

Aus der Klinik für Dermatologie und Allergologie
Direktor: Prof. Dr. med. Michael Hertl
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Identifizierung autoreaktiver T-Zellen bei Patienten
mit Pemphigus Vulgaris mittels MHC-II-Dextramere**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Luca Scarsella aus L'Aquila

Marburg, 2023

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
02.06.2023

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin

Dekanin:
Frau Prof. Dr. D. Hilfiker-Kleiner

Referent:
Herr Prof. Dr. M. Hertl

1. Korreferent:
Herr Prof. Dr. M. Bacher

Widmung

Für meine Eltern

Für meine Schwester

1. Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
AF700	Alexa Fluor 700
APC	Allophycocyanin
BV510	Brilliant violet 510
CD	Cluster of differentiation
CLIP	Class-II-associated invariant chain peptide
CPDA	Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin
DIF	Direkte Immunfluoreszenz
DMSO	Dimethylsulfoxid
Dsg3	Desmoglein 3
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
H&E	Hämatoxylin-Eosin
HLA	Human leukocyte antigen
HRP	Enzyme horseradish peroxidase
Ig	Immunoglobulin
IIF	Indirekte Immunfluoreszenz
IL-2	Interleukin-2
MACS	Magnetic activated cell sorting
MHC	Major histocompatibility complex class 2
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells

PBS	Phosphate-buffered saline
PE	Phycoerythrin
PE / Cy7	Phycoerythrin / Cyanine 7
PerCP-Cy5.5	Peridinin Chlorophyll Protein Complex / Cyanine5.5
PFA	Paraformaldehyde
PKI	Protein Kinase Inhibitor
PV	Pemphigus vulgaris
Rpm	Rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institut-Medium
Tab	Tabelle
TZR	T-Zellen-Rezeptor
Th	T- helper cell
Th1	Type 1 T- helper cell
Th2	Type 2 T- helper cell
Th17	Type 17 T- helper cell

2. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1** Klinisches Bild des PV an Haut und Mundschleimhaut
- Abb. 2** Histopatologisches Bild des PV
- Abb. 3** Direkte (DIF) und indirekte (IIF) Immunfluoreszenz
- Abb. 4** Struktur des Humanen Leukozyten-Antigen-Systems
- Abb. 5** Unterschiede in MHC-Antigen-TCR-Bindung von CD4+- und CD8+-T-Zellen
- Abb. 6** Pemphigus vulgaris-assoziierte-HLA-Klasse II Allele weltweit
- Abb. 7** MHC-Peptid-Dextramer Interaktion mit dem T- Zell-Rezeptor
- Abb. 8** Versuchsaufbau
- Abb. 9** Isolierung von peripheren Blut-mononukleären Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation
- Abb. 10** Gating-Strategie zur Identifizierung der Dextramer + peripherer CD4+ T Zellen
- Abb. 11** Darstellung der Dextramer-Dsg3-Peptide Färbungen von peripheren CD4+ T- Zellen
- Abb. 12** Dextramer-Dsg3-Peptide-Reaktivität bei PV- Patienten und gesunden Kontrollen
- Abb. 13** Einfluss der immunsuppressiven Therapie auf die T-Zell-Reaktivität peripherer Dsg3 spezifischer T-Zellen
- Abb. 14** Dextramer-Dsg3-Reaktivität von aktiven und in Remission Patienten
- Abb. 15** CLIP (Class-II-associated invariant chain peptide) Reaktivität bei PV Patienten und gesunden Kontrollen
- Abb. 16** TZR-HLA-Bindungsaffinität bei Krebs, infektiösen und autoimmunen Krankheiten

3. Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Übersicht der Pemphigus vulgaris Patienten

Tab. 2 Übersicht der gesunden Spender

Tab. 3 HLA-Klasse II- Desmoglein 3-Peptid-Dextramer Eigenschaften

Tab. 4 Durchflusszytometrischer Vorgang

4. Einleitung

4.1 Pemphigus-Erkrankungen

Pemphigus vulgaris (PV) ist eine schwere Autoimmunkrankheit, welche zur Gruppe der blasenbildenden Autoimmundermatosen gehört und die häufigste Variante der Pemphiguserkrankungen darstellt (**Didona et al, 2019; Kasperkiewicz et al, 2017; Pollmann et al, 2018**). Die Einteilung der Pemphiguserkrankungen erfolgt anhand der betroffenen Zielstrukturen (**Hertl et al, 2002**). Je nach Zielautoantigen und klinischer Manifestation unterscheidet man PV, Pemphigus foliaceus (PF), paraneoplastischen Pemphigus (PNP) (**Didona et al, 2020; Solimani et al, 2019**), Pemphigus vegetans (**Mergler et al, 2017**), Pemphigus herpetiformis und IgA-Pemphigus. Die wichtigsten Charakteristika der jeweiligen Pemphigus-Form lassen sich wie folgt darstellen: Bei PV handelt es sich um eine organspezifische Autoimmunerkrankung der Haut und Schleimhäute, die sich klinisch durch schlaffe und fragile Blasen darstellt. Zentral in der Pathogenese des PV sind IgG-Autoantikörper gegen Desmoglein 1 (Dsg1) und Desmoglein 3 (Dsg3) (**Didona et al, 2019; Ding et al, 1997**), die einen intraepidermalen Adhäsionsverlust verursachen. Im Gegensatz dazu ist beim PF keine Schleimhautbeteiligung nachweisbar, sondern die Erkrankung manifestiert sich in der Epidermis durch eine oberflächliche subkorneale Blasenbildung. Die autoreaktiven Antikörper sind hierbei gegen Dsg1 gerichtet. Charakteristisch ist hierfür die Manifestation an seborrhoischen Hautarealen (**Chan et al., 2010; Hofmann et al, 2018**). PNP lässt sich klinisch durch schmerzhafte Schleimhautreosionen, denen ein Tumor zugrunde liegt, erkennen. Im Serum von Patienten lassen sich dabei Autoantikörper gegen Plakine, Dsg1 und Dsg3 nachweisen (**Anhalt et al, 2004**). Der Pemphigus vegetans ist durch eine mächtige Proliferation des Epithels in der läsionalen Haut charakterisiert, die zur Bildung verruköser Wucherungen führt. Namensgebend für den IgA-Pemphigus sind IgA-Autoantikörper gegen Dsg oder Desmocollin, was klinisch in Bildung schlaffer Blasen und anulär gruppierter Erosionen resultiert. (**Papakonstantinou et al, 2018**). Kennzeichnend für den Pemphigus

