aitchison, T.C., Lever, R. und Mackie, R.M. (1990). Assessment of a contact-plate sampling technique and subsequent quantitative bacterial studies in atopic dermatitis. *Br J Dermatol*, **123**(4): 493-501. doi:10.1111/j.1365-2133.1990.tb01455.x
- Witte, M.E., Nijland, P.G., Drexhage, J.A.R., Gerritsen, W., Geerts, D., van het Hof, B., Reijkerkerk, A., de Vries, H.E., van der Valk, P. und van Horssen, J. (2013). Reduced expression of PGC-1 α partly underlies mitochondrial changes and correlates with neuronal loss in multiple sclerosis cortex. *Acta Neuropathologica*, **125**(2): 231-243. doi:10.1007/s00401-012-1052-y
- Wu, C., Yosef, N., Thalhamer, T., Zhu, C., Xiao, S., Kishi, Y., Regev, A. und Kuchroo, V.K. (2013). Induction of pathogenic TH17 cells by inducible salt-sensing kinase SGK1. *Nature*, **496**(7446): 513-517. doi:10.1038/nature11984
- Xiong, Y., Lingrel, J.B., Wüthrich, M., Klein, B.S., Vasudevan, N.T., Jain, M.K., George, M. und Deepe, G.S., Jr. (2016). Transcription Factor KLF2 in Dendritic Cells Downregulates Th2 Programming via the HIF-1 α /Jagged2/Notch Axis. *mBio*, **7**(3): e00436-00416. doi:10.1128/mBio.00436-16
- Xu, J., Yang, Y., Qiu, G., Lal, G., Wu, Z., Levy, D.E., Ochando, J.C., Bromberg, J.S. und Ding, Y. (2009). c-Maf regulates IL-10 expression during Th17 polarization. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, **182**(10): 6226-6236. doi:10.4049/jimmunol.0900123
- Xu, W., Hong, S.J., Zeitchek, M., Cooper, G., Jia, S., Xie, P., Qureshi, H.A., Zhong, A., Porterfield, M.D., Galiano, R.D., Surmeier, D.J. und Mustoe, T.A. (2015). Hydration status regulates sodium flux and inflammatory pathways through epithelial sodium channel (ENaC) in the skin. *J Invest Dermatol*, **135**(3): 796-806. doi:10.1038/jid.2014.477
- Yang, B.H., Hagemann, S., Mamareli, P., Lauer, U., Hoffmann, U., Beckstette, M., Föhse, L., Prinz, I., Pezoldt, J., Suerbaum, S., Sparwasser, T., Hamann, A., Floess, S., Huehn, J. und Lochner, M. (2016). Foxp3⁺ T cells expressing ROR γ t represent a stable regulatory T-cell effector lineage with enhanced suppressive capacity during intestinal inflammation. *Mucosal Immunology*, **9**(2): 444-457. doi:10.1038/mi.2015.74
- Yang, X.O., Panopoulos, A.D., Nurieva, R., Chang, S.H., Wang, D., Watowich, S.S. und Dong, C. (2007). STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *The Journal of biological chemistry*, **282**(13): 9358-9363. doi:10.1074/jbc.C600321200
- Yang, Y., Ochando, J., Yopp, A., Bromberg, J.S. und Ding, Y. (2005). IL-6 plays a unique role in initiating c-Maf expression during early stage of CD4 T cell activation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, **174**(5): 2720-2729. doi:10.4049/jimmunol.174.5.2720
- Yeh, N., Glosson, N.L., Wang, N., Guindon, L., McKinley, C., Hamada, H., Li, Q., Dutton, R.W., Shrikant, P., Zhou, B., Brutkiewicz, R.R., Blum, J.S. und Kaplan, M.H. (2010). Tc17 cells are capable of mediating immunity to vaccinia virus by acquisition of a cytotoxic phenotype. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, **185**(4): 2089-2098. doi:10.4049/jimmunol.1000818

- Zhao, J., Jia, S., Xie, P., Friedrich, E., Galiano, R.D., Qi, S., Mao, R., Mustoe, T.A. und Hong, S.J. (2020). Knockdown of sodium channel Na(x) reduces dermatitis symptoms in rabbit skin. *Lab Invest*, **100**(5): 751-761. doi:10.1038/s41374-020-0371-1
- Zheng, S.G., Gray, J.D., Ohtsuka, K., Yamagiwa, S. und Horwitz, D.A. (2002). Generation ex vivo of TGF-beta-producing regulatory T cells from CD4+CD25- precursors. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, **169**(8): 4183-4189. doi:10.4049/jimmunol.169.8.4183
- Zheng, S.G., Wang, J., Wang, P., Gray, J.D. und Horwitz, D.A. (2007). IL-2 is essential for TGF-beta to convert naive CD4+CD25- cells to CD25+Foxp3+ regulatory T cells and for expansion of these cells. *The Journal of Immunology*, **178**(4): 2018-2027. doi:10.4049/jimmunol.178.4.2018
- Ziegler, S.F. (2006). FOXP3: Of Mice and Men. *Annu Rev Immunol*, **24**(1): 209-226. doi:10.1146/annurev.immunol.24.021605.090547
- Zielinski, C.E. (2017). Human T cell immune surveillance: Phenotypic, functional and migratory heterogeneity for tailored immune responses. *Immunology Letters*, **190**: 125-129. doi:10.1016/j.imlet.2017.08.001
- Zielinski, C.E., Mele, F., Aschenbrenner, D., Jarrossay, D., Ronchi, F., Gattorno, M., Monticelli, S., Lanzavecchia, A. und Sallusto, F. (2012). Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN-gamma or IL-10 and are regulated by IL-1beta. *Nature*, **484**(7395): 514-518. doi:10.1038/nature10957
- Zimmerli, W. und Gallin, J.I. (1988). Pus potassium. *Inflammation*, **12**(1): 37-43. doi:10.1007/BF00915890

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlichst bei all denen bedanken, die mich auf verschiedenste Art und Weise während der Durchführung und Erstellung dieser Arbeit begleitet und tatkräftig unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Professor Christina Zielinski für ihre Inspiration zu diesem spannenden Forschungsprojekt, die rege fachliche Unterstützung zu jeder Tages- und Nachtzeit, den offenen und stimulierenden Austausch und der Hilfe beim Eintauchen in das Projekt. Insbesondere bedanken möchte ich mich auch für den steten Ansporn, immer neugierig zu bleiben, und auch vermeintlich verpatzte Experimente stets zu hinterfragen, denn „auch das Penicillin wurde in einer verschimmelten Petrischale entdeckt!“. Auch in der letzten Phase meiner Arbeit möchte ich für die wertvollen Tipps und Tricks bei der schriftlichen Zusammenstellung, die wiederholten Korrekturlesungen und Anregungen auf jener letzten Strecke dieses spannenden Projekts danken.

Herrn Professor Marc Schmidt-Supprian danke ich für die Hilfsbereitschaft, mir als Mentor während meines Projektes zur Seite zu stehen, sowie für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Mein ganz besonderer Dank gilt natürlich allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der AG Zielinski aus München und aus Berlin für die wissenschaftliche Zusammenarbeit durch fachliche, technische und emotionale Unterstützung sowie all die hilfreichen Anregungen im Zuge wertvoller wissenschaftlicher Diskussionen in Labmeetings, Laboren und Biergärten.

Ganz besonders danken möchte ich selbstverständlich auch allen Koautoren, ohne welche die Erstellung jener vielseitigen und spannenden Arbeit niemals möglich geworden und insbesondere sehr viel weniger spaßig, stimulierend und abwechslungsreich gewesen wäre.

Danken möchte ich auch den Flow Cytometry und Sorting Facilities in Berlin und in München für die technische Unterstützung, die geduldige Beratung und all die wertvollen Tipps und Hinweise.

Auch der TUM Graduate School möchte ich herzlich für das bereichernde Seminar- und Unterstützungsangebot während der Durchführung und Zusammenstellung der Arbeit danken.

Nicht zuletzt danke ich selbstverständlich meiner Familie für die aufmerksame und liebevolle Unterstützung sowie ihre niemals enden wollende Geduld in Zeiten langer Nächte und schlechter Stimmung.

Danken möchte ich auch meinen Studienkollegen und Freunden für ihren Rückhalt, die Aufheiterungen und die Unterstützung, den Kopf wieder für neue Ideen frei zu bekommen.

Ohne jene vielseitige und tatkräftige Unterstützung wäre diese spannende Arbeit niemals möglich gewesen.

9 Anhang

- 9.1 Anhang 1 – Sodium chloride is an ionic checkpoint for human TH2 cells and shapes the atopic skin microenvironment**
- 9.2 Anhang 2 – Salt generates anti-inflammatory Th17 cells but amplifies their pathogenicity in pro-inflammatory cytokine microenvironments**
- 9.3 Anhang 3 – Shaping the diversity of Th2 cell responses in epithelial tissues and its potential for allergy treatment**
- 9.4 Anhang 4 – Allergische Erkrankungen bei Erwachsenen – Prävalenz, Bedeutung und Implikationen für die Prävention und Gesundheitsförderung**

9.1 Anhang 1 – Sodium chloride is an ionic checkpoint for human TH2 cells and shapes the atopic skin microenvironment

Veröffentlichungsform: Forschungsartikel

Titel: Sodium chloride is an ionic checkpoint for human TH2 cells and shapes the atopic skin microenvironment

Autoren: Julia Matthias, Julia Maul, Rebecca Noster, Hanna Meinl, Ying-Yin Chao, Heiko Gerstenberg, Florian Jeschke, Gilles Gasparoni, Anna Welle, Jörn Walter, Karl Nordström, Klaus Eberhardt, Dennis Renisch, Sainitin Donakonda, Percy Knolle, Dominik Soll, Stephan Grabbe, Natalie Garzorz-Stark, Kilian Eyerich, Tilo Biedermann, Dirk Baumjohann, Christina E. Zielinski

Name des Journals: Science Translational Medicine

Erscheinungsdatum: Februar 2019

Bandnummer: 480

Ausgabe: 11

DOI: 10.1126/scitranslmed.aau0683

Pubmed ID: 30787167

Seitenangabe: Originalpublikation Seiten 1-11; Ergänzendes Material Seiten 1-25

ALLERGY

Sodium chloride is an ionic checkpoint for human T_H2 cells and shapes the atopic skin microenvironment

Julia Matthias^{1,2,3}, Julia Maul⁴, Rebecca Noster³, Hanna Meini^{1,2,5}, Ying-Yin Chao^{1,2,5}, Heiko Gerstenberg⁶, Florian Jeschke⁶, Gilles Gasparoni⁷, Anna Welle⁷, Jörn Walter⁷, Karl Nordström⁷, Klaus Eberhardt⁸, Dennis Renisch⁸, Sainitin Donakonda^{2,9}, Percy Knolle^{2,9}, Dominik Soll^{1,2}, Stephan Grabbe¹⁰, Natalie Garzorz-Stark¹¹, Kilian Eyerich¹¹, Tilo Biedermann¹¹, Dirk Baumjohann⁴, Christina E. Zielinski^{1,2,3,5*}

Copyright © 2019
The Authors, some
rights reserved;
exclusive licensee
American Association
for the Advancement
of Science. No claim
to original U.S.
Government Works

The incidence of allergic diseases has increased over the past 50 years, likely due to environmental factors. However, the nature of these factors and the mode of action by which they induce the type 2 immune deviation characteristic of atopic diseases remain unclear. It has previously been reported that dietary sodium chloride promotes the polarization of T helper 17 (T_H17) cells with implications for autoimmune diseases such as multiple sclerosis. Here, we demonstrate that sodium chloride also potently promotes T_H2 cell responses on multiple regulatory levels. Sodium chloride enhanced interleukin-4 (IL-4) and IL-13 production while suppressing interferon- γ (IFN- γ) production in memory T cells. It diverted alternative T cell fates into the T_H2 cell phenotype and also induced de novo T_H2 cell polarization from naïve T cell precursors. Mechanistically, sodium chloride exerted its effects via the osmosensitive transcription factor NFAT5 and the kinase SGK-1, which regulated T_H2 signature cytokines and master transcription factors in hyperosmolar salt conditions. The skin of patients suffering from atopic dermatitis contained elevated sodium compared to nonlesional atopic and healthy skin. These results suggest that sodium chloride represents a so far overlooked cutaneous microenvironmental checkpoint in atopic dermatitis that can induce T_H2 cell responses, the orchestrators of atopic diseases.

INTRODUCTION

Naïve T helper (T_H) cells can differentiate into functionally diverse subsets of effector T cells that are tailored to specific antimicrobial responses. They respond to polarizing cues such as T cell receptor (TCR) signal strength, costimulation, and cytokine signaling to differentiate into distinct T cell subsets (1). Still, much remains unknown with respect to how signals are recognized and integrated to determine cell fate and function. Microenvironmental factors in the tissues are thought to provide additional cues that drive T_H cell differentiation. Recently, ionic checkpoints such as sodium chloride (NaCl) and potassium have been demonstrated to modulate T cell responses. In particular, NaCl has been shown to boost T_H17 cell differentiation from naïve T cell precursors with implications for the pathogenesis of multiple sclerosis under high-salt diet conditions (2–4). Moreover, elevated concentrations of potassium following tumor cell necrosis have been shown to provide a tumor-permissive microenvironment by paralyzing cytotoxic T cell functions (5). Therefore, the ionic composition of the microenvironment represents a relatively unexplored determinant of T cell polarization and T cell effector functionalities.

Epidemiological studies provide robust support for a rapid increase in the incidence of allergic and autoimmune diseases over the past 50 years. This is thought to be due to environmental nongenetic changes of yet unclear origin (6). More than 100 years ago, a renowned pediatric reference book claimed the improvement of atopic dermatitis upon dietary salt restriction based on clinical observations but without any mechanistic evidence (7). Considering the steady increase in the dietary consumption of processed food and thus of NaCl over the past 50 years, we set out to investigate a potential link between NaCl-mediated ionic signaling and enhanced T_H2 cell responses, which are the culprits in the pathogenesis of allergic diseases. Our data demonstrate the existence of an ionic determinant of T_H2 immunity, which challenges the current cytokine-focused concept of T cell polarization and proposes an alternative target for type 2 immunity in allergic diseases.

RESULTS

NaCl enhances T_H2 cell effector functions

Recent reports have demonstrated a strong impact of NaCl on increasing T_H17 cell differentiation from naïve T cell precursors in polarizing cytokine conditions (2, 3). However, NaCl is particularly enriched in peripheral barrier tissues such as the skin, which naïve T cells do not enter during their regular recirculation route (8). Therefore, we sought to determine whether NaCl could also regulate T cell responses on the memory and effector T cell level, which would support a role of ionic signals for in situ immunomodulation.

We purified CD4⁺ CD45RA⁻ memory T cells from the blood of healthy adult donors and analyzed interleukin-17 (IL-17) expression on the single-cell level after expansion with CD3 and CD28 antibodies in the absence (low NaCl) or presence (high NaCl) of additional 50 mM NaCl, which reflects physiological NaCl concentrations in peripheral blood and skin, respectively (9). Addition of NaCl beyond 50 mM decreased cell viability and resulted in cell death (fig. S1).

¹Institute of Virology, Technical University of Munich, 81675 Munich, Germany. ²German Center for Infection Research, Partner Site Munich, Munich, Germany. ³Department of Dermatology, Unit Cellular Immunoregulation, Charité-Universitätsmedizin Berlin, 10117 Berlin, Germany. ⁴Institute for Immunology, Biomedical Center, Ludwig-Maximilians-Universität München, 82152 Planegg-Martinsried, Germany. ⁵TranslaTUM, Technical University of Munich, 81675 Munich, Germany. ⁶ZWE FRM II, Technical University of Munich, 85748 Garching, Germany. ⁷Department of Genetics, University of Saarland, 66123 Saarbrücken, Germany. ⁸Institute for Nuclear Chemistry, Johannes Gutenberg-Universität Mainz and Helmholtz Institute Mainz, 55252 Mainz, Germany. ⁹Institute of Molecular Immunology and Experimental Oncology, Technical University of Munich, 81675 Munich, Germany. ¹⁰Department of Dermatology, University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz, 55131 Mainz, Germany. ¹¹Department of Dermatology and Allergology, Technical University of Munich; Clinical Unit Allergology (EKA), Helmholtz Zentrum München; German Research Centre for Environmental Health GmbH, 80802 Munich, Germany.

*Corresponding author. Email: christina.zielinski@tum.de

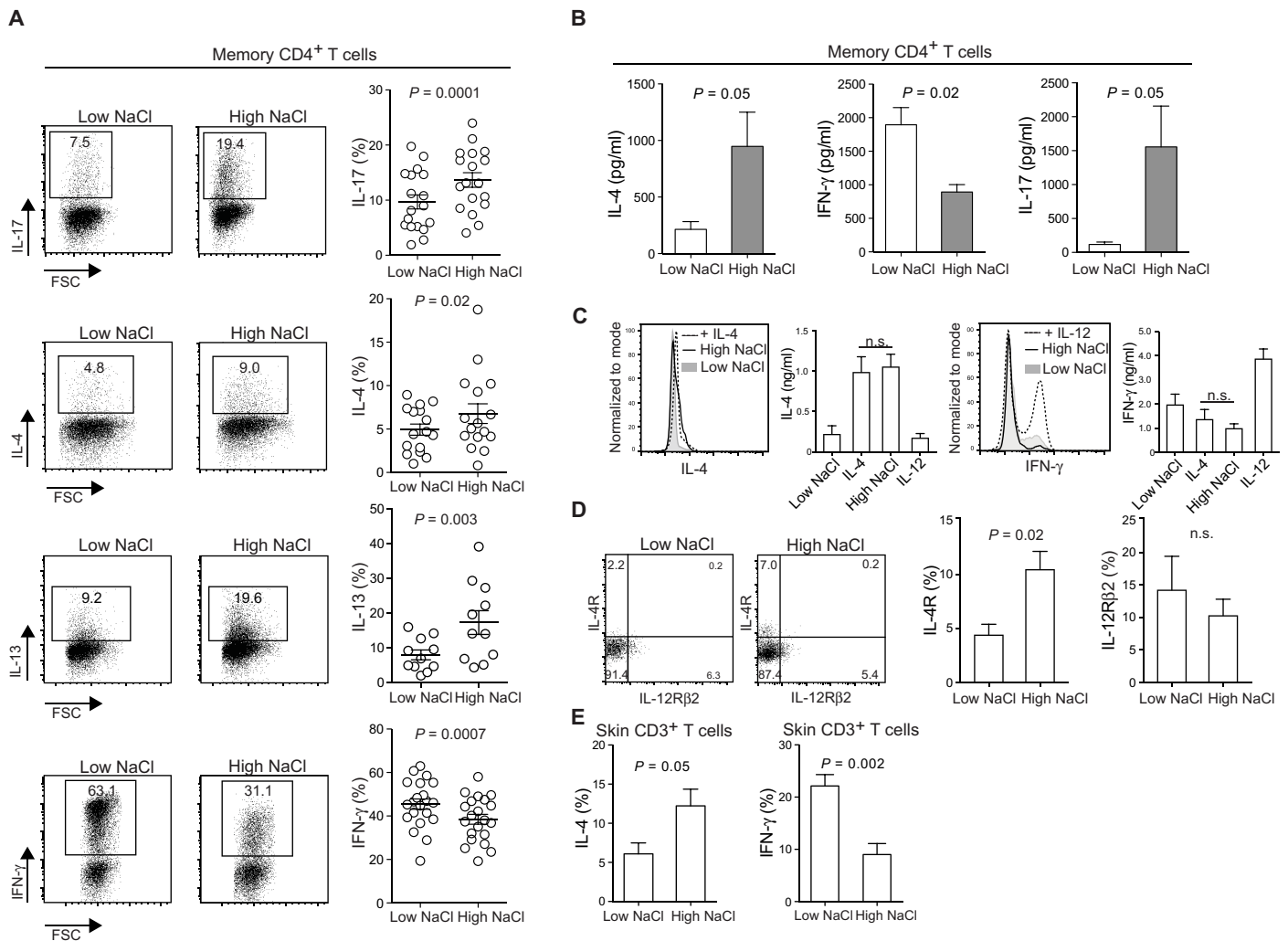


Fig. 1. NaCl enhances T_H2 and suppresses T_H1 cell responses in memory T cells. (A to D) Human memory T_H cells were sorted from fresh peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) as CD4⁺CD14⁻CD45RA⁻ T cells by flow cytometry and stimulated for a total culture period of 5 days in the presence (high) or absence (low) of additional 50 mM NaCl with anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibody (mAb) for 48 hours. (A) Intracellular staining and flow cytometry [fluorescence-activated cell sorter (FACS)] on day 5 after phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and ionomycin restimulation. FACS staining of an individual experiment (left) and cumulative data is shown, with each circle representing one donor (IL-17, n = 18; IL-4, n = 17; IL-13, n = 11; IFN-γ, n = 22). (B) ELISA of cell culture supernatants analyzed on day 5 (n = 3). (C) Flow cytometry and ELISA of T cells stimulated as in (A) and (B) and treated in IL-4 or IL-12 cytokine microenvironments (FACS panels are representative of three experiments; ELISA, n = 3). P = 0.007 (IL-4) and P = 0.003 (IFN-γ), Kruskal-Wallis test. Dunn's multiple comparisons post hoc test was performed for comparisons between IL-4 and high NaCl. (D) IL-12RB expression as shown by FACS. One representative experiment and cumulative data (n = 5) are shown. (E) Skin CD3⁺ T cells obtained after abdominoplasties were sorted and characterized by flow cytometry according to fig. S4 and stimulated and analyzed as in (A) (n = 3). Paired Student's *t* tests were used for comparisons between two groups. n.s., not significant.

NaCl strongly enhanced IL-17 expression in memory T_H cells in the absence of exogenous polarizing cytokines (Fig. 1A). In line with a general enforcement of the T_H17 cell signature, it also increased IL-22, a cytokine involved in the repair of barrier tissues, as well as other T_H17 cell-associated signature molecules such as the master transcription factor ROR-γt, the chemokine receptor CCR6, and the antimicrobial T_H17 cytokine IL-26 (fig. S2) (10–12). Memory T cells display a complex cytokine expression pattern. We therefore extended our analysis to other T_H cell lineage-defining cytokines. Unexpectedly, we observed up-regulation of the T_H2 signature cytokine IL-4 by both intracellular cytokine staining and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) even in the presence of IL-4-neutralizing antibodies (Fig. 1, A and B, and figs. S3 and S4). The T_H2 signature was corroborated by IL-13 up-regulation (Fig. 1A). Interferon-γ (IFN-γ) expression was down-regulated in accordance with the reciprocal regulation of T_H2 and T_H1 pathways. This T_H2 bias was further supported by the up-regulation of IL-4, IL-13, and IL-5 and down-regulation of IFN-γ in T_H cell clones upon restimulation in high NaCl conditions (fig. S5). NaCl acted as an equally efficient signal for T_H2 cytokine up-regulation and IFN-γ suppression as exogenous IL-4 (Fig. 1C), which has so far been considered to be the principal T_H2-polarizing factor (13). NaCl also up-regulated IL-4R expression on memory T_H cells, which supports a feedback amplification of the T_H2 axis (Fig. 1D). IL-12Rβ2 expression was unaffected. The T_H2-promoting effect was restricted to ionic osmolytes containing sodium and was strongest for NaCl among all tested tonicity signals. A T_H2 skewing could not be induced by nonionic

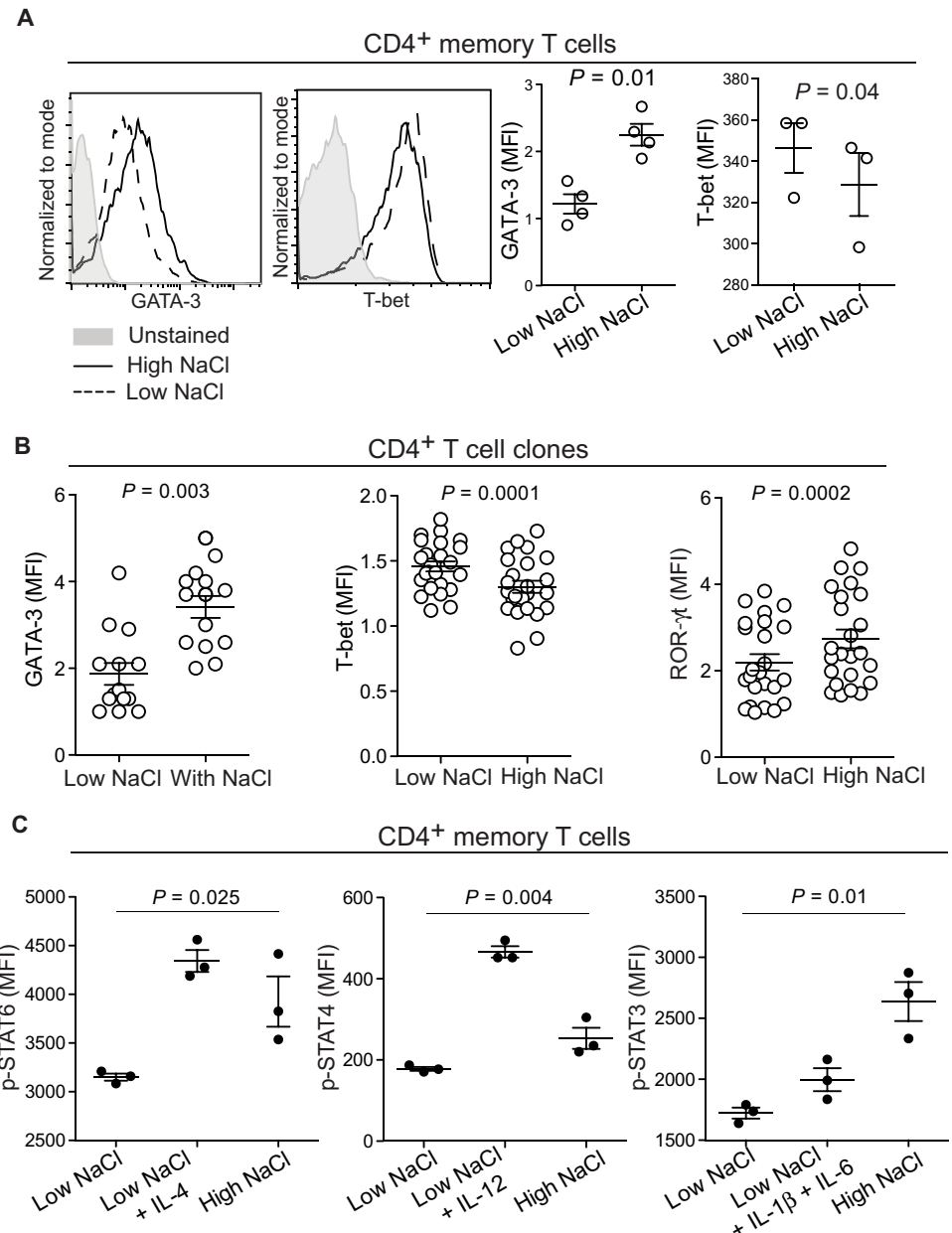
Downloaded from <http://stm.sciencemag.org/> by guest on March 15, 2019

Fig. 2. NaCl induces the transcriptional activation of T_H2 and suppression of T_H1 programs.

(A) Human memory T cells were stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 mAb for 48 hours of a 5-day culture period in the presence (high) or absence (low) of additional 50 mM NaCl before intracellular staining for transcription factors on day 5. Representative flow cytometry analyses (left) and cumulative data (right) are shown, with each circle indicating one donor and experiment (GATA-3, $n = 4$; T-bet, $n = 3$). MFI, mean fluorescence intensity.

(B) T cell clones were generated from $CD4^+ CD45RA^-$ memory T cells during a 14-day culture period with irradiated allogeneic feeder cells and phytohemagglutinin and were restimulated and analyzed as in (A). T cell clones were randomly selected from growing cultures for restimulation experiments. Each circle represents an individual T cell clone (GATA-3, $n = 14$; T-bet, $n = 24$; ROR- γ t, $n = 24$). Paired Student's t test was used for comparison between two groups (A and B).

(C) Memory T cells were stimulated as in (A) and (B) in low or high NaCl conditions or in the presence of recombinant polarizing cytokines in low NaCl conditions for 5 days before restimulation for 30 min with IL-4, IL-12, and IL-6. Phosphorylation of STAT molecules was assessed after intracellular staining and flow cytometry ($n = 3$). $P = 0.025$ (p-STAT6), $P = 0.004$ (p-STAT4), and $P = 0.01$ (p-STAT3), Kruskal-Wallis test.



osmolytes such as urea or mannitol, which were tested at various concentrations (fig. S6, A and B).

We also extended our investigations on the impact of NaCl signals to the CD8 T cell compartment. IL-17 was up-regulated in CD8 memory T cells under elevated NaCl conditions, although to a much lower extent than in CD4 memory T cells. IL-4 production, however, was not increased in CD8 T cells in contrast to CD4 T cells (fig. S7).

We next tested the response of T cells isolated from healthy human skin to restimulation with NaCl. Peripheral tissues contain heterogeneous memory T cell populations, which differ from those in the blood (14). Their functional plasticity and response to immunomodulatory factors remain poorly defined. Skin-resident T cells are particularly prone to exposure to ionic signals exerted by fluctuating concentrations of NaCl, because the skin is known to act as a reservoir for excess dietary

NaCl (15). To characterize the identity of skin T cells, we phenotyped them according to their differential expression of CD69 and CD103, as both markers correlate with tissue residency (16). This confirmed the heterogeneous composition of skin memory T cells, which is distinct from memory T cell subsets in the blood (fig. S8). We found robust IL-4 up-regulation with concomitant IFN- γ down-regulation in skin-resident T cells upon stimulation with NaCl (Fig. 1E). In addition, we also observed up-regulation of the skin-homing chemokine receptor CCR8 by NaCl, which correlates with higher IL-4 and lower IFN- γ expression (fig. S9, A and B), as well as with skin T cell residency (17, 18). Therefore, NaCl also exerts T_H2 -promoting effects on cutaneous memory T cell subsets, which reside at sites of relatively elevated NaCl concentrations in vivo. Overall, these findings demonstrate that ionic signals exerted by NaCl can directly alter human memory T cell functions

in the absence of exogenous cytokine signals, with potent T_{H2} -promoting functions that may match the T_{H2} -polarizing potential of IL-4.

NaCl induces transcriptional activation of the T_{H2} program

To further corroborate that NaCl can promote the T_{H2} identity, we analyzed the expression of master transcription factors after T cell stimulation in the presence of increased NaCl concentrations (Fig. 2). GATA-3, the master transcription factor of T_{H2} cells, was highly up-regulated in memory T cells upon TCR stimulation in the presence of additional NaCl, whereas T-bet, the master transcription factor of T_{H1} cells, was down-regulated (Fig. 2A). We also generated T cell clones to avoid the selective outgrowth of undefined T cell subpopulations and subjected each clone individually to restimulation in the presence or absence of additional NaCl. GATA-3 was highly up-regulated in memory T cell clones upon NaCl stimulation, whereas T-bet was down-regulated, again supporting the T_{H2} -promoting role of NaCl (Fig. 2B). In accordance with higher IL-17 expression (Fig. 1A and fig. S5B), ROR- γ t expression was also enhanced upon NaCl stimulation (Fig. 2B).

Signal transducers and activators of transcription proteins (STATs) have crucial roles in transmitting cytokine signals and in specifying T_H cell polarization (19). For that reason, we investigated the effect of NaCl on lineage-specifying STAT molecules (Fig. 2C). Memory T_H cells were stimulated polyclonally with anti-CD3 and anti-CD28 in the presence or absence of additional NaCl for 5 days or with the polarizing cytokines IL-4, IL-12, or IL-6 and IL-1 β . On day 5, T cells were briefly restimulated with IL-4, IL-12, or IL-6 for 30 min to induce STAT6, STAT4, or STAT3 phosphorylation, respectively. T cells that were stimulated in the presence of NaCl displayed stronger STAT6 phosphorylation upon IL-4 exposure than control T cells cultured in the absence of exogenous NaCl. STAT4 phosphorylation, however, was unaffected by NaCl stimulation. STAT3 was strongly up-regulated by NaCl in memory T_H cells (Fig. 2C). Together, these results argue that NaCl promotes the T_{H2} and T_{H17} cell signature also on the level of the transcriptional STAT gatekeepers.

To provide a more global view on the T_H cell polarization bias induced by NaCl, we performed next-generation mRNA sequencing to analyze the gene expression changes of memory T_H cells stimulated in the presence of low versus high NaCl concentrations. Gene set enrichment analysis of the differentially expressed genes using T_{H1} - and T_{H2} -associated gene sets corroborated the strong NaCl-induced T_{H2} bias also on a transcriptome-wide level (fig. S10).

NaCl skews distinct T_H cell subsets to acquire T_{H2} properties

We next wanted to determine whether distinct T_H cell fates displayed plasticity to adopt the T_{H2} phenotype upon exposure to NaCl. We therefore isolated fully differentiated human T_{H1} , T_{H2} , and T_{H17} cell subsets *ex vivo* from peripheral blood according to their differential expression of chemokine receptor surface markers, which, according to our previous work, reliably identifies the respective T_H cell lineages (11, 20). After 5 days of stimulation with CD3 and CD28 mAb, the T cell subsets maintained their characteristic signature cytokine profiles as expected. In the presence of additional NaCl, T_{H2} cells further up-regulated IL-4, whereas their low baseline IFN- γ production was further down-regulated, promoting their T_{H2} identity. T_{H2} cells also up-regulated IL-17, although overall IL-17 expression remained relatively low. T_{H1} cells did not alter their low IL-4 or IL-17 production upon restimulation with NaCl but substantially down-regulated IFN- γ . T_{H17} cells also increased IL-4 production, while down-regulating IFN- γ and increasing IL-17 (Fig. 3A). To corroborate plasticity as the

underlying process of T_{H2} phenotype acquisition, we generated T cell clones and subjected individual clones to restimulation in the presence of additional NaCl. This approach confirmed that homogenous clonal T cell populations could acquire or increase IL-4 production while at the same time expressing decreased IFN- γ and increased IL-17 on the clonal level (Fig. 3B). We also observed that IL-4–negative T cell clones could acquire the ability to produce IL-4 in response to restimulation with NaCl (Fig. 3, B and C). This *de novo* acquisition of cytokine expression also applied to individual IL-17–negative T cell clones, which up-regulated IL-17 expression upon restimulation with NaCl (Fig. 3C).

Because memory T cells are long-lived and can be reactivated in changing microenvironmental contexts by their cognate antigens, we investigated the stability of NaCl-induced functional changes in human T_H cells. To this end, we stimulated memory T_H cells in high NaCl conditions for 5 days before transferring them into low NaCl conditions for another 5 days of anti-CD3 and anti-CD28 restimulation and vice versa. The data demonstrate that the up-regulation of IL-4 is dependent on the presence of high NaCl concentrations because increased IL-4 expression could not be maintained upon restimulation in low NaCl conditions. Repetitive restimulation compromised overall IL-4 production. This was partially counteracted if restimulation occurred in high NaCl conditions (Fig. 3D).

It has previously been shown that epigenetic mechanisms regulate the stability and plasticity of T cell programs (21). We therefore determined whether ionic signaling by NaCl could epigenetically imprint the T_{H2} program in human T_H cells. To this end, we analyzed DNA methylation signatures of selected regulatory regions at several candidate loci in response to NaCl using targeted ultradeep sequencing of bisulfite-converted DNA. Our data suggest that the increase in T_{H2} effector functions is not exerted by methylation changes at the analyzed regions (Fig. 3E and table S1). Together, NaCl-mediated ionic signaling most likely preserved the flexibility of T cell effector functions and provided an acute adaptation to the microenvironment, in line with the functional re-adaptation to low NaCl conditions shown in the restimulation experiments (Fig. 3D).

NaCl promotes T_{H2} cell differentiation from naïve T cell precursors in the absence of polarizing cytokines

Given the T_{H2} -promoting effects of NaCl on memory and effector T cell subpopulations, we next sought to determine whether it could exert direct polarizing effects on the naïve T cell compartment. Although NaCl has previously been demonstrated to promote human T_{H17} cell differentiation from naïve T cell precursors, this only occurred in the presence of exogenous polarizing cytokines (2). We therefore isolated human naïve T cells to high purity and stimulated them in the presence or absence of additional NaCl. We observed a significant increase of IL-4 and IL-13 production upon stimulation with NaCl in the absence of polarizing cytokines (Fig. 4A). This also occurred in the presence of IL-4–neutralizing antibodies (fig. S11). As expected, IFN- γ could be induced by polyclonal stimulation. It was suppressed, instead, in the presence of exogenous NaCl, in line with the reciprocal T_{H1} - T_{H2} regulation pattern. Also, IL-17–producing cells could be slightly, although significantly, induced by NaCl, even in the absence of exogenous polarizing cytokines, whereas polyclonal stimulation alone had no IL-17–promoting effect. These findings were supported by quantifying cytokine release by ELISA (Fig. 4B). Similar to memory cells, naïve cells selectively up-regulated GATA-3 expression, but not T-bet and ROR- γ t, upon NaCl stimulation (Fig. 4C). Under

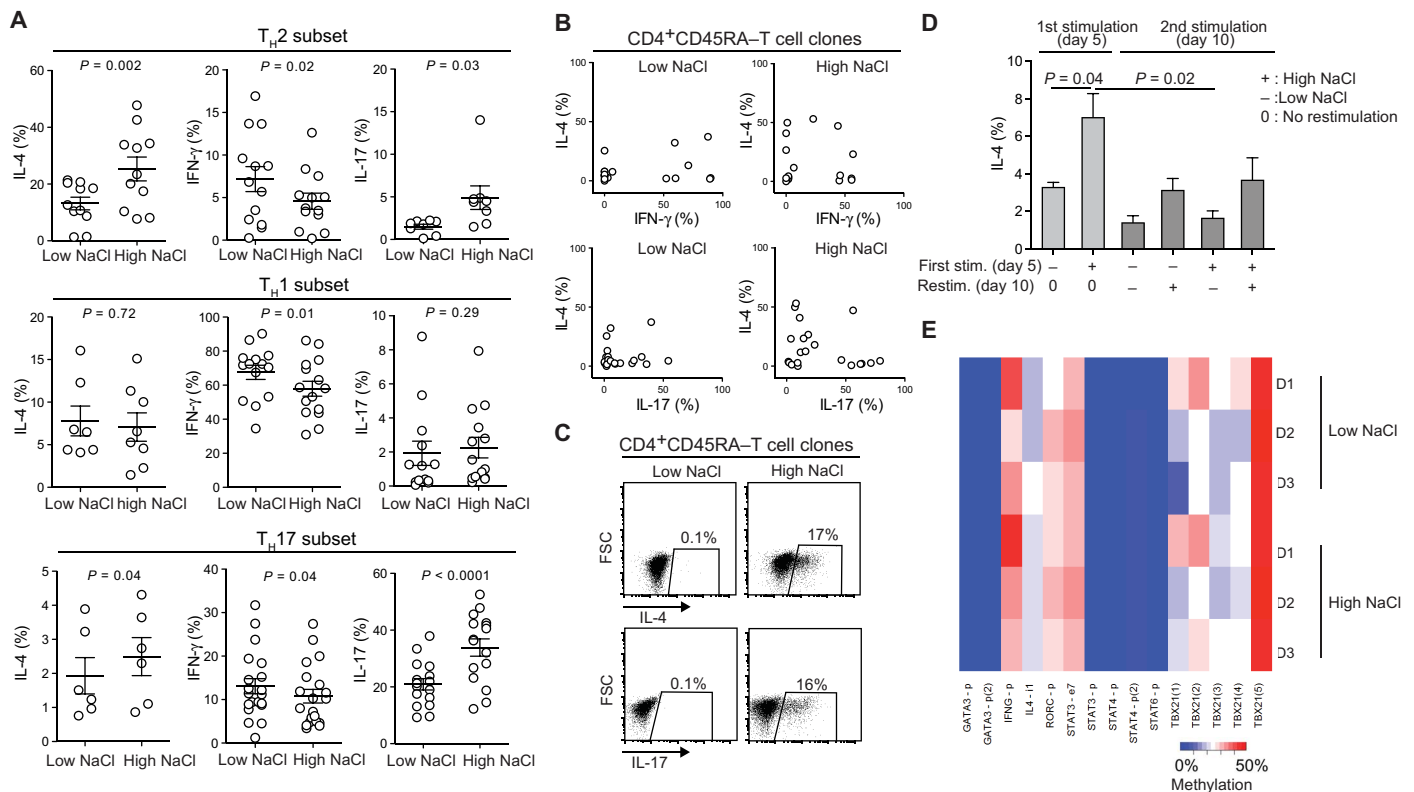


Fig. 3. NaCl reprograms distinct T_H cell subsets to acquire T_H2 properties. (A) Polarized human memory T_H cell subsets were sorted ex vivo according to the differential expression of chemokine receptor surface markers and restimulated in the presence (high) or absence (low) of additional 50 mM NaCl with CD3 and CD28 mAb for 48 hours of a 5-day culture period. Cytokine expression was determined by intracellular cytokine staining and flow cytometry. Paired Student's *t* test was used for comparison between two groups. (B) Random T cell clones that were generated from memory T cells were stimulated as in (A), and their cytokine coexpression pattern was measured in the presence of low versus high NaCl concentrations. Every circle represents a unique T cell clone. (C) Individual T cell clones that were generated from memory T cells were selected on the basis of being negative for IL-4 or IL-17 expression. They were restimulated in the presence of low versus high NaCl concentrations for 5 days before intracellular staining. Two individual clones from one experiment and blood donor ($n = 3$) are shown. (D) Intracellular cytokine staining of human CD4⁺ CD45RA⁻ memory T cells after stimulation as in (A). The same T cell cultures were then split and restimulated for another 5 days in low and high NaCl conditions before intracellular cytokine staining and flow cytometric analysis following PMA and ionomycin stimulation on day 10 ($n = 4$). Paired Student's *t* test was used for comparison between two groups. (E) Heatmap with average CpG methylation as measured by deep sequencing of bisulfite PCR amplicons for indicated regions (p, promoter; l, intron; e, exon; numbers in brackets indicate amplicons for different subregions of the respective genes; D1 to D3, donors 1 to 3; comparison of matched low versus high NaCl conditions for D1 to D3 by Student's *t* test with false discovery rate-adjusted *P* values).

T_H17-polarizing conditions, the NaCl-induced IL-4 up-regulation in human naïve T cells was abrogated (fig. S12).

To further corroborate a role for hypersalinity in the enhancement of type 2 immunity, we tested its effects on murine T cell polarization. Naïve T cells derived from the spleen and lymph nodes from C57BL/6 mice were stimulated with CD3 and CD28 mAb in the presence of distinct polarizing cytokines and cytokine-blocking antibodies that are known to reliably polarize T_H1, T_H2, T_H17, and T_{reg} (T regulatory) responses in vitro. Naïve T cell priming in the presence of additional 40 mM NaCl strongly enhanced T_H2 cell priming with recombinant IL-4 with respect to IL-4 and GATA-3 expression. The presence of additional NaCl also induced slight IL-4 and GATA-3 up-regulation in several non-T_H2 cell conditions despite the presence of IL-4 antagonistic cytokines such as IL-12 and transforming growth factor- β (TGF- β) (fig. S13, A to C). Increased IL-4 concentrations were also detected in the culture supernatant of T_H2 cells that were treated with additional NaCl (fig. S13D).

Together, these findings demonstrate that NaCl acts as a T_H2 cell-polarizing signal during the priming of naïve T cells from both humans

and mice as assessed by multiple readouts. Moreover, this occurred in the absence of exogenous T_H2-polarizing cytokines such as IL-4 as well as independent of autocrine IL-4 signaling and, with mouse cells, even despite the presence of T_H2-counteracting cytokines.

SGK-1 and NFAT5 mechanistically link NaCl signaling with the T_H2 program

Having established that NaCl has considerable effects on the induction and enhancement of the T_H2 cell program, we sought to investigate the underlying molecular mechanisms. We tested whether the nuclear factor of activated T cells 5 (NFAT5), which is known to be an osmosensitive transcription factor (22), is induced in human memory T_H cells upon polyclonal activation in the presence of NaCl. NFAT5 was significantly up-regulated as assessed by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) (Fig. 5A). Serum- and glucocorticoid-regulated kinase 1 (SGK-1) is also known to be regulated by tonicity signals and to be a downstream target of NFAT5 (23). Accordingly, short hairpin RNA (shRNA)-mediated silencing of *NFAT5* down-regulated *SGK1* transcript abundance in low and high NaCl

Fig. 4. NaCl promotes T_H2 cell differentiation from naïve T cell precursors in the absence of polarizing cytokines. (A) Cytokine expression was determined by flow cytometry after PMA and ionomycin restimulation for 5 hours. Left: Cytokine expression in one individual blood donor. Right: Cumulative data of all donors. (B) Supernatants from the cultures in (A) were tested by ELISA and normalized to cell numbers by counting beads. (C) Transcription factor expression was determined by flow cytometry after treatment as in (A) and (B). Each circle represents a separate blood donor. Paired Student's *t* test was used for comparison between two groups. gMFI, geometric MFI.

conditions, whereas silencing of *SGK1* had no impact on *NFAT5* expression (fig. S14). Similar to *NFAT5*, *SGK-1* was more abundant in CD3- and CD28-stimulated memory T_H cells in the presence of additional NaCl (Fig. 5A). We found that these osmosensitive molecules directly control the T_H2 program in hyperosmolar conditions because shRNA-induced silencing of *NFAT5* and *SGK-1* abrogated NaCl-induced IL-4 up-regulation and IFN- γ suppression (Fig. 5B). This was further corroborated by *GATA-3* and *T-bet* expression, which reached baseline expression following *NFAT5* and *SGK-1* silencing in hypersaline conditions (Fig. 5C). shRNAs directed against *NFAT5* and *SGK-1* did not regulate IL-4 or IFN- γ production or *GATA3* or *TBX21* expression in low NaCl conditions (Fig. 5B and fig. S15). Together, these data demonstrate a role of osmosensitive transcription factors for the regulation of the T_H2 program in hyperosmotic tissue microenvironments.