herpetiformis ist das Auftreten herpetiformer gruppierter Bläschen, welche histologisch durch eine eosinophile Spongiose charakterisiert sind. Auch in diesem Fall sind IgG-Antikörper gegen Dsg3 oder Dsg1 mittels ELISA im Serum von Patienten nachweisbar (**Robinson et al**, 1999).

4.2 Epidemiologie

PV ist die häufigste klinische Variante der Pemphigus-Erkrankungen, die durch einen schweren und potenziell letalen Verlauf gekennzeichnet ist. Die Anzahl der PV- Neuerkrankungen liegt in Deutschland bei 0,5 pro eine Million Einwohner pro Jahr. Bei der Diagnosestellung sind europäische Patienten im Durchschnitt 50-60 Jahre alt. In den USA, Europa und Japan herrscht beim PV eine hohe Prävalenz des weiblichen Geschlechts. Hinsichtlich der Epidemiologie der anderen Pemphigusvarianten ist die Inzidenzrate geringer im Vergleich zum PV, jedoch mit der Ausnahme einiger Länder (Nordafrika und Südamerika), in denen PF, beispielsweise, endemisch auftritt (in einigen Gegenden von Brasilien liegt die Prävalenz des PF bei 3-5%). Die Mortalitätsrate des PV beträgt, abhängig von geographischer und ethnischer Zugehörigkeit, ca. 1.6–12%, (**Kasperkiewicz et al**, 2017). Wie im Paragraph 4.8 beschrieben, wurde ein häufiges Auftreten von PV innerhalb bestimmter Populationen (z.B. in Italien, Frankreich und Brasilien) im Zusammenhang mit spezifischen HLA-Klasse II-Allelen beobachtet (**Hofmann et al**, 2018; **Kasperkiewicz et al**, 2017).

4.3 Krankheitsbild

Initial präsentiert sich der PV bei 2/3 der Patienten mit erosiven, schmerzhaften Hautveränderungen der Mundschleimhaut, gelegentlich der Konjunktiven, der genitalen Schleimhaut, des Larynx oder des Ösophagus (**Pollmann et al**, 2018). Die nasale Schleimhaut stellt hingegen die seltenste Lokalisation dar. Hinderlich für eine Früherkennung von PV ist es, dass das Krankheitsbild häufig mit einer Gingivostomatitis herpetica und Lichen ruber erosivus mucosae verwechselt wird. Als weitere

Differentialdiagnosen werden seltenere Pemphigusvarianten, arzneimittelinduzierter Pemphigus, Erythema exsudativum multiforme und die lineare IgA-Dermatose aufgeführt. Die klinische Manifestation des mukosalen PV ist durch multiple, schmerzhafte Erosionen gekennzeichnet (Abb.1). Im genitalen Bereich kann man auch weißlich belegte Erosionen erkennen (Didona et al., 2019). An der Haut finden sich beim PV schlaaffe, fragile Blasen, die das klinische Bild jedoch recht selten prägen. Der häufigste klinische Befund besteht aus großflächigen, erythematösen, nässenden und im Verlauf krustös belegten Erosionen. Mechanisch stärker beanspruchte Hautregionen bilden dabei Prädilektionsstellen für seborrhische Areale sowie für die Intertrigo. Komplikationen wie bakterielle oder virale Superinfektionen können im Verlauf der Krankheit aufgrund der zerstörten epidermalen Barriere auftreten (Hofmann et al, 2018)

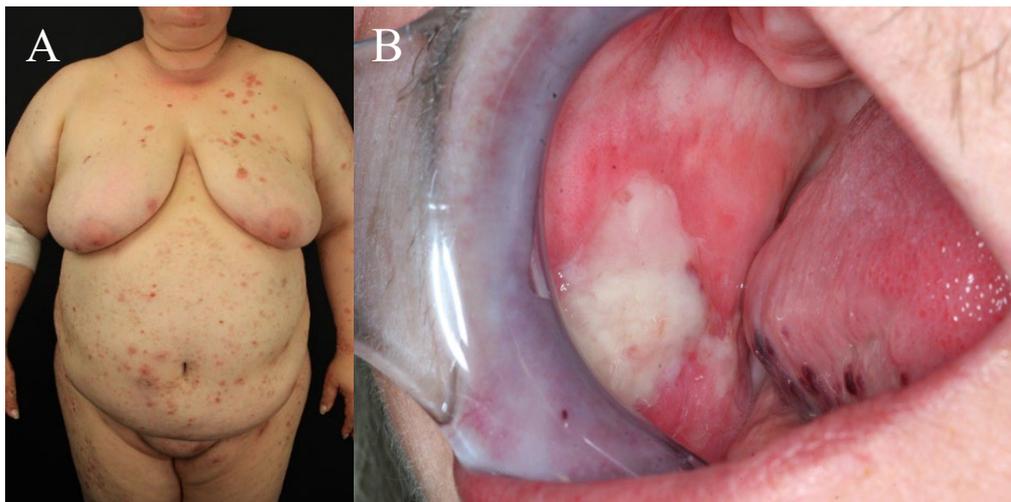


Abbildung 1. Klinisches Bild des PV an Haut und Mundschleimhaut
A) Generalisierte Erosionen an der Haut. B) Mundschleimhaut mit fibrinbelegten Erosionen. Quelle: Klinik für Dermatologie und Allergologie, Universitätsklinikum Marburg.

4.4 Histopathologie

Histopathologische Veränderungen beim PV belaufen sich auf die intraepidermale Blasenbildung und das begleitende Entzündungsinfiltrat

(Amagai et al, 1996). Eine basale bzw. suprabasale Spaltbildung mit an der Basalmembran verbleibenden und gebundenen Zellen ist hierbei oft sichtbar (Abb.2). Vor dem Hintergrund der Vielfältigkeit der befallenen Zielstrukturen bei verschiedenen Pemphigusvarianten sei darauf hingewiesen, dass die Spaltbildung bei PF vor allem im Stratum granulosum der Epidermis (Waschke et al, 2008) stattfindet. Ein weiteres histologisches Attribut des PV ist auf die akantholytischen Effekte der anti-Dsg3-Antikörper zurückzuführen - die basalen Keratinozyten verlieren hierdurch ihre seitlichen Zellkontakte (Hofmann et al, 2018). In der Vergangenheit wurden die dadurch entstehenden abgerundeten, akantholytischen und isolierten Keratinozyten, die in der Flüssigkeit und am Blasengrund von PV Patienten identifiziert werden können, als Pemphiguszellen bezeichnet (Tzanck et al, 1947; Durdu et al, 2008). Dieses Konzept ist jedoch nicht mehr aktuell, weil „Pemphiguszellen“ auch bei anderen bullösen Autoimmundermatitiden nachgewiesen werden können, wie z.B. bullöses Pemphigoid (Gupta et al, 2005). Des Weiteren beobachtet man sehr selten ein schwaches eosinophiles Infiltrat im Bereich der Blase (Karpati et al, 1993). Eine eosinophile Spongiose ist bereits im präbullösen Stadium erkennbar.

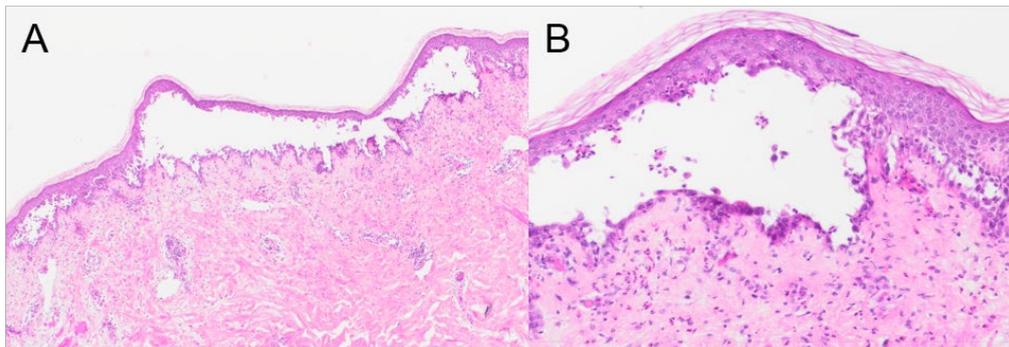


Abbildung 2. Histopathologisches Bild des PV

A) Typische intraepidermale Acantholyse mit auf der Basalmembran verbleibenden Keratinozyten; Hämatoxylin-Eosin (H&E) 4x. B) Intraepidermale Acantholyse mit lymphozytärem Infiltrat; H&E 20x. Quelle: Klinik Dermatologie und Allergologie, Universitätsklinikum Marburg.