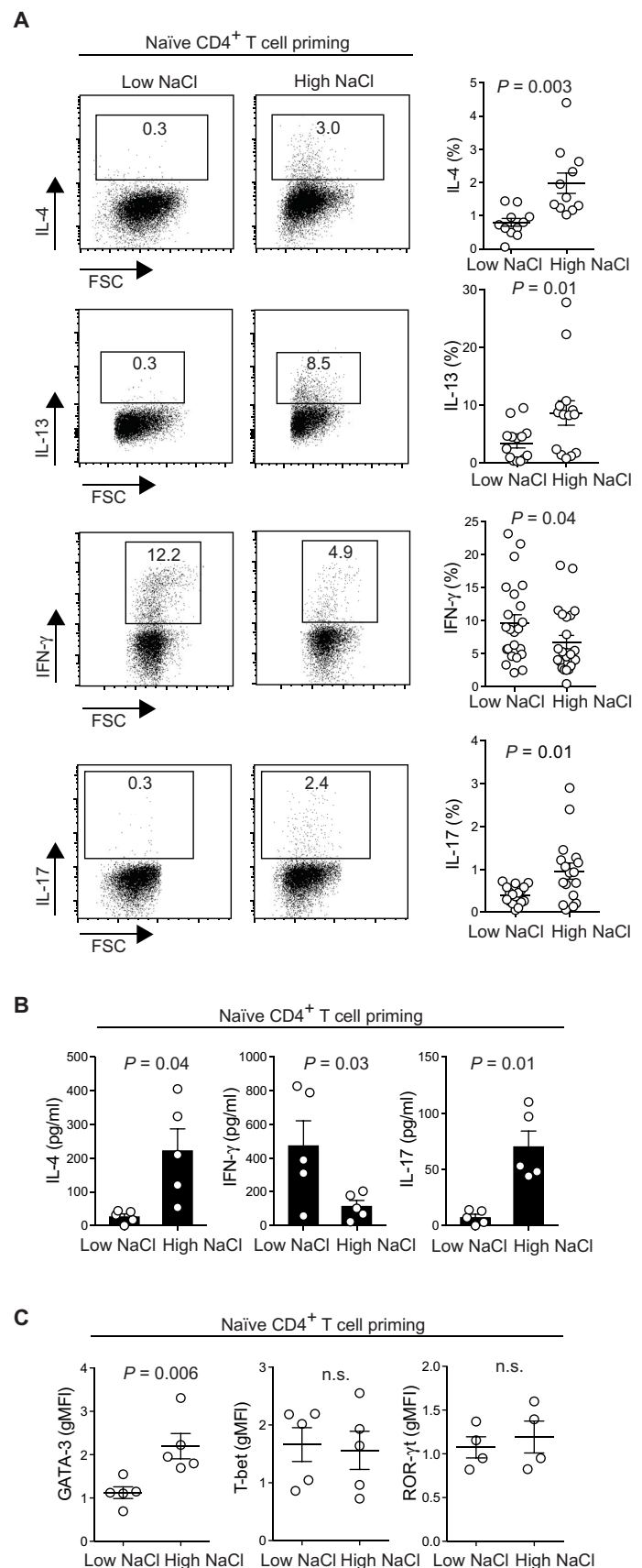
Atopic dermatitis skin lesions contain increased sodium concentrations

Last, we aimed to identify whether NaCl is associated with the pathogenesis of allergic diseases in humans. Despite intense and long-term research efforts, it still remains elusive how the T_H2 bias is initiated in allergies (24). To this end, we investigated NaCl concentrations in the skin of adult patients suffering from atopic dermatitis (also known as atopic eczema; table S2), a T_H2 -driven chronic inflammatory skin disease with a high prevalence and strongly increasing incidence in industrialized nations (25). Neutron activation analysis (NAA) allows for precise probing of element content in an organic matrix (26).

Lesional skin of patients suffering from moderate to severe atopic dermatitis (mean SCORing Atopic Dermatitis = 63) displayed strongly increased concentrations of sodium compared to matched nonlesional patient skin (30-fold) (Fig. 6A and table S2). We did not observe any difference in the sodium content between nonlesional skin of atopic dermatitis patients and skin from age-matched healthy donors. No sodium enrichment was detected in the inflamed skin of age-matched patients suffering from moderate to severe psoriasis (mean Psoriasis Area and Severity Index = 25), indicating that NaCl accumulation is not a general phenomenon of the inflamed skin (Fig. 6B).

DISCUSSION

Adaptive immune cells integrate cues from the tissue microenvironment that tailor their phenotype and function for antigen-specific host defense and tolerance (27). IL-4 has so far been considered a crucial cytokine for the final commitment and maintenance of T_H2 immunity (28). We demonstrate here an IL-4-independent T_H2 polarization pathway that is mediated by NaCl. NaCl was effective both



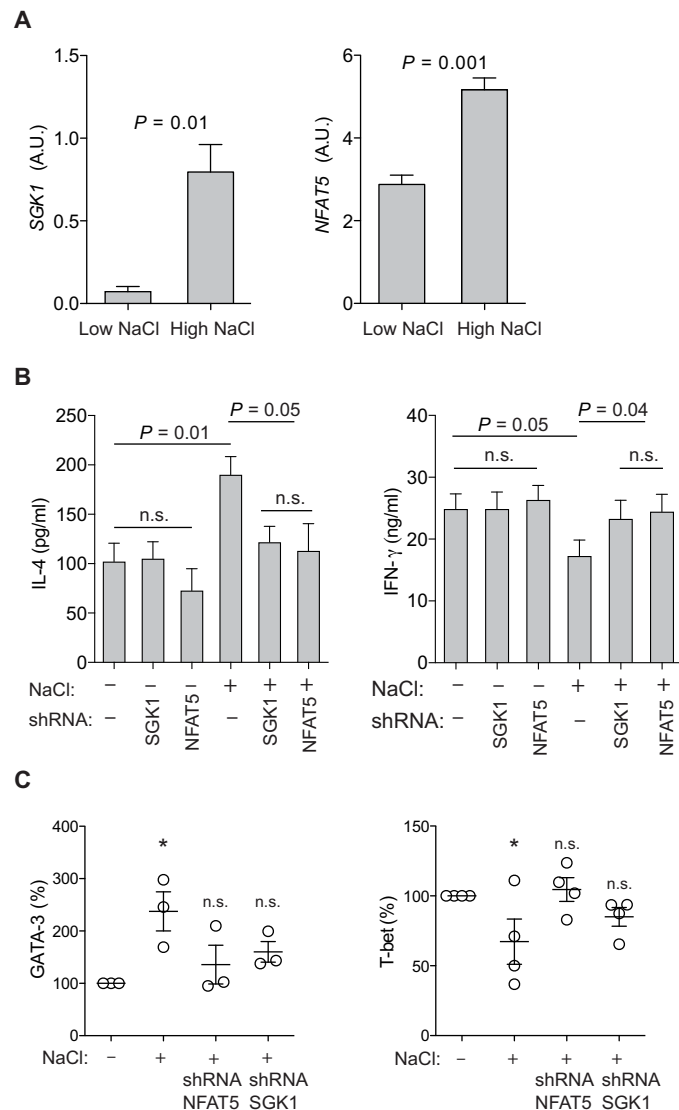


Fig. 5. SGK-1 and NFAT5 mechanistically link salt signaling with the TH2 program. (A) qRT-PCR of memory TH2 cells. Paired Student's *t* test was used for comparison between two groups. A.U., arbitrary units. (B) Cytokine production in supernatants was determined by ELISA after stimulation in low- or high-salt conditions for 5 days and shRNA-mediated silencing of SGK1 or NFAT5 ($n = 3$ to 6). The control conditions indicated as (-) contain scrambled shRNA. For IL-4 and IFN- γ , $P \leq 0.05$ (mixed-effects analysis for multiple comparisons). Unpaired Student's *t* test was used for comparison between two groups. (C) Intracellular staining and flow cytometry of the master transcription factor GATA-3 ($P \leq 0.05$, Kruskal-Wallis test) and T-bet ($P = 0.12$, Kruskal-Wallis test) after stimulation in low- or high-salt conditions for 5 days and shRNA-mediated silencing of NFAT5 and SGK1. Dunn's post hoc test was not significant (n.s.) for comparison between low NaCl conditions with scrambled shRNA and high NaCl conditions with shRNA for NFAT5 or SGK1. * $P \leq 0.05$, Dunn's post hoc test for comparison with low NaCl conditions containing scrambled shRNA.

during the naïve T cell priming phase as well as at the memory T cell stage and could also divert alternative TH cell fates into a TH2 phenotype. NaCl not only biased the TH1-TH2 dichotomy toward TH2 cell responses on multiple regulatory levels but also promoted effector TH17 cell responses. Our studies have identified NFAT5 and its downstream target SGK-1 as molecular regulators of the TH2 cell

program in hyperosmolar NaCl conditions. The skin of patients with atopic dermatitis, a TH2-driven disease, was highly enriched in NaCl. Together, these results revealed NaCl as an ionic checkpoint for type 2 immunity and to be associated with the pathogenesis of atopic dermatitis. Therefore, targeting NaCl-induced tonicity signaling could serve as a therapeutic strategy for the treatment of allergic diseases.

Previous studies demonstrated that NaCl promoted the differentiation of TH17 cells in polarizing cytokine conditions with implications for the pathogenesis of multiple sclerosis (2–4). Our data support and extend these conclusions not only on the naïve but also on the memory T cell level, even in the absence of exogenous polarizing cytokines. Although TH2-associated regulatory factors such as GATA-3 and TH2 effector cytokines were assessed in these previous studies as well, this occurred in TH17-polarizing cytokine conditions, which, according to our investigations, have abrogated the ability of NaCl to directly promote TH2 cells (2). This suggests that the cytokine microenvironment modulates the impact of NaCl for T cell differentiation and function.

Although our data are in accordance with the NaCl-induced support of TH17 cell differentiation, they challenge the notion of NaCl-induced TH17 cell pathogenicity, which requires IL-17 to be coexpressed with IFN- γ on the single-cell level (2, 11, 29, 30). The TH1/IFN- γ down-regulation that we demonstrate is in agreement not only with the concomitant reciprocal up-regulation of TH2 cell responses but also with the previous observation that osmotic shrinkage of T cells by NaCl blunts IFN- γ expression (31). Overall, our data demonstrate considerable plasticity of T cell functions in response to NaCl with an overall skewing toward the TH2 fate.

mTORC2 (mammalian target of rapamycin complex 2) acts as an upstream activator of SGK-1 (32). Our results are in accordance with previous reports that demonstrated a role for mTORC2 in the commitment to the TH2 lineage but which did not identify which upstream signals differentially engaged the mTORC1 versus mTORC2 pathway (33, 34). T cell-specific deletion of the mTORC2-specific adaptor Rictor abrogated the activation of SGK-1 (33), resulting in reduced allergic asthma as well as increased antitumor and antiviral immune responses in mouse models. In addition, the Wnt antagonist Dickkopf-1 promoted TH2 cell responses via the mTOR pathway and SGK-1 in mouse models of house dust mite-induced asthma or *Leishmania major* infection (35). Downstream targets of SGK-1 signaling following mTORC2 activation were shown to be JunB and the long isoform of the transcription factor TCF-1 for the TH2 versus TH1 fate, respectively (32). These previous insights into the control of TH cell fates by mTOR complexes in mice corroborate our findings in the context of hypertonic NaCl-induced T cell signaling. In particular, they propose NaCl as an upstream regulator of mTORC2 and thus of TH2 cell differentiation.

We found highly elevated concentrations of sodium in the affected skin of atopic dermatitis patients (eczema) compared to unaffected control skin, which is in line with the TH2-mediated pathogenesis of this chronic inflammatory disease (36). Previous gene profiling studies reported the up-regulation of genes encoding negatively charged glycosaminoglycans in lesional atopic skin, which can promote and thus potentially explain the accumulation of sodium ions in the skin by non-covalent binding (15, 37, 38). Genes involved in glycosaminoglycan deposition (i.e., β 1,3-glucuronosyltransferase-I) are downstream targets of NFAT5 (39), which we have reported here to be the transcriptional regulator of the high-salt response.

The profound barrier dysfunction in atopic dermatitis promotes microbial dysbiosis (40–42). The atopic skin is heavily colonized by

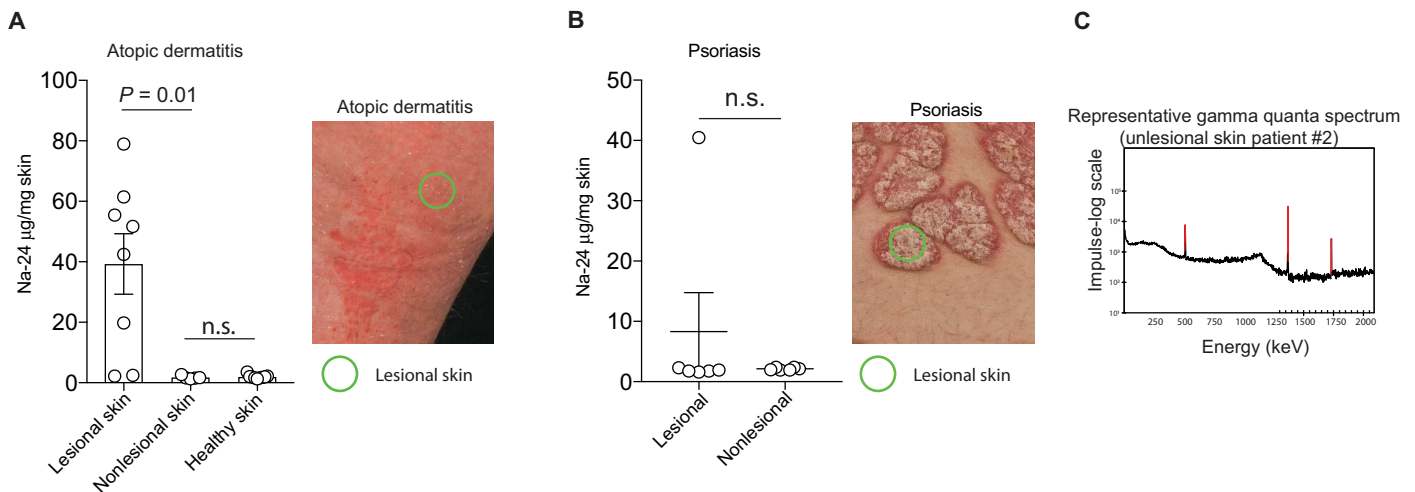


Fig. 6. The skin of atopic dermatitis patients has elevated sodium content. (A) NAA of 4-mm skin punch biopsies. The punch biopsies were taken from lesional and nonlesional skin of atopic dermatitis patients and of healthy controls (patients undergoing plastic surgery) (table S2, patient information). The concentration of sodium is shown (mean \pm SEM). The right panel illustrates the clinical presentation of a representative patient with atopic dermatitis. (B) NAA from lesional and nonlesional skin of psoriasis patients. Right: Clinical presentation of a representative patient with psoriasis. (C) Representative spectrum of gamma quanta emission. The spectrum has been recorded after a thermal neutron irradiation with 4.3×10^{16} cm⁻² and a counting time of 30 min 1 day after the end of exposure. Unpaired Student's *t* test was used for comparison between two groups.

Staphylococcus aureus, which correlates significantly with the severity of atopic skin inflammation, whereas skin colonization with other bacteria is profoundly reduced in atopic dermatitis (42, 43). *S. aureus* is known to be tolerant to high NaCl concentrations and to outgrow other bacteria in elevated NaCl conditions (42, 44, 45). Therefore, NaCl accumulation could provide a rationale for the microbial dysbiosis of atopic dermatitis, which has so far remained enigmatic.

A limitation of the study is that our investigations have been performed with peripheral human T cells *in vitro* and that we have not firmly established the causality of sodium deposition in the atopic skin and T_H2-mediated disease pathogenesis *in vivo*. An epithelial sodium sensor, Na_x, has recently been shown to respond to perturbations of sodium homeostasis in the skin that is characterized by an atopic barrier defect (46). Although previous work has not investigated the direct link of Na_x with the immune system, sodium sensing has been implicated in fibroblast-associated pathogenesis of atopic dermatitis because the *in vivo* knockdown of Na_x in mice resulted in improvement of atopic dermatitis (46). Its downstream target ENaC, the major sodium channel in epithelial cells, is regulated by NFAT5 and SGK-1 (46–48), which we identified herein to regulate the T_H2 bias. In combination, these murine and our human findings mechanistically link evidence of sodium deposition in the atopic skin with its impact on the pathogenesis of atopic dermatitis via the T_H2 axis. This could finally provide a mechanistic rationale for the early observational clinical studies and therapeutic recommendations by Finkelstein (7) who published in his renowned pediatric reference book in 1912 that dietary salt restriction improves atopic dermatitis. Together, a reductionist model could be envisioned for the pathogenesis of atopic dermatitis, which integrates the phenomenon of NaCl deposition in the atopic skin, the NaCl-induced T_H2 bias of atopic immune deviation, and the hegemony of NaCl-resistant *S. aureus* (fig. S16).

In conclusion, our investigations have revealed NaCl as an ionic checkpoint for human type 2 immunity with a potential clinical relevance for atopic dermatitis. Future studies into the compartmentalization and dynamic regulation of NaCl and other osmolytes in distinct

human tissues will have to be conducted to unravel the full repertoire of tonicity-mediated immunomodulation in health and disease.

MATERIALS AND METHODS

Study design

This is an experimental study involving human blood from healthy donors or C57BL/6 mice. We also collected fresh skin samples from randomly selected healthy donors undergoing elective abdominoplasty or skin biopsies from atopic dermatitis and psoriasis patients as well as their matched blood (table S2). The purpose of the study was to study the effect of NaCl on T cell functions by performing *in vitro* functional assays and to establish an association with the pathogenesis of T cell-mediated skin diseases by blinded NaCl measurements in skin samples using *ex vivo* NAA. Replication is indicated in the figures and legends. The ethics approval was obtained from the Institutional Review Board of the Technical University of Munich (195/15s, 491/16 S, and 146/17S) and the Charité-Universitätsmedizin Berlin (EA1/221/11). All work was carried out in accordance with the Declaration of Helsinki for experiments involving humans. Primary data are reported in data file S1.

Cell purification and sorting

PBMCs were isolated by density gradient centrifugation using Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare). CD4⁺ T cells were isolated from fresh PBMC by positive selection with CD4-specific microbeads (Miltenyi Biotec) using autoMACS Pro Separator. T_H cell subsets were sorted to at least 98% purity as follows: T_H1 subset, CXCR3⁺CCR4⁻CCR6⁻CD45RA⁻CD25⁻CD14⁻; T_H2 subset, CXCR3⁻CCR4⁺CCR6⁻CD45RA⁻CD25⁻CD14⁻; and T_H17 subset, CXCR3⁻CCR4⁺CCR6⁺CD45RA⁻CD25⁻CD14⁻. Memory T_H cells were isolated as CD3⁺CD14⁻CD4⁺CD45RA⁻ lymphocytes, and naïve T cells were isolated as CD3⁺CD14⁻CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁻CCR7⁺ lymphocytes to a purity of over 98%. The antibodies used for sorting by flow cytometry were identical to those we have described previously (11, 30). Cells were sorted with BD FACSAria III (BD Biosciences).

T cells from fresh healthy human skin (abdominoplasties) were isolated after 16-hour digestion of the epidermis and dermis with collagenase IV (0.8 mg/ml; Gibco).

Cell culture

Human T cells were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 2 mM glutamine, 1 % (v/v) nonessential amino acids, 1 % (v/v) sodium pyruvate, penicillin (50 U/ml), streptomycin (50 µg/ml; all from Invitrogen), and 10 % (v/v) fetal calf serum (Biochrom). Hypersalinity (+NaCl) was induced by increasing NaCl concentrations by 50 mM NaCl compared to baseline cell culture medium including supplements (NaCl, Sigma-Aldrich). In some indicated experiments, T cell cultures were performed in the presence of recombinant cytokines (IL-6, 50 ng/ml; IL-12, 10 ng/ml; IL-4, 10 ng/ml; TGF-β, 5 ng/ml; IL-1β, 10 ng/ml; IL-23, 50 ng/ml; all from R&D Systems) or neutralizing antibodies (anti-IL-4, 10 µg/ml; BD Biosciences). Naïve T cells were labeled with carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) according to standard protocols and analyzed by gating on CFSE^{low} cells. T cells were stimulated with plate-bound anti-CD3 (2 µg/ml; clone TR66) and anti-CD28 (CD28.2, 2 µg/ml; both BD Biosciences) for 48 hours before transfer into uncoated wells for another 3 days for a total culture period of 5 days unless indicated otherwise in the legends. T cell clones were generated in nonpolarizing conditions as described previously following single-cell deposition with flow cytometry-assisted cell sorting or by limiting dilution (49).

Cytokine and transcription factor analyses

Intracellular cytokine and transcription factor staining was performed as described before (20). Cells were stained with anti-cytokine antibodies (IL-4, IL-13, IFN-γ, IL-17A, and IL-5, all from BioLegend) and with antibodies against transcription factors (GATA-3 and ROR-γt, eBioscience; T-bet, BioLegend) or surface markers (IL-4R, R&D Systems; IL-12Rβ2, Miltenyi Biotec; CCR8, BioLegend) and were analyzed with BD LSRFortessa (BD Biosciences), CytoFLEX (Beckman Coulter), or MACSQuant Analyzer (Miltenyi Biotec). Flow cytometry data were analyzed with FlowJo software (TreeStar) or with Cytobank (Cytobank Inc.). Cytokines in culture supernatants were measured by ELISA (R&D Systems) or by Luminex (eBioscience) according to standard protocols after restimulation of cultured T cells with PMA (50 nM; Sigma-Aldrich) and plate-bound anti-CD3 (1 µg/ml, TR66) for 8 hours or as indicated in the respective figure legends. Counting beads (CountBright Absolute Counting Beads, Thermo Fisher Scientific) were used to normalize for cell numbers if analysis of cumulative supernatants obtained from 5-day cell cultures was performed.

Gene expression analysis

The High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) was used for complementary DNA (cDNA) synthesis according to the manufacturer's protocol. Transcripts were quantified by real-time PCR with predesigned TaqMan gene expression assays (SGK1, Hs00985033_g1; NFAT5, Hs00232437_m1; TBX21, Hs00203436_m1; GATA3, Hs00231122_m1; RORC2, Hs01076112_m1; 18S, Hs03928985) and reagents (Applied Biosystems). mRNA abundance was normalized to the amount of 18S ribosomal RNA and is expressed as arbitrary units (A.U.). Transcriptome-wide gene expression analysis was performed as outlined in Supplementary Materials and Methods.

Lentiviral gene silencing

Bacterial stocks containing lentiviral vectors with shRNA targeted against *SGK1* and *NFAT5* were purchased from Sigma-Aldrich. All

vectors were amplified and purified using the MaxiPrep or MidiPrep Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Lentiviral particles were generated in human embryonic kidney (HEK) 293 cells. Presorted human memory T cells (5×10^4) were activated on anti-CD3/CD28-coated plates for 12 hours before transduction with supernatants from cultures with pooled lentiviral particles against *SGK1* and *NFAT5*, without shRNA insertion or with scrambled shRNA. After 48 hours, cells were washed and selected with puromycin (Sigma-Aldrich). Gene expression was measured by quantitative real-time PCR 4 days after transduction.

Quantification of skin sodium concentrations

NAA at the Forschungsneutronenquelle Heinz Maier-Leibniz (FRM II) in Munich was used to detect chemical elements in 4-mm frozen skin punch biopsies (lesional and nonlesional). The emission of several gamma quanta of characteristic energy upon decay of isotopes was measured after neutron irradiation. The intensity of the characteristic gamma radiation allowed the determination of the activity (given in becquerels) of the emitter. The activity A at the end of the neutron exposure is connected to the number N of atoms of the mother isotope in the sample by means of the following equation:

$$A = N * \sigma * \phi * \left(1 - \exp \left[-\ln(2) * t / T_{1/2} \right] \right)$$

where ϕ is the thermal neutron flux density in $1/(\text{cm}^2\text{s})$, σ is the activation cross section of the isotope in cm^2 , t is the irradiation time, and $T_{1/2}$ is the half-life of the radioisotope in equal units.

Statistical analysis

Student's two-tailed paired and unpaired t tests as well as Kruskal-Wallis tests with Dunn's multiple comparisons post hoc tests were used for statistical comparisons between two or more groups, respectively, and their use was indicated in the respective figure legends, with error bars indicating the SEM. P values of 0.05 or less were considered significant. Analyses were performed using Prism 6 (GraphPad).

SUPPLEMENTARY MATERIALS

www.sciencetranslationalmedicine.org/cgi/content/full/11/480/eaau0683/DC1

Materials and Methods

- Fig. S1. The viability of human T cells is preserved over a wide range of NaCl concentrations.
 Fig. S2. T_H17 cell signature molecules are up-regulated upon stimulation of memory T_H cells with NaCl.
 Fig. S3. NaCl increases memory T_H2 cell responses independently of exogenous or autocrine IL-4.
 Fig. S4. NaCl induces up-regulation of IL-4, IL-17, as well as IL-4 and IL-17 double-positive T cells.
 Fig. S5. NaCl enhances T_H2 and suppresses T_H1 cell responses in T_H cell clones.
 Fig. S6. Comparison of different osmolytes demonstrates NaCl to be the most potent inducer of IL-4 and suppressor of IFN-γ in memory T cells.
 Fig. S7. Memory CD8 T cells show stable IL-4 and IFN-γ expression upon stimulation with NaCl but up-regulate IL-17.
 Fig. S8. Skin T cells are distinct from blood T cells and differ in their expression of the tissue residency markers CD69 and CD103.
 Fig. S9. NaCl induces the up-regulation of the skin-homing chemokine receptor CCR8, which enriches for T_H2-associated cytokines.
 Fig. S10. Transcriptome-wide enrichment of a T_H2 cell signature by NaCl.
 Fig. S11. NaCl induces T_H2 cell polarization independently of exogenous or autocrine IL-4.
 Fig. S12. T_H17-polarizing cytokine conditions abrogate the T_H2-promoting effect of NaCl.
 Fig. S13. Mouse T cells differentiate into T_H2 cells in response to NaCl.
 Fig. S14. SGK-1 is a downstream target of NFAT5.
 Fig. S15. GATA-3 and T-bet are not regulated by NFAT5 and SGK-1 in low NaCl conditions.
 Fig. S16. Model.
 Table S1. Selected regions and primer sequences used for DNA methylation analyses.

Table S2. Patient information.

Data file S1. Primary data.

References (50–54)

REFERENCES AND NOTES

- F. Sallusto, Heterogeneity of human CD4⁺ T cells against microbes. *Annu. Rev. Immunol.* **34**, 317–334 (2016).
- M. Kleinewietfeld, A. Manzel, J. Titze, H. Kvakan, N. Yosef, R. A. Linker, D. N. Muller, D. A. Hafler, Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic T_H17 cells. *Nature* **496**, 518–522 (2013).
- C. Wu, N. Yosef, T. Thalhamer, C. Zhu, S. Xiao, Y. Kishi, A. Regev, V. K. Kuchroo, Induction of pathogenic T_H17 cells by inducible salt-sensing kinase SGK1. *Nature* **496**, 513–517 (2013).
- N. Wilck, M. G. Matus, S. M. Kearney, S. W. Olesen, K. Forslund, H. Bartolomaeus, S. Haase, A. Mahler, A. Balogh, L. Markó, O. Vvedenskaya, F. H. Kleiner, D. Tsvetkov, L. Klug, P. I. Costea, S. Sunagawa, L. Maier, N. Rakova, V. Schatz, P. Neubert, C. Frätzer, A. Krannich, M. Gollasch, D. A. Grohwa, B. F. Côte-Real, R. G. Gerlach, M. Basic, A. Typas, C. Wu, J. M. Titze, J. Jantsch, M. Boschmann, R. Dechend, M. Kleinewietfeld, S. Kempa, P. Bork, R. A. Linker, E. J. Alm, D. N. Müller, Salt-responsive gut commensal modulates T_H17 axis and disease. *Nature* **551**, 585–589 (2017).
- R. Eil, S. K. Vodnalá, D. Clever, C. A. Klebanoff, M. Sukumar, J. H. Pan, D. C. Palmer, A. Gros, T. N. Yamamoto, S. J. Patel, G. C. Guittard, Z. Yu, V. Carbonaro, K. Okkenhaug, D. S. Schrupp, W. M. Linehan, R. Roychowdhury, N. P. Restifo, Ionic immune suppression within the tumour microenvironment limits T cell effector function. *Nature* **537**, 539–543 (2016).
- J.-F. Bach, The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N. Engl. J. Med.* **347**, 911–920 (2002).
- H. Finkelstein, *Lehrbuch der Sauglingskrankheiten* (Berlin Julius Springer Verlag, 1921), pp. 812–814.
- C. R. Mackay, Migration pathways and immunologic memory among T lymphocytes. *Semin. Immunol.* **4**, 51–58 (1992).
- C. Kopp, P. Linz, L. Wachsmuth, A. Dahlmann, T. Horbach, C. Schöfl, W. Renz, D. Santoro, T. Niendorf, D. N. Müller, M. Neiningler, A. Cavallaro, K.-U. Eckardt, R. E. Schmieder, F. C. Luft, M. Uder, J. Titze, ²³Na magnetic resonance imaging of tissue sodium. *Hypertension* **59**, 167–172 (2012).
- G. F. Sonnenberg, L. A. Fouser, D. Artis, Border patrol: Regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22. *Nat. Immunol.* **12**, 383–390 (2011).
- C. E. Zielinski, F. Mele, D. Aschenbrenner, D. Jarrossay, F. Ronchi, M. Gattorno, S. Monticelli, A. Lanzavecchia, F. Sallusto, Pathogen-induced human T_H17 cells produce IFN- γ or IL-10 and are regulated by IL-1 β . *Nature* **484**, 514–518 (2012).
- S. Meller, J. Di Domizio, K. S. Voo, H. C. Friedrich, G. Chamilos, D. Ganguly, C. Conrad, J. Gregorio, D. Le Roy, T. Roger, J. E. Ladbury, B. Homey, S. Watowich, R. L. Modlin, D. P. Kontoyiannis, Y.-J. Liu, S. T. Arold, M. Gilliet, T_H17 cells promote microbial killing and innate immune sensing of DNA via interleukin 26. *Nat. Immunol.* **16**, 970–979 (2015).
- W. E. Paul, What determines Th2 differentiation, in vitro and in vivo? *Immunol. Cell Biol.* **88**, 236–239 (2010).
- J. J. C. Thome, D. L. Farber, Emerging concepts in tissue-resident T cells: Lessons from humans. *Trends Immunol.* **36**, 428–435 (2015).
- J. Titze, M. Shakibaei, M. Schaffhuber, G. Schulze-Tanzil, M. Porst, K. H. Schwind, P. Dietsch, K. F. Hilgers, Glycosaminoglycan polymerization may enable osmotically inactive Na⁺ storage in the skin. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **287**, H203–H208 (2004).
- C. E. Zielinski, Human T cell immune surveillance: Phenotypic, functional and migratory heterogeneity for tailored immune responses. *Immunol. Lett.* **190**, 125–129 (2017).
- S. A. Islam, D. S. Chang, R. A. Colvin, M. H. Byrne, M. L. McCully, B. Moser, S. A. Lira, I. F. Charo, A. D. Luster, Mouse CCL8, a CCR8 agonist, promotes atopic dermatitis by recruiting IL-5⁺ T_H2 cells. *Nat. Immunol.* **12**, 167–177 (2011).
- M. L. McCully, K. Ladell, R. Andrews, R. E. Jones, K. L. Miners, L. Roger, D. M. Baird, M. J. Cameron, Z. M. Jessop, I. S. Whitaker, E. L. Davies, D. A. Price, B. Moser, CCR8 expression defines tissue-resident memory T cells in human skin. *J. Immunol.* **200**, 1639–1650 (2018).
- S. Eyerich, C. E. Zielinski, Defining Th-cell subsets in a classical and tissue-specific manner: Examples from the skin. *Eur. J. Immunol.* **44**, 3475–3483 (2014).
- R. Noster, R. Riedel, M.-F. Mashreghi, H. Radbruch, L. Harms, C. Haftmann, H.-D. Chang, A. Radbruch, C. E. Zielinski, IL-17 and GM-CSF expression are antagonistically regulated by human T helper cells. *Sci. Transl. Med.* **6**, 241ra80 (2014).
- Y. Kanno, G. Vahedi, K. Hirahara, K. Singleton, J. J. O’Shea, Transcriptional and epigenetic control of T helper cell specification: Molecular mechanisms underlying commitment and plasticity. *Annu. Rev. Immunol.* **30**, 707–731 (2012).
- C. López-Rodríguez, J. Aramburu, L. Jin, A. S. Rakehan, M. Michino, A. Rao, Bridging the NFAT and NF- κ B families: NFAT5 dimerization regulates cytokine gene transcription in response to osmotic stress. *Immunity* **15**, 47–58 (2001).
- L. M. Bell, M. L. L. Leong, B. Kim, E. Wang, J. Park, B. A. Hemmings, G. L. Firestone, Hyperosmotic stress stimulates promoter activity and regulates cellular utilization of the serum- and glucocorticoid-inducible protein kinase (Sgk) by a p38 MAPK-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* **275**, 25262–25272 (2000).
- T. Werfel, J.-P. Allam, T. Biedermann, K. Eyerich, S. Gilles, E. Guttman-Yassky, W. Hoetzenecker, E. Knol, H.-U. Simon, A. Wollenberg, T. Bieber, R. Lauener, P. Schmid-Grendelmeier, C. Traidl-Hoffmann, C. A. Akdis, Cellular and molecular immunologic mechanisms in patients with atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **138**, 336–349 (2016).
- S. Weidinger, L. A. Beck, T. Bieber, K. Kabashima, A. D. Irvine, Atopic dermatitis. *Nat. Rev. Dis. Primers* **4**, 1 (2018).
- R. R. Greenberg, P. Bode, E. A. De Nadai Fernandez, Neutron activation analysis: A primary method of measurement. *Spectrochim. Acta Part B* **66**, 193–241 (2011).
- C. E. Zielinski, D. Corti, F. Mele, D. Pinto, A. Lanzavecchia, F. Sallusto, Dissecting the human immunologic memory for pathogens. *Immunol. Rev.* **240**, 40–51 (2011).
- W. E. Paul, J. Zhu, How are T_H2-type immune responses initiated and amplified? *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 225–235 (2010).
- F. Sallusto, C. E. Zielinski, A. Lanzavecchia, Human Th17 subsets. *Eur. J. Immunol.* **42**, 2215–2220 (2012).
- R. Noster, H. D. de Koning, E. Maier, M. Prelog, E. Lainka, C. E. Zielinski, Dysregulation of proinflammatory versus anti-inflammatory human TH17 cell functionalities in the autoimmune Schnitzler syndrome. *J. Allergy Clin. Immunol.* **138**, 1161–1169.e6 (2016).
- K. S. Lang, C. Weigert, S. Braedel, S. Fillon, M. Palmada, E. Schleicher, H.-G. Rammensee, F. Lang, Inhibition of interferon- γ expression by osmotic shrinkage of peripheral blood lymphocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **284**, C200–C208 (2003).
- E. B. Heikamp, C. H. Patel, S. Collins, A. Waickman, M.-H. Oh, I.-H. Sun, P. Illei, A. Sharma, A. Naray-Fejes-Toth, G. Fejes-Toth, J. Misra-Sen, M. R. Horton, J. D. Powell, The AGC kinase SGK1 regulates T_H1 and T_H2 differentiation downstream of the mTORC2 complex. *Nat. Immunol.* **15**, 457–464 (2014).
- G. M. Delgoffe, K. N. Pollizzi, A. T. Waickman, E. Heikamp, D. J. Meyers, M. R. Horton, B. Xiao, P. F. Worley, J. D. Powell, The kinase mTOR regulates the differentiation of helper T cells through the selective activation of signaling by mTORC1 and mTORC2. *Nat. Immunol.* **12**, 295–303 (2011).
- K. Lee, P. Gudapati, S. Dragovic, C. Spencer, S. Joyce, N. Killeen, M. A. Magnuson, M. Boothby, Mammalian target of rapamycin protein complex 2 regulates differentiation of Th1 and Th2 cell subsets via distinct signaling pathways. *Immunity* **32**, 743–753 (2010).
- G.-M. Chae, A. K. Ehrlich, P. Y. Chan, A. M. Teixeira, O. Henegariu, L. Hao, J. H. Shin, J.-H. Park, W. H. Tang, S.-T. Kim, S. E. Maher, K. Goldsmith-Pestana, P. Shan, J. Hwa, P. J. Lee, D. S. Krause, C. V. Rothlin, D. McMahon-Pratt, A. L. M. Bothwell, The Wnt antagonist Dickkopf-1 promotes pathological type 2 cell-mediated inflammation. *Immunity* **44**, 246–258 (2016).
- P. M. Brunner, E. Guttman-Yassky, D. Y. M. Leung, The immunology of atopic dermatitis and its reversibility with broad spectrum and targeted therapies. *J. Allergy Clin. Immunol.* **139**, S65–S76 (2017).
- Y.-D. Park, Y.-J. Lyou, K.-J. Lee, D.-Y. Lee, J.-M. Yang, Towards profiling the gene expression of fibroblasts from atopic dermatitis patients: Human 8K complementary DNA microarray. *Clin. Exp. Allergy* **36**, 649–657 (2006).
- J. Malaise, V. Bourguignon, E. De Vuyst, C. Lambert de Rouvroit, A. F. Nikkels, B. Flamion, Y. Pournay, Hyaluronan metabolism in human keratinocytes and atopic dermatitis skin is driven by a balance of hyaluronan synthases 1 and 3. *J. Invest. Dermatol.* **134**, 2174–2182 (2014).
- A. Hiyama, S. Gajghate, D. Sakai, J. Mochida, I. M. Shapiro, M. V. Risbud, Activation of TonEBP by calcium controls β 1,3-glucuronosyltransferase-1 expression, a key regulator of glycosaminoglycan synthesis in cells of the intervertebral disc. *J. Biol. Chem.* **284**, 9824–9834 (2009).
- M. D. Howell, B. E. Kim, P. Gao, A. V. Grant, M. Boguniewicz, A. DeBenedetto, L. Schneider, L. A. Beck, K. C. Barnes, D. Y. M. Leung, Cytokine modulation of atopic dermatitis flaggrin skin expression. *J. Allergy Clin. Immunol.* **124**, R7–R12 (2009).
- P. M. Elias, Y. Hatano, M. L. Williams, Basis for the barrier abnormality in atopic dermatitis: Outside-inside-outside pathogenic mechanisms. *J. Allergy Clin. Immunol.* **121**, 1337–1343 (2008).
- J. A. Geoghegan, A. D. Irvine, T. J. Foster, *Staphylococcus aureus* and atopic dermatitis: A complex and evolving relationship. *Trends Microbiol.* **26**, 484–497 (2017).
- A. L. Byrd, C. Deming, S. K. B. Cassidy, O. J. Harrison, W.-I. Ng, S. Conlan; NISC Comparative Sequencing Program, Y. Belkaid, J. A. Segre, H. H. Kong, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strain diversity underlying pediatric atopic dermatitis. *Sci. Transl. Med.* **9**, eaal4651 (2017).

44. I. A. Parfentjev, A. R. Catelli, Tolerance of *Staphylococcus aureus* to sodium chloride. *J. Bacteriol.* **88**, 1–3 (1964).
45. G. H. Chapman, The significance of sodium chloride in studies of staphylococci. *J. Bacteriol.* **50**, 201–203 (1945).
46. W. Xu, S. J. Hong, A. Zhong, P. Xie, S. Jia, Z. Xie, M. Zeitchek, S. Niknam-Bienia, J. Zhao, D. M. Porterfield, D. J. Surmeier, K. P. Leung, R. D. Galiano, T. A. Mustoe, Sodium channel Na_v is a regulator in epithelial sodium homeostasis. *Sci. Transl. Med.* **7**, 312ra177 (2015).
47. W. Xu, S. J. Hong, M. Zeitchek, G. Cooper, S. Jia, P. Xie, H. A. Qureshi, A. Zhong, M. D. Porterfield, R. D. Galiano, D. J. Surmeier, T. A. Mustoe, Hydration status regulates sodium flux and inflammatory pathways through epithelial sodium channel (ENaC) in the skin. *J. Invest. Dermatol.* **135**, 796–806 (2015).
48. D. Pearce, T. R. Kleyman, Salt, sodium channels, and SGK1. *J. Clin. Invest.* **117**, 592–595 (2007).
49. M. Messi, I. Giacchetto, K. Nagata, A. Lanzavecchia, G. Natoli, F. Sallusto, Memory and flexibility of cytokine gene expression as separable properties of human T_H1 and T_H2 lymphocytes. *Nat. Immunol.* **4**, 78–86 (2003).
50. M. M. Montoya, J. Maul, P. B. Singh, H. H. Pua, F. Dahlström, N. Wu, X. Huang, K. M. Ansel, D. Baumjohann, A distinct inhibitory function for miR-18a in Th17 cell differentiation. *J. Immunol.* **199**, 559–569 (2017).
51. A. Dobin, C. A. Davis, F. Schlesinger, J. Drenkow, C. Zaleski, S. Jha, P. Batut, M. Chaisson, T. R. Gingeras, STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **29**, 15–21 (2013).
52. F. Krueger, Trim Galore! (2016); www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/.
53. A. Wysoker, K. Tibbetts, T. Fennell, Picard Tools (2016); <https://broadinstitute.github.io/picard/>.
54. M. I. Love, W. Huber, S. Anders, Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **15**, 550 (2014).

Acknowledgments: We thank S. Wolff for coordinating the skin irradiation at the neutron activation source in Garching. We thank S. Hegenbarth for technical assistance and C. Heuser for critical review of the manuscript. We acknowledge the BMC Core Facility Flow Cytometry of the LMU Munich for providing equipment and the Flow Cytometry Core Facility of the

German Rheumatism Research Center (DRFZ) in Berlin for cell sorting. **Funding:** This work was funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG; German Research Foundation SFB1054 Teilprojekt B10 to C.E.Z., Teilprojekt B12 to D.B., SFB1335 Teilprojekt P18 to C.E.Z., Teilprojekt P17 to T.B., Emmy Noether Programme BA 5132/1-1 to D.B., and SFB TR156 to S.G.), the Fritz-Thyssen Stiftung (to C.E.Z.), and the German Center for Infection Research (to C.E.Z.).

Author contributions: J. Matthias performed experiments with human cells and analyzed and interpreted the data. J. Maul performed all experiments with murine cells and, together with D.B., analyzed and interpreted the data. R.N., H.M., Y.-Y.C. and D.S. performed experiments and analyzed the data. H.G., F.J., K.E., D.R., and H.M. performed the measurements of sodium concentrations by NAA and analyzed and interpreted the data. G.G. and J.W. performed the epigenetic experiments and analyzed and interpreted the data. G.G. and A.W. performed next-generation RNA sequencing (RNA-seq). K.N. processed and analyzed the RNA-seq data (ID: PRJNA503839). S.D. and P.K. performed further bioinformatic analyses with transcriptomic datasets provided by K.N. N.G.-S., K.E., T.B., and S.G. provided skin biopsies from atopic dermatitis patients and characterized and scored the patient samples. C.E.Z. conceived the study, supervised the experiments, interpreted the data, and wrote the manuscript. All authors reviewed and approved the manuscript. **Competing interests:** The authors declare that they have no competing interests. **Data and materials availability:** All data related to this study are present in the paper or the Supplementary Materials.

Submitted 5 May 2018

Resubmitted 14 August 2018

Accepted 25 January 2019

Published 20 February 2019

10.1126/scitranslmed.aau0683

Citation: J. Matthias, J. Maul, R. Noster, H. Meinel, Y.-Y. Chao, H. Gerstenberg, F. Jeschke, G. Gasparoni, A. Welle, J. Walter, K. Nordström, K. Eberhardt, D. Renisch, S. Donakonda, P. Knolle, D. Soll, S. Grabbe, N. Garzorz-Stark, K. Eyerich, T. Biedermann, D. Baumjohann, C. E. Zielinski, Sodium chloride is an ionic checkpoint for human T_H2 cells and shapes the atopic skin microenvironment. *Sci. Transl. Med.* **11**, eaau0683 (2019).

Supplementary Materials for

Sodium chloride is an ionic checkpoint for human T_H2 cells and shapes the atopic skin microenvironment

Julia Matthias, Julia Maul, Rebecca Noster, Hanna Meinl, Ying-Yin Chao, Heiko Gerstenberg, Florian Jeschke, Gilles Gasparoni, Anna Welle, Jörn Walter, Karl Nordström, Klaus Eberhardt, Dennis Renisch, Sainitin Donakonda, Percy Knolle, Dominik Soll, Stephan Grabbe, Natalie Garzorz-Stark, Kilian Eyerich, Tilo Biedermann, Dirk Baumjohann, Christina E. Zielinski*

*Corresponding author. Email: christina.zielinski@tum.de

Published 20 February 2019, *Sci. Transl. Med.* **11**, eaau0683 (2019)
DOI: 10.1126/scitranslmed.aau0683

The PDF file includes:

Materials and Methods

- Fig. S1. The viability of human T cells is preserved over a wide range of NaCl concentrations.
- Fig. S2. T_H17 cell signature molecules are up-regulated upon stimulation of memory T_H cells with NaCl.
- Fig. S3. NaCl increases memory T_H2 cell responses independently of exogenous or autocrine IL-4.
- Fig. S4. NaCl induces up-regulation of IL-4, IL-17, as well as IL-4 and IL-17 double-positive T cells.
- Fig. S5. NaCl enhances T_H2 and suppresses T_H1 cell responses in T_H cell clones.
- Fig. S6. Comparison of different osmolytes demonstrates NaCl to be the most potent inducer of IL-4 and suppressor of IFN- γ in memory T cells.
- Fig. S7. Memory CD8 T cells show stable IL-4 and IFN- γ expression upon stimulation with NaCl but up-regulate IL-17.
- Fig. S8. Skin T cells are distinct from blood T cells and differ in their expression of the tissue residency markers CD69 and CD103.
- Fig. S9. NaCl induces the up-regulation of the skin-homing chemokine receptor CCR8, which enriches for T_H2-associated cytokines.
- Fig. S10. Transcriptome-wide enrichment of a T_H2 cell signature by NaCl.
- Fig. S11. NaCl induces T_H2 cell polarization independently of exogenous or autocrine IL-4.
- Fig. S12. T_H17-polarizing cytokine conditions abrogate the T_H2-promoting effect of NaCl.
- Fig. S13. Mouse T cells differentiate into T_H2 cells in response to NaCl.
- Fig. S14. SGK-1 is a downstream target of NFAT5.
- Fig. S15. GATA-3 and T-bet are not regulated by NFAT5 and SGK-1 in low NaCl conditions.
- Fig. S16. Model.
- Table S1. Selected regions and primer sequences used for DNA methylation analyses.