4.5 Diagnosestellung

Zielführend bei der Diagnosestellung des PV sind die dermatologische Untersuchung, die histopathologische Analyse sowie die direkte Immunfluoreszenz (DIF). Bei akuter Krankheitsaktivität stellt das sogenannte Nikolski-Zeichen mit zwei Subtypen ein wichtiges klinisches Diagnostikum dar. Dabei spricht man vom Nikolski-Phänomen Typ I, wenn die Einwirkung seitlicher Scherkräfte an klinisch unbetreffener Haut die Ausbildung einer neuen Blase verursacht. Das Nikolski-Phänomen Typ II tritt bei bereits bestehenden intakten Blasen, wenn sich diese durch leichten Druck seitlich verschieben/vergrößern lassen (**Hoffmann et al, 2016; Hofmann et al, 2018**). Gesichert wird die Diagnose des PV durch die Untersuchung von IgG-Autoantikörpern im Gewebe mittels DIF, indirekter Immunfluoreszenz (IIF) und im Serum mittels ELISA. Die DIF (Abb.3A) zeigt dabei ein charakteristisches retikuläres Fluoreszenzbild, bestehend aus Ablagerungen von IgG und Komplementarfaktor C3c an der Oberfläche epidermaler Keratinozyten (**Edwards et al, 2019**). Die IIF erfolgt auf Affenösophagusgewebe, das mit dem Serum der Patienten inkubiert wird. In Folge lässt sich auf der Zelloberfläche der Epithelzellen der Haut eine netzförmige IgG-Ablagerung nachweisen (**Schmidt et al, 2000**).

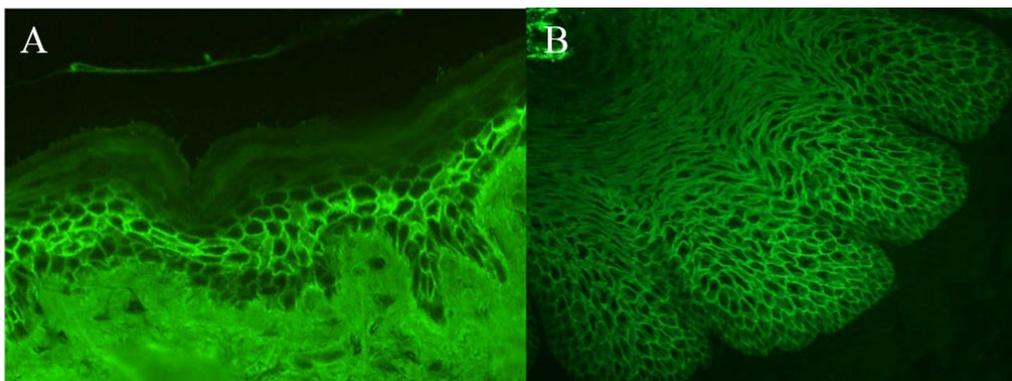


Abbildung 3. Direkte (DIF) und indirekte (IIF) Immunfluoreszenz

A) DIF, netzförmige IgG-Ablagerung auf der Zelloberfläche von epidermalen Keratinozyten. B) IIF, charakteristische Fluoreszenz auf der Zelloberfläche im Affenösophagusgewebe. Quelle: Klinik Dermatologie und Allergologie, Universitätsklinikum Marburg.

Durch die Analyse der Patientenseren mittels kommerziell erhältlichen ELISA-Kits kann man spezifische IgG gegen Dsg3 und Dsg1 nachweisen (**Hertl et al, 2015; Murrell et al, 2020; Waschke et al, 2008**).

4.6 Therapieansätze des Pemphigus vulgaris

In den meisten Fällen erfolgt die Therapie des PV mit systemischen Kortikosteroiden, welche über die Hemmung der proinflammatorischen Zytokine wirken (**Didona et al, 2019**). Initial besteht die Behandlung in der Verabreichung hochdosierter Kortikosteroide, die genaue Dosierung berechnet sich wie folgt: 1,0 – 1,5 mg/kg Körpergewicht [KG]/d Prednisolonäquivalent. Die systemische Therapie wird im Laufe der Zeit reduziert. Sollte der Patient eine unzureichende klinische Verbesserung auf das letztgenannte Therapieschema aufweisen, kann die Einleitung hochdosierter intravenöser Immunglobuline (IVIg) in Erwägung gezogen werden. Dem ist ebenso zu folgen, wenn ein rasch progredientes ausgeprägtes Krankheitsbild auftritt (**Eming et al, 2015; Hertl et al, 2015**). Als steroidsparende Medikamente werden adjuvante Immunsuppressiva, meist Azathioprin, Mycophenolatmofetil, Cyclophosphamid oder Methotrexat eingesetzt. Die Anwendung von Rituximab wird zunehmend bereits als First-Line-Therapie eingesetzt. Es handelt sich um einen chimären monoklonalen gegen CD-20-T-Zellen gerichteten Antikörper. Der Wirkmechanismus von Rituximab beruht auf der Reduktion von anti-Dsg3 und anti-Dsg1-IgG produzierenden B- Zellen bei PV Patienten (**Joly et al, 2017; Amber et al, 2018; Hofmann et al, 2018**).

4.7 Immunpathologie des Pemphigus vulgaris

Da PV durch eine autoimmune Antwort verursacht wird, können bei Betroffenen Ig- Autoantikörper und autoreaktive T- und B-Zellen im peripheren Blut nachgewiesen werden. Autoreaktive Antikörper sind beim PV gegen die extrazelluläre Domäne (Dsg3 ECD1-5₍₁₋₅₆₆₎) des Dsg3 gerichtet (**Amagai et al, 1999; Harman et al, 2001; Müller et al, 2006; Müller et al,**