Table S2. Patient information.
References (50–54)

Other Supplementary Material for this manuscript includes the following:

(available at www.sciencetranslationalmedicine.org/cgi/content/full/11/480/eaau0683/DC1)

Data file S1. Primary data.

Supplementary Materials and Methods

Murine cell culture conditions and cytokine analyses

For experiments with murine T cells, single-cell suspensions were generated from spleen, inguinal, axillary, and brachial lymph nodes of C57BL/6 and BALB/c mice. Mice were purchased from Janvier Labs and housed under specific pathogen-free conditions. All experiments were performed in accordance with the regulations of the Regierung von Oberbayern. Naïve CD4⁺ T cells were isolated by negative selection via the mouse naïve CD4⁺ T cell isolation kit (StemCell Technologies). Cells were seeded at a density of 200,000 cells/well in a flat-bottom 96-well plate, stimulated with plate-bound anti-CD3 and anti-CD28 antibodies (Th2 condition: 0.25 µg/ml anti-CD3 and 2 µg/ml anti-CD28; all other conditions 2 µg/ml anti-CD3 and 2 µg/ml anti-CD28, BioXCell) and different mixtures of cytokines and monoclonal antibodies (Th0 condition: anti-IL-4, anti-IFN γ ; Th1 condition: anti-IL-4, IL-12; Th2 condition: anti-IFN γ , IL-4; Treg condition: anti-IL-4, anti-IFN γ , TGF- β ; Th17 conditions: anti-IL-4, anti-IFN γ , TGF- β , IL-6, or anti-IL-4, anti-IFN γ , TGF- β , IL-6, IL-23, or anti-IL-4, anti-IFN γ , IL-1 β , IL-6, IL-23) with or without addition of 40 mM NaCl in DMEM (supplemented with 10% FCS, 10 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate, 1x MEM NEAA, 50 µM β -Mercaptoethanol, and 100 U PenStrep) (LifeTechnologies). Neutralizing antibodies and cytokines were used at the following concentrations: anti-IL-4 (10 µg/ml) and anti-IFN γ (10 µg/ml) from BioLegend; IL-4 (50 ng/ml), IL-12 (10 ng/ml), IL-6 (25 ng/ml), IL-1 β (20 ng/ml), IL-23 (20 ng/ml) and TGF- β (2 ng/ml) from PeproTech. After 2.5 days in culture, cells were split into two new 96-well plates with a freshly prepared cytokine mix.

For experiments with murine T cells, cells were analyzed by flow cytometry after a culture period of 3.5 days. Intracellular cytokine staining and staining for surface markers and transcription factors were performed as described previously (50). The following fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies were used: anti-CD4 (clone RM4-5, Tonbo

Biosciences); GATA-3 (TWAJ, eBioscience); IL-4 (11B11, BioLegend). Data were acquired on an LSRFortessa (BD Biosciences) or a BD FACSCanto II (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo software (TreeStar).

For quantification of murine cytokine production by ELISA, cells were stimulated for 2.5 days *in vitro* in polarizing conditions, washed twice and resuspended in medium without any additional NaCl, cytokines, or blocking antibodies. After additional 24 h of incubation at 37°C, the supernatant was collected and the IL-4 concentration was determined by ELISA (Mouse IL-4 ELISA MAX Deluxe, BioLegend) according to the manufacturer's instructions. Absorbance was measured with the GloMax Discover plate reader (Promega). IL-4 concentrations were normalized to the number of viable CD4⁺ T cells per well, which was determined by flow cytometry using counting beads (123count eBeads Counting Beads, Invitrogen).

Transcriptome analysis

From 0.5 – 1 x 10⁶ snap-frozen cells total RNA was isolated for mRNA seq and DNaseI-treated using the Direct-zol kit (Zymo Research) according to the manufacturer's protocol. From ca. 200 ng total RNA, mRNA was bound to streptavidin-coated tubes with the mRNA Capture kit (Roche). After three washes, first strand synthesis was performed with 200U M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) at 37°C for 1.5 h. Second strands were generated using 10U DNA Polymerase I (Thermo Fisher Scientific), 200U T4-Ligase (NEB), 5U RNase H at 16° C for 2.5 h. Then cDNA was tagmented with 0.2 µl Tn5 enzyme from the Nextera Library Preparation kit (Illumina) for 5 min at 55° C. After clean-up with the MinElute PCR purification kit (Qiagen) and PCR amplification (9 - 12 cycles) with NEB Next PCR Master mix, samples were purified with AMPure XP beads (Beckman Coulter) and sequenced for 100 basepairs using a V3 single read flow cell on a HiSeq 2500 (Illumina). The generated data was trimmed for quality and adapter reads with TrimGalore! (v0.3.3;

http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/) and then mapped with STAR aligner (51, 52). Duplicates were marked with the MarkDuplicates function from Picard tools (53). Reads were summarized with featureCounts. Differentially expressed genes (DEGs) were extracted using DeSeq2 package in R (54).

Gene set enrichment analysis

Gene set enrichment was performed using GSEA v3.0 (<http://www.gseamsigdb.org/gsea/index.jsp>). The differentially expressed genes from the transcriptome comparing memory T cells cultured in low versus high NaCl conditions were ranked according to the Wald test statistics for differential expression provided by DESeq2 (RNA-Seq). The GSEA PreRanked tool was utilized in GSEA to compute the normalized enrichment score (NES). FDR $q < 0.25$ is considered a statistically significant enrichment. The NES relates to the enrichment score, which mirrors the degree to which a gene set is overrepresented at the top or bottom of a ranked list of genes. The Th1 and Th2 gene sets (gene set: GSE22886_Th1_vs_Th2 48h) were obtained from the Molecular signature database (MSigDB).

Targeted methylation analysis using NGS

Regional DNA methylation at genes of interest was analyzed using deep sequencing of bisulfite PCR amplicons. For PCR amplicon design, locus-specific primers for selected regions were designed using an in-house bisulfite primer design tool (oligos see **table S1**). At the 5' ends of each primer, NGS-compatible adapter tags were added (forward oligo tag: 5'TCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT 3', reverse oligo tag: 5'GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT 3'). PCRs were set up in 30 μ l reactions using 3 μ l of 10x Hot Fire Pol Buffer (Solis BioDyne), 4 μ l of 10 mM dNTPs (Fisher Scientific), 2.25 μ l of 25 mM MgCl₂ (Solis BioDyne), 0.6 μ l of amplicon specific

forward and reverse primer (10 μ M each), 0.3 μ l of Hot FirePol DNA Polymerase (5 U/ μ l ; Solis Biodyne), 1 μ l of bisulfite DNA and 18.25 μ l of double distilled water. PCRs were run in an ABI Veriti thermo-cycler (Life Technologies) using the following program: 95°C for 10 min, then 40 cycles of 95°C for 1 min, 2.5 min of 56°C and 40 s at 72°C, followed by 7 min of 72°C and hold at 4°C. PCR products were cleaned up using Agencourt AMPure XP Beads (Beckman Coulter). All amplified products were diluted to 4 nM. Next, amplicon NGS tags were finalized by PCR: a typical 50 μ l reaction contained 25 μ l of the DNA pool, 5 μ l of 10x HotStartTaq buffer (Qiagen), 4 μ l of 10 mM d’NTPs, 2 μ l of 25 mM MgCl₂, 2.5 μ l of 10 μ M forward primer

(5’CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATXXXXXXXXGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT 3’ , ,X’ marks a sample-specific barcode), 2.5 μ l of 10 mM reverse-primer (5’AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACXXXXXXXXTCTTCCCTACACGACGC TCTTCCGATC 3’ , ,X’ marks a sample-specific barcode), 0.6 μ l of HotStartTaq polymerase (Qiagen) and 8.6 μ l of double distilled water. The reactions were incubated for 15 min at 97°C, followed by 5 cycles of 97°C (30 s), 60°C (30 s) and 72°C (30 s). After another ampure beads based clean up step, samples were quantified by a Qubit High Sensitivity Assay (Life Technologies) and diluted to 10 nM. Finally, all samples were pooled and loaded on an Illumina MiSeq sequencing machine. Amplicons were sequenced 2x250 bp (paired end) involving a MiSeq reagent kit V2 chemistry (Illumina). The raw sequencing data was quality checked using FastQC (v0.10.3; <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) and trimmed for adaptors and low quality bases using the tools cutadapt (v1.3; <https://code.google.com/p/cutadapt/>) and Trim Galore! (v0.3.3; http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/). Paired reads were joined using the FLASH tool (<http://ccb.jhu.edu/software/FLASH/>). Next, reads were sorted in a two-step procedure by (i) the NGS barcode adaptors to assign Sample ID and (ii) the initial 15 bp to assign amplicon ID. Subsequently, the sorted data were loaded into the BiQAnalyzer HT

software 22 (<http://biq-analyzer-ht.bioinf.mpi-inf.mpg.de/>) using the following settings: the analyzed methylation context was set to "C", minimal sequence identity was set to 0.9 and minimal conversion rate was set to 0.95. Only reads that covered more than 30% of all CpGs in an amplicon were used. The filtered high quality reads were then used for calling of methylation levels. Statistical analyses on obtained methylation calls were analyzed using in-house R-scripts.

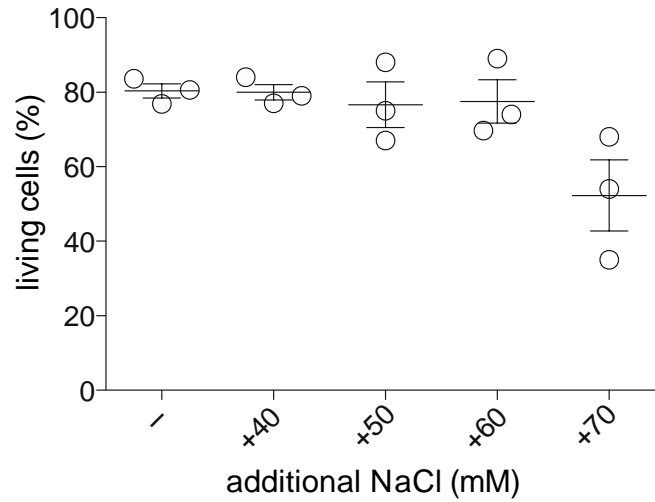


Fig. S1. The viability of human T cells is preserved over a wide range of NaCl concentrations. Human CD4⁺ CD45RA⁻ memory T cells were sorted by flow cytometry and stimulated for 48h with CD3 and CD28 mAb for a total culture period of 5 days in the presence or absence of titrated concentrations of additional NaCl. T cell viability was assessed with Zombie fixable viability dyes and flow cytometry. Each circle represents an individual healthy blood donor and independent experiment (mean \pm S.E.M. n = 3).

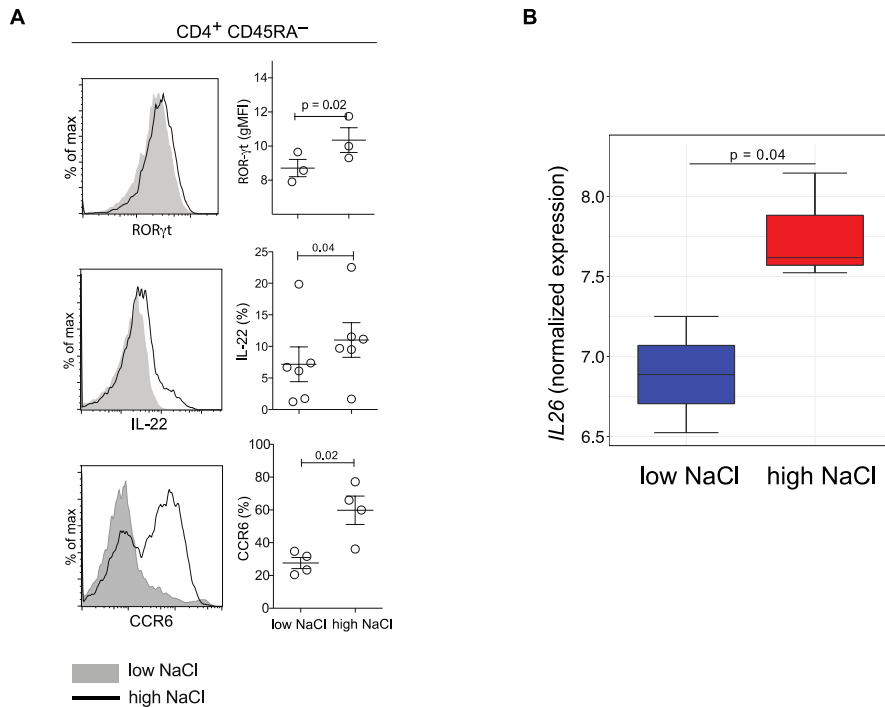


Fig. S2. TH17 cell signature molecules are up-regulated upon stimulation of memory TH cells with NaCl. (A) Human memory T helper cells were sorted from fresh PBMC as CD4⁺CD14⁻CD45RA⁻ T cells by flow cytometry and stimulated for a total culture period of 5 days in the presence (high) or absence (low) of additional 50 mM NaCl with CD3 and CD28 mAb for 48h. Intracellular staining and flow cytometry (FACS) on day 5 following PMA and ionomycin restimulation. Shown is one representative FACS staining (left panel) and cumulative data with each circle representing one donor (mean \pm S.E.M.). Paired Student's *t* tests were used for comparisons between two groups. *p*, *P* value. (B) T cells from three individual donors were isolated and stimulated as in (A) and then subjected to transcriptomic analysis by next-generation mRNA sequencing. Shown are boxplots of normalized gene expression levels for *IL26* using the DESeq2 software tool. Log₂ scale transformation of sequence read counts by normalizing with respect to RNA-seq library size was performed and rlog values of *IL26* are presented. Red coloring denotes upregulation, blue coloring denotes downregulation.

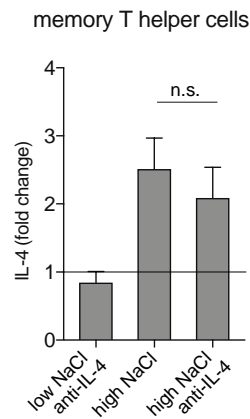


Fig. S3. NaCl increases memory T_H2 cell responses independently of exogenous or autocrine IL-4. Human memory T helper cells were sorted from fresh PBMC as CD4⁺CD14⁻CD45RA⁻ T cells by flow cytometry and stimulated for a total culture period of 5 days in the presence (high) or absence (low) of additional 50 mM NaCl with CD3 and CD28 mAb for 48h. Anti-IL-4 neutralizing antibodies (10µg/ml) were added where indicated at the beginning of the culture. Intracellular staining and flow cytometry (FACS) on day 5 following PMA and ionomycin restimulation. Cytokine expression was normalized to control conditions (low NaCl). (n = 5; mean ± S.E.M.; p < 0.001, Kruskal Wallis test).

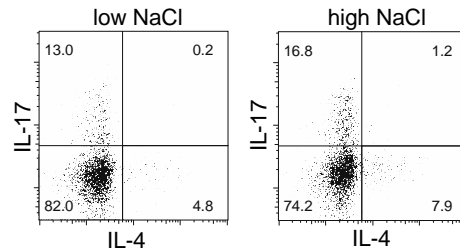


Fig. S4. NaCl induces up-regulation of IL-4, IL-17, as well as IL-4 and IL-17 double-positive T cells. Human memory T helper cells were sorted from fresh PBMC as CD4⁺CD14⁻CD45RA⁻ T cells by flow cytometry and stimulated for a total culture period of 5 days in the presence (high) or absence (low) of additional 50 mM NaCl with CD3 and CD28 mAb for 48h. Intracellular staining and flow cytometry (FACS) on day 5 following PMA and ionomycin restimulation. Shown is one representative FACS staining of data shown in Fig.1A.

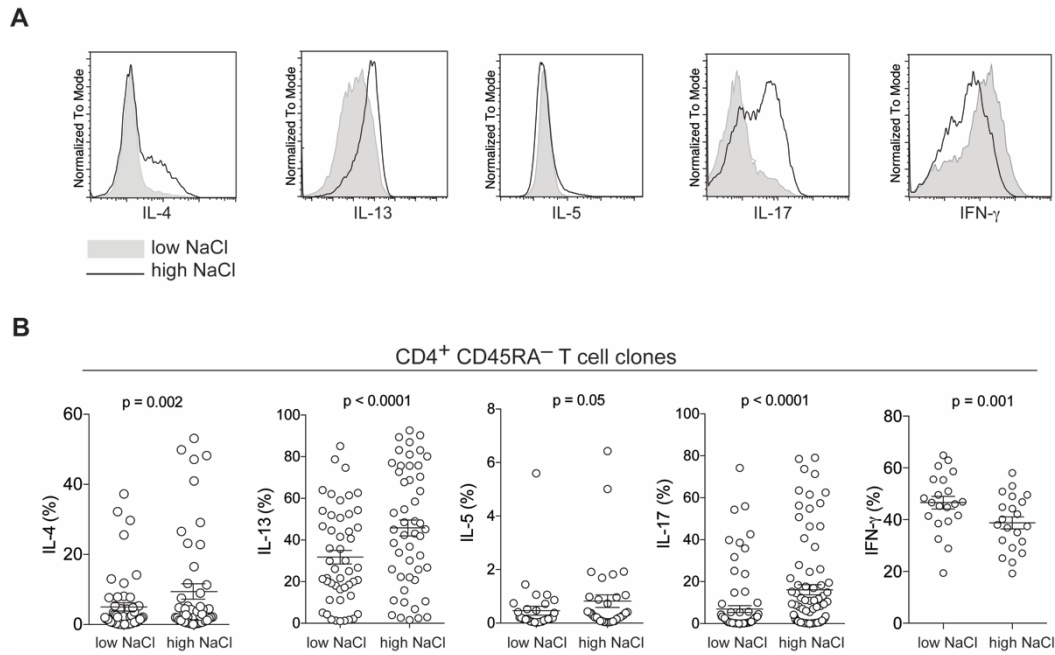


Fig. S5. NaCl enhances TH2 and suppresses TH1 cell responses in TH cell clones. Human memory T helper cells were sorted from fresh PBMC as CD4⁺CD14⁻CD45RA⁻ T cells by flow cytometry. T cell clones were generated from sorted cells during a 14 day culture period with irradiated allogeneic feeder cells and phytohemagglutinin before restimulation in low and high NaCl conditions with CD3 and CD28 mAb for 48h and a total restimulation period of 5 days. T cell clones were randomly selected from growing cultures for these restimulation experiments. Intracellular staining and flow cytometry (FACS) on day 5 following PMA and ionomycin restimulation. Shown is one representative FACS staining for each cytokine in a T cell clone (**A**) and cumulative data with each circle representing one individual T cell clone (mean \pm S.E.M.) (**B**). Paired Student's *t* tests were used for comparisons between two groups. *p*, *P* value.

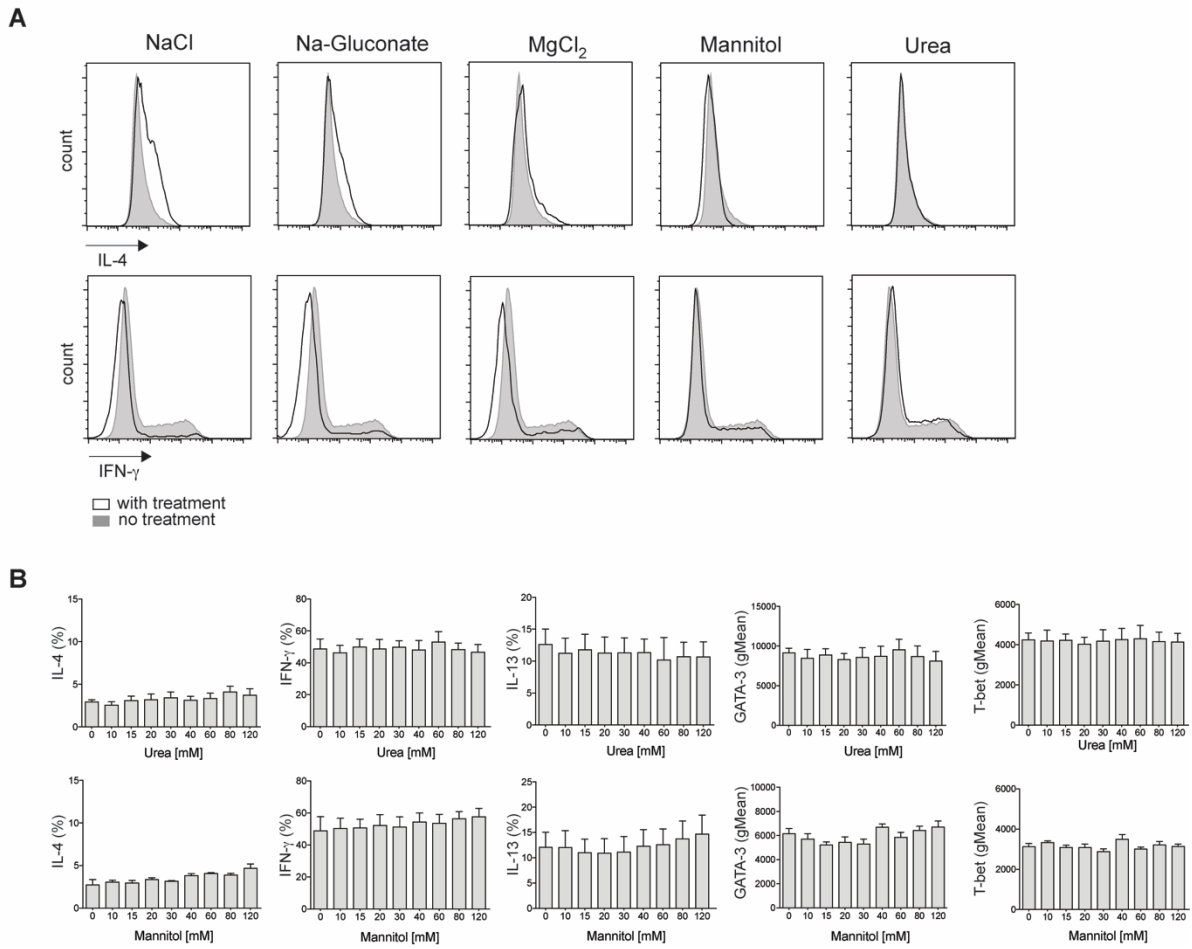


Fig. S6. Comparison of different osmolytes demonstrates NaCl to be the most potent inducer of IL-4 and suppressor of IFN- γ in memory T cells. (A) Human CD4⁺ CD45RA⁻ memory T cells were sorted by flow cytometry and stimulated for 48h with CD3 and CD28 mAb for a total culture period of 5 days in the presence or absence of the indicated osmolytes (+ 50 mM NaCl, + 40 mM Na-Gluconate, + 30 mM MgCl₂, + 80 mM mannitol, + 80 mM urea). Shown is one representative experiment (n, number of experiments, n = 3-6). **(B)** Human CD4⁺CD45RA⁻ memory T cells were stimulated as in (A) in the presence of a range of titrated concentrations of urea or mannitol, which did not adversely affect viability (viability \geq 80%). (n = 3, mean \pm S.E.M.).

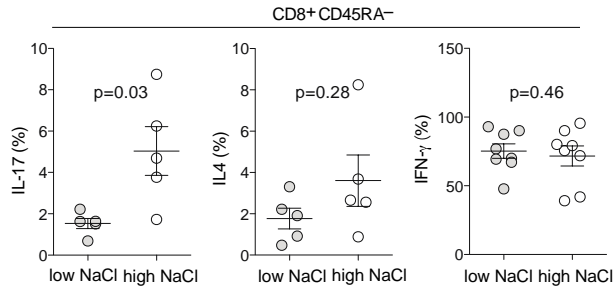


Fig. S7. Memory CD8 T cells show stable IL-4 and IFN- γ expression upon stimulation with NaCl but up-regulate IL-17. CD8⁺ CD45RA⁻ T cells were sorted by flow cytometry and stimulated for 48h with CD3 and CD28 mAb for a total culture period of 5 days in the presence or absence of 50 mM NaCl. Intracellular cytokine staining and flow cytometry on day 5 following restimulation for 5h with PMA and ionomycin. Each circle represents an individual experiment and donor (mean \pm S.E.M.). Paired Student's *t* tests were used for comparisons between two groups. p, *P* value.

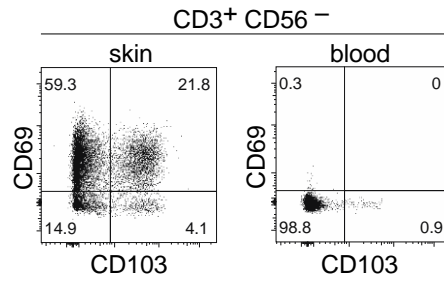


Fig. S8. Skin T cells are distinct from blood T cells and differ in their expression of the tissue residency markers CD69 and CD103. T cells were isolated by enzymatic digestion with collagenase IV from healthy human skin that was obtained from abdominoplasties. T cells were sorted by flow cytometry to obtain CD3⁺CD56⁻ T cells and analyzed by flow cytometry for CD69 and CD103 expression. Shown is one representative experiment (n, number of experiments, n > 12).

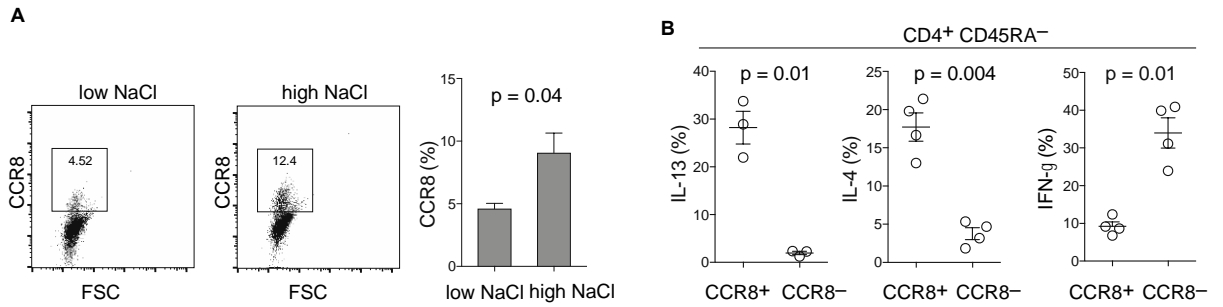


Fig. S9. NaCl induces the up-regulation of the skin-homing chemokine receptor CCR8, which enriches for TH2-associated cytokines. Human memory T helper cells were sorted from fresh PBMC as CD4⁺CD14⁻CD45RA⁻ T cells by flow cytometry and stimulated for a total culture period of 5 days in the presence (high) or absence (low) of additional 50 mM NaCl with CD3 and CD28 mAb for 48h. **(A)** Flow cytometry (FACS) on day 5. Shown is one representative FACS staining (left panel) and cumulative data from individual experiments (right panel), $n = 5$. **(B)** CCR8⁺ CD4⁺CD14⁻CD45RA⁻ and CCR8⁻ CD4⁺CD14⁻CD45RA⁻ T cells (matched samples) were sorted by flow cytometry and stimulated as in **(A)** including PMA and ionomycin restimulation for 5 hours. Intracellular cytokine staining and flow cytometry was performed. Each circle represents a separate blood donor (mean \pm S.E.M.). Paired Student's t tests were used for comparisons between two groups. p , P value.

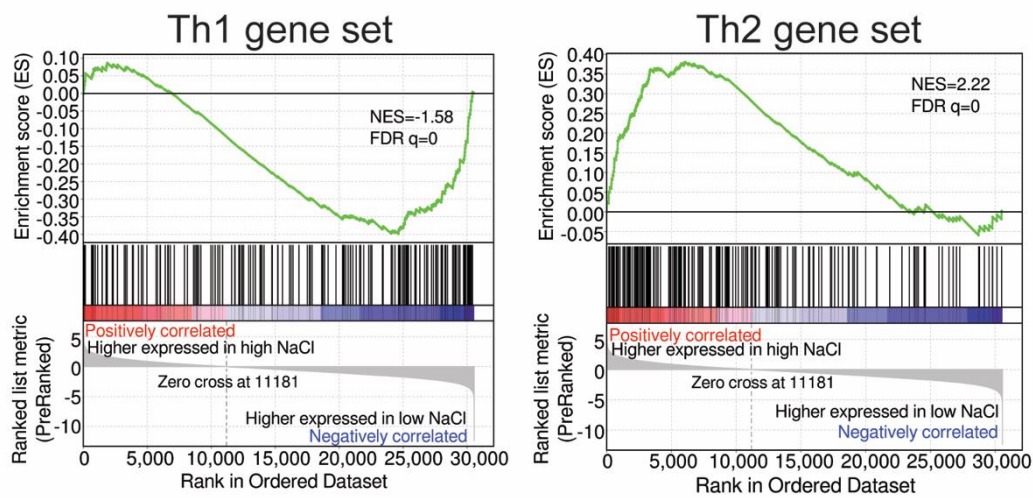


Fig. S10. Transcriptome-wide enrichment of a Th2 cell signature by NaCl. The GSEA enrichment plots of the transcriptome of CD4⁺CD45RA⁻ memory T cells treated in low or high NaCl conditions compared to Th1 (left panel) and Th2 (right panel) gene sets. The green curve of the plots shows the running enrichment score. NES, normalized enrichment score, FDR q values represent the statistical significance of enrichment.

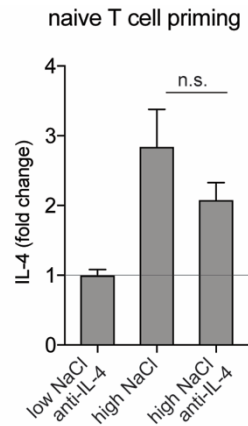


Fig. S11. NaCl induces TH2 cell polarization independently of exogenous or autocrine IL-4. Human naive T helper cells were sorted from fresh PBMC as CD4⁺CD14⁻CD45RA⁺ T cells by flow cytometry and stimulated for a total culture period of 5 days in the presence (high) or absence (low) of additional 50 mM NaCl with CD3 and CD28 mAb for 48h. Anti-IL-4 neutralizing antibodies (10µg/ml) were added where indicated at the beginning of the culture. Intracellular staining and flow cytometry (FACS) on day 5 following PMA and ionomycin restimulation. Cytokine expression was normalized to control conditions (low NaCl). (n = 5; mean ± S.E.M.; p < 0.001, Kruskal Wallis test).

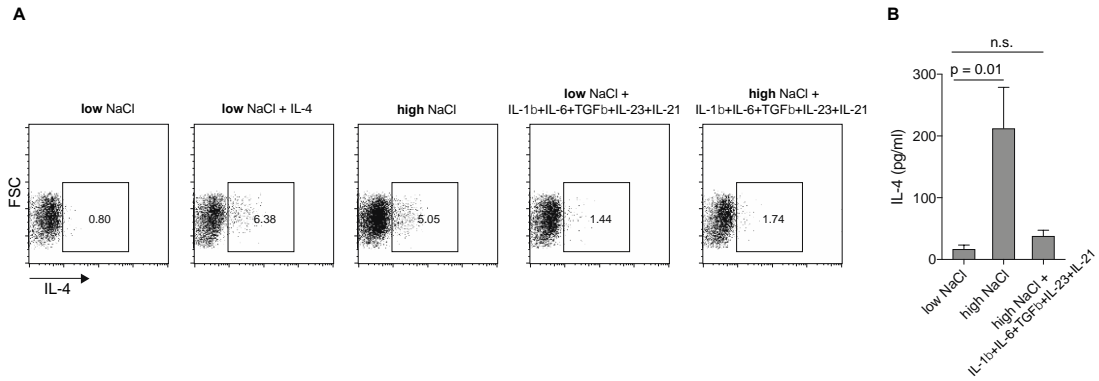


Fig. S12. TH17-polarizing cytokine conditions abrogate the TH2-promoting effect of NaCl. (A) Naïve CD4⁺CD45RA⁺CCR7⁺ T cells were sorted by flow cytometry and stimulated with the Th17 cell polarizing cytokines IL-1 β , IL-6, TGF- β and IL-23 in the presence or absence of additional 50 mM NaCl for a total culture period of 5 days after stimulation with plate-bound CD3 and CD28 mAb for 48h. Intracellular cytokine staining and flow cytometry on day 5 following PMA and ionomycin restimulation. Shown is one representative experiment (n = 3). (B) Naïve CD4⁺CD45RA⁺CCR7⁺ T cells were stimulated as in (A) and supernatants were analyzed for IL-4 production by ELISA (n = 3-4, mean \pm S.E.M., p = 0.001, Kruskal-Wallis test).

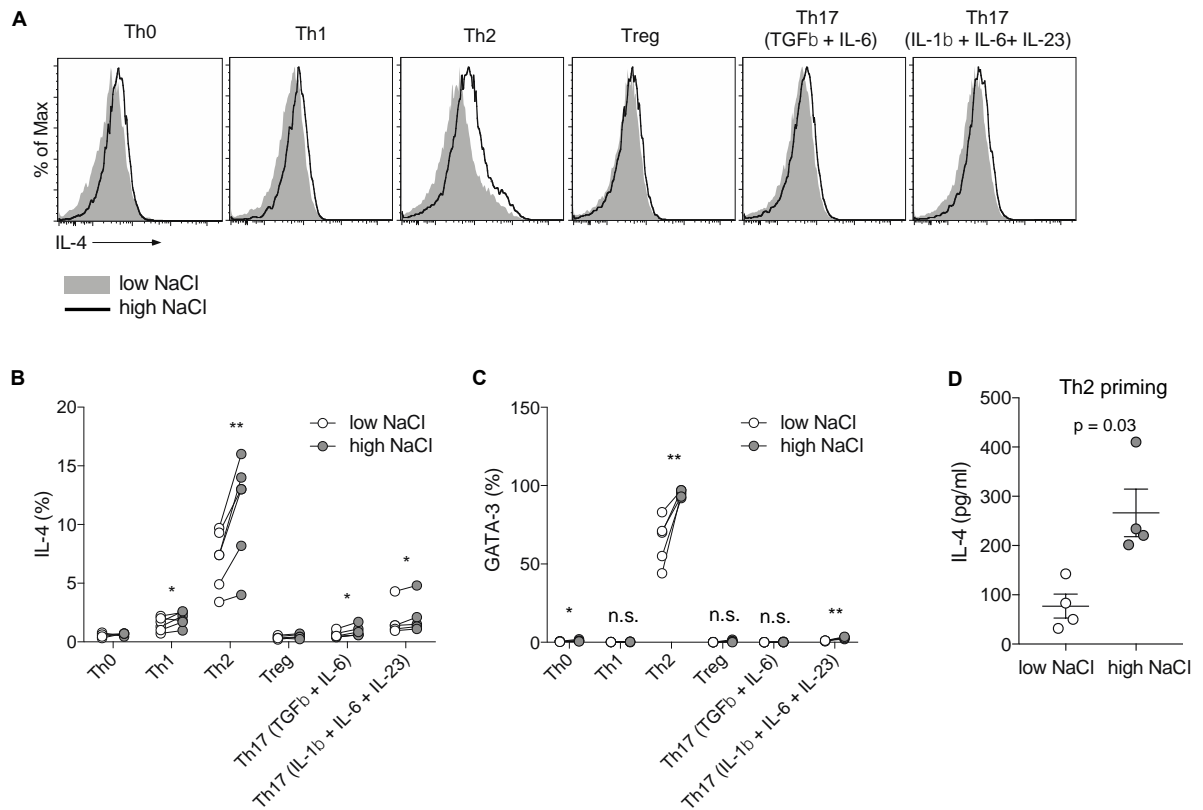


Fig. S13. Mouse T cells differentiate into TH2 cells in response to NaCl. Naïve murine CD4⁺ T cells were cultured *in vitro* under various T helper cell polarizing conditions with or without additional NaCl and analyzed on day 3.5 for IL-4 and GATA-3 expression by flow cytometry. **(A)** Representative histograms show intracellular IL-4 production after stimulation of cells with PMA and ionomycin. Cells treated with additional NaCl during the culture are depicted as black line and control cells are shown in grey. **(B, C)** Quantification of intracellular IL-4 production (as in A) and of GATA-3. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, two-tailed paired t test ($n = 5$, mean \pm S.E.M). **(D)** ELISA of cell culture supernatants harvested from Th2 polarizing T cell cultures (+IL-4) that were stimulated for 2.5 days in low or high NaCl conditions. Cells were replated in low NaCl conditions in the absence of exogenous cytokines after washing, and supernatants were harvested for analysis by ELISA after 24h. The cytokine concentration is normalized to 10,000 T cells for each condition. Each circle represents one mouse.

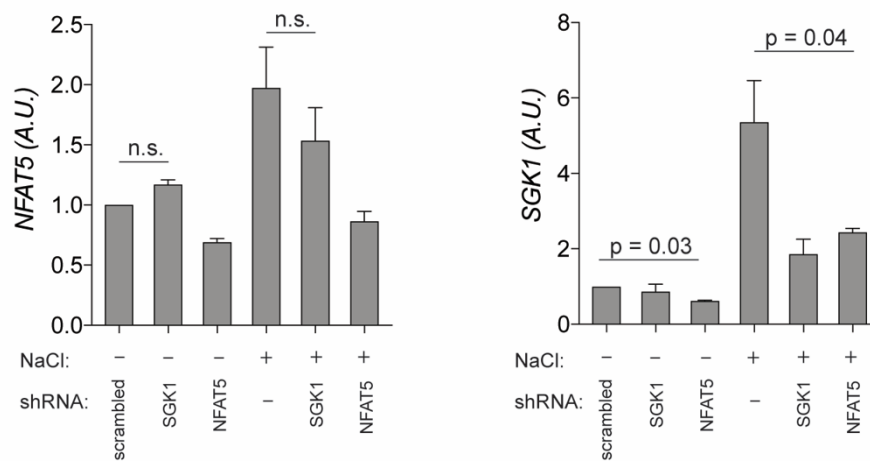


Fig. S14. SGK-1 is a downstream target of NFAT5. Human memory CD4⁺ CD45RA⁻ T cells were stimulated for a total culture period of 5 days in the presence (high) or absence (low) of additional 50 mM NaCl with CD3 and CD28 mAb for 48h. SGK1 and NFAT5 expression were determined by qRT-PCR in the presence or absence of shRNA-mediated silencing of SGK1 and NFAT5 in low and high NaCl conditions (NFAT5, n = 4 for low NaCl conditions, n = 9 for high NaCl conditions; SGK1, n=4; mean \pm S.E.M.). n.s., not significant (unpaired student's t test).

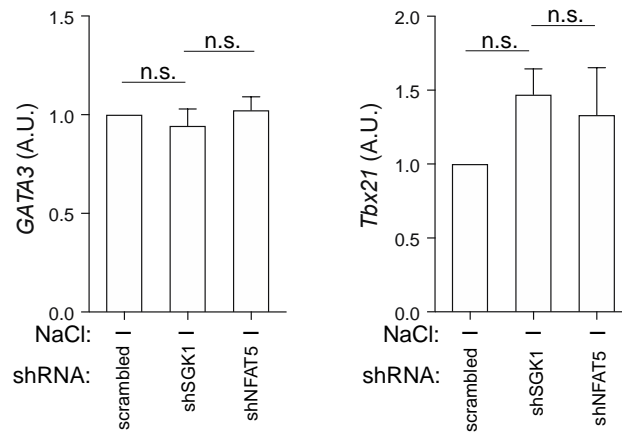


Fig. S15. GATA-3 and T-bet are not regulated by NFAT5 and SGK-1 in low NaCl conditions. Human memory CD4⁺ CD45RA⁻ T cells were stimulated with CD3 and CD28 mAb for 48h and cultured for 5 days in the absence of additional NaCl (low NaCl). GATA3 and TBX21 expression were determined by qRT-PCR in the presence or absence of shRNAs targeting NFAT5 or SGK1, n = 3 (mean ± S.E.M.)

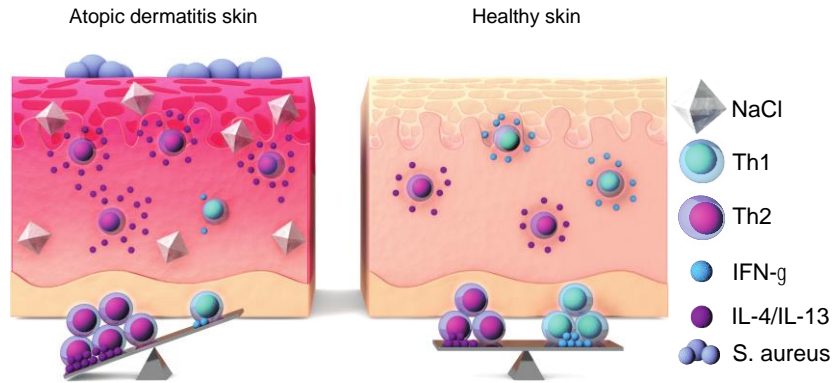


Fig. S16. Model. Sodium chloride is highly enriched in the cutaneous microenvironment of atopic dermatitis skin lesions where it can promote Th2 cell responses. Atopic dermatitis is characterized by an *S. aureus* dominated dysbiosis, which can also be promoted by NaCl, since *S. aureus* is tolerant to high NaCl concentrations in contrast to other species of the skin microbiota. Together, this model highlights a central role for NaCl as a microenvironmental factor of the atopic skin, because it links Th2 cell responses and dysbiosis as the main features of atopic dermatitis.

Table S1. Selected regions and primer sequences used for DNA methylation analyses.

Amplicon	Forward Primer	Reverse Primer	Genomic Region (hg19)
IL4 intron 1	TCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTatagtttagttttagatttggftaa	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTccataaaaaacaaaactaaaatacaciaaacta	chr5:132010410-132010973
RORC promoter	TCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTgggtatgtgttggggtttggtaa	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTctaccactaataaaaaacaaataactccc	chr1:151803784-151804361
STAT6 promoter	TCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTgltgatttggatttggatggtttgg	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTcccaaatataaacctataalaaccca	chr12:57503960-57504484
STAT4 promoter 2	TCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTgagttttggatttatttgggttag	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTctctccaaactataatctaaaac	chr2:192015824-192016389
STAT4 promoter 1	TCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTtagtttgglaaaaggagatttggttt	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTaaatataaacctccactaataalaac	chr2:192015209-192015785
STAT3 promoter	TCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTggggaglaataatttaaaagaaaagatg	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTaaactctaaaacctaaaaatataataaac	chr17:40539651-40540229
STAT3 exon 7	TCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTgttatgtataattatattttaggittaagt	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTaaaatatttctaaacttattttaaattccaac	chr17:40489067-40489639
GATA3 promoter	TCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTtaatttagtaatttaggggttatttaggtt	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTatataaaaaacacatccacctctc	chr10:8097198-8097775
IFNG promoter	TCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTataaatttaaaatgattttataagagatg	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTaaaataacacaaataacataataaatctatct	chr12:68553167-68553745
TBX21(1)	TCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTaggtagtttagtggtgtagtggtg	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTaaaacaacacccctcaaccccaactct	chr17:45811784-45812278
TBX21(2)	TCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTtttatggttttaggtttaggtt	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTaaactaaataaaaaactaaacatcaaaaaa	chr17:45812205-45812746
TBX21(3)	TCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTgggggttttggtaaggaggt	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTataccctaccctattctacc	chr17:45813899-45814399
TBX21(4)	TCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTgggtagaaalgggtagggta	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTcccacaccccaaaaaaac	chr17:45814379-45814681
TBX21(5)	TCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTgagttttatttggatttatttgggt	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTtaatttcccaaaaactctctaac	chr17:45819979-45820516

Table S2. Patient information. Clinical information on skin samples obtained from patients **(A)** with atopic dermatitis or psoriasis and from healthy control donors **(B)** including age, sex and disease activity (SCORAD, PASI). **(A)** and **(B)** show all parameters for each individual patient or donor.

A

Patient information (Atopic dermatitis)

Patient #	Age	Sex	SCORAD
1	39	female	85
2	73	male	70
3	74	male	50
4	68	male	63
5	31	female	50
6	51	male	50
7	44	male	43
8	41	male	96

Patient information (Psoriasis)

Patient #	Age	Sex	PASI
1	40	male	15
2	19	male	31
3	58	male	15
4	68	male	35
5	49	female	4
6	48	male	50

B

Healthy skin donor information

Healthy #	Age	Sex
1	35	female
2	44	female
3	65	female
4	78	female
5	43	male
6	37	male
7	63	female
8	52	female
9	46	female

9.2 Anhang 2 – Salt generates anti-inflammatory Th17 cells but amplifies their pathogenicity in pro-inflammatory cytokine microenvironments

Veröffentlichungsform:	Forschungsartikel
Titel:	Salt generates anti-inflammatory Th17 cells but amplifies their pathogenicity in pro-inflammatory cytokine microenvironments
Autoren:	Julia Matthias, Sylvia Heink, Felix Picard, Julia Zeiträg, Anna Kolz, Ying-Yin Chao, Dominik Soll, Gustavo P. de Almeida, Elke Glasmacher, Ilse D. Jacobsen, Thomas Riedel, Anneli Peters, Stefan Floess, Jochen Huehn, Dirk Baumjohann, Magdalena Huber, Thomas Korn, Christina E. Zielinski
Name des Journals:	The Journal of Clinical Investigation
Erscheinungsdatum:	September 2020
Bandnummer:	130
Ausgabe:	9
DOI:	10.1172/JCI137786
Pubmed ID:	32484796
Seitenangabe:	Originalpublikation Seiten 1-14; Ergänzendes Material Seiten 1-8

Salt generates antiinflammatory Th17 cells but amplifies pathogenicity in proinflammatory cytokine microenvironments

Julia Matthias,^{1,2,3} Sylvia Heink,^{4,5} Felix Picard,⁶ Julia Zeiträg,⁷ Anna Kolz,⁸ Ying-Yin Chao,^{1,2,9} Dominik Soll,^{1,2} Gustavo P. de Almeida,^{1,2,9} Elke Glasmacher,¹⁰ Ilse D. Jacobsen,^{11,12} Thomas Riedel,¹³ Anneli Peters,⁸ Stefan Floess,¹⁴ Jochen Huehn,¹⁴ Dirk Baumjohann,⁷ Magdalena Huber,⁶ Thomas Korn,^{4,5} and Christina E. Zielinski^{1,2,3,9}

¹Institute of Virology, Technical University of Munich, Munich, Germany. ²German Center for Infection Research, Partner Site Munich, Munich, Germany. ³Department of Cellular Immunoregulation, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany. ⁴Klinikum rechts der Isar, Department of Experimental Neuroimmunology, Technical University of Munich, Munich, Germany. ⁵Munich Cluster for Systems Neurology (SyNergy), Munich, Germany. ⁶Institute for Medical Microbiology and Hygiene, University of Marburg, Marburg, Germany. ⁷Institute for Immunology, Biomedical Center, Faculty of Medicine, Ludwig Maximilian University of Munich (LMU Munich), Planegg-Martinsried, Germany. ⁸Institute of Clinical Neuroimmunology, Hospital and Biomedical Center of LMU Munich, Planegg-Martinsried, Germany. ⁹TranslaTUM, Technical University of Munich, Munich, Germany. ¹⁰Roche Innovation Center Munich, pRED, Large Molecule Research, Penzberg, Germany. ¹¹Research Group Microbial Immunology, Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology – Hans Knöll Institute, Jena, Germany. ¹²Institute of Microbiology, Friedrich Schiller University, Jena, Germany. ¹³Leibniz Institute DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig and German Center for Infection Research, Partner Site Hannover-Braunschweig, Hannover-Braunschweig, Germany. ¹⁴Department of Experimental Immunology, Helmholtz Centre for Infection Research, Braunschweig, Germany.

Th cells integrate signals from their microenvironment to acquire distinct specialization programs for efficient clearance of diverse pathogens or for immunotolerance. Ionic signals have recently been demonstrated to affect T cell polarization and function. Sodium chloride (NaCl) was proposed to accumulate in peripheral tissues upon dietary intake and to promote autoimmunity via the Th17 cell axis. Here, we demonstrate that high-NaCl conditions induced a stable, pathogen-specific, antiinflammatory Th17 cell fate in human T cells in vitro. The p38/MAPK pathway, involving NFAT5 and SGK1, regulated FoxP3 and IL-17A expression in high-NaCl conditions. The NaCl-induced acquisition of an antiinflammatory Th17 cell fate was confirmed in vivo in an experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) mouse model, which demonstrated strongly reduced disease symptoms upon transfer of T cells polarized in high-NaCl conditions. However, NaCl was coopted to promote murine and human Th17 cell pathogenicity, if T cell stimulation occurred in a proinflammatory and TGF- β -low cytokine microenvironment. Taken together, our findings reveal a context-dependent, dichotomous role for NaCl in shaping Th17 cell pathogenicity. NaCl might therefore prove beneficial for the treatment of chronic inflammatory diseases in combination with cytokine-blocking drugs.

Introduction

Human immune surveillance requires distinct T cell specialization programs for efficient clearance of diverse pathogens. This is realized by distinct migration patterns as well as cytokine profiles that tailor the responses of T cells to their respective target antigens (1). The proinflammatory nature of Th17 cells has been strongly associated with the containment of *Candida albicans* infections as well as with the pathogenesis of autoimmune diseases (2). Consequently, numerous therapies have emerged that target this T cell subset and its effector functions with striking efficacy (3).

Recently, heterogeneity was revealed within the Th17 cell subset, which also included an antiinflammatory Th17 cell fate (2, 4, 5).

A post-activation program characterized by IL-10 expression confers immunosuppressive properties to Th17 cells, which limits the proliferation of bystander T cells as well as inflammatory functions of innate immune cells (6, 7). In addition, ROR- γ t- and FoxP3-coexpressing T cells that share both Th17 cell and immunoregulatory Treg identities have been identified as functionally contributing to the containment of inflammation at mucosal surfaces (8–10).

Although this functional dichotomy of pro- and antiinflammatory effects has been well established, the extracellular signals and intracellular mechanisms that instruct this dichotomy of pro- and antiinflammatory Th17 cell fates remain poorly defined and almost exclusively restricted to cytokine effects. For example, IL-1 β has been identified as a critical switch factor that determines human Th17 cell pathogenicity by inducing the expression of proinflammatory molecules and suppressing the expression of antiinflammatory molecules (2). In mice, IL-23 licenses Th17 cells for pathogenicity, whereas TGF- β drives antiinflammatory Th17 cell responses (11–14).

Sodium chloride (NaCl) represents a critical, yet still largely overlooked, determinant of the human tissue microenvironment with major implications for organ-specific immune regulation,

Authorship note: SH and FP contributed equally to this work. MH and TK contributed equally to this work.

Conflict of interest: The authors have declared that no conflict of interest.

Copyright: © 2020, American Society for Clinical Investigation.

Submitted: March 3, 2020; **Accepted:** May 14, 2020; **Published:** July 27, 2020.

Reference information: *J Clin Invest*. <https://doi.org/10.1172/JCI137786>.

allergy, and autoimmunity (15–18). Peripheral tissues, such as the skin, are thought to accumulate NaCl at high concentrations independently of systemic renal osmolyte regulation. This occurs not only in response to dietary intake but also in diet-independent settings such as in atopic dermatitis or infections (19–21). Naive T cells, which surveil secondary lymphoid organs, have previously been shown to dramatically upregulate IL-17A upon NaCl exposure in polarizing cytokine conditions (22, 23). However, naive T cells do not patrol peripheral tissues, unlike effector or tissue-resident memory T cells (24–26). Therefore, the direct effect of NaCl as a determinant of the tissue microenvironment remains to be explored for tissue-homing effector T cell subsets. In particular, the role of NaCl in the dichotomous nature of the inflammatory state of Th17 cells remains to be elucidated.

Our data demonstrate that NaCl shifts Th17 cells toward an anti-inflammatory fate. A proinflammatory cytokine microenvironment can, however, divert its antiinflammatory function and instead coopt NaCl for amplifying Th17 cell pathogenicity. NaCl therefore exerts divergent effects on Th17 cells depending on the cytokine context.

Results

NaCl amplifies Th17 cell effector functions in memory T cells. We previously demonstrated that NaCl exerts effects not only on naive Th cells, as postulated before (22, 23), but also on CD45RA⁺ memory T cells, in which NaCl enhanced both IL-17A and IL-4 production, even in the absence of polarizing cytokines (16). We decided to investigate the impact of NaCl on effector memory T cells (Tem), which, in contrast to naive and central memory T cells (Tcm), readily enter peripheral tissues, and thus a NaCl-enriched microenvironment, during their recirculation route or for further differentiation into resident memory T cells (Trm) (24, 25, 27). We therefore isolated human CD4⁺CD45RA⁺CCR7⁺ Tem cells *ex vivo* and restimulated them at a low NaCl (140 mM) or high NaCl (185 mM) concentration, reflecting a physiological blood or tissue microenvironment, respectively (16, 17). We found that IL-17A production and other Th17 cell signature properties, such as ROR- γ t, IL-22, and CCR6 expression, strongly increased in high-NaCl conditions (Figure 1, A and B). This enhanced Th17 signature was further supported by a transcriptome-wide analysis, which revealed the enrichment for Th17 cell-associated gene signatures upon restimulation of Th17 cells in the high-NaCl condition (Figure 1C). Skin Trm cells, which were identified by CD69 and CD103 coexpression, also upregulated IL-17A expression upon *in vitro* restimulation in the high-NaCl condition (Figure 1D). Polarizing cytokines, which have previously been shown to induce Th17 cell differentiation and expansion, masked the direct Th17-promoting effects of NaCl at the effector T cell level, as we observed no further synergistic effects (Figure 1E). Our data therefore demonstrate that NaCl directly affects fully differentiated effector T cells, which readily respond to NaCl by amplification of Th17 cell-associated effector functions independently of exogenous cytokines.

NaCl induces antiinflammatory Th17 cell responses. Recently, divergent post-activation fates have been delineated within the Th17 cell lineage, showing a dichotomy of pro- versus anti-inflammatory functions (2, 6, 7). We therefore stimulated *ex vivo*-isolated human Th17 cells in the presence of low and high NaCl concentrations to test for coexpression of antiinflammatory

molecules. Surprisingly, FoxP3 expression was strongly upregulated in high-NaCl compared with low-NaCl conditions, giving rise to IL-17A and FoxP3 double-positive T cells (Figure 2A). This finding was supported by analysis of T cell clones, which showed further upregulation of both FoxP3 and IL-17A expression in high-NaCl conditions despite chronic T cell receptor activation (Supplemental Figure 1, A and B; supplemental material available online with this article; <https://doi.org/10.1172/JCI137786DS1>). The putatively antiinflammatory Th17 cell phenotype was further corroborated by strong upregulation of the immunosuppressive cytokine TGF- β in response to high-NaCl concentrations (Figure 2A). ROR- γ t⁺ Th17 cells also acquired *de novo* FoxP3 coexpression upon restimulation in high-NaCl conditions (Figure 2B), thus displaying a pattern of transcription factors that was previously shown to translate into antiinflammatory functions (8, 10). The FoxP3 upregulation induced by NaCl even exceeded that of ROR- γ t upregulation in *ex vivo*-isolated memory Th cells (Figure 2B). NaCl exerted its antiinflammatory effects on Th17 cells in a dose-dependent manner over a wide range of NaCl concentrations, whereas IL-17A upregulation plateaued by only small incremental increases in extracellular NaCl (Supplemental Figure 2, A–D). To corroborate the antiinflammatory Th17 cell phenotype that was induced by NaCl, we also assessed the expression of other molecules that are associated with immunosuppressive T cell functions. High-NaCl conditions increased the expression of other regulatory signature molecules such as *IL10*, *LAG3*, *ICOS*, and *CTLA4* in Th17 cells (Figure 2C). We performed next-generation RNA-Seq of Th17 cells stimulated in low- or high-NaCl conditions to interrogate these cells transcriptome-wide for a Treg signature. Gene set enrichment analysis (GSEA) showed a clear enrichment of the Treg signature in Th17 cells stimulated in high- compared with low-NaCl conditions (Figure 2D). The induction of an anti-inflammatory T cell fate by NaCl was not restricted to Th17 cells, as it also occurred in Th1 and Th2 cells (Supplemental Figure 3). Tregs, which were isolated *ex vivo* as CD25^{hi}CD127^{lo} cells, also further increased FoxP3 and TGF- β expression upon restimulation in high-NaCl conditions. This increase was accompanied by ROR- γ t and IL-17A upregulation (Supplemental Figure 4), which, according to previous reports, might abrogate the overall antiinflammatory function of Tregs (28–30). This is in contrast to the impact of NaCl on other Th cell subsets, which acquired an anti-inflammatory profile instead (Supplemental Figure 4).

Consistent with our finding that NaCl was sufficient to promote the antiinflammatory Th17 cell fate upon restimulation of memory T cells, we also observed a reduction in proinflammatory IFN- γ coexpression in IL-17A-producing T cell clones (Figure 2E). Together, these data indicate by multiple phenotypic and transcriptional readouts that NaCl might promote an antiinflammatory phenotype of human Th17 cells.

NaCl-induced FoxP3 upregulation, but not IL-17A upregulation, can be stably maintained in the absence of high NaCl concentrations. Immune surveillance by effector T cells is realized by their continuous recirculation through the blood, peripheral tissues, and secondary lymphoid organs. Considering the compartmentalization of NaCl concentrations in peripheral tissues (17), circulating effector T cells are exposed to repeated fluctuations of NaCl levels in their microenvironment. We therefore asked whether the changes

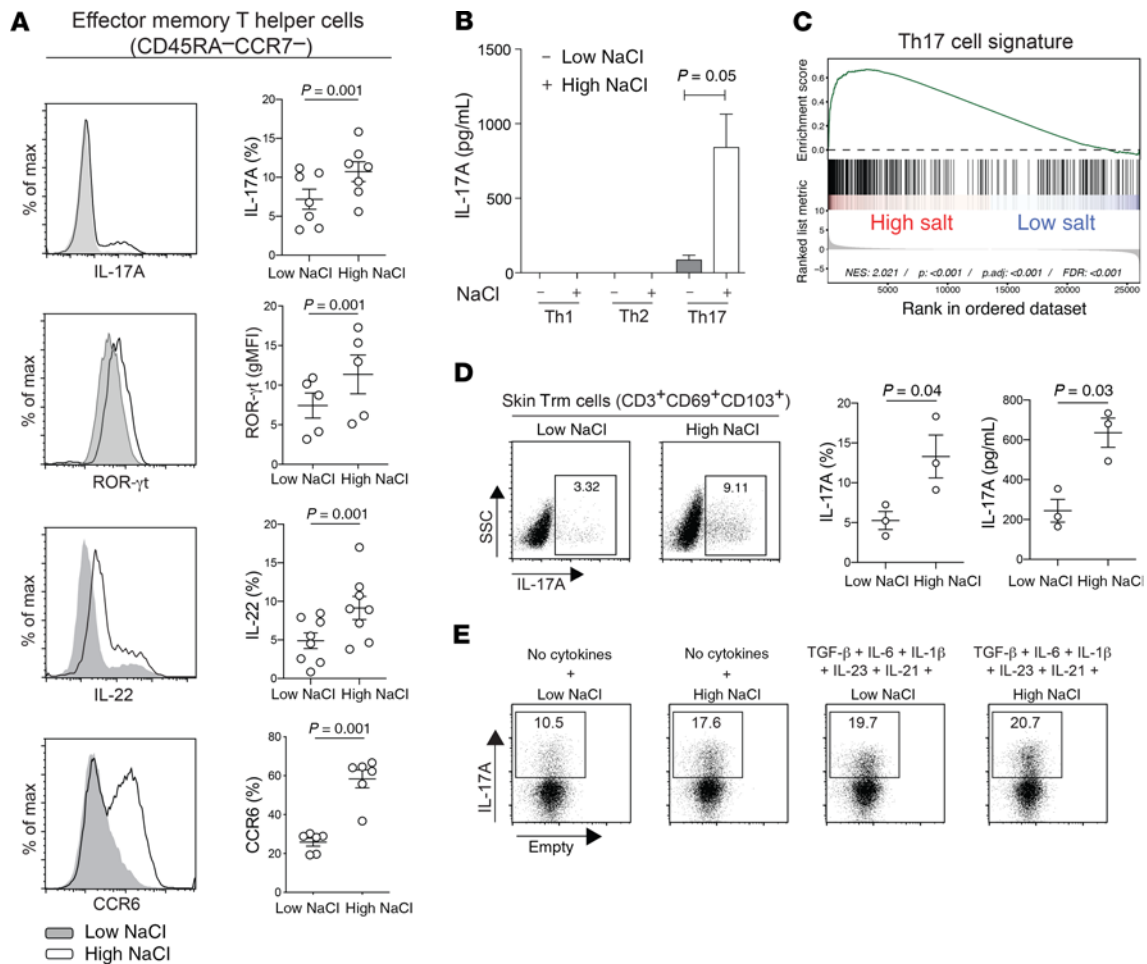


Figure 1. NaCl promotes the Th17 cell program in human effector memory Th cells independently of polarizing cytokines. (A–C) Human effector memory Th cells were FACS sorted from fresh human PBMCs as CD4⁺CD14[−]CD45RA[−]CCR7[−] T cells and stimulated for a total culture period of 5 days in low- or high-NaCl conditions with CD3 and CD28 mAbs (48 hours plate-bound). (A) Intracellular staining and FACS on day 5 after PMA and ionomycin restimulation for 5 hours. FACS staining of an individual experiment (left) and cumulative data are shown. Each circle indicates an individual donor. gMFI, geometric MFI; max, maximum. (B) ELISA analysis of cell culture supernatants analyzed on day 5 after stimulation with PdBU and CD3 mAb for 8 hours ($n = 3$). (C) Transcriptome analysis and GSEA (GSE52260) of genes related to the Th17 signature in Th17 cells stimulated as in A (67). (D) Skin CD3⁺ T cells were isolated from human abdominal skin by overnight collagenase digestion followed by FACS sorting. The cells were stimulated for 48 hours with CD3 and CD28 mAbs in low- or high-NaCl conditions followed by intracellular cytokine staining after PMA and ionomycin restimulation. A representative experiment (left) and cumulative data are shown (middle). ELISA analysis (right) of cell culture supernatants from skin CD3⁺ T cells restimulated with PdBU and CD3 mAbs for 8 hours after 48 hours of CD3 and CD28 mAb stimulation in low- and high-NaCl conditions. Data were normalized to 20,000 T cells. Each circle indicates an individual donor. (E) FACS analysis performed as in A in the absence or presence of Th17-polarizing cytokines. The data are representative of 3 donors. (A, B, and D) A 2-tailed, paired Student's *t* test was performed for comparisons between 2 groups.

in Th17 cell functions observed above were contingent on the acute presence of NaCl, or whether they could be stably maintained after the cells enter low-NaCl microenvironments.

Furthermore, the stable maintenance of increased human FoxP3 expression in T cells over time and in changing microenvironments would stress the antiinflammatory human T cell functionality, whereas transient FoxP3 upregulation instead correlates with human T cell activation according to previous reports (31, 32).

To this end, we subjected Th17 cells that were restimulated in high-NaCl conditions to repeated restimulations in low-NaCl conditions. Whereas NaCl-mediated IL-17A upregulation was not maintained upon repeated polyclonal TCR restimulation in the absence of high NaCl levels, increased FoxP3 expression was stably maintained during 2 consecutive rounds of TCR restimulation,

even after withdrawal of NaCl (Figure 3, A and B). However, this increased expression was not maintained for TGF- β (Figure 3C).

Collectively, these data indicate that the increase in Th17 cell effector functions, such as IL-17A production, is contingent on the acute presence of NaCl in the extracellular microenvironment, whereas the antiinflammatory effect of NaCl on the Th17 cell phenotype persists over the long term, even upon reentry into a low-NaCl microenvironment such as the blood.

NFAT5 and SGK1 regulate FoxP3 and IL-17A expression in memory T cells in high-NaCl conditions. We next addressed the molecular mechanism by which NaCl affects human effector Th17 cells. Hyperosmotic stress can be sensed by mammalian cells through the p38/MAPK pathway and its downstream targets NFAT5 and SGK1 (33, 34). This pathway has recently been shown to confer

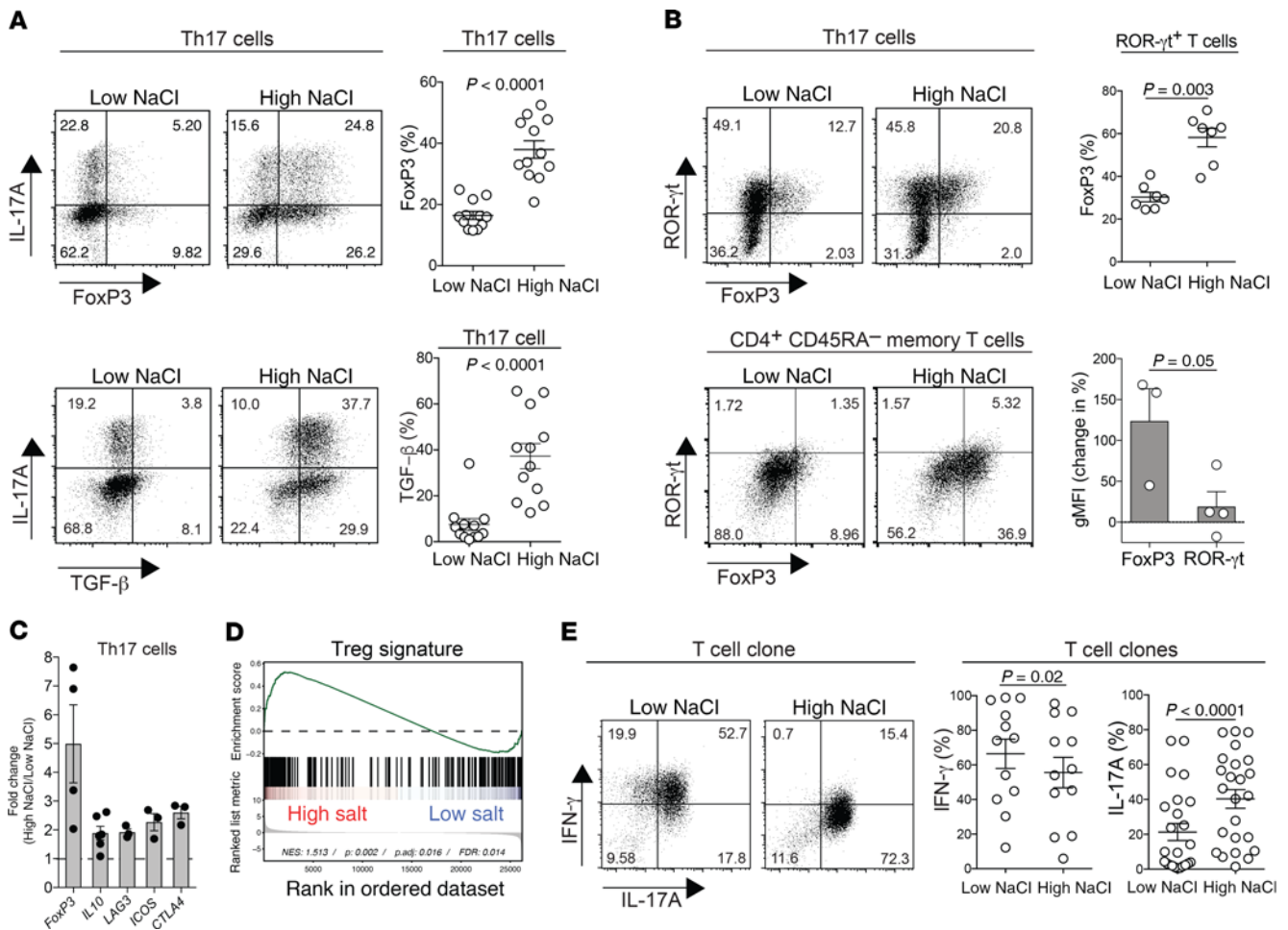


Figure 2. Human Th17 cells acquire antiinflammatory functions upon restimulation in high-NaCl conditions. (A) CD4⁺CD14⁻CD45RA⁻CCR6⁺CCR4⁺CXCR3⁻ Th17 cells were sorted by flow cytometry from fresh human PBMCs as T cells and stimulated for a total culture period of 5 days in high- or low-NaCl conditions with CD3 and CD28 mAbs (48 hours plate-bound). Results for intracellular staining and FACS analysis on day 5 following PMA and ionomycin restimulation are shown. A representative FACS plot and cumulative data with each circle representing an individual donor are shown. (B) Intracellular staining for transcription factors followed by FACS analysis of T cells isolated and stimulated for 5 days with CD3 and CD28 mAbs (48 hours plate-bound). Top panel: Circles indicate individual blood donors. Bottom panel: Change in transcription factor expression in T cells stimulated in high- versus low-NaCl conditions ($n = 3-4$). (C) qRT-PCR analysis of Th17 cells stimulated as in (A) ($n = 3-6$). A 2-tailed Student's t test was performed for comparisons of high- versus low-NaCl conditions; $P < 0.05$ for each of the transcripts shown. (D) GSEA for Treg-associated genes (GEO GSE18893) in Th17 cells cultured in low- or high-NaCl conditions for 5 days (48 hours CD3/CD28 mAbs). (E) T cell clones were generated from CD4⁺CD14⁻CD45RA⁻CCR6⁺CCR4⁺CXCR3⁻ T cells, which were enriched for Th17 cells, and then restimulated in low or high NaCl concentrations, as in (A). Intracellular staining and FACS analysis are shown. A representative FACS plot and cumulative data are shown. Each circle represents a separate T cell clone. A 2-tailed Student's t test was used for comparisons between 2 groups (A-C, and E).

pathogenicity to developing Th17 cells (22, 23). We therefore interrogated the same pathway for its impact on NaCl-mediated regulation of the antiinflammatory human Th17 cell phenotype, which we have unraveled above. Pharmacological blockade of p38 signaling abrogated NaCl-induced IL-17A and FoxP3 upregulation in effector Th17 cells (Figure 4A). Similar to previous reports that tested the effect of NaCl on naive T cells in Th17-polarizing cytokine conditions (22), this study found that effector Th17 cells also upregulated the expression of both *NFAT5* and its downstream target *SGK1* upon restimulation in high-NaCl conditions, as shown by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) analysis (Figure 4B). shRNA-mediated silencing of both genes abrogated their NaCl-induced upregulation, demonstrating that *NFAT5* and *SGK1* regulated IL-17A as well as FoxP3 expression in hypersaline conditions (Figure 4C). These findings were also

supported by the reduced expression of TGF- β and ROR- γ t following blockade with SGK1 (Supplemental Figure 5). Consistent with this antiinflammatory Treg-like Th17 cell commitment, we identified binding sites for NFAT5 in the *TGFB1*, *STAT5*, and *FOXP3* promoter regions using a previously published ChIP-Seq data set (Supplemental Figure 6 and ref. 35). Overall, these results demonstrate a role for the p38/MAPK/NFAT5/SGK1 axis not only for the regulation of IL-17A but also for FoxP3 expression in effector Th17 cells in high- but not low-NaCl conditions. Importantly, this reveals a distinct modulation of transcriptional programs depending on extracellular NaCl concentrations.

A proinflammatory cytokine microenvironment abrogates the induction of an antiinflammatory Th17 cell phenotype by NaCl. The NaCl-induced antiinflammatory effects on human Th17 cells were unexpected, considering that NaCl has been previously reported

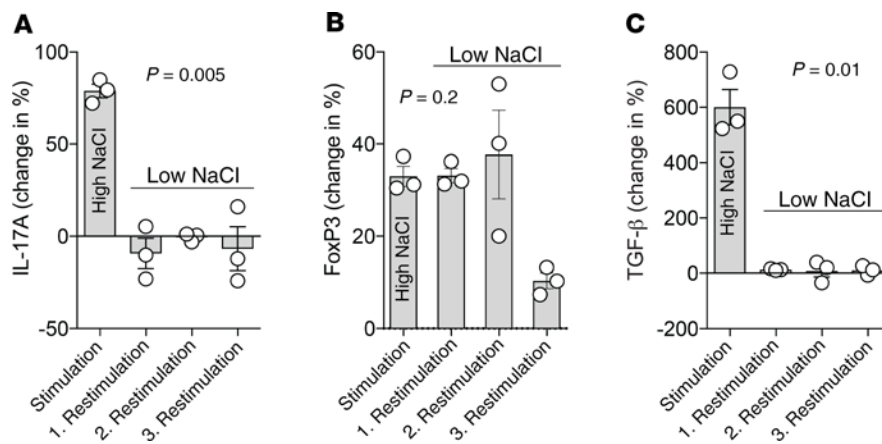


Figure 3. NaCl-induced FoxP3 upregulation in Th17 cells is stably maintained after entering low-NaCl conditions, whereas IL-17A upregulation is transient. (A–C) Human Th17 cells (CCR6⁺CCR4⁺CXCR3⁻) were restimulated with CD3 and CD28 mAbs (48 hours plate-bound) in low or high NaCl concentrations for a total culture period of 5 days. Intracellular staining and FACS analysis after PMA and ionomycin restimulation are shown. The Th17 cells were restimulated again with CD3 and CD28 mAbs up to 3 times for 5 days, with 2 additional resting days between the restimulations ($n = 3$). The change of the geometric mean of FoxP3 expression (B) compared with control Th17 cells that were restimulated once in low-NaCl conditions (C) are shown. One-way ANOVA was used for comparisons among multiple groups.

to induce pathogenic Th17 cell differentiation from naive T cell precursors (22, 23). Since human Th17 cell differentiation requires the presence of several polarizing cytokines, including IL-6 and IL-1 β , which have previously been shown to instruct T cell pathogenicity (2, 36), we tested the effect of high NaCl concentrations on effector Th17 cells in the presence of individual proinflammatory cytokines as well as their combinations (5). IL-6 and IL-1 β suppressed FoxP3 expression, which is in line with previous reports (refs. 37–40 and Figure 5, A and B). We found that the presence of these Th17-polarizing cytokines also abrogated NaCl-induced FoxP3 upregulation, giving rise to a proinflammatory Th17 cell phenotype (Figure 5, A and B). Autocrine TGF- β secretion was also suppressed by these proinflammatory cytokines in high-NaCl conditions (Figure 5, A and C). Both antiinflammatory molecules were likewise inhibited in high-NaCl conditions if IL-23 and IL-21 joined the Th17-polarizing cytokines (Figure 5, A and B). TGF- β was relevant for concomitant FoxP3 upregulation in high-NaCl conditions, as shown by reduced FoxP3 expression levels upon TGF- β depletion with neutralizing Abs (Figure 5C). This also stressed that secreted TGF- β was bioactive, enabling its activity in an autocrine manner. NaCl-induced IL-17A upregulation was not further enhanced in effector Th17 cells in the presence of these proinflammatory cytokines (Figure 5A and Figure 1E).

Together, these data indicate a dominant role for proinflammatory cytokines over the antiinflammatory effects that NaCl directly exerts on effector T cells. NaCl has, therefore, a context-dependent function in the complex immune microenvironment that can translate into divergent Th17 cell fates.

The antigen specificity of Th17 cells determines whether pro- or antiinflammatory effects are induced by NaCl. We previously demonstrated that distinct cytokine priming conditions are required for the generation of human Th17 cells, which differ in their pathogen specificities (2). In particular, IL-1 β is required for *C. albicans*-specific Th17 cell polarization but is dispensable for *Staphylococcus aureus*-specific Th17 cell polarization (2, 4). This translates into pro- versus antiinflammatory Th17 cell functions, respectively (6). Given that IL-1 β was able to abrogate the antiinflammatory effect of NaCl on effector Th17 cells, we tested whether the requirement for IL-1 β in generating *C. albicans*-specific Th17 cells would render these cells more resistant to the antiinflammatory effects of NaCl than *S. aureus*-specific Th17 cells. We isolated human effector Th17

cells from the blood according to the differential expression of surface markers *ex vivo* and restimulated them with *C. albicans*- or *S. aureus*-pulsed monocytes (2, 41). The *C. albicans*- and *S. aureus*-specific Th17 cells that were isolated, as confirmed by CFSE dilution, were then cloned and assessed for antiinflammatory factors. We observed a strong upregulation of FoxP3 expression in the *S. aureus*-specific Th17 cell clones in response to high-NaCl restimulation. In contrast, the *C. albicans*-specific Th17 cell clones were resistant to the effects of high NaCl concentration on FoxP3 expression. We applied the same approach to study TGF- β expression and found that it was also upregulated in *S. aureus*- but not *C. albicans*-specific Th17 cell clones upon restimulation in high-NaCl conditions (Figure 6A). These findings demonstrate that NaCl exerts divergent effects on the functional responses in effector T cells depending on the microbial antigen specificities of the effector T cells.

We then addressed the underlying mechanism. We hypothesized that the priming requirement of naive T cells for proinflammatory IL-1 β , which we discovered previously (2), renders the emerging *C. albicans*-specific Th17 cells resistant to the antiinflammatory effects of NaCl. We therefore reconstructed *C. albicans*-specific T cell priming *in vitro* by coculturing naive CFSE-labeled T cells and autologous monocytes pulsed with *C. albicans* in the presence or absence of IL-1 β -blocking Abs as described previously (2, 42). Likewise, *S. aureus*-specific T cell differentiation was performed in the presence or absence of recombinant IL-1 β to assess whether supplementation with exogenous IL-1 β renders *S. aureus*-specific naive T cells resistant to FoxP3 upregulation during their priming phase. Proliferating CFSE⁰ T cells were cloned and then restimulated in low- or high-NaCl conditions. Interestingly, the *in vitro*-polarized *C. albicans*-specific T cell clones that had been generated in the presence of IL-1 β -blocking Abs upregulated FoxP3 to a much greater degree in response to NaCl than did T cell clones polarized by *C. albicans* in non-neutralizing conditions (Figure 6B). This demonstrates that the *C. albicans*-specific Th17 cells were instructed by IL-1 β during their differentiation process to resist the antiinflammatory effects of NaCl. The *in vitro*-polarized *S. aureus*-specific Th17 cells resisted FoxP3 upregulation in high-NaCl conditions only if priming occurred in the presence of exogenous IL-1 β . Taken together, these results demonstrate that the dichotomous microbe-specific responses of Th17 cells toward NaCl depend on the differential priming requirements of these cells for IL-1 β .

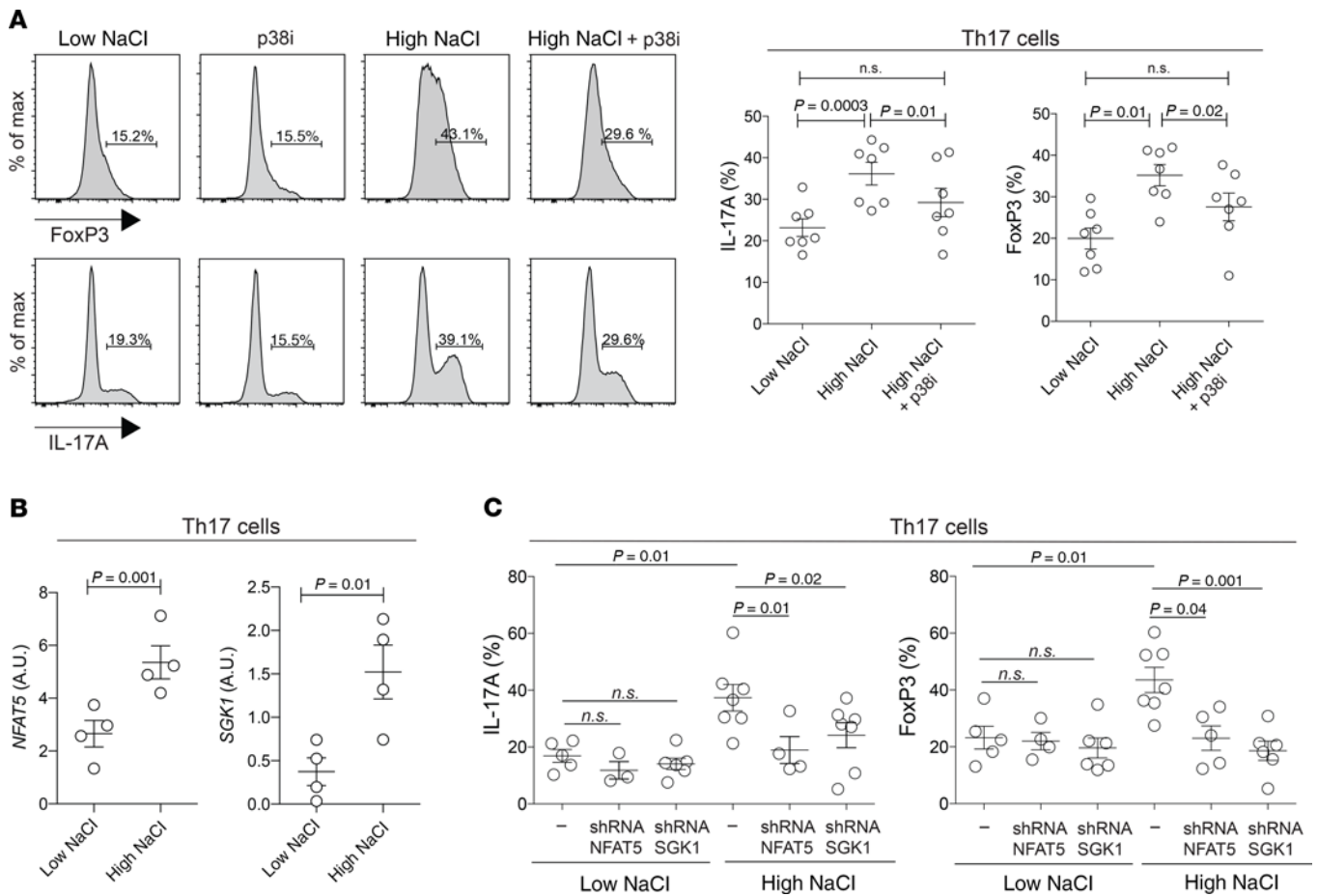


Figure 4. NFAT5 and SGK1 are engaged in the regulation of FoxP3 and IL-17A expression in high- but not low-NaCl conditions. (A) Human Th17 cells (CCR6⁺CCR4⁺CXCR3⁻) were restimulated in high or low NaCl concentrations in the presence or absence of a pharmacological inhibitor of p38 (p38i, SB202190) for a total culture period of 5 days with CD3 and CD28 mAbs (48 hours plate-bound). Results for intracellular staining and FACS analysis on day 5 after PMA and ionomycin restimulation are shown. Representative FACS data (left) and cumulative data (right) are shown. Gates were set according to the unstained controls. A 2-tailed Student's *t* test was used for comparisons between 2 groups. (B) qRT-PCR analysis of Th17 cells on day 5 isolated and stimulated as in A. (C) Intracellular staining and FACS analysis after restimulation in low- or high-NaCl conditions for 5 days in the presence or absence (scrambled shRNA) of shRNA-mediated silencing of NFAT5 and SGK1. Each circle represents an individual blood donor. One-way ANOVA was used for comparisons between multiple groups (FoxP3, $P < 0.0004$; IL-17A, $P < 0.001$).

High-NaCl conditions reduce the pathogenicity of murine Th17 cells in an experimental autoimmune encephalomyelitis mouse model but promote pathogenicity in the absence of TGF- β . It has previously been shown that a high-NaCl diet can translate into autoimmune inflammation via the Th17 cell axis (43). In particular, changes in the gut microbiome in response to dietary NaCl have been shown to affect Th17 cell polarization (43). However, whether NaCl directly regulates Th17 cell pathogenicity in vivo remains unknown. Considering the antiinflammatory Th17 cell phenotype observed in high-NaCl conditions in vitro, we decided to investigate its overall impact on autoimmune pathogenesis in vivo in an adoptive T cell transfer mouse model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE).

Several distinct cytokine conditions have been identified previously for efficient murine Th17 cell priming (44). In accordance with previous reports (38, 40, 45, 46), the combination of TGF- β with various proinflammatory cytokines, such as IL-6, IL-23, and IL-1 β , as well as their combinations, efficiently induced IL-17A compared with control conditions in the absence of polarizing cytokines (Th0) (Figure 7, A and B). Interestingly, high-NaCl

conditions increased FoxP3 expression, giving rise to IL-17A/FoxP3-coexpressing murine CD4⁺ T cells. This was accompanied by IL-17A downregulation (Figure 7, A and B). To test whether high-NaCl conditions reduced the pathogenicity of these Th17 cells in vivo, we adoptively transferred myelin oligodendrocyte glycoprotein-reactive (MOG₃₅₋₅₅-reactive) T cells into RAG-knockout mice to establish the adoptive transfer EAE mouse model. Naive T cells (CD4⁺CD44^{lo}Foxp3.gfp⁻) were sorted using FACS from 2D2 transgenic Foxp3.gfp reporter mice and stimulated for 3.5 days with anti-CD3 and anti-CD28 Abs and TGF- β (2 ng/mL) plus IL-6 (25 ng/mL), with or without supplementation of 40 mM NaCl. These in vitro-differentiated Th17 cells were thoroughly washed before adoptive transfer in equal numbers (2×10^6 viable cells per recipient) into immunodeficient *Rag1*^{-/-} mice that received 200 ng pertussis toxin (PTx) i.v. on the day of and 2 days after transfer. The T cells polarized with TGF- β plus IL-6 in high-NaCl conditions did not induce EAE, in contrast to their TGF- β -plus-IL-6-polarized counterparts, which were stimulated in low-NaCl conditions (Figure 7C). The lack of EAE induction in

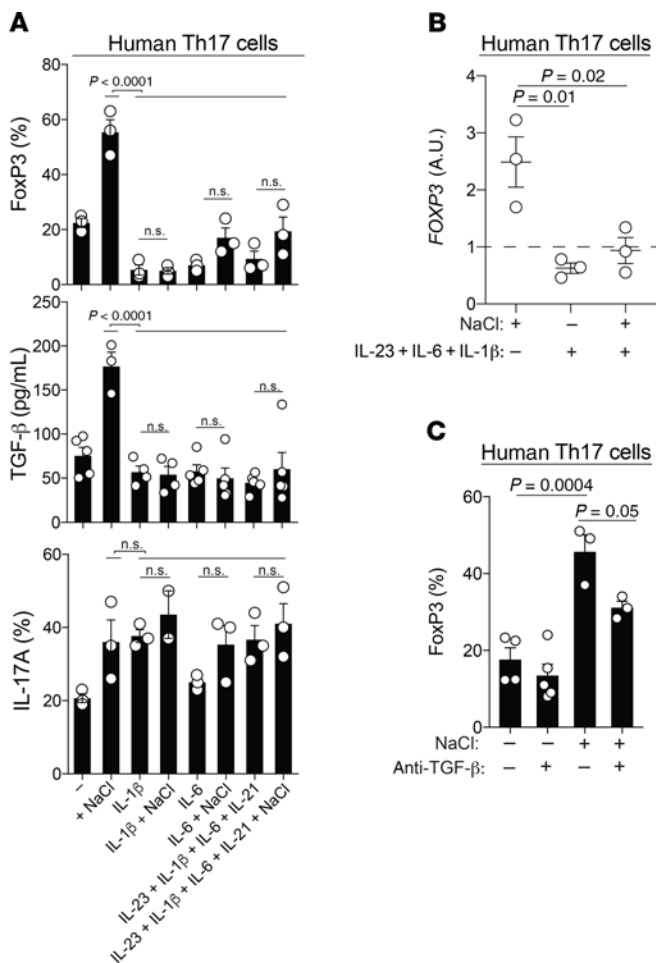


Figure 5. Proinflammatory cytokines abrogate the antiinflammatory switch in the Th17 cell phenotype that is induced in high-NaCl conditions. (A) FACS analysis (FoxP3, IL-17A) and ELISA (TGF-β) of human Th17 cells stimulated with CD3 and CD28 mAbs for 48 hours in high- or low-NaCl conditions for a total culture period of 5 days. $P < 0.0001$, by 1-way ANOVA (FoxP3 and TGF-β); $P = 0.03$, by 1-way ANOVA (IL-17A). (B) qRT-PCR analysis of human Th17 cells on day 5 after stimulation with CD3 and CD28 mAbs for 48 hours in high- or low-NaCl conditions and the presence or absence of Th17-polarizing cytokines. $P = 0.01$ and $P = 0.02$, by 1-way ANOVA. (C) FACS analysis performed with cells treated as in B. $P = 0.0004$ and $P = 0.05$, by 1-way ANOVA. ±, in the presence or absence of; ± NaCl, in high- or low-NaCl conditions.

high-NaCl conditions was accompanied by a reduced accumulation of IL-17A⁺ T cells in the CNS compared with the spleen upon ex vivo T cell analysis (Supplemental Figure 7, A and B). Collectively, these data provide evidence that NaCl can lead to reduced autoimmune disease by directly effecting Th17 cell polarization.

Efficient murine Th17 cell priming has also been previously reported in the absence of exogenous TGF-β (47). In the presence of cytokine combinations containing IL-1β, IL-23, or IL-6, high-NaCl conditions did not allow for FoxP3 upregulation but strongly induced IL-17A production, thus promoting the pathogenic murine Th17 cell phenotype, an finding in line with previous reports (Figure 7, D and E, and refs. 22, 23). Autocrine TGF-β production was below the detection level (data not shown). Adoptive transfer of murine T cells polarized in these cytokine conditions

resulted in relatively early and increased disease symptoms if T cell priming occurred in high- rather than low-NaCl conditions (Figure 7F). This is consistent with previous reports suggesting a pathogenic effect of NaCl on autoimmunity. Cumulatively, these data reveal that NaCl can exert divergent effects on autoimmune disease in the EAE mouse model by differential regulation of Th17 cell pathogenicity via the TGF-β switch. This cytokine-mediated switch in the ability of NaCl to induce disease in the EAE model was mirrored by reciprocal accumulation of FoxP3⁺ or IL-17A⁺ T cells in the CNS upon adoptive transfer of NaCl-treated T cells that were cultured in high-NaCl conditions that differed in the presence of TGF-β (Supplemental Figure 7, C and D).

Discussion

The ionic composition of the tissue microenvironment represents a critical, but so far largely overlooked, determinant of physiological and pathological tissue-specific T cell effector responses (16, 48, 49). Although dietary NaCl intake might influence local tissue concentrations, its body-wide differential distribution in homeostatic conditions exposes the circulating and resident immune cells to distinct NaCl microenvironments. NaCl has previously been highlighted as a novel and highly potent driver of Th17 cell differentiation and thus autoimmunity (22, 23). Our data support these findings but provide another layer of complexity that leads to divergent conclusions. We have revealed a dual context-dependent function of NaCl with respect to T cell fates, which translates into pro- and antiinflammatory Th17 cell effector functions. This finding has implications for the pathogenesis and treatment of chronic inflammatory diseases and for protective immunity.

We demonstrated that NaCl promoted Th17 cell functions at the effector T cell level independently of exogenous polarizing cytokines. Surprisingly, the effect on effector Th17 cells was accompanied by a strong and stable induction of FoxP3 expression upon direct restimulation with NaCl. Expression of antiinflammatory effector molecules such as TGF-β was also strongly induced by NaCl, supporting an overall switch toward an antiinflammatory T cell fate with concomitant maintenance of the Th17 cell identity. The antiinflammatory Th17 cell functionality adapted in a dose-dependent manner to its NaCl microenvironment, whereas IL-17A production reached a plateau with only small incremental increases in extracellular NaCl concentrations. In contrast, proinflammatory IFN-γ coproduction was downregulated, which was consistent with the previously reported shift from Th1 to Th2 responses in high-salt conditions (16, 49). This suggests that high NaCl concentrations, which are encountered in peripheral tissues (17), primarily regulate and further modulate the antiinflammatory functional repertoire of Th17 cells, whereas IL-17A expression levels can become saturated even before entering tissue microenvironments. Cumulatively, these findings support the view that antiinflammatory Th17 cell features prevail in NaCl-enriched tissue microenvironments.