2008). Einige Patienten, die zusätzlich anti-Dsg1-Antikörper besitzen, entwickeln Haut- und Schleimhaut-Beteiligung. Hinsichtlich seines biochemischen Ursprungs lässt sich Dsg3 als ein integrales, transmembranöses Protein beschreiben, das zur Gruppe der desmosomalen Cadherine gehört und einen strukturellen Bestandteil von Desmosomen darstellt (**Hammers et al**, 2016; **Karpati et al**, 1993). Es lässt sich sowohl im Stratum basale als auch im Stratum spinosum finden. Außerdem ist Dsg3 auch im Follikel der Haare mit Verankerungsfunktion lokalisiert (**Koch et al**, 1998). Dsg3 kann nicht nur als ein Strukturprotein sondern auch als ein Rezeptor und Regulator verschiedener intrazellulärer Signalwege betrachtet werden (**Spindler et al**, 2013; **Tsang et al**, 2010; **Tsang et al**, 2012). Die Krankheitsaktivität des PV korreliert im Allgemeinen mit der im Serum befindlichen anti-Dsg3-Antikörper-Konzentration (**Li et al**, 2015). Zwei Untertypen von Antikörpern sind in der PV Pathogenese involviert: IgG4 und IgG1. IgG4-Antikörper stellen den vorherrschenden Autoantikörpersubtyp bei aktiven PV Patienten dar, IgG1 Antikörper sind vor allem bei Patienten in Remission zu finden (**Yeoh et al**, 2019). Die Tatsache, dass im Serum von PV Patienten Antikörper mit unterschiedlichen Spezifitäten nachgewiesen werden können, liefert den Beweis für den polyklonalen Charakter der Immunantwort bei PV (**Saito et al**, 2012). Der durch die Bindung von anti-Dsg3-IgG an Desmosomen bedingte Verlust der desmosomalen Adhäsion führt letzten Endes zur Blasenbildung. Darüber hinaus verursacht die Antikörperbindung die Produktion und Sekretion proinflammatorischer Zytokine, wie Interleukin-1 (IL-2) und Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), die ihrerseits zur Akantholyse beitragen (**Sajda et al**, 2018). Es wurde zudem festgestellt, dass die transplazentare Übertragung von IgG-Autoantikörpern bei Neugeborenen klinische Symptome verursachen kann (**Wu H et al**, 2000; **Splinder et al**, 2018).

4.7.1 T-Zellen

Eine zentrale Rolle in der Pathogenese des PV ist den T-Zellen zuzuschreiben. Dabei können im Blut von PV-Patienten sowohl Dsg3-spezifische T-Helfer (Th) 1 als auch Th2 Zellen detektiert werden (**Hertl et al**, 2006; **Veldman**

et al, 2012). Die Bindung spezifischer Dsg3- Epitope an spezifische HLA-Allele ist entscheidend, um die Initiierung und die Aufrechterhaltung der autoimmunen Prozesse zu bedingen. Nicht nur in Assoziation mit HLA- Klasse II - HLA-DRB1 *04:02 sondern auch mit HLA-DQB1 *05:03 können die Dsg3-Peptide präsentiert werden. Die Aktivierung beider Th-Zell-Subpopulationen erfolgt vor allem durch Th2 abhängige Zytokine, die Interleukine (IL-4, IL-5, IL-13) (**Hertl et al**, 1999; **Hertl et al**, 2000). Die Produktion des IgG4-Subtyps bei akut erkrankten Patienten ist Th2-Zell abhängig. Dagegen erfolgt die IgG1 Produktion durch die Aktivierung von Th1-Zellen (**Brandt et al**, 2012). Ausschlaggebend ist hierbei der Umstand, dass die zentrale Toleranz, die während der Entwicklung von T-Zellen im Thymus erfolgt, bei PV-Patienten gestört ist. Entkommen autoreaktive T-Zellen der negativen Selektion des Thymus, so sind im Regelfall CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ regulatorische T-Zellen für ihre periphere Kontrolle zuständig (**Sugiyama et al**, 2007). Bei PV kann eine Verminderung dieser regulatorischen T-Zellen im peripheren Blut nachgewiesen werden (**Amber et al**, 2013; **Bjorkman et al**, 1987; **Hennerici et al**, 2016).

4.7.2 B-Zellen

Die Aufgabe der B-Zellen in der Pathogenese des PV ist aus zweierlei Sicht zu betrachten. Einerseits produzieren B-Zellen nach der Differenzierung in Plasmazellen IgG-1-Antikörper, die eine entscheidende Rolle in der PV-Pathogenese spielen (**Musette et al**, 2018), andererseits sind sie als antigenpräsentierende Zellen (APC) für die Aktivierung der T-Zell-Immunantwort verantwortlich (**Pierce et al**, 1988; **Rossetti et al**, 2018). Die Antigenpräsentation erfolgt auf der Zelloberfläche durch den das Antigen bindenden MHC-Klasse-II-Komplex, wodurch es zu der Aktivierung der T-Zellen kommt. Aktivierte B-Zellen können somit zusätzlich andere, noch nicht aktivierte T-Zellen anregen und somit die Immunantwort verstärken (**Ma et al**, 2019). Das Zusammenspiel mit T-Helferzellen führt durch die Zytokin-Produktion zur Generierung von B-Gedächtniszellen, die entscheidend für das Andauern des autoimmunen Prozesses sind. Die B-Gedächtniszellen, wie CD19⁺ CD27⁺ B-Gedächtniszellen, halten die Kapazität, autoreaktive

Antikörper zu produzieren (Pollmann et al, 2019; Cho et al, 2019). Mit Hilfe immunhistologischer Färbungen wurde die Gegenwart von B-Zellen in PV assoziierten Läsionen entdeckt, vor allem von CD19+ B-Zellen und CD138+ Plasmazellen. Die Fähigkeit zur Produktion von anti-Dsg3-Antikörpern bleibt den Immunzellen aus der läsionalen Haut erhalten, auch wenn diese in Kultur angesetzt werden. (Yuan et al, 2017).