Our findings revealed that transcriptional networks instructing specific T cell identities differ depending on the NaCl concentration in the microenvironment. Mechanistically, we demonstrated that NFAT5 and its downstream kinase SGK1 are critical for the antiinflammatory switch in Th17 cells induced by high-NaCl conditions. Interestingly, expression of FoxP3 and IL-17A was not regulated by NFAT5 or SGK1 in low-NaCl conditions but rather

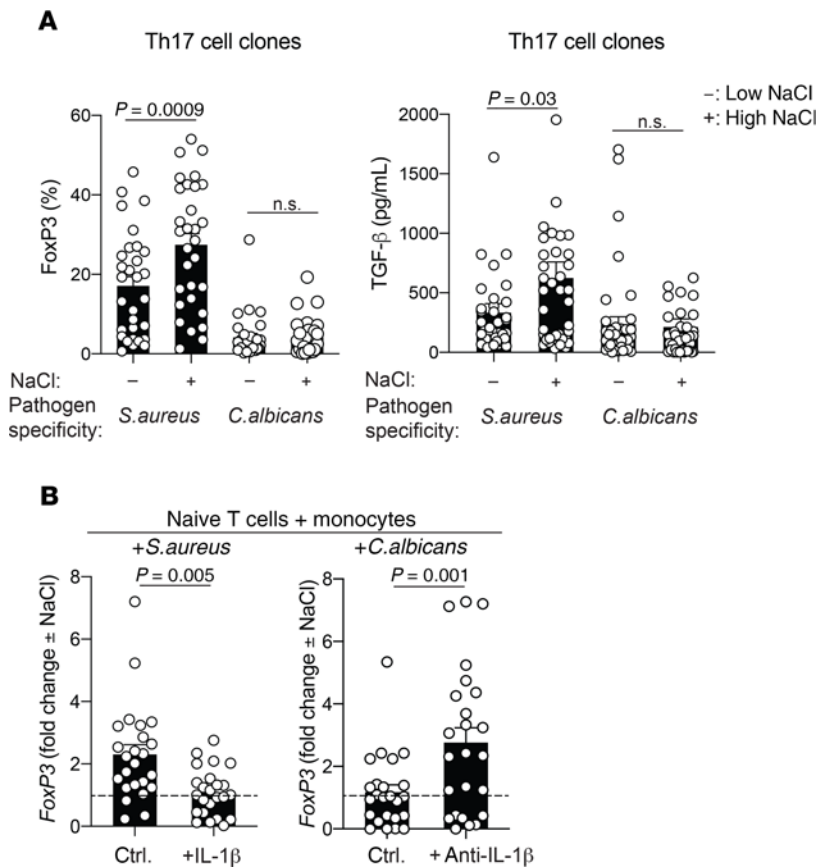


Figure 6. The microbial antigen specificity of human Th17 cells determines whether pro- or antiinflammatory effects are promoted by NaCl. (A) Human Th17 cells were sorted by flow cytometry, labeled with CFSE, and restimulated with autologous monocytes (2:1 ratio) that had been pulsed for 3 hours with *S. aureus* (DSM799) or *C. albicans* (SC5314) lysates before glutaraldehyde fixation as described previously (2). CFSE^{lo} Th17 cells were FACS sorted on day 4 and then cloned. The T cell clones were restimulated on days 12 to 14 with CD3 and CD28 for 48 hours and analyzed after a 5-day culture period in low- or high-NaCl conditions before intracellular staining and FACS analysis or ELISA of the culture supernatants. (B) Naive T cells were sorted as CD4⁺CD45RA⁺ T cells and stimulated with autologous monocytes that were pulsed with microbial lysates in the presence or absence of endogenously produced or recombinant IL-1 β . CFSE^{lo} T cells were FACS sorted and cloned on day 9. The T cell clones were restimulated in low- or high-NaCl conditions as in A. The fold change of FoxP3 expression in high- versus low-NaCl conditions is shown. ctrl., control. An unpaired 2-tailed Student's *t* test was used for comparisons between 2 groups. Circles indicate individual T cell clones.

upon restimulation in high-NaCl conditions. Transcriptional regulation should therefore be revisited within the context of tissue NaCl concentrations, which are not currently reflected by NaCl concentrations in standard cell culture media. We anticipate that this adaptation to physiological ionic contexts will unravel many more transcriptional pathways that have been overlooked thus far in standard cell culture media conditions. A human salt atlas depicting the body-wide differential distribution of NaCl concentrations will be important to establish, in order to map the tissue distribution of this important immunomodulator in health and disease as well as in dietary contexts.

Previous studies support our observation that SGK1 expression is associated with an antiinflammatory T cell identity. SGK1 has previously been shown to be more strongly expressed in peripherally induced Tregs (pTregs) than in Th17 or naive T cells in mice and is known to be induced by TGF- β (50). Furthermore, we and others have demonstrated that SGK1 promotes Th2 cell development over Th1 cell development in mice and humans and thus promotes allergic pathogenesis over autoimmune pathogenesis (16, 51). However, in Tregs, SGK1 was previously shown to disarm the immunosuppressive functionality and to even suppress the induction of FoxP3 expression (23, 50). These effects might particularly apply to thymus-derived natural Tregs, since induced Tregs remain suppressive in high-NaCl conditions (28, 29). Our own study does not preclude the possibility that the loss of immunosuppressive functions might be induced by NaCl in ex vivo-isolated Tregs. We observed that NaCl acted consistently across all investigated T cell subsets by increasing the coexpression of

FoxP3 with effector cytokines. Although this change in phenotype translated into acquisition of an antiinflammatory Th17 cell fate according to our findings, it might instead result in loss of suppressive functions selectively in Tregs, and in particular in the pTreg subset, which would be in line with previous reports (28–30).

The upregulation of antiinflammatory TGF- β expression in human Th17 cells observed in this study is consistent with the previously reported regulation of TGF- β production by NaCl-inducible NFAT5 and the induction of TGF- β expression upon hypertonic stress in other cell types (52–54). TGF- β has also been identified as an inducer of SGK1 (23). This finding indicates the existence of an autocrine feedback loop that might reinforce the antiinflammatory T cell fate in hypersaline tissue microenvironments (50). The reduced FoxP3 expression that we observed upon restimulation of Th17 cells in the presence of TGF- β -neutralizing Abs further suggested a supporting role of NaCl-induced TGF- β for the antiinflammatory fate of human Th17 cells. Additionally, SGK1 promotes TGF- β signaling through degradation of NEDD-4L, a molecule that has been reported to limit SMAD2/SMAD3 signaling (55). This suggests that NaCl not only increases the production of TGF- β but also its downstream signaling in target cells, thus mediating an overall immunosuppressive cellular crosstalk.

An intriguing finding of our study was that proinflammatory cytokines such as IL-1 β can license NaCl for T cell pathogenicity and thus serve as switch factors for the divergent functional effects of NaCl on human Th17 cells. NaCl either amplified antiinflammatory human Th17 cell properties or maintained proinflammatory properties, depending on this cytokine switch. Our observation might

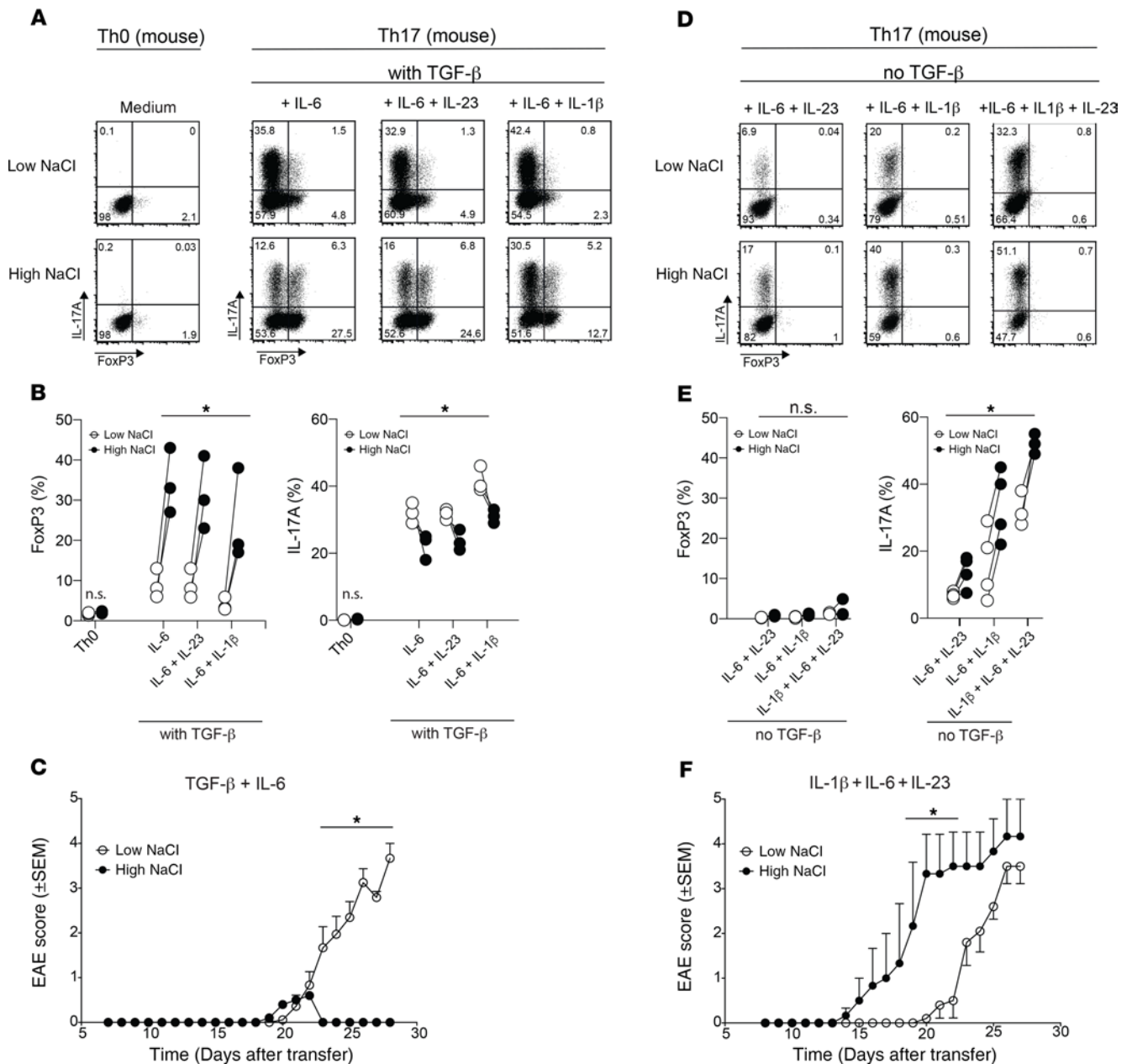


Figure 7. TGF- β governs the reciprocal enhancement of pro- versus anti-inflammatory Th17 cell functions by NaCl in vitro and in vivo in an EAE mouse model. (A) Naive murine CD4⁺ T cells from 2D2 mice were cultured in vitro in neutral (Th0) or various Th17-polarizing conditions (Th17), including TGF- β in low- or high-NaCl conditions, and analyzed by FACS on day 3.5 for IL-17A and FoxP3 expression. Representative dot plots show intracellular IL-17A and FoxP3 expression after restimulation of the cells with PMA and ionomycin. (B) Intracellular IL-17A and FoxP3 expression was quantified as in A. (C) Clinical EAE scores (0–5) were determined after adoptive transfer of T cells (1.5×10^5) that were polarized in vitro for 3.5 days with TGF- β and IL-6 (both 25 ng/mL) in high- or low-NaCl conditions. (D and E) Naive murine CD4⁺ T cells were cultured as in A in the absence of exogenous TGF- β . Representative dot plots and summary plots are shown. (F) Clinical EAE scores after adoptive transfer of T cells (2×10^5) that were polarized in vitro for 3.5 days with IL-1 β , IL-6, and IL-23 in high- versus low-NaCl conditions. * $P < 0.05$, A 2-tailed, paired Student's *t* test was performed for pairwise comparisons of low- and high-NaCl conditions ($n = 3$ –4 mice; data are representative of at least 3 independent experiments) (B and E) and 2-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons test (C and F).

explain why the direct anti-inflammatory property of NaCl has previously been masked and therefore overlooked in priming experiments involving polarizing cytokines, which dominantly inhibit FoxP3 expression (22). We showed that these cytokines were also sufficient to obscure the direct effect of NaCl on IL-17A upregulation in effector Th17 cells, as no synergistic effects were observed (22). Proinflammatory Th17-polarizing cytokines also downregulated

autocrine TGF- β production, thus abrogating the positive autocrine feedback for FoxP3 upregulation in human Th17 cells that was promoted by high-NaCl conditions (see model in Supplemental Figure 8). Cumulatively, these findings highlight how changing 1 factor of the microenvironment can shift the overall immune response in the opposite direction. Cytokine-blocking therapies might therefore amplify the anti-inflammatory effects of NaCl in the inflamed tissue.

Our findings with murine T cells also challenge the current concept that NaCl promotes Th17 cell pathogenicity and thus autoimmunity. Previous studies in mice have indicated that NaCl has a pathogenic impact on murine Th17 cell differentiation, but they did not address FoxP3 coexpression by these cells, which is well known to alter the functionality of differentiating Th17 cells (8, 45). In addition, naive T cell polarization requires cytokine signaling, thus obscuring direct NaCl effects. Here, we found that TGF- β acted as a critical molecular switch factor that amplified the antiinflammatory effects of NaCl, i.e., FoxP3 upregulation and IL-17A downregulation, whereas its absence allowed for amplification of the proinflammatory murine Th17 cell phenotype by NaCl. Consistent with our findings, results from other studies have shown that NaCl has little effect on murine IL-17A production in TGF- β -plus-IL-6-polarizing conditions and that there is no role for SGK1 expression in this process (23). Instead, an important role for SGK1-dependent murine IL-17A upregulation was previously observed in IL-23-containing priming conditions (23), highlighting the pathogenic role of NaCl in the context of proinflammatory cytokines. Exogenous TGF- β was critical for allowing NaCl to enhance the antiinflammatory murine Th17 cell fate, possibly due to insufficient autocrine TGF- β production in the presence of polarizing proinflammatory cytokines. This was comparable to our human T cell cultures, in which differential levels of autocrine TGF- β that were secondarily modulated by polarizing cytokines likewise translated into divergent Th17 cell effector functions in high-NaCl conditions (see model in Supplemental Figure 8). This observation is reminiscent of the reciprocal regulation by the IL-6 switch factor that has previously been reported for murine Tregs and Th17 cells in TGF- β conditions (40, 46). The detailed molecular mechanism by which these divergent Th17 cell fates are regulated in the context of ionic signaling remains to be dissected.

To demonstrate that these NaCl-induced T cell cytokine expression profiles translate into either pro- or antiinflammatory T cell effector functions, we validated them *in vivo*. Previously, a pathogenic effect of NaCl has been emphasized for autoimmune diseases in mouse models, which had been based on disease aggravation following a high-NaCl diet (18, 22, 23, 56–58). Indirect effects, such as modification of the gut microbiota or increased blood-brain barrier permeability, most likely account for this overall dietary effect (15, 43, 59). Using the adoptive transfer mouse model of EAE, we were able to circumvent the widespread effects of diet on the immune system and beyond. This model revealed that NaCl exerted direct as opposed to indirect antiinflammatory T cell functions *in vivo*, which were accompanied by lower disease activity. Our findings were consistent with a NaCl-induced enrichment of FoxP3⁺ versus IL-17A⁺ T cells in the CNS. The opposite disease outcome was amplified by NaCl, however, when murine Th17 cells were primed in the absence of exogenous TGF- β , consistent with our *in vitro* Th17 cell phenotyping data. Cumulatively, our findings challenge the current concept that NaCl promotes autoimmune disease pathogenicity *per se*. Instead, they propose a dual context-dependent function of NaCl with reciprocal regulation of autoimmunity.

Strikingly, our adoptive T cell transfer strategy also suggested *in vivo* stability of the protective Th17 cell fate that was induced in high-NaCl conditions *in vitro*. This is illustrated by the

maintenance of the antiinflammatory FoxP3^{hi}IL-17A^{lo} phenotype of CNS-infiltrating T cells in the EAE mouse model, which corresponded to their *in vitro*-generated phenotype and correlated with reduced disease scores. These findings were also in line with the maintenance of NaCl-induced FoxP3 upregulation in human Th17 cells upon repeated restimulations in changing microenvironments. Cumulatively, this *in vivo* stability of *in vitro*-induced T cell effects has implications for NaCl in adoptive T cell therapies in settings of autoimmunity, cancer, and infections.

NaCl has previously been reported to accumulate in bacterial skin infections and to play antimicrobial roles via macrophages (60). Our data demonstrate that NaCl exerts differential effects on human Th17 cells depending on their microbial antigen specificities. NaCl induced strong FoxP3 upregulation in *S. aureus*-specific Th17 cells but not *C. albicans*-specific Th17 cells. This intriguing pathogen-specific effect of NaCl is consistent with the differential Th17 priming requirements for IL-1 β for *C. albicans*- versus *S. aureus*-specific T cells that we have previously reported (2). Accordingly, *C. albicans*-specific T cell priming in the presence of IL-1 β -blocking Abs enhanced the ability of NaCl to upregulate FoxP3 expression compared with culture conditions in the absence of NaCl. Together, the data suggest differential effects of NaCl on Th17 cells depending on the type of infection. Moreover, they demonstrate that the dichotomous effects of NaCl are not dependent on the simultaneous presence of the IL-1 β switch, but rather are associated with prior IL-1 β signaling experience during the initial pathogen-specific Th17 cell-priming phase. Whether this durable T cell experience is imprinted epigenetically remains to be investigated. These findings highlight that NaCl fine-tunes antimicrobial immune responses as a rheostat depending on cytokine experience and the type of pathogen. It remains to be determined in the context of specific tissues and infections whether NaCl is beneficial for microbial clearance by the adaptive T cell immune system.

Our findings suggest that the enrichment of NaCl in peripheral tissues could stabilize immunotolerance in steady-state conditions or, alternatively, promote inflammation in settings of infections or autoimmunity. These insights could translate into new therapeutic strategies, since currently available drugs that block IL-1 β , IL-6, or IL-23 in chronic inflammatory diseases might shift the balance toward beneficial clinical outcomes upon NaCl accumulation in peripheral tissues.

Methods

Cell purification and sorting. Fresh peripheral blood was obtained from healthy donors. PBMCs were isolated by density gradient centrifugation using Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare). Th cells and monocytes were isolated from the PBMCs by positive selection with CD4- or CD14-specific microbeads (Miltenyi Biotec), respectively, using an autoMACS Pro Separator. Th cell subsets were sorted to at least 98% purity using the following markers: Th1 subset, CXCR3⁺CCR4⁺CCR6⁻CD45RA⁻; Th2 subset, CXCR3⁺CCR4⁺CCR6⁻CD45RA⁻; and Th17 subset, CXCR3⁺CCR4⁺CCR6⁺CD45RA⁻. Memory Th cells were isolated as CD45RA⁻ lymphocytes, and naive T cells were isolated as CD45RA⁺CD45RO⁻CCR7⁺ lymphocytes at a purity of over 98%. The Abs used for sorting by flow cytometry were identical to those we have described previously (2, 6). The cells were sorted with a BD FACSAria III (BD Biosciences). Skin T cells were isolated from fresh human abdominal skin

samples obtained after plastic surgery by overnight collagenase digestion (Collagenase Type IV, Thermo Fisher Scientific) and cell sorting.

Cell culture. Human T cells were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 2 mM glutamine, 1% (vol/vol) nonessential amino acids, 1% (vol/vol) sodium pyruvate, penicillin (50 U/mL), streptomycin (50 µg/mL; all from Invitrogen, Thermo Fisher Scientific), and 10% (vol/vol) FCS (Biochrom). Hypersalinity (high NaCl levels) was induced by increasing the NaCl concentration to 185 mM, whereas the baseline concentrations of NaCl in cell culture medium including supplements were 140 mM (NaCl, MilliporeSigma). Final sodium concentrations were confirmed in the cell culture media by potentiometry with a Cobas 8000 Analyzer (Roche). In the indicated experiments, T cell cultures were performed in the presence of recombinant cytokines (IL-6, 50 ng/mL; TGF-β, 5 ng/mL; IL-1β, 10 ng/mL; IL-23, 50 ng/mL; IL-21, 50 ng/mL; all from R&D Systems) or neutralizing Abs (anti-IL-1β, BD Biosciences; anti-TGF-β, R&D Systems; both 10 µg/mL). T cells were stimulated with plate-bound anti-CD3 (2 µg/mL, clone TR66) and anti-CD28 (2 µg/mL CD28.2; both from BD Biosciences) Abs. T cell clones were generated in non-polarizing conditions, as described previously, following single-cell deposition via flow cytometry-assisted cell sorting or by limiting dilution plating (61). Pathogen-specific T cell clones were generated as described previously (2, 42).

Cytokine and transcription factor analyses. For intracellular cytokine staining, human cells were restimulated for 5 hours with PMA and ionomycin, with brefeldin A added for the final 2.5 hours of culture (all from MilliporeSigma). The cells were fixed and permeabilized with Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions. For transcription factor analysis, cells were fixed and permeabilized with Cytofix/Cytoperm (eBioscience). The cells were stained with anti-cytokine Abs (Abs specific for IL-17A [clone BL168], IFN-γ [4S.B3], IL-22 [clone 2G12A41], and TGF-β [TW4-2F8]; all from BioLegend) and with Abs against transcription factors (ROR-γt [clone AFKJS-9]), FoxP3 [clone PCH101], both eBioscience) and were analyzed with a BD LSRFortessa (BD Biosciences), a CytoFLEX (Beckman Coulter), or a MACSQuant Analyzer (Miltenyi Biotec). Flow cytometric data were analyzed with FlowJo (Tree Star) or Cytobank (Cytobank Inc.) software. Cytokines in culture supernatants were quantified by ELISA (R&D Systems) or by Luminex (Thermo Fisher Scientific), according to standard protocols, after restimulation of cultured T cells with phorbol 12-13-dibutyrate (50 nM, MilliporeSigma) and plate-bound anti-CD3 (1 µg/mL, TR66) for 8 hours or as indicated in the respective figure legends.

For experiments with murine T cells, single-cell suspensions were generated from the spleen and inguinal, axil, and brachial lymph nodes of C57BL/6 mice (Janvier Labs). Naive CD4⁺ T cells were obtained by negative selection using a mouse naive CD4⁺ T Cell Isolation Kit (StemCell Technologies or Miltenyi Biotec). The cells were seeded at a density of 200,000 cells/well in a 96-well flat-bottomed plate and stimulated with plate-bound anti-CD3 and anti-CD28 Abs (2 µg/mL anti-CD3 [clone 145-2C11] and 2 µg/mL anti-CD28 [clone 37.51] for *in vitro* experiments; 4 µg/mL anti-CD3 and soluble anti-CD28 for *in vivo* experiments; Bio X Cell) and different mixtures of cytokines and mAbs (Th0 conditions: anti-IL-4, anti-IFN-γ; Th17 conditions: anti-IL-4, anti-IFN-γ, and cytokine mixtures as indicated) with or without the addition of 40 mM NaCl in DMEM (supplemented with 10% FCS, 10 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate,

1× nonessential amino acids [MEM NEAA], 50 µM β-mercaptoethanol, and 100 U penicillin-streptomycin; Life Technologies, Thermo Fisher Scientific). Neutralizing Abs and cytokines were used at the following concentrations: anti-IL-4 (clone 11B11, 10 µg/mL), anti-IFN-γ (clone XMG1.2, 10 µg/mL) from BioLegend, and anti-TGF-β (clone 1D11.16.8, 20 µg/mL) from Bio X Cell; and IL-6 (25 ng/mL), IL-1β (20 ng/mL), IL-23 (20 ng/mL), and TGF-β (2 ng/mL) from Pepro-Tech or R&D Systems. After 2.5 days in culture, cells were split into 2 new 96-well plates with a freshly prepared cytokine mixture. After 3.5 days in culture, cells were stimulated with 10 nM PMA and 1 µM ionomycin for 2 hours, followed by the addition of 5 µg/mL brefeldin A for another 2 hours. Dead cells were excluded with Fixable Viability Dye eFluor 780 (eBioscience) or LIVE/DEAD Fixable NiR Dead Cell Stain (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). Nonspecific binding was blocked with anti-CD16/anti-CD32 (clone 93, BioLegend) plus 2% normal mouse serum and 2% normal rat serum. Detection of intracellular FoxP3 (FJK-16s) and IL-17A (TC11-18H10.1) was performed using the FoxP3/Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience) according to the manufacturer's instructions. Data were acquired on an BD LSRFortessa (BD Biosciences), a BD FACSCanto II (BD Biosciences), or a Cytoflex (Beckman Coulter) and analyzed with FlowJo software (Tree Star). Mice were housed in specific pathogen-free conditions. All data for C57BL/6 mice were reproduced with 2D2 [C57BL/6-Tg (Tcr-2D2, Tcrb2D2)1Kuch/J] transgenic mice (The Jackson Laboratory).

Adoptive transfer EAE mouse model. Single-cell suspensions were generated from spleen, inguinal, axil, brachial, and mandibular lymph nodes of 2D2_Foxp3.gfp donor mice [Tg(Tcr2D2, Tcrb2D2)1Kuch crossed with Treg reporter strain Foxp3^{tm1Kuch} on a C57BL/6 background] by passing the tissue through a 70-µm cell strainer. Naive CD4⁺ T cells were obtained by pre-enrichment using an "untouched" CD4⁺ T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec) with subsequent flow cytometric analysis (CD4⁺ [clone RM4-5], CD44^{lo} [clone IM7], Foxp3.gfp⁻). Cells were seeded at a density of 200,000 cells/well in a flat-bottom 96-well plate and stimulated with plate-bound anti-CD3 (clone 145-2C11, 4 µg/mL, Bio X Cell) and soluble anti-CD28 (clone PV-1, 2 µg/mL, Bio X Cell). Recombinant cytokines (all from R&D Systems) and mAbs (anti-IFN-γ and anti-IL-4 [both 10 µg/mL], from Bio X Cell plus 25 ng/mL IL-6 and 2 ng/mL TGF-β1 or IL-1β, IL-6, IL-23 [all 25 ng/mL], respectively) were added to DMEM (supplemented with 10% FCS, 50 µM β-mercaptoethanol, MEM-NEAA, MEM vitamins, folic acid, 50 U/mL penicillin, 50 µg/mL streptomycin, and 0.1 mg/mL gentamicin) with or without addition of 40 mM NaCl. Cells were cultured for 3.5 days before adoptive transfer. Differentiated T cells were injected *i.v.* into Rag1-deficient recipient mice (Rag1^{tm1Mom}) that received 200 ng PTx (MilliporeSigma) *i.v.* on the day of and 2 days after transfer. Clinical signs of EAE were assessed daily with the following scoring system: 0, no signs of disease; 1, loss of tone in the tail; 2, hind limb paresis; 3, hind limb paralysis; 4, tetraplegia; and 5, moribund. At the peak of disease (29 days), CNS-infiltrating cells were isolated after perfusion through the left cardiac ventricle with PBS. Brain and spinal cord were dissected and digested with collagenase D (2.5 mg/mL) and DNase I (1 mg/mL) at 37°C for 45 minutes. After passing the tissue through a 70-µm cell strainer, cells were separated by discontinuous Percoll gradient (70%/37%) centrifugation. Mononuclear cells were isolated from the interphase.

Gene expression analysis. Total RNA was extracted using TRIzol Reagent (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) according to the

manufacturer's instructions. A high-capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) was used for cDNA synthesis according to the manufacturer's protocol. Transcripts were quantified by real-time PCR with predesigned TaqMan Gene Expression Assays (*SGK1*, Hs00985033; *NFAT5*, Hs00232437; *RORC2*, Hs01076112; *FOXP3*, Hs01085834; *IL10*, Hs00961622; *CTLA4*, Hs00175480_m1; *18S*, Hs03928985; *LAG3*, Hs00958444_g1; and *ICOS*, Hs00359999_m1) and reagents (Applied Biosystems). mRNA abundance was normalized to the amount of 18S rRNA and is expressed in AU.

For RNA-Seq analyses, Th17 cells were isolated *ex vivo* as described above and stimulated for 48 hours with CD3 and CD28 mAbs for a total culture duration of 5 days in the presence of low and high NaCl concentrations. Total RNA was extracted from cells lysed in TRI Reagent (MilliporeSigma) according to the manufacturer's protocol. RNA was quantified using a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific), and its quality was verified with an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) according to the manufacturer's guidelines.

Library preparation for RNA-Seq was performed using the TruSeq Stranded Total RNA Sample Preparation Guide (Illumina) starting with 450 ng RNA as the input for each sample. Only 11 cycles were used for PCR amplification to minimize PCR bias. The barcoded libraries were sequenced on a HiSeq 2500 (Illumina) with paired-end, 100-bp reads. Approximately 6 Gb of sequencing reads were produced on average per sample. The reads were mapped to the reference transcriptome built from the human genome assembly hg38 (GRCh38) using STAR, version 2.6.1a (62). Transcripts were quantified with Salmon, version 0.11.3, in the alignment-based mode (63). Downstream analyses were performed with the statistical framework R (ISBN 3-900051-07-0). Differentially expressed genes were identified using the R package DESeq2 (64), taking into consideration the effect of samples. No fold-change cutoff was set for determining differentially expressed genes, thus, all genes with a FDR of less than 0.05 by the Wald test were considered significantly dysregulated. Plots were produced with the R package ggplot2 (65). The clusterProfiler R package (66) was used for GSEA, and genes were ranked according to the shrunken fold-change values calculated by DESeq2, as previously suggested (64). Our raw data are publicly available in the NCBI's Gene Expression Omnibus database (GEO GSE148669).

Lentivirus-mediated gene silencing. Bacterial stocks containing lentiviral vectors with shRNAs targeting *SGK1* and *NFAT5* were purchased from MilliporeSigma (*SGK1*: TRCN0000196562, TRCN0000194957, TRCN0000040175, TRCN0000040177, TRCN0000010432; *NFAT5*: TRCN0000437810, TRCN0000020021, TRCN0000020022, TRCN0000020023, and TRCN0000020019). All vectors were amplified and purified using a MaxiPrep or MidiPrep Kit (QIAGEN) according to the manufacturer's instructions. Lentiviral particles were generated in HEK293 cells. Presorted human memory T cells (5×10^4) were activated on anti-CD3/anti-CD28 Ab-coated plates for 12 hours before transduction with the supernatants from cultures with pooled lentiviral particles against *SGK1* or *NFAT5* or those without shRNA insertion.

After 48 hours, the cells were washed and selected with puromycin (MilliporeSigma). Silenced gene expression was verified by qRT-PCR 4 days after transduction.

Statistics. The statistical tests are indicated in the respective figure legends. Error bars indicate the SEM. *P* values of 0.05 or less were considered significant. Analyses were performed using GraphPad Prism 7-8 (GraphPad Software).

Study approval. Ethics approval was obtained from the IRB of the Technical University of Munich (195/15s, 146/17s, 491/16s) and the Charité – Universitätsmedizin Berlin (EA1/221/11). Participants of this study provided written informed consent. All work involving humans was carried out in accordance with Declaration of Helsinki principles for experiments involving humans. All experiments were performed in accordance with the regulations of the Regierung von Oberbayern and the Regierungspräsidium Giessen.

Author contributions

JM performed experiments with human material and analyzed and interpreted the data. JZ and AK performed murine *in vitro* experiments and, together with DB and AP, analyzed and interpreted the data. YYC and DS performed experiments with human T cells and analyzed and interpreted the data. EG performed mRNA-Seq. GPDA performed bioinformatic and statistical analyses. IDJ and TR generated and characterized the antigen lysates of *C. albicans* yeast and *S. aureus*, respectively. SH and FP performed experiments related to the transfer EAE model in 2 independent mouse facilities and, together with TK and MH, analyzed and interpreted the data. SF and JH performed experiments and analyzed data related to the stability of Th17 cell functions in response to NaCl. CEZ conceived the study, supervised the experiments, interpreted the data, and wrote the manuscript.

Acknowledgments

This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation, SFB1054) (Projekt-nummer: 210592381) Teilprojekt B10 (to CEZ), B12 (to DB), B06 (to TK); SFB1335 (Projektnummer: 360372040), Teilprojekt P18 (to CEZ); the Emmy Noether Program BA 5132/1-1 and BA 5132/1-2 (252623821) (to DB) and PE 2681/1-1 (to AP); DFG HU 1824/5-1, HU 1824/7-1, GIF I-1474-414.13/2018 (to MH); the Fresenius Stiftung, 2015_A232 (to MH); the Fritz-Thyssen Stiftung (to CEZ); Collaborative Research Center/Transregio 124 Project C5 (to IDJ); and the German Center for Infection Research (to CEZ). TK is supported by Synergy (EXC 2145, ID 390857198). We thank Rebecca Noster and Hanna Meinel for experimental support. We acknowledge the BMC Core Facility Flow Cytometry of the LMU Munich for providing equipment.

Address correspondence to: Christina E. Zielinski, Translational and Institute of Virology, Technical University of Munich, Ismaninger Strasse 22, Bau 522, D-81675 Munich, Germany. Phone: 49.89.4140.7143; Email: christina.zielinski@tum.de.

1. Zielinski CE, Corti D, Mele F, Pinto D, Lanzavecchia A, Sallusto F. Dissecting the human immunologic memory for pathogens. *Immunol Rev*. 2011;240(1):40–51.

2. Zielinski CE, et al. Pathogen-induced human Th17 cells produce IFN- γ or IL-10 and are regulated by IL-1 β . *Nature*. 2012;484(7395):514–518.

3. Patel DD, Kuchroo VK. Th17 cell pathway

in human immunity: lessons from genetics and therapeutic interventions. *Immunity*. 2015;43(6):1040–1051.

4. Sallusto F, Zielinski CE, Lanzavecchia A. Human

- Th17 subsets. *Eur J Immunol*. 2012;42(9):2215–2220.
5. Stockinger B, Omenetti S. The dichotomous nature of T helper 17 cells. *Nat Rev Immunol*. 2017;17(9):535–544.
 6. Noster R, de Koning HD, Maier E, Prelog M, Lainka E, Zielinski CE. Dysregulation of proinflammatory versus anti-inflammatory human T_H17 cell functionalities in the autoinflammatory Schnitzler syndrome. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;138(4):1161–1169.e6.
 7. Aschenbrenner D, et al. An immunoregulatory and tissue-residency program modulated by c-MAF in human T_H17 cells. *Nat Immunol*. 2018;19(10):1126–1136.
 8. Ohnmacht C, et al. Mucosal immunology. The microbiota regulates type 2 immunity through ROR γ T⁺ T cells. *Science*. 2015;349(6251):989–993.
 9. Yang BH, et al. Foxp3(+) T cells expressing ROR γ T represent a stable regulatory T-cell effector lineage with enhanced suppressive capacity during intestinal inflammation. *Mucosal Immunol*. 2016;9(2):444–457.
 10. Lochner M, et al. In vivo equilibrium of proinflammatory IL-17+ and regulatory IL-10⁺ Foxp3⁺ ROR γ T⁺ T cells. *J Exp Med*. 2008;205(6):1381–1393.
 11. Langrish CL, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med*. 2005;201(2):233–240.
 12. Gagliani N, et al. Th17 cells transdifferentiate into regulatory T cells during resolution of inflammation. *Nature*. 2015;523(7559):221–225.
 13. Lee Y, et al. Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. *Nat Immunol*. 2012;13(10):991–999.
 14. McGeachy MJ, et al. TGF- β and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol*. 2007;8(12):1390–1397.
 15. Sharif K, Amital H, Shoenfeld Y. The role of dietary sodium in autoimmune diseases: The salty truth. *Autoimmun Rev*. 2018;17(11):1069–1073.
 16. Matthias J, et al. Sodium chloride is an ionic checkpoint for human T_H2 cells and shapes the atopic skin microenvironment. *Sci Transl Med*. 2019;11(480):eaau0683.
 17. Müller DN, Wilck N, Haase S, Kleinewietfeld M, Linker RA. Sodium in the microenvironment regulates immune responses and tissue homeostasis. *Nat Rev Immunol*. 2019;19(4):243–254.
 18. Luo T, et al. Th17/Treg imbalance induced by dietary salt variation indicates inflammation of target organs in humans. *Sci Rep*. 2016;6:26767.
 19. Go WY, Liu X, Roti MA, Liu F, Ho SN. NFAT5/TonEBP mutant mice define osmotic stress as a critical feature of the lymphoid microenvironment. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101(29):10673–10678.
 20. Hofmeister LH, Perisic S, Titze J. Tissue sodium storage: evidence for kidney-like extrarenal countercurrent systems? *Pflugers Arch*. 2015;467(3):551–558.
 21. Fischereder M, et al. Sodium storage in human tissues is mediated by glycosaminoglycan expression. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2017;313(2):F319–F325.
 22. Kleinewietfeld M, et al. Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH17 cells. *Nature*. 2013;496(7446):518–522.
 23. Wu C, et al. Induction of pathogenic TH17 cells by inducible salt-sensing kinase SGK1. *Nature*. 2013;496(7446):513–517.
 24. Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*. 1999;401(6754):708–712.
 25. Zielinski CE. Human T cell immune surveillance: phenotypic, functional and migratory heterogeneity for tailored immune responses. *Immunol Lett*. 2017;190:125–129.
 26. Thome JJ, Farber DL. Emerging concepts in tissue-resident T cells: lessons from humans. *Trends Immunol*. 2015;36(7):428–435.
 27. Park CO, Kupper TS. The emerging role of resident memory T cells in protective immunity and inflammatory disease. *Nat Med*. 2015;21(7):688–697.
 28. Hernandez AL, et al. Sodium chloride inhibits the suppressive function of FOXP3⁺ regulatory T cells. *J Clin Invest*. 2015;125(11):4212–4222.
 29. Luo Y, et al. Negligible effect of sodium chloride on the development and function of TGF- β -induced CD4⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells. *Cell Rep*. 2019;26(7):1869–1879.e3.
 30. Beriou G, et al. IL-17-producing human peripheral regulatory T cells retain suppressive function. *Blood*. 2009;113(18):4240–4249.
 31. Wang J, Ioan-Facsinay A, van der Voort EI, Huizinga TW, Toes RE. Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4⁺ T cells. *Eur J Immunol*. 2007;37(1):129–138.
 32. Sakaguchi S, Mikami N, Wing JB, Tanaka A, Ichiyama K, Ohkura N. Regulatory T cells and human disease. *Annu Rev Immunol*. 2020;38:541–566.
 33. López-Rodríguez C, Aramburu J, Jin L, Rakeman AS, Michino M, Rao A. Bridging the NFAT and NF- κ B families: NFAT5 dimerization regulates cytokine gene transcription in response to osmotic stress. *Immunity*. 2001;15(1):47–58.
 34. Lang F, Stouraras C, Alesutan I. Regulation of transport across cell membranes by the serum- and glucocorticoid-inducible kinase SGK1. *Mol Membr Biol*. 2014;31(1):29–36.
 35. Yan J, et al. Transcription factor binding in human cells occurs in dense clusters formed around cohesin anchor sites. *Cell*. 2013;154(4):801–813.
 36. Acosta-Rodríguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F. Interleukins 1 β and 6 but not transforming growth factor- β are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol*. 2007;8(9):942–949.
 37. Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor- β and induction of the nuclear receptor ROR γ T. *Nat Immunol*. 2008;9(6):641–649.
 38. Ikeda S, Saijo S, Murayama MA, Shimizu K, Akitasu A, Iwakura Y. Excess IL-1 signaling enhances the development of Th17 cells by downregulating TGF- β -induced Foxp3 expression. *J Immunol*. 2014;192(4):1449–1458.
 39. Izcue A, et al. Interleukin-23 restrains regulatory T cell activity to drive T cell-dependent colitis. *Immunity*. 2008;28(4):559–570.
 40. Bettelli E, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006;441(7090):235–238.
 41. Acosta-Rodríguez EV, et al. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol*. 2007;8(6):639–646.
 42. Braun JM, Zielinski CE. In vitro generation of microbe-specific human Th17 cells. *Methods Mol Biol*. 2014;1193:97–104.
 43. Wilck N, et al. Salt-responsive gut commensal modulates T_H17 axis and disease. *Nature*. 2017;551(7682):585–589.
 44. Peters A, Lee Y, Kuchroo VK. The many faces of Th17 cells. *Curr Opin Immunol*. 2011;23(6):702–706.
 45. Zhou L, et al. TGF- β -induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing ROR γ T function. *Nature*. 2008;453(7192):236–240.
 46. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGF β in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*. 2006;24(2):179–189.
 47. Ghoreschi K, et al. Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF- β signalling. *Nature*. 2010;467(7318):967–971.
 48. Müller DN, Wilck N, Haase S, Kleinewietfeld M, Linker RA. Sodium in the microenvironment regulates immune responses and tissue homeostasis. *Nat Rev Immunol*. 2019;19(4):243–254.
 49. Matthias J, Zielinski CE. Shaping the diversity of Th2 cell responses in epithelial tissues and its potential for allergy treatment. *Eur J Immunol*. 2019;49(9):1321–1333.
 50. Wu C, et al. SGK1 governs the reciprocal development of Th17 and regulatory T cells. *Cell Rep*. 2018;22(3):653–665.
 51. Heikamp EB, et al. The AGC kinase SGK1 regulates TH1 and TH2 differentiation downstream of the mTORC2 complex. *Nat Immunol*. 2014;15(5):457–464.
 52. Li W, et al. MiR-568 inhibits the activation and function of CD4⁺ T cells and Treg cells by targeting NFAT5. *Int Immunol*. 2014;26(5):269–281.
 53. Sugiura T, et al. Effects of hypertonic stress on transforming growth factor- β activity in normal rat kidney cells. *Kidney Int*. 1998;53(6):1654–1660.
 54. Gutcher I, Donkor MK, Ma Q, Rudensky AY, Flavell RA, Li MO. Autocrine transforming growth factor- β 1 promotes in vivo Th17 cell differentiation. *Immunity*. 2011;34(3):396–408.
 55. Gao S, et al. Ubiquitin ligase Nedd4L targets activated Smad2/3 to limit TGF- β signaling. *Mol Cell*. 2009;36(3):457–468.
 56. Aguiar SLF, et al. High-salt diet induces IL-17-dependent gut inflammation and exacerbates colitis in mice. *Front Immunol*. 2017;8:1969.
 57. Jung SM, et al. Sodium chloride aggravates arthritis via Th17 polarization. *Yonsei Med J*. 2019;60(1):88–97.
 58. Wei Y, et al. High salt diet stimulates gut Th17 response and exacerbates TNBS-induced colitis in mice. *Oncotarget*. 2017;8(1):70–82.
 59. Kremensov DN, Case LK, Hickey WF, Teuscher C. Exacerbation of autoimmune neuroinflammation by dietary sodium is genetically controlled

- and sex specific. *FASEB J.* 2015;29(8):3446-3457.
60. Jantsch J, et al. Cutaneous Na⁺ storage strengthens the antimicrobial barrier function of the skin and boosts macrophage-driven host defense. *Cell Metab.* 2015;21(3):493-501.
61. Messi M, Giacchetto I, Nagata K, Lanzavecchia A, Natoli G, Sallusto F. Memory and flexibility of cytokine gene expression as separable properties of human T(H)1 and T(H)2 lymphocytes. *Nat Immunol.* 2003;4(1):78-86.
62. Dobin A, et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics.* 2013;29(1):15-21.
63. Patro R, Duggal G, Love MI, Irizarry RA, Kingsford C. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nat Methods.* 2017;14(4):417-419.
64. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014;15(12):550.
65. Wickham H. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis.* Springer Verlag; 2016.
66. R Core Team. R Project for Statistical Computing. <https://www.r-project.org>. Updated June 12, 2020. Accessed June 12, 2020.
67. Tuomela S, et al. Comparative analysis of human and mouse transcriptomes of Th17 cell priming. *Oncotarget.* 2016;7(12):13416-13428.

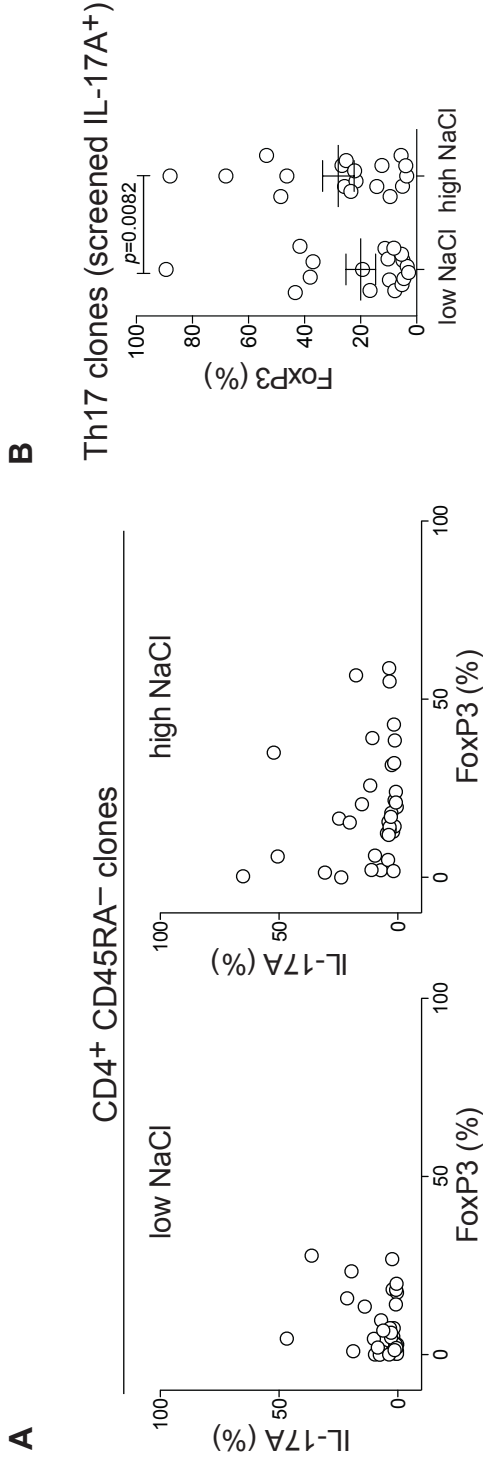


Figure S1. NaCl promotes an anti-inflammatory phenotype in human T cell clones. a, Resting T cell clones were generated from CD45RA⁻ memory T helper cells and restimulated with CD3 and CD28 mAbs for 5 days (48 hours plate-bound) in low and high NaCl concentrations. Intracellular cytokine staining FACS analysis is shown. **b,** CD4⁺CCR3⁻CCR4⁺CCR6⁺ Th17 cells were sorted and cloned by limiting dilution plating. T cell clones expressing >20% IL-17A were restimulated and analyzed as in (a). Each circle represents an individual T cell clone. Student's two-tailed t test was used for comparisons between two groups.

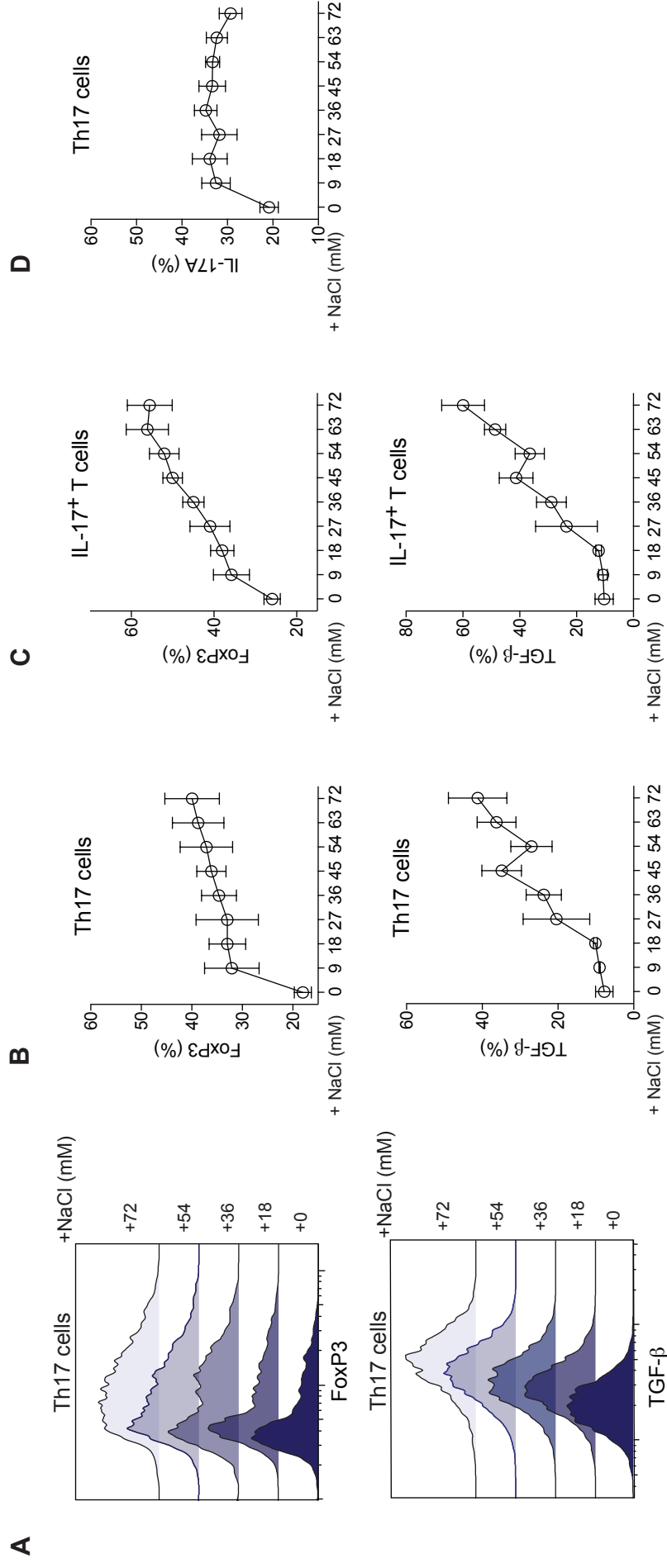


Figure S2. NaCl exerts its anti-inflammatory effects on Th17 cells in a dose-dependent manner over a wide range of NaCl concentrations, whereas IL-17 upregulation reaches a plateau after only small increments of extracellular NaCl. a-d, Th17 cells (CD4⁺CXCR3⁻CCR4⁺CCR6⁺) were sorted from human PBMC *ex vivo* and restimulated for 48 hours with CD3 and CD28 mAbs (48 hours plate-bound) in the presence of titrated concentrations of additional NaCl for a culture period of 5 days. Cytokine and transcription factor expression was determined by intracellular staining and FACS analysis after PMA and ionomycin restimulation for 5 hours. **a, One representative experiment and **(b-d)** cumulative data for Th17 cells that were sorted according to their differential expression of chemokine receptors and that were gated on IL-17 positive T cells (**c**) are shown. Data show the mean \pm SEM of four independent experiments (for the conditions +0 mM and +67.5 mM NaCl, n= 15).**

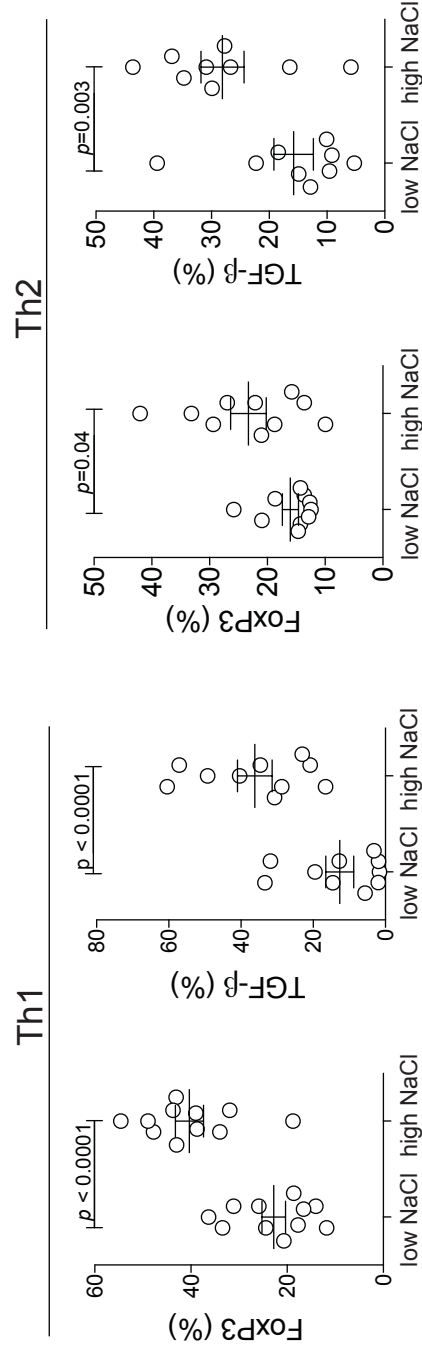


Figure S3. NaCl increases anti-inflammatory T cell effector functions across human T helper cell subsets. Th1 (CXCR3⁺CCR4⁻CCR6⁻) and Th2 cells (CXCR3⁻CCR4⁺CCR6⁻) were isolated *ex vivo* from human PBMC by flow cytometry and restimulated with CD3 and CD28 mAbs for 5 days (48 hours plate-bound) in low or high NaCl conditions before intracellular staining and FACS analysis after PMA and ionomycin restimulation. Each circle represents an individual blood donor. Student's two-tailed t test was used for comparisons between two groups.

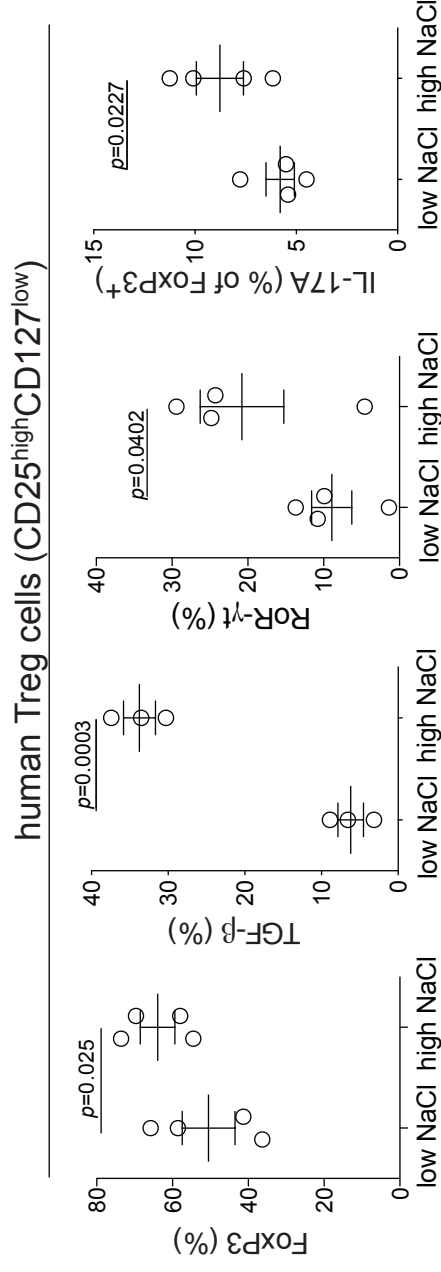


Figure S4. Treg cells acquire Th17 cell properties upon restimulation in high NaCl conditions despite maintaining an anti-inflammatory Treg signature. Human Treg cells were sorted as CD25^{hi}CD127^{low} T cells and stimulated for 5 days with CD3 and CD28 mAbs (48 hours plate-bound) in high or low NaCl conditions before intracellular staining and FACS analysis after PMA and ionomycin restimulation for 5 hours. Each circle represents an individual blood donor. Student's two-tailed t test was used for comparisons between two groups.

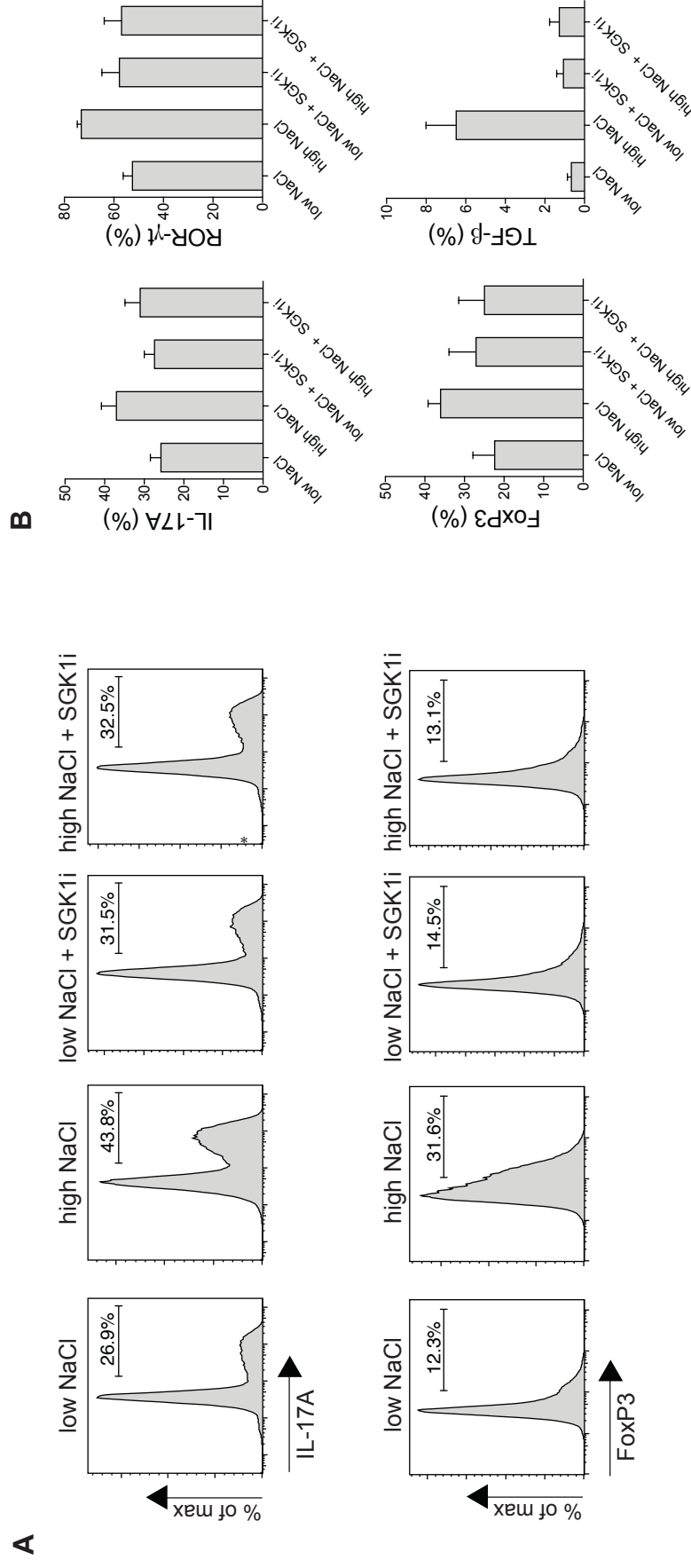


Figure S5. NaCl-mediated upregulation of IL-17 and FoxP3 expression in Th17 cells is abrogated by pharmacological inhibition of SGK1. Human Th17 cells (CXCR3⁻CCR4⁺CCR6⁺CD45RA⁻) were isolated *ex vivo* by flow cytometry and stimulated for 48 hours with CD3 and CD28 mAbs in low or high NaCl conditions with or without the presence of the SGK1 inhibitor GSK650394 (SGK1i) at a concentration of 1×10^{-6} M. After PMA and ionomycin restimulation on day 5, intracellular staining and FACS analysis were performed. **a**, One representative experiment is shown. **b**, Data show the mean \pm SEM of three to four independent blood donors ($p < 0.05$ for IL-17A, FoxP3, TGF- β ; n.s. for ROR- γ t, one-way ANOVA).

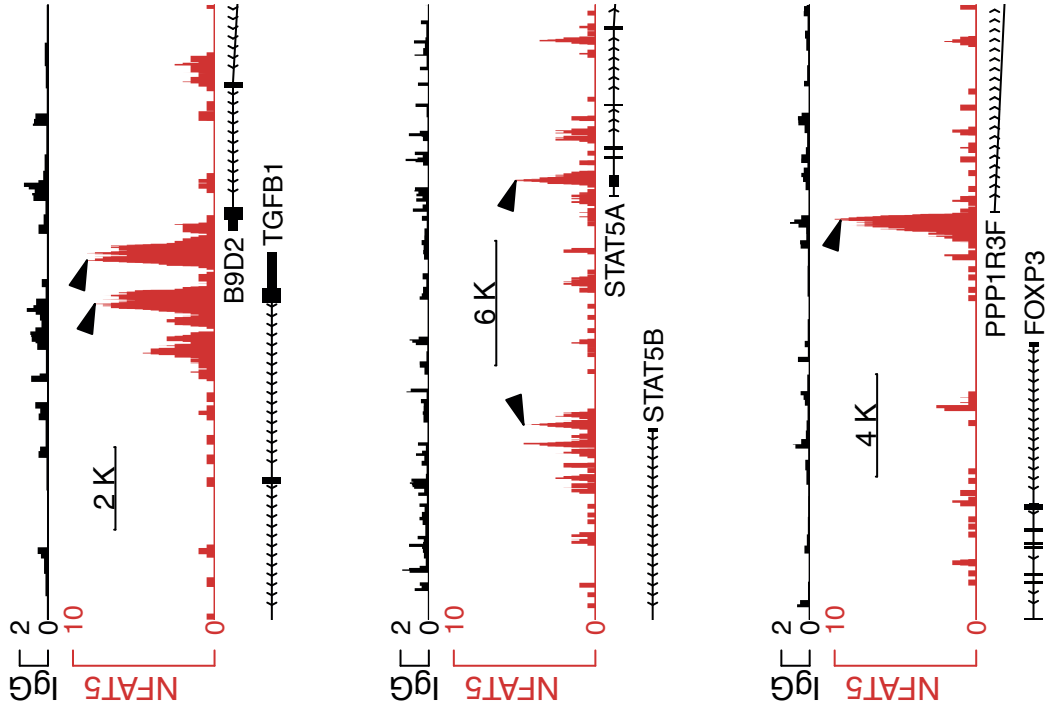


Figure S6. NFAT5 binds to the promoter regions of Treg-associated genes. ChIP-Seq analysis of NFAT5 binding sites in Treg-associated promoter regions. The arrowheads indicate the areas identified after peak calling, which show significant enrichment over the control experiment with IgG. The raw ChIP-Seq data for NFAT5 and IgG in the LoVo colon adenocarcinoma cell line were obtained from previously published work (GSE49402) (35). Reads were mapped to the human primary assembly genome hg38 (GRCh38.p12, Gencode release 30) with bowtie excluding multimapped reads and reporting only best alignments (62). Peaks were called using Homer v4.10 findPeaks tool in factor mode and the IgG experiment as the input control (63). Downstream analyses were performed with the statistical framework R. Genome browser tracks were produced with the help of the Bioconductor package trackViewer v1.18.3 (64).

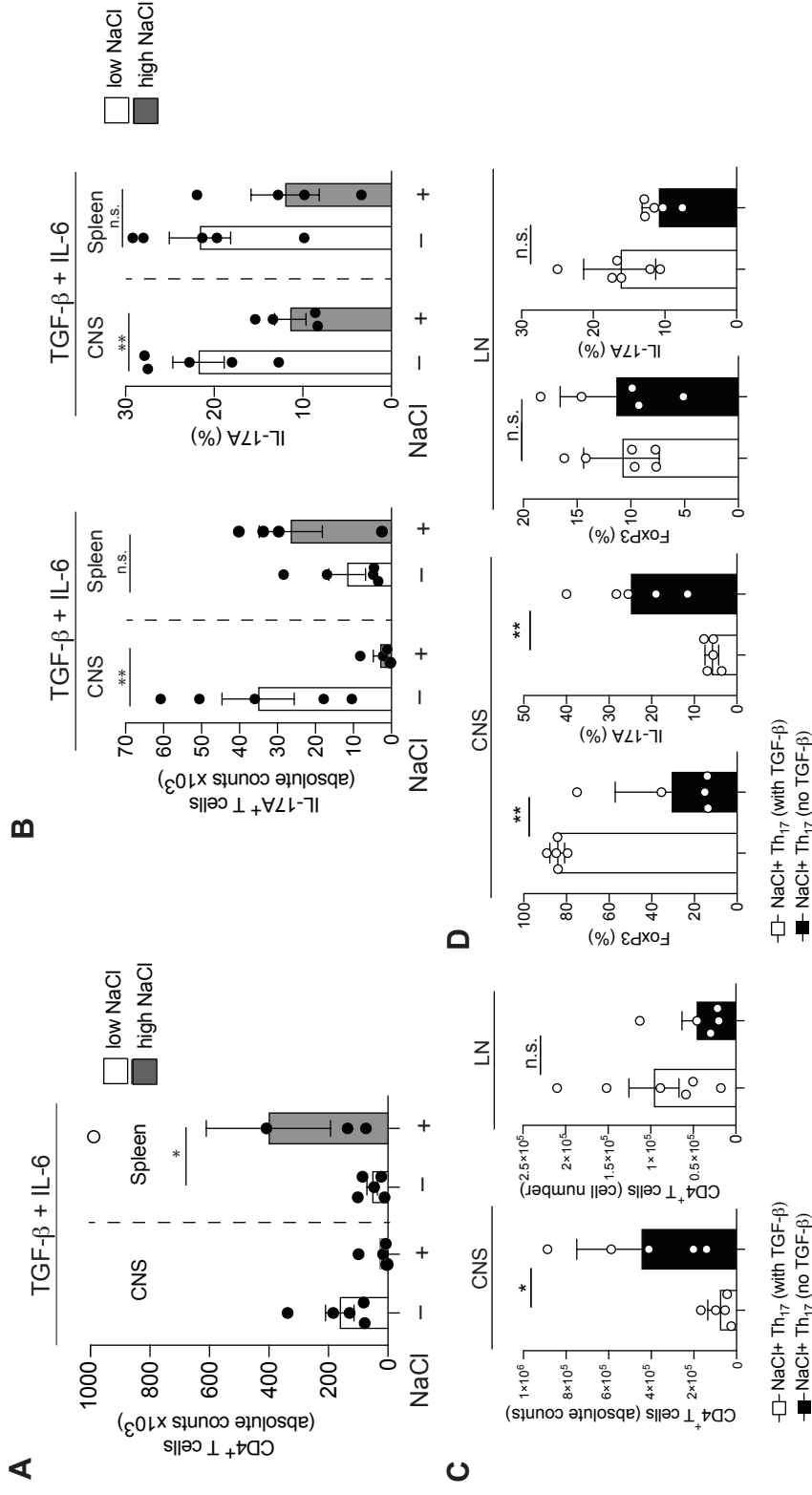


Figure S7. NaCl-induced enhancement or reduction in EAE disease scores correlates with the distribution of T cells in the CNS versus lymphoid organs and with their *ex vivo* phenotype. **a.** Absolute CD4⁺ T cell numbers in the CNS and spleen of mice at peak of disease after adoptive T cell transfer (mean \pm SEM, n=4-5, in high NaCl group one mouse died of disease before day 29). Two-way ANOVA with Sidak's multiple comparisons test (* p <0.05). **b.** The absolute numbers (left) and relative frequencies (right) of CD4⁺ T cells producing IL-17 were determined by intracellular cytokine staining and flow cytometry at the peak of disease after 5 hours of PMA (50ng/ml) and ionomycin (1 μ g/ml) restimulation in the presence of monensin (1 μ g/ml). **c.** *Ex vivo* analysis of absolute numbers of T cells in the CNS and draining lymph nodes (LN) isolated at the peak of disease after adoptive transfer of T cells that were stimulated with high NaCl in TGF- β , IL-6 and IL-1 β containing conditions (Th17 with TGF- β) versus with high NaCl in IL-6, IL-1 β and IL-23 (Th17 no TGF- β) containing conditions. **d.** Analysis of FoxP3 and IL-17 expression by flow cytometry after PMA and ionomycin restimulation of T cells isolated as in c). Data show mean \pm SEM. Student's two-tailed t test (n=5) was used for comparisons between two groups.

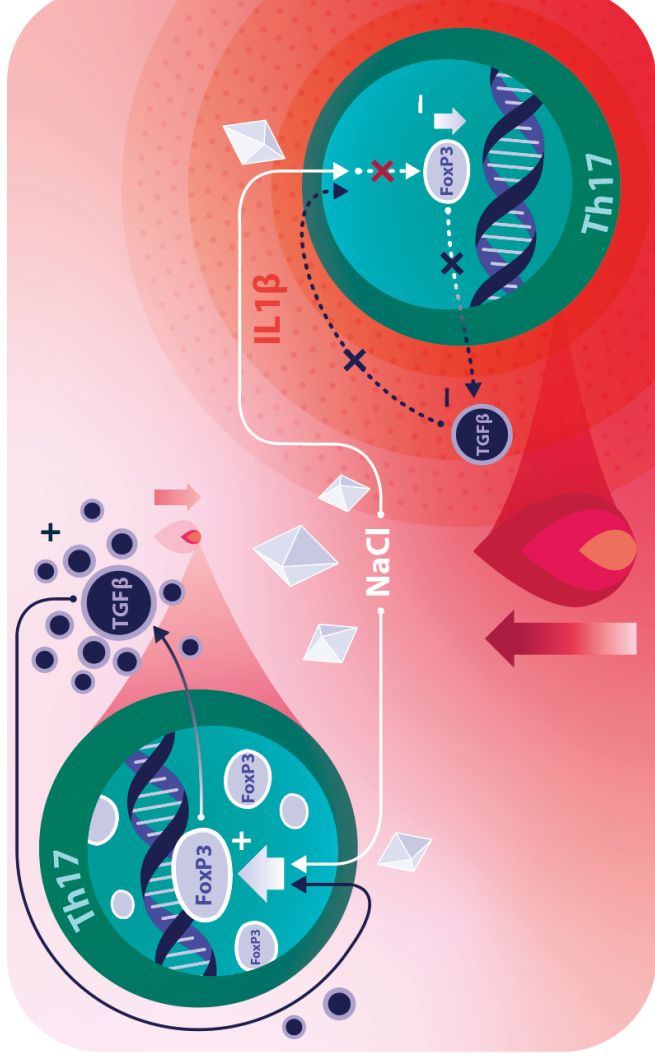


Figure S8. Model –pro- versus anti-inflammatory Th17 cell responses are promoted by NaCl through TGF-β regulation via the IL-1β switch. NaCl amplifies the anti-inflammatory Th17 cell fate in steady state conditions by enhancing the autocrine TGF-β loop, which promotes and stabilizes FoxP3 expression. A pro-inflammatory cytokine microenvironment including IL-1β abrogates the anti-inflammatory effect of NaCl by dominantly inhibiting FoxP3 expression and TGF-β production, thus promoting Th17 cell pathogenicity in settings of infection or inflammation. NaCl can therefore promote both the pro- and anti-inflammatory Th17 cell fate depending on cytokine switch factors in the microenvironment.

9.3 Anhang 3 – Shaping the diversity of Th2 cell responses in epithelial tissues and its potential for allergy treatment

Veröffentlichungsform:	Review-Artikel
Titel:	Shaping the diversity of Th2 cell responses in epithelial tissues and its potential for allergy treatment
Autoren:	Julia Matthias, Christina E. Zielinski
Name des Journals:	European Journal of Immunology
Erscheinungsdatum:	September 2019
Bandnummer:	49
Ausgabe:	9
DOI:	10.1002/eji.201848011
Pubmed ID:	31274191
Seitenangabe:	1321-1333 (13 Seiten)

**REVIEW****Shaping the diversity of Th2 cell responses in epithelial tissues and its potential for allergy treatment**Julia Matthias^{1,2} and Christina E. Zielinski^{1,2,3} ¹ Institute of Virology, Technical University of Munich, 81675 Munich, Germany² German Center for Infection Research (DZIF), Partner Site, Munich, Germany³ TranslaTUM, Technical University of Munich, 81675 Munich, Germany

Th2 cells have evolved to protect from large helminth infections and to exert tissue protective functions in response to nonmicrobial noxious stimuli. The initiation, maintenance, and execution of these functions depend on the integration of diverse polarizing cues by cellular sensors and molecular programs as well as the collaboration with cells that are coopted for signal exchange. The complexity of input signals and cellular collaboration generates tissue specific Th2 cell heterogeneity and specialization. In this review, we aim to discuss the advances and recent breakthroughs in our understanding of Th2 cell responses and highlight developmental and functional differences among T cells within the diversifying field of type 2 immunity. We will focus on factors provided by the tissue microenvironment and highlight factors with potential implications for the pathogenesis of allergic skin and lung diseases. Especially new insights into the role of immunometabolism, the microbiota and ionic signals enhance the complexity of Th2 cell regulation and warrant a critical evaluation. Finally, we will discuss how this ensemble of established knowledge and recent breakthroughs about Th2 immunobiology advance our understanding of the pathogenesis of allergic diseases and how this could be exploited for future immunotherapies.

Keywords: Th2 cells · allergy · sodium chloride · metabolism · immunotherapy**Introduction**

CD4⁺ Th cells choreograph adaptive immune responses by their secretion of cytokines, by their migration properties and their collaborative interaction with other cell types. Th cells can be categorized into distinct phenotypic and functional subsets [1]. Their responses are tailored to the specific elimination of diverse pathogens [2, 3]. The dualism of Th1 and Th2 cells was originally formulated 30 years ago but has now been replaced by a concept that embraces further Th cell heterogeneity and plasticity. Th1 and Th2 cells target intracellular pathogens and large nonreplicating pathogens such as helminths, respectively. To aid in this

heterogeneity Th17 cells are specialized in fungal clearance [3, 4], while Treg cells exert immunosuppressive functions [5]. Other Th cell subsets, such as Th9, Th22 and Th-GM-CSF cells, which exert effector functions in the skin or central nervous system, have more recently emerged on the scene and await further dissection of their functions and regulatory networks [6–9]. In addition, mixed Th cell differentiation states occur as a result of T cell plasticity [10].

Th2 cells, which are the focus of our review, are thought to have evolved in response to helminth parasites. Helminth infections represent a global health burden with more than a billion people infected [11]. Non-infectious settings are also associated with Th2 cell responses. Th2 cells have been shown to be beneficial for neonatal lung development, angiogenesis, and thermogenesis, which is supported by an overall Th2 cell bias in murine neonates [12–14]. Together, barrier protection and tissue

Correspondence: Dr. Christina E. Zielinski
e-mail: christina.zielinski@tum.de

remodeling seem to be common denominators of type 2 biased Th cell responses. These processes can be exploited by Th2 cells for anti-helminthic host defense while at the same time limiting collateral tissue destruction. However, if the regulation of Th2 effector functions leaves the boundaries of well-orchestrated checks and balances, overexuberant, or off-target effects of Th2 cell responses might result in allergies covering the range of atopic diseases from eczema to allergic asthma.

The incidence of allergic diseases has been increasing over the past 50 years as a result of genetic and, in particular, rapid environmental adaptation [15]. Th2 cells represent major determinants in the pathogenesis of allergic diseases. Although their regulation has been studied extensively for more than 30 years, new factors and tissue-specific cues have recently enhanced our understanding of Th2 mediated allergic pathologies. Recent technological advances in multidimensional analysis of T cells at the single cell level have further enabled investigations into the heterogeneity of Th2 cell responses [16–19]. Tissue specific adaptation responses have revealed the existence of resident versus recirculating Th2 cells with implications for asthma and possibly other allergic diseases [20]. This opens up new avenues for therapeutic strategies in the modulation of Th2 cells and thus the treatment of systemic as well as tissue restricted allergic diseases.

Recent scientific highlights that advanced our understanding of Th2 cells, in particular their induction, regulation, heterogeneity, and tissue specific adaptation will be critically discussed in this review with respect to their impact for allergic disease pathogenesis and their potential for therapeutic targeting.

Induction of Th2 cell responses

Despite extensive prior work on the molecular regulation of Th2 cells, the priming requirements are still ill defined. IL-4 is commonly accepted as the key Th2 cell polarizing cue for naïve Th cells [21]. So far, the cellular origin of IL-4 that induces Th2 cell priming remains unclear. Because Th2 cells also produce IL-4 as their signature cytokine, it has been suggested that Th2 differentiation could be a default process in the absence of skewing cytokine conditions and even driven by autocrine IL-2 in response to antigenic T cell activation [22]. Basophils, which can provide IL-4, have previously been suggested to initiate Th2 cell polarization in mice, an idea that has largely been abandoned due to poor MHC class II expression [23–25]. DCs are needed for optimal antigen presentation but are not thought to be producers of IL-4 [26, 27]. DCs have nevertheless been shown to be relevant for the induction of Th2 cell responses and to exert their polarizing property by costimuli such as OX40L and Notch ligand Jagged 1, instead. Notch signaling, which has multiple roles for T cell development and function, has also been demonstrated to promote Th2 cell polarization via induction of GATA-3 in a mouse model [28, 29]. The subset of cutaneous CD11b⁺CD301b⁺PDL2⁺ DCs preferentially express these molecules and, accordingly, has been demonstrated to be a potent Th2 inducer in mice [30, 31]. Still, new data question whether it is necessary for Jagged1 and Jagged2 to

be expressed by DCs for Th2 cell generation [32]. More recently, group 2 innate lymphoid cells (ILC2) cells have been identified as rich sources of IL-4. Leukotriene D4 was shown to stimulate IL-4 secretion by ILC2s, which was sufficient to potently drive Th2 differentiation *in vitro* in an IL-4-dependent manner [33]. Leukotrienes have also been shown to drive Th2 cell responses *in vivo* in response to specific allergens and in allergic skin inflammation [34, 35].

Signaling strength represents another determinant of Th cell polarization. While strong TCR mediated signals preferentially induce Th1 cell responses, weak stimulation via the TCR, and low antigen presentation favors a Th2 cell response in mice [36]. However, also very high doses of antigenic peptides have been reported to favor the Th2 cell differentiation program, contradicting previous reports [37, 38]. Although the initial source of the Th2 polarizing cytokine IL-4 still remains ill defined, other cytokines, which are mainly derived from epithelial cellular sources of barrier organs (e.g., thymic stromal lymphopoietin (TSLP), IL-25, and IL-33), have been shown to influence Th2 cell polarization as well as diversification [39]. TSLP is produced by epithelia that are exposed to different insults. Its receptor is expressed on naïve Th cells and can drive the differentiation of a distinct pro-inflammatory murine Th2 cell population characterized by IL-13 expression if systemic TSLP levels are sensed in lymphoid organs [40]. TSLP has also been shown to support Th2 cell responses via suppression of IL-12 secretion by DCs. This property can be co-opted by particular helminths rendering TSLP redundant for the development of Th2 cell responses [41].

Tissue-derived cytokines orchestrate Th2 cell diversification

Another “tissue checkpoint” of Th2 cell differentiation is IL-25 (also known as IL-17E). IL-25, which is mainly produced by tissue epithelial cells in mice [42], can promote Th2 cell differentiation by enhancing NFATc1 and JunB expression. This potentiates early IL-4 expression and the expansion and cytokine production of effector Th2 cells in mice and patients suffering from allergies [43, 44]. The alarmin IL-1 α , which can be released by keratinocytes [45], can also potentiate Th2 cell responses in an autocrine T cell dependent feedback loop [46, 47]. Likewise, IL-33, which represents another tissue derived source of a Th2 potentiating factor, has been described to enhance Th2 cell responses and tissue homeostasis [48–50]. Considering that expression of its receptor ST2 occurs independently of IL-4 but dependently on GATA-3, IL-33 signaling is thought to occur during later steps of murine Th2 cell differentiation, where it increases IL-5 and IL-13 production [51]. IL-33 polarization of antigen stimulated naïve murine and human T cells leads to IL-5 upregulation in the absence of IL-4. This is independent of GATA-3 and STAT6 but MAPK and NF- κ B dependent [52]. Clearance of gastrointestinal helminth infections requires IL-13 production by Th2 cells, which is also promoted by IL-33. Lack of EGFR, which mediates IL-13 expression by forming a signaling complex with its

ligand amphiregulin and the IL-33 receptor T1/ST2, abrogated IL-13 production, and thus host resistance in mice [53]. Although EGFR expression is TCR-activation dependent and thus antigen-specific, the induced ability to respond to IL-33 amplified the IL-13 response in an antigen-independent and thus innate-like manner [53]. Together, this demonstrates that these tissue-derived cytokines diversify the Th2 cell response in terms of differential cytokine expression profiles for further specialization purposes.

T cells co-opt NLRP3 for regulation of type 2 immune responses

NLRP3 is the most studied member of the family of nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors (NOD-receptors) and an integral component of the inflammasome complex, which cleaves IL-1 β to exert innate danger signaling and cell death by pyroptosis [54, 55]. Surprisingly, it was found in mice that NLRP3 regulated the Th2 program by directly binding to the *il4* promoter and by facilitating its transactivation via IRF4 [56, 57]. This was independent of its role in inflammasome activation. Accordingly, NLRP3 expression in Th cells was shown to be necessary for asthma induction in a mouse model [56]. Whether these recent insights into the transcriptional regulation of Th2 cells translate into novel therapeutic options remain to be seen, considering the recent identification of specific NLRP3 inhibitors in the context of inflammasome driven autoinflammatory diseases [58].

T follicular helper cells as drivers of type 2 immunity

T follicular helper cells (Tfh) drive humoral hallmarks of type 2 immunity [59, 60]. In addition, they have been identified as cellular collaborators for the induction of Th2 cells. IL-4 committed Tfh cells were shown to be precursors of allergen-specific Th2 cells [61, 62]. They are formed upon exposure to house dust mite allergen in a mouse model [61]. Due to their CXCR5 expression, Tfh cells are attracted to the germinal centers of lymph nodes where they support proliferation and differentiation of B-cells into plasma cells and where they provide critical help for antibody maturation [63, 64]. By their ability to produce substantial amounts of IL-4, Tfh cells reinforce a Th2 permissive cytokine environment and might therefore further encourage the induction of Th2 cells. During parasitic helminth infection, murine Tfh cells have been shown to maintain type 2 immunity through IL-4 secretion and to drive the primary IgE response [65]. The requirements for IL-4 production by Tfh cells themselves remain less well understood and differ from those of Th2 cells. Notch signaling has recently been shown to be required for Tfh cell generation but to be dispensable for Th2 cell differentiation in settings of helminth infections, highlighting one bifurcation checkpoint between these two cellular players of type 2 immunity [66].

Metabolic control of Th cell responses

Th cell responses are determined by their metabolic microenvironment. Th cells share a similar immunometabolism with respect to their engagement of the glycolytic machinery and mitochondria as compared to Treg cells or their naïve T cell precursors [67]. Still, insights are emerging that also delineate Th2 cells from other Th subsets. The kinase mTOR has a central role as a sensor of nutrients. It serves as a core of two signaling complexes, mTOR complex 1 (mTORc1) and mTOR complex 2 (mTORc2), which orchestrate several cellular processes including Th1 and Th2 cell polarization, respectively [68]. mTORc2 can contribute to Th2 cell polarization by inhibiting the negative feedback inhibitor SOCS5, which functions as a suppressor of STAT6 [69]. Loss of mTORc2 signaling results in a failure to generate Th2 cells but preserves the generation of murine Th1 and Th17 cells [70, 71]. mTORc1 signaling is, however, still required since it coordinates multiple metabolic programs in T cells to allow for antigen-triggered activation and exit from naïve T cell quiescence, a prerequisite for subsequent Th2 cell polarization [72]. The upstream signals from the tissue microenvironment favoring mTORc2 over mTORc1 signaling remain poorly defined. The mevalonate pathway, also called the HMG-CoA reductase pathway, that yields into the production of isoprenoids such as cholesterol, has also been shown to have a role on Th1 versus Th2 specification [73]. Statins, which block HMG-CoA within this pathway, have been shown to skew toward Th2, while suppressing Th1 cells. This had beneficial effects in the EAE mouse model of MS [73].

Heterogeneity of Th2 cell responses

The Th2 cell subset is characterized by the secretion of its effector cytokines IL-4, IL-5, IL-13, and IL-9 [74]. The differential integration of the polarizing cues outlined above shapes the overall function of the ensuing Th2 cells and thus creates Th2 cell heterogeneity and additional Th2 cell subpopulations with specialized functions in health and disease (Fig. 1). However, T cells that have received identical signals can also differ in effector cytokine production. This might be due to stochastic events of signal integration followed by uncoupling of concomitant cytokine production. This cytokine heterogeneity can also be due to spatial and temporal segregation of cytokine production. IL-4 and IL-13 have been demonstrated to be coregulated by identical transcriptional programs. Their genomic locus on chromosome 5 in humans and chromosome 11 in mice is under control of the locus control region (LCR) on the *Rad 50* gene, which is indispensable for their *in vivo* production [75]. Yet, both Th2 cell signature genes differ in their molecular regulation. Calcineurin dependence, for example, applies to IL-4 but not to IL-13 production in mice [76]. IL-13 positive T cells have been identified that lack IL-4 co-expression. They have been shown to derive from naïve T cell precursors independently of IL-4 producing cells in Th2 cell conditions supplemented with TSLP and constitute a separate pro-inflammatory Th2 cell

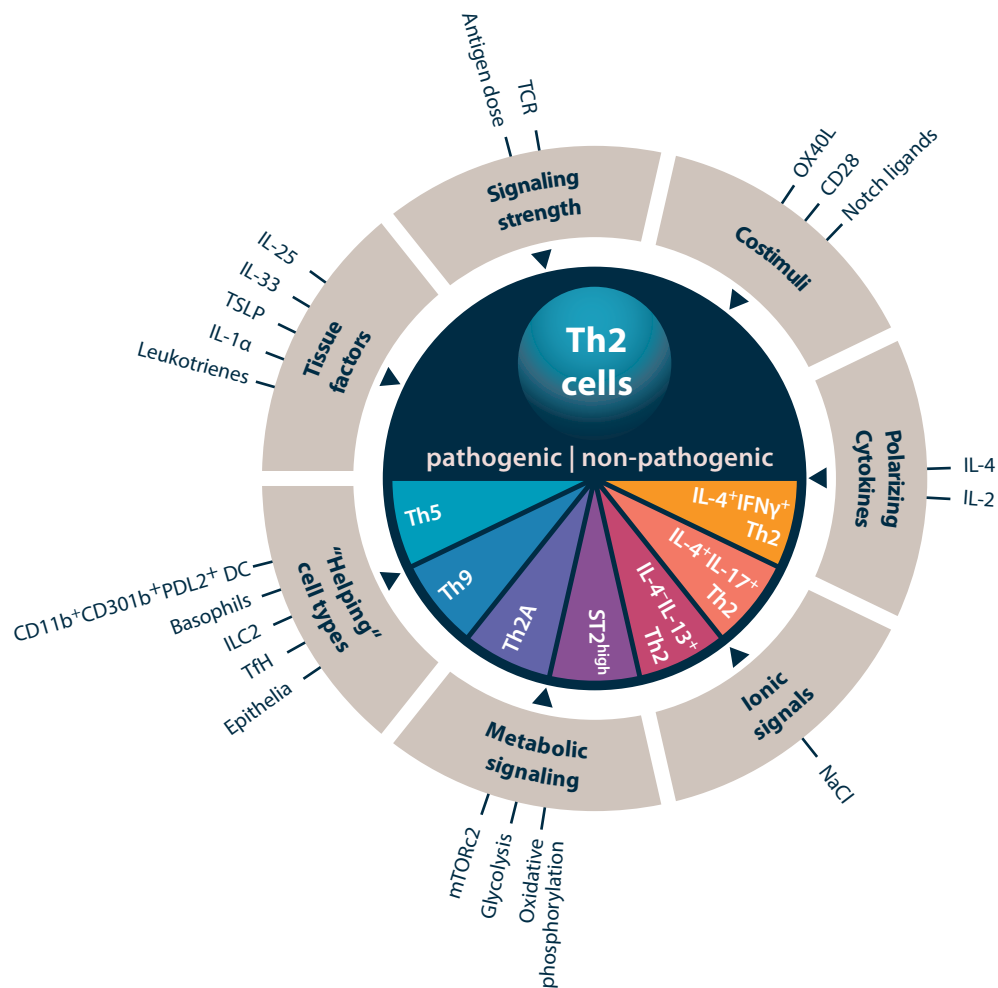


Figure 1. The heterogeneity of Th2 cells is shaped by different signals. Th2 cells can exert pro- or anti-inflammatory functions. They can be categorized into distinct subsets based on the differential expression of cytokines and surface markers (central circle and colored segments). The respective Th2 cell phenotypes and functions are induced by several intrinsic and extrinsic signals (grey areas).

subset in a mouse model [40, 77]. Therefore, Th2 functionalities might arise, which are biased toward one or another signature cytokine. This has further effects on downstream events since IL-4 but not IL-13 can act on naïve T cells for the purpose of Th2 cell polarization and proliferation. Several Th2 mediated allergic symptoms are also differentially regulated by either IL-13 or IL-4. Airway hypersensitivity and mucus metaplasia as encountered in asthma can be blocked by anti-IL-13, but not anti-IL-4 in a mouse model [78, 79].

Single-cell RNA sequencing has revealed production of the steroid pregnenolone by a subpopulation of Th2 cells in vitro and in a helminth infection model in vivo [17]. This steroid hormone producing Th2 cells have previously been masked by bulk transcriptomic analyses. IL-4 promoted, whereas IL-12 suppressed pregnenolone production, in line with its enrichment and absence in the Th2 and Th1 subset, respectively. Pregnenolone exerted immunosuppressive functions in mice, limited ongoing inflammation and could thus equip Th2 cells with a role in the restoration of immune homeostasis [17, 80]. In addition, this property was also

observed in tumor infiltrating Th cells, contributing to a tumor permissive microenvironment [80]. Together, these findings propose a largely overlooked T cell property beyond cytokine production, which is biased toward the Th2 cell subset and shaped in the immunosuppressive tissue microenvironment of chronic helminth infections and tumors.

IL-5 producing Th2-like cells

Similar to the segregation of the Th2 signature cytokines IL-4 and IL-13, observations about IL-5 production, which was independent of other Th2-associated cytokines, suggest the existence of a unique Th5 cell subset in mice [52, 81]. IL-5 producing T cells exacerbated allergen-induced airway inflammation in WT as well as IL-4 KO mice. This demonstrated that IL-5 can mediate allergic disease also independently of IL-4. IL-33 can also induce amphiregulin production by ST2^{hi} memory-type Th2 cells, which are distinct from IL-5 producing Th2 cells and also referred to as

pathogenic Th2 cells [82]. Amphiregulin exerts pathogenic roles in type 2 immunity and contributes to airway fibrosis in asthma through its ability to reprogram eosinophils toward an inflammatory state that includes increased production of osteopontin as has been shown in polyps from patients with eosinophilic chronic rhinosinusitis [82]. The IL-33-Th2-amphiregulin-osteopontin axis could therefore represent a potential target for therapeutically counteracting the fibrosis that is associated with chronic allergic disorders but also other fibrotic diseases such as liver fibrosis [83]. Amphiregulin production is, however, not only restricted to Th2 cells. Also, MUs provide a relevant source of Amphiregulin, by which they mediate tissue repair through its downstream TGF- β activation [83].

IL-9 producing Th2-like cells

IL-9 single-producing T cells have been identified and delineated as a unique Th9 cell subset. Their overall function mimics that of classic Th2 cells and explains their association with allergic skin and lung inflammation [84]. Th9 cells exert effector functions targeted at the elimination of helminths independently of IL-4 [7]. PU.1 was one of the first transcription factors to be associated with IL-9 induction in the Th9 cell subset in mice and humans [85, 86]. BATF and IRF-4 cooperatively contribute to Th9 cell development [87]. CNS-25 acts as an enhancer upstream of the *il9* gene binding most IL-9 promoting transcription factors, as could be shown in mice [88]. TL1A, which represents a member of the TNF superfamily, promotes Th9 differentiation, and function through induction of transcriptional BATF3 expression in mice and humans [89]. The transcription factor peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ) regulates IL-9 but not other Th2 signature cytokines and therefore defines a subpopulation of IL-9 expressing T cells within the human Th2 cell pool [90]. The subset status of Th9 cells still remains a matter of debate, since these putative Th9 cells display features overlapping with classic Th2 cell regulation. The Th9 phenotype is displayed, in particular, upon activation of Th2 cells, which is accompanied by transient downregulation of IL-4, IL-13, and IL-5 but upregulation of IL-9, thus reflecting a functional state of Th2 cells [90]. Further studies of their epigenetic identity as well as their ontogeny by lineage tracing could help to resolve this dispute.