4.8 Pemphigus vulgaris und Humane Leukozyten Antigene

Unter dem Begriff HLA werden die sogenannten MHC-Antigene bei Menschen zusammengefasst (Terasaky et al, 1990). Generell sind die MHC-Moleküle hochgradige, polymorphe an der Zelloberfläche exprimierte Heterodimere. Die HLA-Gene sind auf dem kurzen Arm des menschlichen Chromosoms 6 lokalisiert (6p21.1-6p21.3) und lassen sich in drei Teile unterteilen: MHC-Klasse-I, MHC-Klasse-II und MHC-Klasse-III-Allele. Der Abbildung 4 ist die gesamte Struktur vom HLA-Komplex zu entnehmen (Sung et al, 2007).

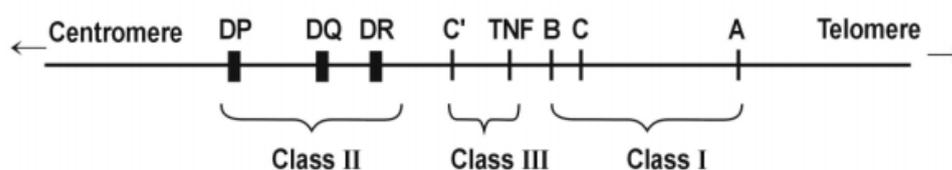


Abbildung 4. Struktur des Humanen Leukozyten-Antigen-Systems

Die Gene des HLA-Systems liegen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6. Am telomeren Ende liegen die HLA-Klasse-I-Antigene, am centromeren Ende die HLA-Klasse-II, dazwischen befinden sich HLA-Klasse-III-Antigene. Quelle: (Sung et al, 2007).

Die MHC-I-Moleküle befinden sich auf den Zelloberflächen kernhaltiger Körperzellen und werden von zytotoxischen T-Zellen erkannt. MHC-I-Moleküle sind Heterodimere und bestehen somit aus zwei Polypeptidketten - einer 45 kDa schweren α -Kette, die mit dem β -Mikroglobulin (12 kDa) durch eine nicht kovalente Bindung verbunden ist (Ferm et al, 1991). Auf der α -Kette lassen sich drei Domänen (α_1 , α_2 und α_3) erkennen, die in den extrazellulären Raum herausragen. α_1 - und α_2 -Domänen bilden zusammen einen Spalt, der Peptide einer Länge von 8 bis 12 Aminosäuren binden kann (Abb.5). Die Antigenpräsentation mittels MHC-Moleküle ist von der primären Lokalisation des Antigens abhängig. Peptide, die an MHC-I-Moleküle binden, stammen von intrazellulären Proteinen ab. Bei diesen Proteinen handelt es sich meistens um virale und tumoröse Antigene (Shawar et al, 1990; Sloan et al, 2002). MHC-II-Moleküle werden in Assoziation mit prozessierten Antigenen als Komplexe auf der Zelloberfläche antigenpräsentierender Zellen wie dendritischer Zellen und B-Zellen exponiert und von TCR der Th-Zellen erkannt. In ihrem molekularen Aufbau ähneln MHC-II-Moleküle prinzipiell den MHC-I Molekülen. Sie werden im Lumen des endoplasmatischen Retikulums synthetisiert und bestehen aus zwei Transmembranproteinketten, α und β , die zusammen die antigenbindende Grube bilden. Theoretisch können die MHC-Klasse-II-Moleküle Peptide von 13 bis 25 Aminosäuren binden, obgleich die Länge der gebundenen Peptide nicht beschränkt ist (Wieczorek et al, 2017) (Abb.5). Bevor das zu präsentierende Antigen an das MHC-II gebunden werden kann, durchläuft es zunächst als exogenes Protein den Prozess der Endozytose durch die antigenpräsentierenden Zellen. Indessen gelangen MHC-II-Moleküle über das Trans-Golgi-Netzwerk in das endosomale / lysosomale Kompartiment, wo nun die Bindung zwischen reifen MHC-II Komplexen und endozytierten Antigenen erfolgen kann. Der so entstandene MHC-II-Peptid Komplex wird letztlich an die Zelloberfläche transportiert und dort den CD4+ T-Zellen präsentiert (Sadegh-Nasseri et al, 2015). Um eine T-Zelle vollständig aktivieren zu können, müssen zwei Voraussetzungen gegeben sein: 1) der T-Zell-Rezeptor (TCR) der T-Zelle muss zusammen mit den Ko-Rezeptoren CD4 oder CD8 an den MHC-Komplex der APC binden. 2) eine Ko-Stimulation muss stattfinden (Gascoigne et al, 2010).