Blurring borders among Th1, Th2, and Th17 traits

Th2 cells can simultaneously display the identities of distinct Th cell subsets. Subpopulations of circulating human T cells have been identified that express both IL-4 as well as the Th17 cell signature cytokine IL-17. These cells have been attributed specific roles in asthma [91]. IL-17 coproducing mouse Th2 cells caused increased recruitment of eosinophils, neutrophils, and lymphocytes into the airway as compared to classical Th2 or Th17 cell subsets [92]. They have also been shown to be resistant to immunosuppressive

treatment with dexamethasone in asthmatic patients in contrast to classic Th2 cells [93]. Defects in the key transcription factor FoxP3 in murine Treg cells result in the reduction of Treg cell regulatory functions and induce a Th2-like phenotype, highlighting the plasticity among T-cell lineages [94]. Despite extensive evidence for the reciprocal molecular regulation of Th1 and Th2 cells, hybrid IL-4 and IFN- γ positive T cells exist that resist reprogramming into either classic Th1 or Th2 cells in humans and mice [95, 96]. IL-4/IFN- γ coexpression can, however, also result from secondary restimulation of classic Th1 or Th2 cells in skewing microenvironments due to cell intrinsic plasticity [95]. Epigenetic remodeling plays a major role in T cell plasticity. The balance between the trimethylation and acetylation of H3K9 is regulated in a lineage-specific manner at key Th1 and Th2 gene promoters and correlates with silencing or activation, respectively [97]. Enhanced plasticity of both Th1 and Th2 cells was observed in mice when *Ezh2* function, which catalyzes histone methylation as a component of the Polycomb Repressive Complex 2, was lost, suggesting that it was relevant for subset stability [98].

Differential expression of surface markers delineates Th2 cell heterogeneity

Surface markers also provide phenotypic heterogeneity paired with functional specialization to T cells. The expression of chemokine receptors, which equip T cells with distinct migration properties, is coregulated with functional adaptation of T cells [99]. Several chemokine receptors have been associated with the Th2 cell subset including CCR3 [100], CCR4 [101], CCR8 [102], and the prostaglandin D2 receptor CRTH2 [103]. The differential expression of CXCR3, CD62L, or CCR8 identified Th2 cells with enhanced effector functions in a murine model of allergic inflammation. Terminally differentiated Th2 cells termed Th2A cells, which coexpress CD49d and CD161 but are negative for CD27, have recently been identified in humans. They are considered pro-allergic and strongly confined to atopic individuals [104]. Although CD161 has been considered a signature surface marker for human Th17 cells as well as their precursors [105, 106], its expression on Th2 cells has previously also been associated with IL-5-producing effector T cells in settings of eosinophilic gastrointestinal disease [107]. This heterogeneity within the Th2 cell subset translates into differential roles in immunopathology and might serve immune monitoring purposes. Murine Th2 cells with CXCR6⁺ST2⁺CD44⁺ surface expression, on the other hand, display specialized functions for the inhibition of helminth fecundity, which could serve biomarker purposes in settings of helminth infections [108].

Taken together, Th2 cell responses are heterogeneous as well as specialized and correlate with distinct functions, molecular regulation patterns as well as surface phenotypes. It should, however, not be overlooked that a division of labor takes place with other specialized cellular collaborators such as Tfh2 as well as ILC2 cells, which also share IL-4 production as an effector mechanism and

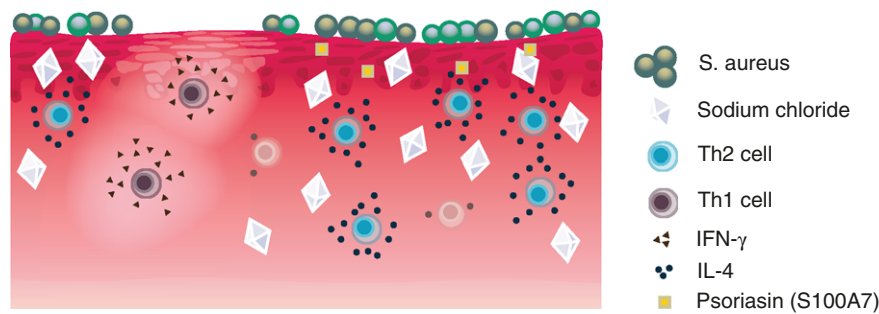


Figure 2. NaCl promotes Th2 cell responses and accumulates in the inflamed skin of atopic dermatitis patients. NaCl upregulates IL-4 and IL-13 expression by Th2 cells, which are crucial for the pathogenesis of atopic dermatitis. The unaffected skin of atopic dermatitis patients contains less NaCl. *S. aureus* is known to outgrow other bacteria in high NaCl concentrations, which could potentially explain the *S. aureus* dominated dysbiosis, a characteristic of atopic dermatitis. How NaCl accumulates in the inflamed skin remains unknown.

result in downstream events for the execution of parasitic expulsion or allergic inflammation [109].

Regulation of Th2 cell responses in peripheral tissues

Tissue specific T cells have previously been considered to be terminally differentiated effector T cells with the ability to recirculate and to home to peripheral tissues. The classic concept of T cell compartmentalization comprising naïve, central, and effector memory T cells has now been complemented by the addition of tissue resident memory T cells (T_{RM}). They express markers of residency such as CD69 and CD103 and persist long-term in their respective tissues where they contribute to fast first-line barrier defense, tissue homeostasis, and possibly other functions that remain to be defined [1]. Most insights into T_{RM} cells have been generated for the CD8⁺ T cell compartment, but more knowledge into polarized Th cell residency programs is emerging. In a mouse model of house dust mite induced airway inflammation tissue, resident Th2 memory cells were identified and shown to exert pathogenic functions by their secretion of type 2 cytokines independently of recirculating T cells [110]. IL-2 signaling was required for instructing the program of Th2 cell residency and pathogenicity [110]. The maintenance of lung resident Th2 cells is antigen independent but contingent on IL-7 secreting lymphatic endothelial cells that are localized within bronchus-associated lymphoid tissues, as has been shown in mice [111]. Clinical observations support the role of resident Th2 cells in conferring allergic diseases. Lung transplants from mildly asthmatic donor patients transferred clinical airway disease to non-asthmatic transplant recipients. Reciprocally, non-asthmatic lungs conferred disease amelioration to asthmatic patients [112].

The role of ionic checkpoints for Th2 cell polarization

Availability of tissue-specific factors might further shape the heterogeneity and distribution of distinct T cell subsets. Recently, a role for sodium chloride (NaCl) for cytokine independent polarization of human naïve T cells into Th2 cells was identified [113]

(Fig. 2). NaCl has been reported before to have immunomodulatory functions in innate and adaptive immunity [114]. It alters the functionality of immune cells in salt-enriched inflamed tissues and shifts the composition of the intestinal microbiota [114]. In the skin, NaCl has previously been shown to exert immunoregulatory functions on rat macrophages with an impact on blood pressure control [115, 116]. Interestingly, NaCl concentrations were further elevated in skin lesions of atopic dermatitis patients in accordance with the Th2-associated pathogenesis of this disease [113, 117]. It is currently unclear, whether this lesional enrichment of cutaneous sodium is associated with dietary salt intake. Normal sodium concentrations in unaffected skin of atopic dermatitis patients rather suggest localized events as a mechanism of lesional sodium deposition [113]. NaCl exerts Th2 cell polarization and Th2 cell expansion through upregulation of serum- and glucocorticoid-regulated kinase 1 (SGK1), which represents a downstream target of mTOR Complex 2 (mTORC2), as T cell specific deletion of the mTORC2 specific adaptor Rictor abrogates the activation of SGK1 [91]. This links environmental NaCl sensing with metabolic Th2 programming. SGK1 and NFAT5 were shown to upregulate GATA-3 as well as phosphorylation of STAT6 in hypersaline conditions [113]. NaCl can also skew Th1 and Th17 cells to acquire Th2 cell properties on the memory T cell level, thus exploiting the plasticity of non-Th2 cells in favor of type 2 cell responses. These effects on T cells are contingent on the acute presence of elevated concentrations of NaCl and cannot be maintained upon NaCl withdrawal [113]. This is in accordance with a lack of epigenetic imprinting of a NaCl induced Th2 signature in contrast to its effect on epigenetic marks in macrophages [118]. These recent insights revealed NaCl as a so far rather overlooked “ionic checkpoint” for Th2 cell responses in addition to other critical players. It remains to be shown whether therapeutic targeting of NaCl sensing and signaling will have an impact on allergies and other type 2 mediated diseases.

NaCl has recently also been suggested to promote autoimmunity via Th17 cell polarization in mice [119, 120]. It acted in concert with polarizing cytokines to increase IL-17 expression, whereas type 2 responses were induced independently of polarizing cytokines by default [119, 120]. This suggests that the cytokine microenvironment plays a critical switch factor role for the immunomodulatory functions of NaCl. This might allow NaCl to act as a tissue rheostat that can promote different T cell

responses depending on cytokine co-factors in the microenvironment. NaCl also has an impact on Treg cells, as it abrogated their suppressive function [121]. A more recent report, on the other hand, demonstrates that peripherally induced iTreg are completely stable and functional in high salt conditions [122]. It will be interesting to systematically establish the differential distribution of NaCl in human tissues to assess the physiological relevance of NaCl as a so far rather overlooked factor of the tissue microenvironment, considering its impact on T cell responses. In addition, it will have to be assessed whether alterations in tissue NaCl concentrations correlate with T cell mediated human disease conditions and whether this could be modulated by diet. The observation that atopic dermatitis is associated with strongly increased skin sodium deposition might be just the beginning [113].

The role of glucose for Th2 cell regulation

Glucose is a small molecule that easily penetrates into tissues. As early as 1932, skin glucose had been found to correlate with blood glucose levels in diabetic patients [123]. Obesity, which is a high-risk factor for the development of the hyperglycemia-associated metabolic syndrome, is associated with the rising prevalence of allergic diseases [124]. Recently, varying concentrations of glucose have been found in the sweat of atopic dermatitis patients [125]. Thus, glucose seems to be a variable microenvironmental tissue factor with a potential impact on Th2 immunity. Th2 cells have the highest rate of glycolysis among the Th cell subsets, as has been shown in mice [126, 127]. GLUT1 deficient murine T cells display decreased effector cell expansion and reduced Th2 cell skewing in the presence of IL-4 [126, 128]. Loss of the Raptor-mTORC1 signaling axis, which is required to regulate TCR-induced glycolysis, as well as direct inhibition of glycolysis, markedly decrease IL-4 production in mice under Th2 polarizing conditions [72]. Furthermore, Raptor deficiency causes diminished IL-4Ra expression and STAT6 phosphorylation. Hyperglycemia has been found to promote the activation of human mast cells—a major driver and executor of allergic immune reactions [129]. Thus, besides a direct impact of glucose on Th2 cells, high-glucose stimulated Th2 cells might further amplify allergic immune reactions by attracting mast cells into a glucose rich microenvironment [130].

The role of temperature for Th2 immunity

Seasonal temperature drops coincide with a transient intensification of treatment for most asthma and atopic dermatitis patients [131, 132]. Inhalation of cold air has been found to increase immune cell infiltration in the airways of mice [133]. Thermoneutral housing with inhalation air temperatures of 30°C as compared to standard 20°C has been found to lower IL-4 and IL-13 concentrations in bronchial alveolar fluid of mice [134], suggesting promotion of Th2 immune responses upon cold air inhalation. The cold-gated ion channel transient receptor potential cation

channel subfamily M member 8 (TRPM8) increases the expression of the Th2 cytokines IL-4 and IL-13 in human cold-stressed airway epithelial cells [135]. Furthermore, TRPM8-stimulation has been shown to decrease the signature cytokine IFN- γ after cold air inhalation in asthmatic mice, which is reverted upon TRPM8 knockdown [133]. TRPM8 expression can also be found in the epidermis of human skin [136]. As the skin is subject to strong temperature changes, it can be speculated that similar pathways apply to the characteristic exacerbation of atopic skin lesions in low temperatures. On the other hand, TRPM8 stimulation was found to relieve chronic itch in mice, which is a major symptom of AD that can amplify the disease course due to scratching behavior [136]. Thus, cold-stress impacts Th2 immunity on multiple levels with partly opposing effects, which still require further clarification. Reciprocally, cold-stress is also affected by an IL-4 signature as exemplified by alternative macrophage activation through IL-4, which orchestrated thermogenic gene expression and energy expenditure in low temperatures in mice [137].

Th2 cells and the microbiota

Barrier tissues such as the skin or gut are constantly exposed to environmental stressors and densely colonized by the commensal microbiota [138]. The healthy non-inflamed human skin harbors around one million T cells/cm², most of them being of a resident phenotype [1, 139].

Accumulating evidence suggests that those tissue resident T cells display antigen specificities against the commensal microbiota and functions tailored for the tissue-microbial dialogue [140]. *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) was shown to promote the accumulation of murine ROR- γ ⁺ CD8 and CD4 T cells that acquired GATA-3 coexpression within the tissue as a result of barrier disruption and exposure to the alarmin IL-18 [141]. This licensed *S. epidermidis* reactive T cells to exert type 2 responses and demonstrated plasticity in the context of perturbed tissue integrity. T cell derived IL-13 production promoted wound repair, thus linking antimicrobial reactivity to tissue homeostasis [141]. The gut microbiota has been shown to induce type 3 ROR- γ ⁺ Treg cells and Th17 cells that counterbalance Th2 cell responses. Dysbiosis could therefore promote exacerbated type 2 immunity and allergy [142].

Targeting Th2 cell responses therapeutically in the tissues

Previous and ongoing strategies to suppress Th2 mediated atopic inflammation comprise unspecific paralysis of the immune system by, for example, corticosteroids or T cell targeted approaches by cyclosporin, a calcineurin inhibitor that prevents IL-2 production via NFAT [117]. These systemic drugs display plenty off-target effects and toxicities. Insights into the mechanistic pathways and the cellular crosstalk within the tissue microenvironment have recently translated into more targeted approaches, thereby

mitigating the diverse origin of Th2 cytokines, such as from steroid-resistant IL13⁺ ILC2 cells, where systemic steroid therapy fails to inhibit cytokine production in asthma patients [143]. In particular, the Th2 effector cytokines IL-4 and IL-13 are currently successfully targeted by inhibition of their common receptor IL-4R. Dupilumab, which blocks IL-4R, is the first biological drug approved for atopic dermatitis. It showed good efficacy in randomized, placebo controlled phase 3 clinical trials (SOLO 1, SOLO 2) [144, 145]. Also single cytokine blockade of IL-13 resulted in improvement of atopic dermatitis [146, 147]. Surprisingly, IL-13 blockade did not prove to be effective for the treatment of asthma in two large randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 clinical trials (STRATOS 1, STRATOS 2) despite its anticipated effects on reducing eosinophilic inflammation, IgE production, macrophage and DC activation as well as airway smooth muscle remodeling. Failure of this treatment modality could potentially be due to lack of action in relevant tissue compartments or redundancy of IL-13-driven responses. In a macaque model of chronic asthma, preliminary efficacy could be achieved using inhalation of IL-13 mAb Fab antibody fragments via a vibrating membrane nebulizer [148]. This implies that immune pathway educated therapeutic strategies should address the compartmentalization of tissue specific immune responses. IL-31 represents another cytokine and a mediator of itch that is preferentially associated with Th2 cell responses in mice [149]. Nemolizumab, an anti-IL-31 receptor mAb, proved efficacious in pruritus control in a double-blind, placebo controlled, randomized clinical trial for atopic dermatitis [150]. The JAK and STAT pathway (JAK-STAT) transmits inflammatory signals to the cell nucleus. In experimental models, JAK inhibitors resulted in decreased IL-4 and IL-13 signaling accompanied by improved skin barrier in atopic dermatitis-like skin disease [151]. Oral and topical JAK inhibitors (tofacitinib) also proved efficacious in patients with moderate-to-severe atopic dermatitis that were resistant to conventional treatments [152]. Although JAK inhibitors can also be applied topically to the inflamed skin, more investigations are needed before more widespread use can be advocated [152, 153].

Chemokine receptors could represent another mode of Th2 cell targeting, since Th2 cell responses are associated with characteristic chemokine receptor expression profiles. CCR4 is highly enriched in Th2 cells and might thus serve as another target according to murine studies, in which CCR4 antagonists improved atopic dermatitis-like skin lesions [154].

Tissue-specific dysbiosis is inherent to several chronic inflammatory diseases of the skin, lung, or gut. Atopic dermatitis is characterized by a dysbiosis dominated by *S. aureus* [117]. It has been shown to improve clinically upon “commensal skin transplants” in atopic dermatitis patients, which exerted antimicrobial activities against *S. aureus* [155]. The underlying reason for the dysbiosis remains enigmatic until now. Interestingly, NaCl, which is highly enriched in the affected skin, favors the preferential outgrowth of *S. aureus* at the expense of other species of the commensal microbiota [156] and could therefore, in conjunction with its direct Th2 promoting effects, provide an important common determinant of atopic disease pathogenesis [113]. However, other factors

likely contribute to the dysbiosis. Psoriasin, an antimicrobial peptide, was found to be highly elevated in the inflamed atopic skin. While it suppresses *E. coli* colonization, its presence allows for *S. aureus* persistence, thus contributing to the pathognomonic dysbiosis [157].

Conclusions

The past few years have witnessed an increase of distinct Th cell subsets with specialized functions in host defense and tissue homeostasis. At the same time, it has been acknowledged that the flexibility and plasticity of individual T cell subsets allows for a broad repertoire of effector functions that are instructed by diverse tissue-specific cues. Th2 cells can therefore assume diverse functions depending on their differential expression of prototypic type 2 cytokines, coexpression of signature cytokines of alternative T cell subsets, distinct migration properties, residence versus recirculation programs, and body location. They even display novel features such as steroid production that could be unmasked thanks to enabling technologies that embrace the high-dimensionality of T cells at the single-cell level [17]. Further phenotypes, functions and regulatory checkpoints that characterize type 2 responses in health and disease will probably emerge soon. Although we have focused on Th2 cells, it should not be overlooked that other cellular subsets share similar effector functions such as IL-4 production by Tfh and ILC2 cells despite differential molecular mechanisms. These insights now need to be integrated into therapeutic strategies that are tailored for homeostatic versus pathogenic Th2 cell functions, as well as their tissue compartmentalization and collaboration with other type 2 associated cells.

Acknowledgements: This work was funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 1335, P18 and SFB1054, B10, to C.E.Z.) as well as by the German Center for Infection Research DZIF (to C.E.Z.). The authors thank Daniela Leitner for the graphical illustration.

Author contributions: J.M. and C.E.Z. jointly wrote the manuscript.

Conflict of interest: The authors do not declare any commercial or financial conflict of interest.

References

- 1 Zielinski, C. E., Human T cell immune surveillance: Phenotypic, functional and migratory heterogeneity for tailored immune responses. *Immunol. Lett.* 2017. 190: 125–129.

- 2 Zielinski, C. E., Microbe driven T-helper cell differentiation: lessons from *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*. *Exp. Dermatol.* 2014. 23: 795–798.
- 3 Zielinski, C. E., Corti, D., Mele, F., Pinto, D., Lanzavecchia, A. and Sallusto, F., Dissecting the human immunologic memory for pathogens. *Immunol. Rev.* 2011. 240: 40–51.
- 4 Zielinski, C. E., Mele, F., Aschenbrenner, D., Jarrossay, D., Ronchi, F., Gattorno, M., Monticelli, S. et al., Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN-gamma or IL-10 and are regulated by IL-1beta. *Nature* 2012. 484: 514–518.
- 5 Pesenacker, A. M., Broady, R. and Levings, M. K., Control of tissue-localized immune responses by human regulatory T cells. *Eur. J. Immunol.* 2015. 45: 333–343.
- 6 Noster, R., Riedel, R., Mashreghi, M. F., Radbruch, H., Harms, L., Haftmann, C., Chang, H. D. et al., IL-17 and GM-CSF expression are antagonistically regulated by human T helper cells. *Sci. Transl. Med.* 2014. 6: 241ra80.
- 7 Veldhoen, M., Uyttenhove, C., van Snick, J., Helmby, H., Westendorf, A., Buer, J., Martin, B. et al., Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat. Immunol.* 2008. 9: 1341–1346.
- 8 Duhon, T., Geiger, R., Jarrossay, D., Lanzavecchia, A. and Sallusto, F., Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat. Immunol.* 2009. 10: 857–863.
- 9 Trifari, S., Kaplan, C. D., Tran, E. H., Crellin, N. K. and Spits, H., Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. *Nat Immunol.* 2009. 10: 864–871.
- 10 O'Shea, J. J. and Paul, W. E., Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science* 2010. 327: 1098–1102.
- 11 Hotez, P. J., Brindley, P. J., Bethony, J. M., King, C. H., Pearce, E. J. and Jacobson, J., Helminth infections: the great neglected tropical diseases. *J. Clin. Invest.* 2008. 118: 1311–1321.
- 12 Saluzzo, S., Gorki, A. D., Rana, B. M. J., Martins, R., Scanlon, S., Starkl, P., Lakovits, K. et al., First-breath-induced type 2 pathways shape the lung immune environment. *Cell Rep.* 2017. 18: 1893–1905.
- 13 Odegaard, J. I., Lee, M. W., Sogawa, Y., Bertholet, A. M., Locksley, R. M., Weinberg, D. E., Kirichok, Y. et al., Perinatal licensing of thermogenesis by IL-33 and ST2. *Cell* 2016. 166: 841–854.
- 14 Kwee, B. J., Budina, E., Najibi, A. J. and Mooney, D. J., CD4 T-cells regulate angiogenesis and myogenesis. *Biomaterials* 2018. 178: 109–121.
- 15 Bach, J. F., The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N. Engl. J. Med.* 2002. 347: 911–920.
- 16 Chiang, D., Chen, X., Jones, S. M., Wood, R. A., Sicherer, S. H., Burks, A. W., Leung, D. Y. M. et al., Single-cell profiling of peanut-responsive T cells in patients with peanut allergy reveals heterogeneous effector TH2 subsets. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2018. 141: 2107–2120.
- 17 Mahata, B., Zhang, X., Kolodziejczyk, A. A., Proserpio, V., Haim-Vilmovsky, L., Taylor, A. E., Hebenstreit, D. et al., Single-cell RNA sequencing reveals T helper cells synthesizing steroids de novo to contribute to immune homeostasis. *Cell Rep.* 2014. 7: 1130–1142.
- 18 Zielinski, C., Theis, F. and Palit, S., Meeting the challenges of high-dimensional data analysis in immunology. *bioRxiv* 2018: 473215.
- 19 Liu, Y., Chen, Z., Xu, K., Wang, Z., Wu, C., Sun, Z., Ji, N. et al., Next generation sequencing for miRNA profile of spleen CD4(+) T cells in the murine model of acute asthma. *Epigenomics* 2018. 10: 1071–1083.
- 20 von Moltke, J. and Pepper, M., Sentinels of the type 2 immune response. *Trends Immunol.* 2018. 39: 99–111.
- 21 Paul, W. E. and Zhu, J., How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified? *Nat. Rev. Immunol.* 2010. 10: 225–235.
- 22 Cote-Sierra, J., Foucras, G., Guo, L., Chiodetti, L., Young, H. A., Hu-Li, J., Zhu, J. et al., Interleukin 2 plays a central role in Th2 differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004. 101: 3880–3885.
- 23 Sokol, C. L., Chu, N. Q., Yu, S., Nish, S. A., Laufer, T. M. and Medzhitov, R., Basophils function as antigen-presenting cells for an allergen-induced T helper type 2 response. *Nat. Immunol.* 2009. 10: 713–720.
- 24 Perrigoue, J. G., Saenz, S. A., Siracusa, M. C., Allenspach, E. J., Taylor, B. C., Giacomin, P. R., Nair, M. G. et al., MHC class II-dependent basophil-CD4+ T cell interactions promote T(H)2 cytokine-dependent immunity. *Nat. Immunol.* 2009. 10: 697–705.
- 25 Hammad, H., Plantinga, M., Deswarte, K., Pouliot, P., Willart, M. A., Kool, M., Muskens, F. et al., Inflammatory dendritic cells—not basophils—are necessary and sufficient for induction of Th2 immunity to inhaled house dust mite allergen. *J. Exp. Med.* 2010. 207: 2097–2111.
- 26 Phythian-Adams, A. T., Cook, P. C., Lundie, R. J., Jones, L. H., Smith, K. A., Barr, T. A., Hochweller, K. et al., CD11c depletion severely disrupts Th2 induction and development in vivo. *J. Exp. Med.* 2010. 207: 2089–2096.
- 27 van Rijt, L. S., Jung, S., Kleinjan, A., Vos, N., Willart, M., Duez, C., Hoogsteden, H. C. et al., In vivo depletion of lung CD11c+ dendritic cells during allergen challenge abrogates the characteristic features of asthma. *J. Exp. Med.* 2005. 201: 981–991.
- 28 Amsen, D., Antov, A., Jankovic, D., Sher, A., Radtke, F., Souabni, A., Busslinger, M. et al., Direct regulation of Gata3 expression determines the T helper differentiation potential of Notch. *Immunity* 2007. 27: 89–99.
- 29 Fang, T. C., Yashiro-Ohtani, Y., Del Bianco, C., Knoblock, D. M., Blacklow, S. C. and Pear, W. S., Notch directly regulates Gata3 expression during T helper 2 cell differentiation. *Immunity* 2007. 27: 100–110.
- 30 Kumamoto, Y., Linehan, M., Weinstein, J. S., Laidlaw, B. J., Craft, J. E. and Iwasaki, A., CD301b(+) dermal dendritic cells drive T helper 2 cell-mediated immunity. *Immunity* 2013. 39: 733–743.
- 31 Connor, L. M., Tang, S. C., Camberis, M., Le Gros, G. and Ronchese, F., Helminth-conditioned dendritic cells prime CD4+ T cells to IL-4 production in vivo. *J. Immunol.* 2014. 193: 2709–2717.
- 32 Tindemans, I., Peeters, M. J. W. and Hendriks, R. W., Notch signaling in T helper cell subsets: instructor or unbiased amplifier? *Front Immunol.* 2017. 8: 419.
- 33 Pelly, V. S., Kannan, Y., Coomes, S. M., Entwistle, L. J., Ruckerl, D., Seddon, B., MacDonald, A. S. et al., IL-4-producing ILC2s are required for the differentiation of TH2 cells following *Heligmosomoides polygyrus* infection. *Mucosal Immunol.* 2016. 9: 1407–1417.
- 34 Oyoshi, M. K., He, R., Li, Y., Mondal, S., Yoon, J., Afshar, R., Chen, M. et al., Leukotriene B4-driven neutrophil recruitment to the skin is essential for allergic skin inflammation. *Immunity* 2012. 37: 747–758.
- 35 Barrett, N. A., Rahman, O. M., Fernandez, J. M., Parsons, M. W., Xing, W., Austen, K. F. and Kanaoka, Y., Dectin-2 mediates Th2 immunity through the generation of cysteinyl leukotrienes. *J. Exp. Med.* 2011. 208: 593–604.
- 36 Tao, X., Constant, S., Jorritsma, P. and Bottomly, K., Strength of TCR signal determines the costimulatory requirements for Th1 and Th2 CD4+ T cell differentiation. *J. Immunol.* 1997. 159: 5956–5963.
- 37 Hosken, N. A., Shibuya, K., Heath, A. W., Murphy, K. M. and O'Garra, A., The effect of antigen dose on CD4+ T helper cell phenotype development in a T cell receptor-alpha beta-transgenic model. *J. Exp. Med.* 1995. 182: 1579–1584.
- 38 Tubo, N. J. and Jenkins, M. K., TCR signal quantity and quality in CD4(+) T cell differentiation. *Trends Immunol.* 2014. 35: 591–596.

- 39 Divekar, R. and Kita, H., Recent advances in epithelium-derived cytokines (IL-33, IL-25, and thymic stromal lymphopoietin) and allergic inflammation. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2015. 15: 98–103.
- 40 Ochiai, S., Jagot, F., Kyle, R. L., Hyde, E., White, R. F., Prout, M., Schmidt, A. J. et al., Thymic stromal lymphopoietin drives the development of IL-13(+) Th2 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2018. 115: 1033–1038.
- 41 Massacand, J. C., Stettler, R. C., Meier, R., Humphreys, N. E., Grecnis, R. K., Marsland, B. J. and Harris, N. L., Helminth products bypass the need for TSLP in Th2 immune responses by directly modulating dendritic cell function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009. 106: 13968–13973.
- 42 von Moltke, J., Ji, M., Liang, H. E. and Locksley, R. M., Tuft-cell-derived IL-25 regulates an intestinal ILC2-epithelial response circuit. *Nature* 2016. 529: 221–225.
- 43 Angkasekwina, P., Park, H., Wang, Y. H., Wang, Y. H., Chang, S. H., Corry, D. B., Liu, Y. J. et al., Interleukin 25 promotes the initiation of proallergic type 2 responses. *J. Exp. Med.* 2007. 204: 1509–1517.
- 44 Wang, Y. H., Angkasekwina, P., Lu, N., Voo, K. S., Arima, K., Hanabuchi, S., Hippe, A. et al., IL-25 augments type 2 immune responses by enhancing the expansion and functions of TSLP-DC-activated Th2 memory cells. *J. Exp. Med.* 2007. 204: 1837–1847.
- 45 Dinarello, C. A., Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu. Rev. Immunol.* 2009. 27: 519–550.
- 46 Huber, M., Beuscher, H. U., Rohwer, P., Kurrle, R., Rollinghoff, M. and Lohoff, M., Costimulation via TCR and IL-1 receptor reveals a novel IL-1 α -mediated autocrine pathway of Th2 cell proliferation. *J. Immunol.* 1998. 160: 4242–4247.
- 47 Huber, M., Rutherford, A., Meister, W., Weiss, A., Rollinghoff, M. and Lohoff, M., TCR- and IL-1-mediated co-stimulation reveals an IL-4-independent way of Th2 cell proliferation. *Int. Immunol.* 1996. 8: 1257–1263.
- 48 Schmitz, J., Owyang, A., Oldham, E., Song, Y., Murphy, E., McClanahan, T. K., Zurawski, G. et al., IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* 2005. 23: 479–490.
- 49 Liew, F. Y., Girard, J. P. and Turnquist, H. R., Interleukin-33 in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2016. 16: 676–689.
- 50 Pascual-Reguant, A., Bayat Sarmadi, J., Baumann, C., Noster, R., Cirera-Salinas, D., Curato, C., Pelczar, P. et al., TH17 cells express ST2 and are controlled by the alarmin IL-33 in the small intestine. *Mucosal Immunol.* 2017. 10: 1431–1442.
- 51 Meisel, C., Bonhagen, K., Lohning, M., Coyle, A. J., Gutierrez-Ramos, J. C., Radbruch, A. and Kamradt, T., Regulation and function of T1/ST2 expression on CD4+ T cells: induction of type 2 cytokine production by T1/ST2 cross-linking. *J. Immunol.* 2001. 166: 3143–3150.
- 52 Kurowska-Stolarska, M., Kewin, P., Murphy, G., Russo, R. C., Stolarski, B., Garcia, C. C., Komai-Koma, M. et al., IL-33 induces antigen-specific IL-5+ T cells and promotes allergic-induced airway inflammation independent of IL-4. *J. Immunol.* 2008. 181: 4780–4790.
- 53 Minutti, C. M., Drube, S., Blair, N., Schwartz, C., McCrae, J. C., McKenzie, A. N., Kamradt, T. et al., Epidermal growth factor receptor expression licenses type-2 helper T cells to function in a T cell receptor-independent fashion. *Immunity* 2017. 47: 710–722 e6.
- 54 Cook, G. P., Savic, S., Wittmann, M. and McDermott, M. F., The NLRP3 inflammasome, a target for therapy in diverse disease states. *Eur. J. Immunol.* 2010. 40: 631–634.
- 55 Place, D. E. and Kanneganti, T. D., Recent advances in inflammasome biology. *Curr. Opin. Immunol.* 2018. 50: 32–38.
- 56 Bruchard, M., Rebe, C., Derangere, V., Togbe, D., Ryffel, B., Boidot, R., Humblin, E. et al., The receptor NLRP3 is a transcriptional regulator of TH2 differentiation. *Nat. Immunol.* 2015. 16: 859–870.
- 57 Bruchard, M., Boidot, R., Ghiringhelli, F. and Vegran, F., Transcriptome analysis of TH2 CD4(+) T cells differentiated from wild-type and NLRP3KO mice. *Genom. Data* 2015. 5: 314–315.
- 58 Coll, R. C., Robertson, A. A., Chae, J. J., Higgins, S. C., Munoz-Planillo, R., Inserra, M. C., Vetter, I. et al., A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. *Nat. Med.* 2015. 21: 248–255.
- 59 King, I. L. and Mohrs, M., IL-4-producing CD4+ T cells in reactive lymph nodes during helminth infection are T follicular helper cells. *J. Exp. Med.* 2009. 206: 1001–1007.
- 60 Sahoo, A., Wali, S. and Nurieva, R., T helper 2 and T follicular helper cells: regulation and function of interleukin-4. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2016. 30: 29–37.
- 61 Ballesteros-Tato, A., Randall, T. D., Lund, F. E., Spolski, R., Leonard, W. J. and Leon, B., T follicular helper cell plasticity shapes pathogenic T helper 2 cell-mediated immunity to inhaled house dust mite. *Immunity* 2016. 44: 259–273.
- 62 Allergy and acidosis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1930. 1: 378–379.
- 63 He, J., Tsai, L. M., Leong, Y. A., Hu, X., Ma, C. S., Chevalier, N., Sun, X. et al., Circulating precursor CCR7(lo)PD-1(hi) CXCR5(+) CD4(+) T cells indicate Tfh cell activity and promote antibody responses upon antigen reexposure. *Immunity* 2013. 39: 770–781.
- 64 Linterman, M. A., Beaton, L., Yu, D., Ramiscal, R. R., Srivastava, M., Hogan, J. J., Verma, N. K. et al., IL-21 acts directly on B cells to regulate Bcl-6 expression and germinal center responses. *J. Exp. Med.* 2010. 207: 353–363.
- 65 Meli, A. P., Fontes, G., Leung Soo, C. and King, I. L., T Follicular helper cell-derived IL-4 is required for IgE production during intestinal helminth infection. *J. Immunol.* 2017. 199: 244–252.
- 66 Dell’Ariaga, M. and Reinhardt, R. L., Notch signaling represents an important checkpoint between follicular T-helper and canonical T-helper 2 cell fate. *Mucosal Immunol.* 2018. 11: 1079–1091.
- 67 Maciolek, J. A., Pasternak, J. A. and Wilson, H. L., Metabolism of activated T lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* 2014. 27: 60–74.
- 68 Pelgrom, L. R. and Everts, B., Metabolic control of type 2 immunity. *Eur. J. Immunol.* 2017. 47: 1266–1275.
- 69 Nakayama, T., Hirahara, K., Onodera, A., Endo, Y., Hosokawa, H., Shinoda, K., Tumes, D. J. et al., Th2 cells in health and disease. *Annu. Rev. Immunol.* 2017. 35: 53–84.
- 70 Delgoffe, G. M., Pollizzi, K. N., Waickman, A. T., Heikamp, E., Meyers, D. J., Horton, M. R., Xiao, B. et al., The kinase mTOR regulates the differentiation of helper T cells through the selective activation of signaling by mTORC1 and mTORC2. *Nat. Immunol.* 2011. 12: 295–303.
- 71 Lee, K., Gudapati, P., Dragovic, S., Spencer, C., Joyce, S., Killeen, N., Magnuson, M. A. et al., Mammalian target of rapamycin protein complex 2 regulates differentiation of Th1 and Th2 cell subsets via distinct signaling pathways. *Immunity* 2010. 32: 743–753.
- 72 Yang, K., Shrestha, S., Zeng, H., Karmaus, P. W., Neale, G., Vogel, P., Guertin, D. A. et al., T cell exit from quiescence and differentiation into Th2 cells depend on Raptor-mTORC1-mediated metabolic reprogramming. *Immunity* 2013. 39: 1043–1056.
- 73 Youssef, S., Stuve, O., Patarroyo, J. C., Ruiz, P. J., Radosevich, J. L., Hur, E. M., Bravo, M. et al., The HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, promotes a Th2 bias and reverses paralysis in central nervous system autoimmune disease. *Nature* 2002. 420: 78–84.

- 74 Eyerich, S. and Zielinski, C. E., Defining Th-cell subsets in a classical and tissue-specific manner: examples from the skin. *Eur. J. Immunol.* 2014. **44**: 3475–3483.
- 75 Koh, B. H., Hwang, S. S., Kim, J. Y., Lee, W., Kang, M. J., Lee, C. G., Park, J. W. et al., Th2 LCR is essential for regulation of Th2 cytokine genes and for pathogenesis of allergic asthma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010. **107**: 10614–10619.
- 76 Guo, L., Urban, J. F., Zhu, J. and Paul, W. E., Elevating calcium in Th2 cells activates multiple pathways to induce IL-4 transcription and mRNA stabilization. *J. Immunol.* 2008. **181**: 3984–3993.
- 77 Gallo, E., Katzman, S. and Villarino, A. V., IL-13-producing Th1 and Th17 cells characterize adaptive responses to both self and foreign antigens. *Eur. J. Immunol.* 2012. **42**: 2322–2328.
- 78 Wills-Karp, M., Luyimbazi, J., Xu, X., Schofield, B., Neben, T. Y., Karp, C. L. and Donaldson, D. D., Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science* 1998. **282**: 2258–2261.
- 79 Grunig, G., Warnock, M., Wakil, A. E., Venkayya, R., Brombacher, F., Rennick, D. M., Sheppard, D. et al., Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma. *Science* 1998. **282**: 2261–2263.
- 80 Mahata, B., Pramanik, J., Weyden, L., Kar, G., Riedel, A., Fonseca, N. A., Kundu, K. et al., Tumors induce de novo steroid biosynthesis in T cells to evade immunity. *bioRxiv* 2018: 471359.
- 81 Endo, Y., Hirahara, K., Iinuma, T., Shinoda, K., Tumes, D. J., Asou, H. K., Matsugae, N. et al., The interleukin-33-p38 kinase axis confers memory T helper 2 cell pathogenicity in the airway. *Immunity* 2015. **42**: 294–308.
- 82 Morimoto, Y., Hirahara, K., Kiuchi, M., Wada, T., Ichikawa, T., Kanno, T., Okano, M. et al., Amphiregulin-Producing Pathogenic Memory T Helper 2 Cells Instruct Eosinophils to Secrete Osteopontin and Facilitate Airway Fibrosis. *Immunity* 2018. **49**: 134–150 e6.
- 83 Minutti, C. M., Modak, R. V., Macdonald, F., Li, F., Smyth, D. J., Dorward, D. A., Blair, N. et al., A Macrophage-Pericyte Axis Directs Tissue Restoration via Amphiregulin-Induced Transforming Growth Factor Beta Activation. *Immunity* 2019. **50**: 645–654 e6.
- 84 Kaplan, M. H., Hufford, M. M. and Olson, M. R., The development and in vivo function of T helper 9 cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2015. **15**: 295–307.
- 85 Chang, H. C., Sehra, S., Goswami, R., Yao, W., Yu, Q., Stritesky, G. L., Jabeen, R. et al., The transcription factor PU.1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation. *Nat. Immunol.* 2010. **11**: 527–534.
- 86 Gerlach, K., Hwang, Y., Nikolaev, A., Atreya, R., Dornhoff, H., Steiner, S., Lehr, H. A. et al., TH9 cells that express the transcription factor PU.1 drive T cell-mediated colitis via IL-9 receptor signaling in intestinal epithelial cells. *Nat. Immunol.* 2014. **15**: 676–686.
- 87 Jabeen, R., Goswami, R., Awe, O., Kulkarni, A., Nguyen, E. T., Attenasio, A., Walsh, D. et al., Th9 cell development requires a BATF-regulated transcriptional network. *J. Clin. Invest.* 2013. **123**: 4641–4653.
- 88 Koh, B., Abdul Qayum, A., Srivastava, R., Fu, Y., Ulrich, B. J., Janga, S. C. and Kaplan, M. H., A conserved enhancer regulates IL9 expression in multiple lineages. *Nat. Commun.* 2018. **9**: 4803.
- 89 Tsuda, M., Hamade, H., Thomas, L. S., Salumbides, B. C., Potdar, A. A., Wong, M. H., Nunnelee, J. S. et al., A role for BATF3 in TH9 differentiation and T-cell-driven mucosal pathologies. *Mucosal Immunol.* 2019.
- 90 Micosse, C., Meyenn von L., Steck, O., Kipfer, E., Adam, C., Simillion, C., Seyed Jafari, S. M. et al., Human “TH9” cells are a subpopulation of PPAR-gamma(+) TH2 cells. *Sci. Immunol.* 2019. **4**.
- 91 Cosmi, L., Maggi, L., Santarlasci, V., Capone, M., Cardilicchia, E., Frosali, F., Querci, V. et al., Identification of a novel subset of human circulating memory CD4(+) T cells that produce both IL-17A and IL-4. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010. **125**: 222–230.e1-4.
- 92 Raymond, M., Van, V. Q., Wakahara, K., Rubio, M. and Sarfati, M., Lung dendritic cells induce T(H)17 cells that produce T(H)2 cytokines, express GATA-3, and promote airway inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2011. **128**: 192–201 e6.
- 93 Irvin, C., Zafar, I., Good, J., Rollins, D., Christianson, C., Gorska, M. M., Martin, R. J. et al., Increased frequency of dual-positive TH2/TH17 cells in bronchoalveolar lavage fluid characterizes a population of patients with severe asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2014. **134**: 1175–1186 e7.
- 94 Van Gool, F., Nguyen, M. L. T., Mumbach, M. R., Satpathy, A. T., Rosenthal, W. L., Giacometti, S., Le, D. T. et al., A mutation in the transcription factor Foxp3 Drives T helper 2 effector function in regulatory T cells. *Immunity* 2019. **50**: 362–377.e6.
- 95 Messi, M., Giacchetto, I., Nagata, K., Lanzavecchia, A., Natoli, G. and Sallusto, F., Memory and flexibility of cytokine gene expression as separable properties of human T(H)1 and T(H)2 lymphocytes. *Nat. Immunol.* 2003. **4**: 78–86.
- 96 Peine, M., Rausch, S., Helmstetter, C., Frohlich, A., Hegazy, A. N., Kuhl, A. A., Greveling, C. G. et al., Stable T-bet(+)GATA-3(+) Th1/Th2 hybrid cells arise in vivo, can develop directly from naive precursors, and limit immunopathologic inflammation. *PLoS Biol.* 2013. **11**: e1001633.
- 97 Allan, R. S., Zueva, E., Cammas, F., Schreiber, H. A., Masson, V., Belz, G. T., Roche, D. et al., An epigenetic silencing pathway controlling T helper 2 cell lineage commitment. *Nature* 2012. **487**: 249–253.
- 98 Tumes, D. J., Onodera, A., Suzuki, A., Shinoda, K., Endo, Y., Iwamura, C., Hosokawa, H. et al., The polycomb protein Ezh2 regulates differentiation and plasticity of CD4(+) T helper type 1 and type 2 cells. *Immunity* 2013. **39**: 819–832.
- 99 Sallusto, F. and Lanzavecchia, A., Heterogeneity of CD4+ memory T cells: functional modules for tailored immunity. *Eur. J. Immunol.* 2009. **39**: 2076–2082.
- 100 Sallusto, F., Mackay, C. R. and Lanzavecchia, A., Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. *Science* 1997. **277**: 2005–2007.
- 101 Morimoto, Y., Bian, Y., Gao, P., Yashiro-Ohtani, Y., Zhou, X. Y., Ono, S., Nakahara, H. et al., Induction of surface CCR4 and its functionality in mouse Th2 cells is regulated differently during Th2 development. *J. Leukoc. Biol.* 2005. **78**: 753–761.
- 102 Zingoni, A., Soto, H., Hedrick, J. A., Stoppacciaro, A., Storlazzi, C. T., Sinigaglia, F., D’Ambrosio, D. et al., The chemokine receptor CCR8 is preferentially expressed in Th2 but not Th1 cells. *J. Immunol.* 1998. **161**: 547–551.
- 103 Pettipher, R., The roles of the prostaglandin D(2) receptors DP(1) and CRTH2 in promoting allergic responses. *Br. J. Pharmacol.* 2008. **153**(Suppl 1): S191-9.
- 104 Wambre, E., Bajzik, V., DeLong, J. H., O’Brien, K., Nguyen, Q. A., Speake, C., Gersuk, V. H. et al., A phenotypically and functionally distinct human TH2 cell subpopulation is associated with allergic disorders. *Sci. Transl. Med.* 2017. **9**: eaam9171.
- 105 Maggi, L., Santarlasci, V., Capone, M., Peired, A., Frosali, F., Crome, S. Q., Querci, V. et al., CD161 is a marker of all human IL-17-producing T-cell subsets and is induced by RORC. *Eur. J. Immunol.* 2010. **40**: 2174–2181.
- 106 Cosmi, L., De Palma, R., Santarlasci, V., Maggi, L., Capone, M., Frosali, F., Rodolico, G. et al., Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor. *J. Exp. Med.* 2008. **205**: 1903–1916.
- 107 Mitson-Salazar, A., Yin, Y., Wansley, D. L., Young, M., Bolan, H., Arceo, S., Ho, N. et al., Hematopoietic prostaglandin D synthase defines a proeosinophilic pathogenic effector human T(H)2 cell subpopulation with enhanced function. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2016. **137**: 907–918 e9.

- 108 Obata-Ninomiya, K., Ishiwata, K., Nakano, H., Endo, Y., Ichikawa, T., Onodera, A., Hirahara, K. et al., CXCR6(+)-ST2(+) memory T helper 2 cells induced the expression of major basic protein in eosinophils to reduce the fecundity of helminth. *Proc Natl Acad Sci USA* 2018. **115**: E9849–E9858.
- 109 King, C., New insights into the differentiation and function of T follicular helper cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2009. **9**: 757–766.
- 110 Hondowicz, B. D., An, D., Schenkel, J. M., Kim, K. S., Steach, H. R., Krishnamurthy, A. T., Keitany, G. J. et al., Interleukin-2-dependent allergen-specific tissue-resident memory cells drive asthma. *Immunity* 2016. **44**: 155–166.
- 111 Shinoda, K., Hirahara, K., Iinuma, T., Ichikawa, T., Suzuki, A. S., Sugaya, K., Tumes, D. J. et al., Thy1+IL-7+ lymphatic endothelial cells in iBALT provide a survival niche for memory T-helper cells in allergic airway inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016. **113**: E2842–51.
- 112 Corris, P. A. and Dark, J. H., Aetiology of asthma: lessons from lung transplantation. *Lancet* 1993. **341**: 1369–1371.
- 113 Matthias, J., Maul, J., Noster, R., Meinel, H., Chao, Y. Y., Gerstenberg, H., Jeschke, F. et al., Sodium chloride is an ionic checkpoint for human TH2 cells and shapes the atopic skin microenvironment. *Sci. Transl. Med.* 2019. **11**.
- 114 Muller, D. N., Wilck, N., Haase, S., Kleinewietfeld, M. and Linker, R. A., Sodium in the microenvironment regulates immune responses and tissue homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* 2019. **19**: 243–254.
- 115 Junger, W. G., Liu, F. C., Loomis, W. H. and Hoyt, D. B., Hypertonic saline enhances cellular immune function. *Circ. Shock* 1994. **42**: 190–196.
- 116 Machnik, A., Neuhofer, W., Jantsch, J., Dahlmann, A., Tammela, T., Machura, K., Park, J. K. et al., Macrophages regulate salt-dependent volume and blood pressure by a vascular endothelial growth factor-C-dependent buffering mechanism. *Nat. Med.* 2009. **15**: 545–552.
- 117 Weidinger, S., Beck, L. A., Bieber, T., Kabashima, K. and Irvine, A. D., Atopic dermatitis. *Nat. Rev. Dis. Primers* 2018. **4**: 1.
- 118 Binger, K. J., Gebhardt, M., Heinig, M., Rintisch, C., Schroeder, A., Neuhofer, W., Hilgers, K. et al., High salt reduces the activation of IL-4- and IL-13-stimulated macrophages. *J. Clin. Invest.* 2015. **125**: 4223–4238.
- 119 Wu, C., Yosef, N., Thalhamer, T., Zhu, C., Xiao, S., Kishi, Y., Regev, A. et al., Induction of pathogenic TH17 cells by inducible salt-sensing kinase SGK1. *Nature* 2013. **496**: 513–517.
- 120 Kleinewietfeld, M., Manzel, A., Titze, J., Vukan, H., Yosef, N., Linker, R. A., Muller, D. N. et al., Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH17 cells. *Nature* 2013. **496**: 518–522.
- 121 Hernandez, A. L., Kitz, A., Wu, C., Lowther, D. E., Rodriguez, D. M., Vudattu, N., Deng, S. et al., Sodium chloride inhibits the suppressive function of FOXP3+ regulatory T cells. *J. Clin. Invest.* 2015. **125**: 4212–4222.
- 122 Luo, Y., Xue, Y., Wang, J., Dang, J., Fang, Q., Huang, G., Olsen, N. et al., Negligible effect of sodium chloride on the development and function of TGF-beta-Induced CD4(+) Foxp3(+) regulatory T cells. *Cell Rep.* 2019. **26**: 1869–1879 e3.
- 123 Trimble, H. C. and Carey, B. W., Jr., The true sugar content of the skin in diabetes. *Archiv. Dermatol. Syphilol.* 1932. **25**: 6–10.
- 124 Zhang, A. and Silverberg, J. I., Association of atopic dermatitis with being overweight and obese: a systematic review and meta-analysis. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2015. **72**: 606–616.e4.
- 125 Ono, E., Murota, H., Mori, Y., Yoshioka, Y., Nomura, Y., Munetsugu, T., Yokozeki, H. et al., Sweat glucose and GLUT2 expression in atopic dermatitis: implication for clinical manifestation and treatment. *PLoS One* 2018. **13**: e0195960–e0195960.
- 126 Michalek, R. D., Gerriets, V. A., Jacobs, S. R., Macintyre, A. N., MacIver, N. J., Mason, E. F., Sullivan, S. A. et al., Cutting edge: distinct glycolytic and lipid oxidative metabolic programs are essential for effector and regulatory CD4+ T cell subsets. *J. Immunol.* 2011. **186**: 3299–3303.
- 127 Shi, L. Z., Wang, R., Huang, G., Vogel, P., Neale, G., Green, D. R. and Chi, H., HIF1alpha-dependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of TH17 and Treg cells. *J. Exp. Med.* 2011. **208**: 1367–1376.
- 128 Macintyre, A. N., Gerriets, V. A., Nichols, A. G., Michalek, R. D., Rudolph, M. C., Deoliveira, D., Anderson, S. M. et al., The glucose transporter Glut1 is selectively essential for CD4 T cell activation and effector function. *Cell Metab.* 2014. **20**: 61–72.
- 129 Nagai, K., Fukushima, T., Oike, H. and Kobori, M., High glucose increases the expression of proinflammatory cytokines and secretion of TNFalpha and beta-hexosaminidase in human mast cells. *Eur. J. Pharmacol.* 2012. **687**(1–3): 39–45.
- 130 Olsson, N., Taub, D. D. and Nilsson, G., Regulation of mast cell migration by T and T cytokines: identification of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-4 as mast cell chemotaxins. *Scand. J. Immunol.* 2004. **59**: 267–272.
- 131 Galdès-Sebaldt, M., McLaughlin, F. J. and Levison, H., Comparison of cold air, ultrasonic mist, and methacholine inhalations as tests of bronchial reactivity in normal and asthmatic children. *J. Pediatr.* 1985. **107**: 526–530.
- 132 Hamann, C. R., Andersen, Y. M. F., Engebretsen, K. A., Skov, L., Silverberg, J. I., Egeberg, A. and Thyssen, J. P., The effects of season and weather on healthcare utilization among patients with atopic dermatitis. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 2018. **32**: 1745–1753.
- 133 Liu, H., Liu, Q., Hua, L. and Pan, J., Inhibition of transient receptor potential melastatin 8 alleviates airway inflammation and remodeling in a murine model of asthma with cold air stimulus. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 2018. **50**: 499–506.
- 134 Liao, W., Zhou, L., Zhao, X., Song, L., Lu, Y., Zhong, N., Yang, P. et al., Thermoneutral housing temperature regulates T-regulatory cell function and inhibits ovabumin-induced asthma development in mice. *Sci. Rep.* 2017. **7**: 7123–7123.
- 135 Sabnis, A. S., Reilly, C. A., Veranth, J. M. and Yost, G. S., Increased transcription of cytokine genes in human lung epithelial cells through activation of a TRPM8 variant by cold temperatures. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008. **295**: L194–L200.
- 136 Bidaux, G., Borowiec, A. S., Gordienko, D., Beck, B., Shapovalov, G. G., Lemonnier, L., Flourakis, M. et al., Epidermal TRPM8 channel isoform controls the balance between keratinocyte proliferation and differentiation in a cold-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015. **112**: E3345–54.
- 137 Nguyen, K. D., Qiu, Y., Cui, X., Goh, Y. P., Mwangi, J., David, T., Mukundan, L. et al., Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis. *Nature* 2011. **480**: 104–108.
- 138 Rescigno, M., The microbiota revolution: Excitement and caution. *Eur. J. Immunol.* 2017. **47**: 1406–1413.
- 139 Clark, R. A., Chong, B., Mirchandani, N., Brinster, N. K., Yamanaka, K., Dowgiert, R. K. and Kupper, T. S., The vast majority of CLA+ T cells are resident in normal skin. *J. Immunol.* 2006. **176**: 4431–4439.
- 140 Linehan, J. L., Harrison, O. J., Han, S. J., Byrd, A. L., Vujkovic-Cvijin, I., Villarino, A. V., Sen, S. K. et al., Non-classical immunity controls microbiota impact on skin immunity and tissue repair. *Cell* 2018. **172**: 784–796 e18.

- 141 Harrison, O. J., Linehan, J. L., Shih, H. Y., Bouladoux, N., Han, S. J., Smelkinson, M., Sen, S. K. et al., Commensal-specific T cell plasticity promotes rapid tissue adaptation to injury. *Science* 2019. 363.
- 142 Ohnmacht, C., Park, J. H., Cording, S., Wing, J. B., Atarashi, K., Obata, Y., Gaboriau-Routhiau, V. et al., Mucosal immunology. The microbiota regulates type 2 immunity through ROR γ mat(+) T cells. *Science* 2015. 349: 989–993.
- 143 Jia, Y., Fang, X., Zhu, X., Bai, C., Zhu, L., Jin, M., Wang, X. et al., IL-13(+) Type 2 Innate Lymphoid Cells Correlate with Asthma Control Status and Treatment Response. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2016. 55: 675–683.
- 144 Simpson, E. L., Bieber, T., Guttman-Yassky, E., Beck, L. A., Blauvelt, A., Cork, M. J., Silverberg, J. I. et al., Two phase 3 trials of dupilumab versus placebo in atopic dermatitis. *N. Engl. J. Med.* 2016. 375: 2335–2348.
- 145 Beck, L. A., Thaci, D., Hamilton, J. D., Graham, N. M., Bieber, T., Rocklin, R., Ming, J. E. et al., Dupilumab treatment in adults with moderate-to-severe atopic dermatitis. *N. Engl. J. Med.* 2014. 371: 130–139.
- 146 Simpson, E. L., Flohr, C., Eichenfield, L. F., Bieber, T., Sofen, H., Taieb, A., Owen, R. et al., Efficacy and safety of lebrikizumab (an anti-IL-13 monoclonal antibody) in adults with moderate-to-severe atopic dermatitis inadequately controlled by topical corticosteroids: A randomized, placebo-controlled phase II trial (TREBLE). *J. Am. Acad. Dermatol.* 2018. 78: 863–871 e11.
- 147 Tsoi, L. C., Rodriguez, E., Degenhardt, F., Baurecht, H., Wehkamp, U., Volks, N., Szymczak, S. et al., Atopic dermatitis is an IL-13 dominant disease with greater molecular heterogeneity compared to psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* 2019.
- 148 Lightwood, D., Tservistas, M., Zehentleitner, M., Sarkar, K., Turner, A., Bracher, M., Smith, B. et al., Efficacy of an inhaled IL-13 antibody fragment in a model of chronic asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2018. 198: 610–619.
- 149 Dillon, S. R., Sprecher, C., Hammond, A., Bilsborough, J., Rosenfeld-Franklin, M., Presnell, S. R., Haugen, H. S. et al., Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice. *Nat. Immunol.* 2004. 5: 752–760.
- 150 Kabashima, K., Furue, M., Hanifin, J. M., Pulka, G., Wollenberg, A., Galus, R., Etoh, T. et al., Nemolizumab in patients with moderate-to-severe atopic dermatitis: Randomized, phase II, long-term extension study. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2018. 142: 1121–1130 e7.
- 151 Amano, W., Nakajima, S., Kunugi, H., Numata, Y., Kitoh, A., Egawa, G., Dainichi, T. et al., The Janus kinase inhibitor JTE-052 improves skin barrier function through suppressing signal transducer and activator of transcription 3 signaling. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2015. 136: 667–677 e7.
- 152 Bissonnette, R., Papp, K. A., Poulin, Y., Gooderham, M., Raman, M., Mallbris, L., Wang, C. et al., Topical tofacitinib for atopic dermatitis: a phase IIa randomized trial. *Br. J. Dermatol.* 2016. 175: 902–911.
- 153 He, H. and Guttman-Yassky, E., JAK Inhibitors for Atopic Dermatitis: An Update. *Am. J. Clin. Dermatol.* 2018.
- 154 Matsuo, K., Hatanaka, S., Kimura, Y., Hara, Y., Nishiwaki, K., Quan, Y. S., Kamiyama, F. et al., A CCR4 antagonist ameliorates atopic dermatitis-like skin lesions induced by dibutyl phthalate and a hydrogel patch containing ovalbumin. *Biomed. Pharmacother.* 2019. 109: 1437–1444.
- 155 Nakatsuji, T., Chen, T. H., Narala, S., Chun, K. A., Two, A. M., Yun, T., Shafiq, F. et al., Antimicrobials from human skin commensal bacteria protect against *Staphylococcus aureus* and are deficient in atopic dermatitis. *Sci. Transl. Med.* 2017. 9: eaah4680.
- 156 Parfentjev, I. A. and Catelli, A. R., Tolerance of *Staphylococcus aureus* to sodium chloride. *J. Bacteriol.* 1964. 88: 1–3.
- 157 Glaser, R., Meyer-Hoffert, U., Harder, J., Cordes, J., Wittersheim, M., Kobliakova, J., Folster-Holst, R. et al., The antimicrobial protein psoriasisin (S100A7) is upregulated in atopic dermatitis and after experimental skin barrier disruption. *J. Invest. Dermatol.* 2009. 129: 641–649.

Abbreviations: ILC2: group 2 innate lymphoid cell · PPAR: peroxisome proliferator-activated receptor · Tfh: T follicular helper · T_{RM}: resident memory T cell · TSLP: thymic stromal lymphopoietin

Full correspondence: Dr. Christina Zielinski, TranslaTUM & Institute of Virology, Trogerstrasse 30, Technical University of Munich, 81675 Munich, Germany
e-mail: christina.zielinski@tum.de

Received: 13/3/2019
Revised: 14/5/2019
Accepted: 4/7/2019
Accepted article online: 5/7/2019

9.4 Anhang 4 – Allergische Erkrankungen bei Erwachsenen – Prävalenz, Bedeutung und Implikationen für die Prävention und Gesundheitsförderung

Veröffentlichungsform:	Buchartikel
Titel:	Allergische Erkrankungen bei Erwachsenen – Prävalenz, Bedeutung und Implikationen für die Prävention und Gesundheitsförderung
Autoren:	Christina E. Zielinski, Julia Matthias
Buchtitel:	Prävention und Gesundheitsförderung
Buchreihe:	Springer Reference Pflege – Therapie – Gesundheit
Erscheinungsdatum:	Februar 2020 (online)
Herausgeber:	Michael Tiemann, Melvin Mohokum
Verlag:	Springer, Berlin, Heidelberg
DOI:	10.1007/978-3-662-55793-8_65-1
Seitenangabe:	1-6



Allergische Erkrankungen bei Erwachsenen – Prävalenz, Bedeutung und Implikationen für die Prävention und Gesundheitsförderung

Christina Zielinski und Julia Matthias

Inhalt

1	Einleitung	1
2	Entwicklung	1
3	Hygiene-Hypothese	2
4	Einflussfaktoren der immunologischen Hypersensitivität	2
4.1	Feinstaub	3
4.2	Natriumchlorid – das Salz in unserer Ernährung	3
4.3	Mikrobiom und Ernährung	3
4.4	Hautpflege	4
5	Implikationen für die Prävention und Gesundheitsförderung	4
	Literatur	4

1 Einleitung

Eine allergische Reaktion ist definiert als eine Hypersensitivität des Immunsystems auf einen normalerweise ungefährlichen Stimulus. Je nach Ursprung der Stimulation und Art der Exposition kann dies eine Vielzahl von Reaktionen hervorrufen. Vor allem betroffen hiervon sind exponierte Oberflächengewebe wie die Haut, die Atemwege, die Konjunktiven und der Gastrointestinaltrakt, welche kontinuierlich mit der Umwelt in Kontakt stehen. Das macht den Formenkreis der Allergien zu einem sehr mannigfaltigen Krankheitsbild.

Nach Schätzungen der World Allergy Organisation (WAO) leiden rund 10–40 % der Bevölkerung weltweit an Erkrankungen des allergischen Formenkreises (Pawankar et al. 2013). 339 Mio. Menschen leiden an Asthma, einer chronischen Atemwegserkrankung, von welcher in Deutschland 10 % aller Kinder und 5 % der Erwachsenen betroffen

sind (Buhl et al. 2017; Global Asthma Network 2018). Asthma ist hiermit einer der häufigsten Gründe für Krankeneinweisungen im Kindesalter (Ferrante und La Grutta 2018) und verursachte im Jahr 2013 alleine in den USA jährliche Ausgaben von 81,9 Mrd. USD durch Behandlungskosten, Arbeitsausfall und Invalidität (Nurmagambetov et al. 2018). 383.000 Menschen versterben jährlich an den Folgen von Asthma, hiervon stammt der Großteil der Erkrankten aus sozial belasteten Gebieten mit niedrigem oder mittlerem Einkommen (World Health Organization 2017). Allergische Erkrankungen wie Asthma tragen weltweit beträchtlich zur Morbidität bei. Dies betrifft vor allem die sozialökonomisch benachteiligte Bevölkerung. Sie stellen somit durch ihre enorme Belastung des Gesundheitssystems ein bedeutendes wirtschaftliches und gesellschaftliches Problem dar.

C. Zielinski (✉)

Institut für Virologie und Deutsches Zentrum für Infektionsforschung,
Technische Universität München, München, Deutschland
E-Mail: christina.zielinski@tum.de

J. Matthias

Charité Berlin, Berlin, Deutschland
E-Mail: julia.matthias@charite.de

2 Entwicklung

Epidemiologische Beobachtungen zeigen einen starken Anstieg der Prävalenz allergischer Erkrankungen seit Mitte des 20. Jahrhunderts (Platts-Mills 2015): So verzeichnete Schottland einen drastischen Anstieg der Asthmaprävalenz bei Schulkindern von 10 % auf 20 % innerhalb von nur

25 Jahren (Pawankar et al. 2013); die Lebenszeitprävalenz der atopischen Dermatitis hat sich mit einem Anstieg auf bis zu 30 % im Kindes- und bis zu 10 % im Erwachsenenalter in Industrienationen innerhalb der letzten 30 Jahre mehr als verdoppelt (Pawankar et al. 2013).

Bei der Entwicklung von Allergien sind nachweislich multiple genetische Faktoren beteiligt, die die individuelle Prädisposition erhöhen (Ortiz und Barnes 2015). Dies kann zwar das häufig beobachtete familiäre Auftreten miterklären, die rasante Zunahme der Prävalenz innerhalb der letzten Jahrzehnte jedoch nicht.

Während unser Immunsystem kaum Zeit hatte sich anzupassen, haben sich unsere Lebensumstände und Ernährungsgewohnheiten durch den Wohlstand und Fortschritt in jüngerer Zeit drastisch verändert. Vor allem in Schwellenländern gleicht sich die Prävalenz allergischer Erkrankungen zunehmend derer von Industrienationen an (Pawankar et al. 2013). Die Hintergründe hiervon sind noch nicht verstanden, die Verwestlichung sich entwickelnder Länder springt jedoch als ein gemeinsames Merkmal ins Auge. Mehr und mehr rückt deshalb die Diskussion um Umweltfaktoren als mögliche Modulatoren allergischer Prozesse in den Fokus.

Die Suche nach Risikofaktoren und ein besseres Verständnis um die Entstehung und den Progress allergischer Erkrankungen sind deshalb zur Entwicklung präventiver Maßnahmen sowohl gesundheitsökonomisch als auch gesellschaftlich von besonderer Bedeutung.

3 Hygiene-Hypothese

Neben Anpassungen unserer Ernährungsgewohnheiten und unseres Lebens- und Arbeitsumfelds hat sich ein weiterer Sektor im Zuge der Industrialisierung ganz erheblich verändert: unser Hygienestandard. Im Rahmen der Sauberkeitserziehung, der Entwicklung von Antiseptika und der Verwendung von Impfstoffen hat sich der Kontakt mit Mikroben und die Frequenz von Infektionskrankheiten im Kindesalter erheblich verringert. Dies ging einher mit einem Anstieg der Inzidenz allergischer Erkrankungen und führte schließlich 1989 zur Formulierung der Hygiene-Hypothese (Strachan 1989). Initial stützte sich die Hygiene-Hypothese auf die Beobachtung eines geringeren Auftretens allergischer Erkrankungen in großen Familienverbänden. Eine Reduktion des (oftmals unhygienischen) Kontakts unter Geschwistern wurde für den Anstieg an Allergien verantwortlich gemacht. Die Hygiene-Hypothese wurde weiter bekräftigt durch die geringere Inzidenz von Allergien bei Kindern, die in bäuerlichen Regionen aufwuchsen und Kontakt zu unpasteurisierter Rohmilch hatten (Riedler et al. 2001). Die deutsche Pädiaterin Erika von Mutius hat hierbei wegweisende epidemiologische Pionierarbeit geleistet. Das vermehrte Auftreten von Allergien bei Kindern in städtischen Gebieten wurde mit

einer schwächer ausgebildeten Immuntoleranz und reduzierten frühkindlichen Reifung des Immunsystems durch weniger mikrobielle Exposition erklärt. Infektionen viraler Art zeigten ebenfalls eine protektive Wirkung. Auch parasitäre Infektionen zeigten, insbesondere in Afrika und Lateinamerika, eine inverse Korrelation mit dem Auftreten von Symptomen des atopischen Formenkreises (Yazdanbakhsh et al. 2002).

Auch der soziale Status korreliert in einer britischen Studie mit der Allergieinzidenz (Strachan 2000). Interessanterweise bleibt bei Migration eines Erwachsenen in ein Gebiet mit höherer Allergie-Prävalenz im Vergleich zum Herkunftsland das Auftreten allergischer Erkrankungen zwar erniedrigt, ein Anstieg gegenüber der Prävalenz des Herkunftslandes hinaus lässt sich jedoch trotzdem beobachten (Tham et al. 2019). Weitere Umweltfaktoren müssen deshalb zur Erklärung der migrationsassoziierten Veränderung der Allergieinzidenz vermutet werden.

4 Einflussfaktoren der immunologischen Hypersensitivität

Die Krankheitsentwicklung und -dynamik allergischer Erkrankungen ist bisher nur unzureichend verstanden. Bisher werden Th2-Zellen, eine Subgruppe der T-Helfer-Zellen, als wichtiger Verursacher des allergischen Entzündungsvorganges diskutiert. Nach Kontakt und Aufnahme des Allergens kommt es durch Th2-vermittelte Stimulation von B-Zellen zur Sekretion von spezifischen IgE-Antikörpern gegen das auslösende Allergen. Diese Antikörper können Mastzellen binden, welche bei wiederholtem Allergenkontakt durch Quervernetzung zur Degranulation der Mastzellen mit Sekretion proinflammatorischer und vasoaktiver Mediatoren führen. Diese Immunreaktion rekrutiert weitere Entzündungszellen und führt schließlich zur Entzündung des betroffenen Gewebes. Im Bereich der Haut entwickeln sich Ekzeme (atopische Dermatitis), im Bereich des Respirationstraktes ein allergisches Asthma oder eine allergische Rhinitis und im Bereich des Gastrointestinaltrakts Übelkeit, Erbrechen und Diarrhö. Breitet sich die allergische Entzündungsreaktion aus, kann es zu einer systemischen Vasodilatation mit Ausbildung eines allergischen Schocks kommen, welcher mit einer hohen Mortalität und Morbidität vergesellschaftet ist. Die genauen auslösenden Mechanismen jener Entzündungsvorgänge sind bisher noch nicht vollständig ergründet. Innerhalb der letzten Jahre konnte eine Beteiligung vieler weiterer Zelltypen, wie unter anderem Th9-Zellen, folliculäre T-Helfer-Zellen, IL4-IL17 koproduzierende T-Helfer-Zellen und regulatorische T-Zellen, gezeigt werden (Matthias und Zielinski 2019).

Lange Zeit wurden ausschließlich immunologische Aspekte, insbesondere Zytokine und Zell-Zellkontakte, als Einflussfaktoren entzündlicher und allergischer Vorgänge

berücksichtigt. In den letzten Jahren gewannen jedoch exogene Umweltfaktoren an Aufmerksamkeit. Dies führte zu einer Fokussierung auf Umweltfaktoren wie Ernährung, Feinstaubexposition und Hygiene. Das Wechselspiel mit dem Immunsystem ist komplex und Gegenstand aktueller Forschungsaktivitäten.

4.1 Feinstaub

Im Zuge der Urbanisierung steigt die Partikelemission, vor allem in dicht besiedelten städtischen Gebieten, stark an. Die steigenden Konzentrationen an Feinstaub werden mit einer Vielzahl von entzündlichen Lungenerkrankungen in Zusammenhang gebracht, unter anderem mit dem Auftreten von allergischem Asthma: verschiedene klinische Studien in den USA und Griechenland fanden eine Assoziation zwischen der Konzentration an Feinstaubpartikeln in der Atemluft und der Exazerbation von Asthma im Kindesalter (Schilcrow et al. 2006; Samoli et al. 2011) und warfen die Frage nach einem möglichen immunologischen Zusammenhang mit der frühkindlichen Feinstaubexposition auf.

Interessanterweise zeigte sich nach kombiniertem Allergen- und Feinstaubkontakt junger Mäuse eine Suppression der Th2-Antwort und ein Anstieg regulatorischer T-Helfer-Zellen. Nach wiederholtem Allergenkontakt entwickelten die Mäuse jedoch starke allergische Entzündungszeichen in den Atemwegen mit Erhöhung der Th2-Zytokine (Saravia et al. 2014; Brandt et al. 2015). Auch bei Nachkommen von Mäusen, welche in der Schwangerschaft Dieselruß ausgesetzt waren, fanden sich erhöhte IgE-Konzentrationen und ein Anstieg von Th2-Zytokinen in der Lunge sowie dem Blut (Manners et al. 2014). Somit scheint bereits eine frühe Feinstaubexposition in utero eine spätere Entwicklung von allergischem Asthma zu begünstigen. Dies könnte neben der genetischen Assoziation die familiäre Häufung von Asthma zusätzlich erklären (Litonjua et al. 1998).

Nicht nur das allergische Asthma, sondern auch die atopische Dermatitis scheint in ihrem Auftreten durch Feinstaubexposition begünstigt zu werden (Ngoc et al. 2017). Die Reduktion der Feinstaubkonzentration in der Atemluft könnte hier einen wichtigen Angriffspunkt zur Prävention allergischer Erkrankungen darstellen.

4.2 Natriumchlorid – das Salz in unserer Ernährung

Anders als im Blut unterliegt die Konzentration von Natrium im Gewebe erheblichen Schwankungen (Matthias und Zielinski 2019). Natriumchlorid (NaCl) nimmt Einfluss auf die Funktionalität von Immunzellen und scheint auch bei allergischen Erkrankungen eine Rolle zu spielen: kürzlich konnte

eine starke Anreicherung von Natrium in läsionaler Haut von Patienten mit atopischer Dermatitis entdeckt werden (Matthias et al. 2019). Die atopische Dermatitis ist eine chronisch inflammatorische Erkrankung, bei welcher sich durch eine überschießende Th2-Immunantwort ein juckendes Hautexzem ausbildet. Es konnte gezeigt werden, dass erhöhte Kochsalz-Konzentrationen eine Th2-Differenzierung von naiven T-Helfer-Zellen ebenso effizient begünstigen, wie das Interleukin-4 (IL-4), welches bisher als essenzielles Zytokin zur Th2-Induktion angesehen wurde.

Auch Gedächtnis-T-Helfer-Zellen, welche den Großteil der T-Zellen in peripheren Geweben wie der Haut ausmachen, erhöhten die Expression des Th2-Signaturzytokins IL-4 und Th2-Transkriptionsfaktors GATA-3 als Folge einer erhöhten Natriumchlorid-Exposition. Die läsionale Haut von Patienten mit atopischer Dermatitis ist häufig dicht mit *Staphylococcus aureus* besiedelt (Paller et al. 2019). Diese Dysbiose geht mit einem aggressiveren Krankheitsverlauf einher. Der Grund für die *Staphylococcus aureus* dominierte Dysbiose ist bisher unzureichend verstanden. Interessanterweise toleriert *Staphylococcus aureus* sehr viel höhere Kochsalz-Konzentrationen als andere Bakterienspezies der residenten Hautflora (Parfentjev und Catelli 1964). Die erhöhten Natriumkonzentrationen läsionaler Haut von Atopikern könnten *Staphylococcus aureus* einen Selektionsvorteil bieten und die Verdrängung der residenten Hautflora begünstigen.

Durch einen vermehrten Konsum von salzreichen vorgefertigten Speisen hat sich die Aufnahme von Kochsalz in der westlichen Welt, parallel zum beobachteten Anstieg allergischer Erkrankungen, drastisch erhöht. Wie das Kochsalz in die Haut gelangt und ob Ernährung hier tatsächlich eine Rolle spielen könnte, ist bisher jedoch ungewiss und bedarf weiterer Klärung durch kontrollierte Studien.

4.3 Mikrobiom und Ernährung

Verschiedene Faktoren, wie der Geburtsmodus, die Ernährung und die Einnahme von Antibiotika beeinflussen bekannterweise die Besiedlung des Darms (Bokulich et al. 2016; Pascal et al. 2018). Doch erst seit kurzem rückt die mikrobielle Komposition des Darm-Mikrobiomes als Einflussfaktor für verschiedene physiologische und immunologische Vorgänge und deren Fehlregulation, wie Autoimmunität und Allergie, vermehrt in den Fokus. So konnte beobachtet werden, dass eine Darmbesiedlung mit *Faecalibacterium*, *Lachnospira*, *Rothia* und *Veillonella* im Mausmodell das Risiko einer Entwicklung allergischer Atemwegserkrankungen reduziert (Arrieta et al. 2015). Keimfreie Mäuse zeigen eine beeinträchtigte Mukusproduktion der Darmschleimhaut im Sinne einer gestörten Darmbarriere (Johansson et al. 2015) sowie eine erhöhte Frequenz an Nahrungsmittelantigen-spezifischen follikulären T-Helfer-Zellen und eine Vermeh-

rung IL4-produzierender T-Helfer-Zellen in den Mesenteriallymphknoten. Dies ist nach Implementierung einer physiologischen Darmflora rückläufig (Hong et al. 2019).

Auch die immunostimulatorische Potenz der unterschiedlichen Bakterienstämme spielt bei der Entwicklung von Allergien eine Rolle. *Bacteroides*-Spezies besitzen im Gegensatz zu *Escherichia coli* eine schwächere immunostimulatorische Kapazität mit der Folge einer eingeschränkten Reifung des gastrointestinalen Immunsystems und einer möglicherweise erhöhten Anfälligkeit zur Allergie (Vatanen et al. 2016). Die Zusammensetzung der gastrointestinalen Bakterienflora ist direkt und indirekt durch Einnahme von Antibiotika und die Zusammensetzung der Ernährung beeinflussbar. So begünstigt eine kochsalzreiche Ernährung eine Minderung an Klostridien-Spezies (Bier et al. 2018), welche durch protektive Eigenschaften auf die Darmbarriere die Entstehung von Allergien vermindern (Stefka et al. 2014). Kurzkettige Fettsäuren, welche durch bakterielle Fermentation unverdaulicher Kohlenhydrate entstehen und durch eine ballaststoffreiche Ernährung zugeführt werden können, zeigten im Mausmodell durch Induktion regulatorischer T-Helfer-Zellen im Darm protektive Eigenschaften gegen allergische Erkrankungen (Smith et al. 2013; Zhu et al. 2019). Dies könnte auch die protektiven Eigenschaften einer mediterranen Ernährung während der Schwangerschaft und in den ersten Lebensjahren bei der Entwicklung von Allergien im Kindesalter erklären.

Weitere Untersuchungen zur Beeinflussung der Nahrungszusammensetzung als präventive Strategie bei der Bekämpfung allergischer Erkrankungen ergaben eine verstärkte Immuntoleranz für Kuhmilchprotein bei Kindern nach einjähriger Gabe von extensiv hydrolysiertes Kaseinnahrung mit probiotischem *Lactobacillus rhamnosus GG* (Canani et al. 2012). In einer weiteren Studie zeigte diese probiotische Ernährungsstrategie selbst nach einem dreijährigen Follow-Up eine nachhaltige Reduktion der Inzidenz von Erkrankungen des atopischen Formenkreises (Canani et al. 2017). Auch eine Symptombesserung des Ekzems pädiatrischer Patienten mit atopischer Dermatitis (Liu et al. 2016) sowie eine größere Effektivität spezifischer Immuntherapien (Tang et al. 2015; Xu et al. 2016) konnte unter Gabe von Probiotika wie *Lactobacillus rhamnosus* oder *Clostridium butyricum* beobachtet werden.

4.4 Hautpflege

Ähnlich dem Darm bietet auch die Haut eine große Kontaktfläche zu unserer Umwelt. Sie gilt als bedeutende Pforte zur Sensibilisierung mit Allergenen und hiermit als potenzieller Startpunkt des atopischen Marsches (Lowe et al. 2018). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass eine frühe und regelmäßige Pflege der Haut innerhalb der ersten sechs Monate nach Geburt das Auftreten einer atopischen Derma-

titis um 50 % reduziert (Simpson et al. 2014). Ob eine frühe Hautpflege und somit Stabilisierung der Hautbarriere auch langfristig die Entwicklung weiterer allergischer Erkrankungen verhindern kann, ist jedoch noch unklar.

5 Implikationen für die Prävention und Gesundheitsförderung

Innerhalb der letzten 50 Jahre konnte im Zuge der Urbanisierung ein steter Anstieg des Auftretens allergischer Erkrankungen beobachtet werden (Platts-Mills 2015). Dieser Anstieg ist nicht allein durch genetische Komponenten zu erklären und lässt einen Einfluss des angepassten Wohnumfelds sowie veränderter Lebens- und Ernährungsgewohnheiten der westlichen Welt vermuten.

Viele allergische Erkrankungen verlaufen chronisch und verursachen durch Behandlungskosten und Arbeitsausfall eine beträchtliche gesellschaftliche Belastung. Die Verhinderung der Krankheitsentstehung durch präventive Maßnahmen ist deshalb von besonderer Bedeutung. Wir haben verschiedene Einflussfaktoren diskutiert, welche im frühen Krankheitsverlauf als Angriffspunkte zur Entwicklung präventiver Strategien dienen könnten. Als gemeinsamer Kerngedanke hat sich hier die besondere Vulnerabilität unserer größten und exponiertesten Körperoberflächen herausgestellt: Lunge, Darm und Haut. Eine Reduktion der Feinstaubbelastung, Einflussnahme auf die Ernährungsgewohnheiten durch ballaststoffreiche Diät und Probiotikagabe sowie frühkindliche Hautpflege haben in verschiedenen klinischen und präklinischen Studien ein Potenzial zur Entwicklung präventiver Strategien gezeigt. Weitere Forschung ist jedoch für ein besseres Verständnis der Entwicklungsmechanismen und Einflussfaktoren von Allergien und zur Weiterentwicklung und Fokussierung präventiver Maßnahmen unbedingt notwendig.

Literatur

- Arrieta M-C, Stiemsma LT, Dimitriu PA, Thorson L, Russell S, Yurist-Doutch S, Kuzeljevic B, Gold MJ, Britton HM, Lefebvre DL, Subbarao P, Mandhane P, Becker A, McNagny KM, Sears MR, Kollmann T, Investigators CS, Mohn WW, Turvey SE, Finlay BB (2015) Early infancy microbial and metabolic alterations affect risk of childhood asthma. *Sci Transl Med* 7(307):307ra152–307ra152. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aab2271>
- Bier A, Braun T, Khasbab R, Di Segni A, Grossman E, Haberman Y, Leibowitz A (2018) A high salt diet modulates the gut microbiota and short chain fatty acids production in a salt-sensitive hypertension rat model. *Nutrients* 10(9):1154. <https://doi.org/10.3390/nu10091154>
- Bokulich NA, Chung J, Battaglia T, Henderson N, Jay M, Li H, Lieber AD, Wu F, Perez-Perez GI, Chen Y, Schweizer W, Zheng X, Contreras M, Dominguez-Bello MG, Blaser MJ (2016) Antibiotics, birth mode, and diet shape microbiome maturation during early life. *Sci Transl Med* 8(343):343ra382–343ra382. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aad7121>

- Brandt EB, Biagini Myers JM, Acciani TH, Ryan PH, Sivaprasad U, Ruff B, LeMasters GK, Bernstein DI, Lockey JE, LeCras TD, Khurana Hershey GK (2015) Exposure to allergen and diesel exhaust particles potentiates secondary allergen-specific memory responses, promoting asthma susceptibility. *J Allergy Clin Immunol* 136(2):295–303.e297. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.11.043>
- Buhl R, Bals R, Baur X, Berdel D, Crieé C-P, Gappa M, Gillissen A, Greulich T, Haidl P, Hamelmann E, Kardos P, Kenn K, Klimek L, Korn S, Lommatsch M, Nicolai DN, Pfaar O, Magnussen H, Nicolai T, Rabe KF, Riedler J, Ritz T, Schultz K, Schuster A, Spindler R, Taube C, Taube K, Vogelmeier C, von Leupold A, Wantke F, Weise S, Wildhaber J, Worth H, Zacharasiewicz A (2017) S2k-Leitlinie zur Diagnostik und Therapie von Patienten mit Asthma. AWMF online
- Canani Berni R, Nocerino R, Terrin G, Coruzzo A, Cosenza L, Leone L, Troncone R (2012) Effect of Lactobacillus GG on tolerance acquisition in infants with cow's milk allergy: a randomized trial. *J Allergy Clin Immunol* 129(2):580–582.e5825. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.10.004>
- Canani RB, Di Costanzo M, Bedogni G, Amoroso A, Cosenza L, Di Scala C, Granata V, Nocerino R (2017) Extensively hydrolyzed casein formula containing Lactobacillus rhamnosus GG reduces the occurrence of other allergic manifestations in children with cow's milk allergy: 3-year randomized controlled trial. *J Allergy Clin Immunol* 139(6):1906–1913.e1904. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.10.050>
- Ferrante G, La Grutta S (2018) The burden of pediatric asthma. *Front Pediatr* 6:186–186. <https://doi.org/10.3389/fped.2018.00186>
- Global Asthma Network (2018) The global asthma report 2018. Global Asthma Network
- Hong S-W, Eunju O, Lee JY, Lee M, Han D, Ko H-J, Sprent J, Surh CD, Kim KS (2019) Food antigens drive spontaneous IgE elevation in the absence of commensal microbiota. *Sci Adv* 5(5):eaaw1507. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaw1507>
- Johansson MEV, Jakobsson HE, Holmén-Larsson J, Schütte A, Emmund A, Rodríguez-Piñeiro AM, Arike L, Wising C, Svensson F, Bäckhed F, Hansson GC (2015) Normalization of host intestinal mucus layers requires long-term microbial colonization. *Cell Host Microbe* 18(5):582–592. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.10.007>
- Litonjua AA, Carey VJ, Burge HA, Weiss ST, Gold DR (1998) Parental history and the risk for childhood asthma. Does mother confer more risk than father? *Am J Respir Crit Care Med* 158(1):176–181. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.158.1.9710014>
- Liu J, Chen F-H, Qiu S-Q, Yang L-T, Zhang H-P, Liu J-Q, Geng X-R, Yang G, Liu Z-Q, Li J, Liu Z-G, Li H-B, Yang P-C (2016) Probiotics enhance the effect of allergy immunotherapy on regulating antigen specific B cell activity in asthma patients. *Am J Transl Res* 8(12):5256–5270
- Lowe AJ, Leung DYM, Tang MLK, Su JC, Allen KJ (2018) The skin as a target for prevention of the atopic march. *Annals of allergy, asthma & immunology: official publication of the American College of Allergy, Asthma Immunol* 120(2):145–151. <https://doi.org/10.1016/j.ana.2017.11.023>
- Manners S, Alam R, Schwartz DA, Gorska MM (2014) A mouse model links asthma susceptibility to prenatal exposure to diesel exhaust. *J Allergy Clin Immunol* 134(1):63–72. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.10.047>
- Matthias J, und C. E. Zielinski (2019). Shaping the diversity of Th2 cell responses in epithelial tissues und its potential for allergy treatment. *Eur J Immunol* 49(9):1321–1333. <https://doi.org/10.1002/eji.201848011>
- Matthias J, Maul J, Noster R, Meinel H, Chao YY, Gerstenberg H, Jeschke F, Gasparoni G, Welle A, Walter J, Nordstrom K, Eberhardt K, Renisch D, Donakonda S, Knolle P, Soll D, Grabbe S, Garzorz-Stark N, Eyerich K, Biedermann T, Baumjohann D, Zielinski CE (2019) Sodium chloride is an ionic checkpoint for human TH2 cells und shapes the atopic skin microenvironment. *Sci Transl Med* 11(480). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aau0683>
- Ngoc LTN, Park D, Lee Y, Lee YC (2017) systematic review und meta-analysis of human skin diseases due to particulate matter. *Int J Environ Res Public Health* 14(12). <https://doi.org/10.3390/ijerph14121458>
- Nurmamagambetov T, Kuwahara R, Garbe P (2018) The economic burden of asthma in the United States, 2008–2013. *Ann Am Thorac Soc* 15(3):348–356. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201703-259OC>
- Ortiz RA, Barnes KC (2015) Genetics of allergic diseases. *Immunol Allergy Clin N Am* 35(1):19–44. <https://doi.org/10.1016/j.iac.2014.09.014>
- Paller AS, Kong HH, Seed P, Naik S, Scharschmidt TC, Gallo RL, Luger T, Irvine AD (2019) The microbiome in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 143(1):26–35. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.11.015>
- Parfentjev IA, Catelli AR (1964) Tolerance of staphylococcus aureus to sodium chloride. *J Bacteriol* 88:1–3
- Pascal M, Perez-Gordo M, Caballero T, Escribese MM, Lopez Longo MN, Luengo O, Manso L, Matheu V, Seoane E, Zamorano M, Labrador M, Mayorga C (2018) Microbiome und allergic diseases. *Front Immunol* 9(1584). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01584>
- Pawankar R, Canonica GW, Holgate ST, Lockey RF (2013) WAO white book on allergy. World Allergy Organization
- Platts-Mills TAE (2015) The allergy epidemics: 1870–2010. *J Allergy Clin Immunol* 136(1):3–13. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.03.048>
- Riedler J, Braun-Fahrlander C, Eder W, Schreuer M, Waser M, Maisch S, Carr D, Schierl R, Nowak D, von Mutius E, Team AS (2001) Exposure to farming in early life und development of asthma und allergy: a cross-sectional survey. *Lancet* 358(9288):1129–1133. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)06252-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)06252-3)
- Samoli E, Nastos PT, Paliatsos AG, Katsouyanni K, Priftis KN (2011) Acute effects of air pollution on pediatric asthma exacerbation: evidence of association und effect modification. *Environ Res* 111(3):418–424. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2011.01.014>
- Saravia J, You D, Thevenot P, Lee GI, Shrestha B, Lomnicki S, Cormier SA (2014) Early-life exposure to combustion-derived particulate matter causes pulmonary immunosuppression. *Mucosal Immunol* 7(3):694–704. <https://doi.org/10.1038/mi.2013.88>
- Schildcrout JS, Sheppard L, Lumley T, Slaughter JC, Koenig JQ, Shapiro GG (2006) Ambient air pollution und asthma exacerbations in children: an eight-city analysis. *Am J Epidemiol* 164(6):505–517. <https://doi.org/10.1093/aje/kwj225>
- Simpson EL, Chalmers JR, Hanifin JM, Thomas KS, Cork MJ, McLean WHI, Brown SJ, Chen Z, Chen Y, Williams HC (2014) Emollient enhancement of the skin barrier from birth offers effective atopic dermatitis prevention. *J Allergy Clin Immunol* 134(4):818–823. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.08.005>
- Smith PM, Howitt MR, Panikov N, Michaud M, Gallini CA, Bohlooly-Y M, Glickman JN, Garrett WS (2013) The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science* 341(6145):569–573. <https://doi.org/10.1126/science.1241165>
- Stefka AT, Feehley T, Tripathi P, Qiu J, McCoy K, Mazmanian SK, Tjota MY, Seo G-Y, Cao S, Theriault BR, Antonopoulos DA, Zhou L, Chang EB, Fu Y-X, Nagler CR (2014) Commensal bacteria protect against food allergen sensitization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(36):13145–13150. <https://doi.org/10.1073/pnas.1412008111>
- Strachan DP (1989) Hay fever, hygiene, und household size. *BMJ* 299(6710):1259–1260. <https://doi.org/10.1136/bmj.299.6710.1259>
- Strachan DP (2000) Family size, infection und atopy: the first decade of the hygiene hypothesis. *Thorax* 55(1):S2–S10. https://doi.org/10.1136/thorax.55.suppl_1.s2
- Tang MLK, Ponsonby A-L, Orsini F, Tey D, Robinson M, Su EL, Licciardi P, Burks W, Donath S (2015) Administration of a probiotic with peanut oral immunotherapy: a randomized trial. *J Allergy Clin Immunol* 135(3):737–744.e738. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.11.034>

- Tham EH, Loo EXL, Zhu Y, Shek LPC (2019) Effects of migration on allergic diseases. *Int Arch Allergy Immunol* 178(2):128–140. <https://doi.org/10.1159/000494129>
- Vatanen T, Kostic AD, d’Hennezel E, Siljander H, Franzosa EA, Yassour M, Kolde R, Vlamakis H, Arthur TD, Hämäläinen A-M, Peet A, Tillmann V, Uibo R, Mokurov S, Dorshakova N, Ilonen J, Virtanen SM, Szabo SJ, Porter JA, Lähdesmäki H, Huttenhower C, Gevers D, Cullen TW, Knip M, Xavier RJ (2016) variation in microbiome *lps* immunogenicity contributes to autoimmunity in humans. *Cell* 165(4):842–853. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.007>
- World Health Organization (2017) Asthma – World Health Organization. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/asthma>. Zugegriffen am 08.12.2019
- Xu L-Z, Yang L-T, Qiu S-Q, Yang G, Luo X-Q, Miao B-P, Geng X-R, Liu Z-Q, Liu J, Wen Z, Wang S, Zhang H-P, Li J, Liu Z-G, Li H-B, Yang P-C (2016) Combination of specific allergen und probiotics induces specific regulatory B cells und enhances specific immunotherapy effect on allergic rhinitis. *Oncotarget* 7(34):54360–54369. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10946>
- Yazdanbakhsh M, Kremsner PG, van Ree R (2002) Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science* 296(5567):490–494. <https://doi.org/10.1126/science.296.5567.490>
- Zhu Z, Zhu B, Hu C, Liu Y, Wang X, Zhang J, Wang F, Zhu M (2019) Short-chain fatty acids as a target for prevention against food allergy by regulatory T cells. *JGH Open* 3(3):190–195. <https://doi.org/10.1002/jgh3.12130>