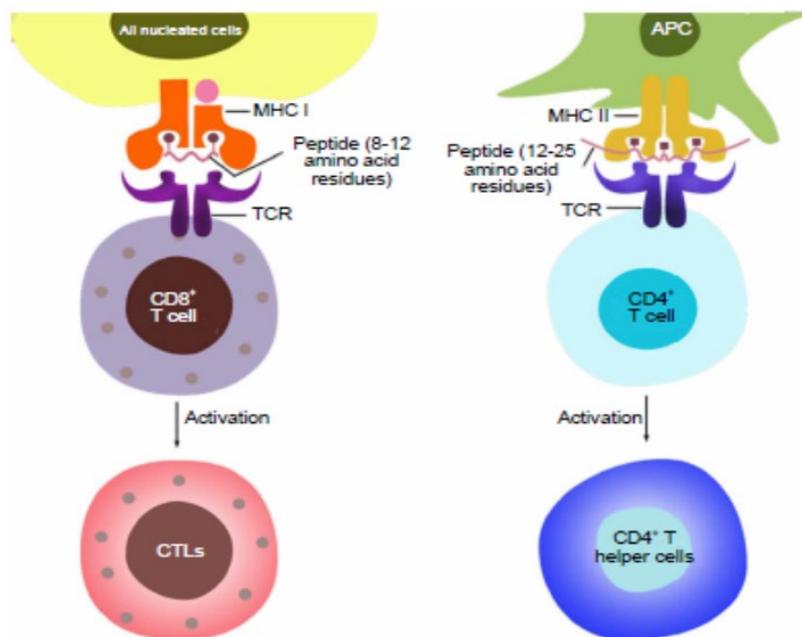


Abbildung 5. Unterschiede in MHC-Antigen-TCR-Bindung von CD4+- und CD8+-T- Zellen

Die klassische Antigenerkennung benötigt entweder den CD4 oder den CD8 Ko- Rezeptor, um mit dem peptidpräsentierenden MHC-I- bzw. MHC-II-Molekül interagieren zu können. MHC-I-Moleküle können in der Regel Peptide binden, welche aus 8 – 12 Aminosäuren bestehen. MHC-II-Moleküle können Peptide binden, die in ihrer Länge zwischen 12 und 25 Aminosäuren variieren, weil die Bindungsgrube für das Peptid an beiden Seiten offen ist, im Vergleich zu MHC-I, bei dem die Bindungsgrube geschlossen ist. Quelle: (Tokuyasu et al, 2018).

Wie bei vielen Autoimmunerkrankungen kann man einen Zusammenhang zwischen HLA- Genen und PV finden. Mehrere Studien haben die HLA-Häufigkeit bei jeder Population beschrieben (Yan et al, 2012; Zivanovic D, 2016)). In Abbildung 6 ist die Prävalenz von verschiedenen HLA-Klasse II-Allelen bei Pemphigus Patienten in verschiedenen Regionen der Welt dargestellt (Vodo et al, 2018).

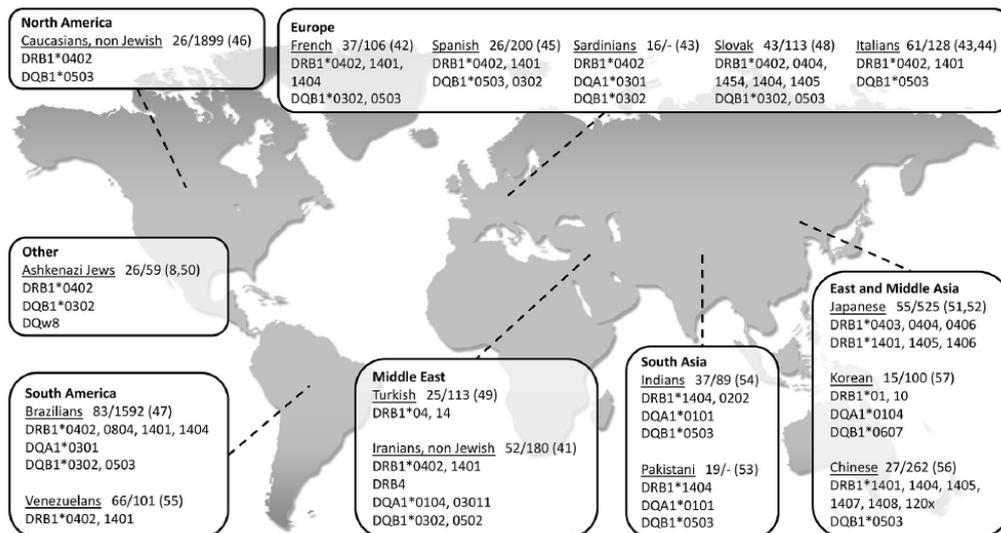


Abbildung 6. PempHigus vulgaris-assozierte-HLA-Klasse-II-Allele weltweit

Geographische Karte mit Häufigkeit von PempHigus vulgaris-assozierten -HLA-Klasse-II- Allele bei verschiedenen Populationen. Quelle: (Vodo et al, 2018).

Der Zusammenhang zwischen PV und HLA-Klasse II wurde bereits durch mehrere Studien belegt (Ahmed et al, 1990; Lee et al, 2006, Zhang et al, 2019). Wie in Abb. 6 dargestellt, sind viele HLA-Klasse II-Allele für bestimmte Populationen spezifisch. In der italienischen, spanischen, französischen, slowakischen, brasilianischen und amerikanischen Bevölkerung wurde eine starke PV-Assoziation mit den Allellen DRB1*04:02 und DQB1*05:03 aufgezeigt. In der jüdischen Population wurde ein Zusammenhang zwischen PV und HLA-DRB1*04:02 festgestellt. Obwohl beim Auftreten von PV die Assoziation mit HLA-Klasse-II die am stärksten belegte ist, ist ein Zusammenhang mit HLA-Klasse-I-Molekülen ebenfalls feststellbar. Viele Studien haben gezeigt, dass einige chinesische Patienten HLA-A3,-A26 und -B60 besitzen, stattdessen kommen HLA-B38,-C12,-B57 und - C15 bei der brasilianischen Population häufiger vor (Vodo et al, 2018, Ahmed et al, 1990; Ahmed et al, 1991). In der vorliegenden Arbeit wurden vier Dsg3-Peptide ausgewählt, welche die höchste Bindungsaffinität den T-Zellenrezeptoren gegenüber

besitzen und deren HLA- DRB1*04:02-Restriktion von mehreren Studien bewiesen wurde (**Wucherpfennig et al**, 1995; **Tong et al**, 2006; **Eming et al**, 2014). Dsg3_(aa190-204)-, Dsg3_(aa206-220)- und Dsg3_(aa254-268)- liegen in den extrazellulären Domänen 1 und 2 (EC1-2), Dsg3_(aa378-392) befindet sich hingegen in der extrazellulären Domäne 3 (ED3) (**Veldman et al**, 2004).

4.9 Humane Leukozyten Antigen-Dextramer

Die Färbung mittels Peptide-MHC-Dextramer (pMHC-Dextramer) ermöglicht es, spezifische TCR und damit für ein bestimmtes Antigen spezifische T-Zellen mittels Durchflusszytometrie zu detektieren (**Massilamany et al**, 2015). pMHC-Dextramer besteht aus zwei Teilen: eine Kette aus Dextran mit zehn gebundenen MHC- Klasse II-Peptid-Komplexen und die chromogenen Moleküle. In dieser Arbeit wird HLA-Klasse II-DRB1*04:02-Dsg3-Peptid-Dextramer verwendet (Abb.7). Durch Konjugation der Dextramer-Komplexe an ein fluoreszierendes Molekül (im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden mit Phycoerythrin (PE) konjugierte Dextramere eingesetzt) können die spezifisch gebundenen T-Zellen im Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS) analysiert und sortiert werden (**Bethune et al**, 2018; **Dolton et al**, 2018). Die pMHC- Dextramere enthalten ein einziges definiertes Peptidepitop und binden sehr effizient an T- Zellen, deren Rezeptoren für das eingesetzte HLA-Klasse II-DRB1*04:02-Dsg3-Peptid spezifisch sind. Die zehn gleichzeitig bindenden pMHC-Moleküle verstärken die schwache Wechselwirkung zwischen TCR und HLA-Klasse II, sodass die schwache Bindungsaffinität kein Problem mehr darstellt. Um die Bindung zwischen TCR und HLA-Klasse II zu stabilisieren, wurden zusätzlich anti-Phycoerythrin-Antikörper angesetzt. Detektion und Visualisierung Antigen-spezifischer T-Zell-Subpopulationen stellt in der Tat die häufigste Anwendungsindikation von Dextrameren dar. Diese Methode liefert die Frequenzen Epitop- spezifischer CD4 T-Zellen in einer mit Interleukin-2 (IL-2) stimulierten Zellpopulation und ermöglicht die Phänotypisierung der Zellen (**Dolton et al**, 2018).

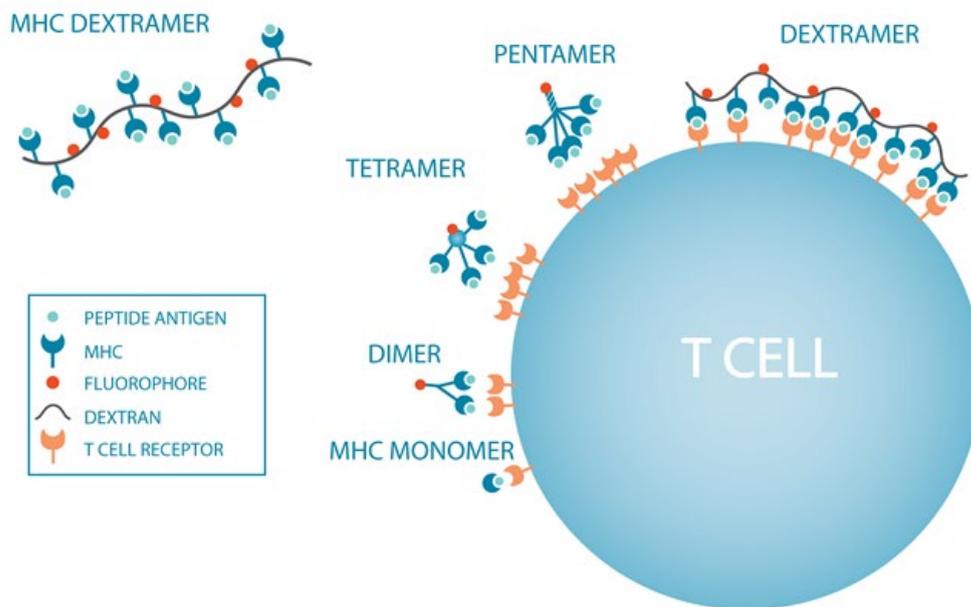


Abbildung 7. MHC-Peptid-Dextramer Interaktion mit dem T-Zell-Rezeptor

Die verwendeten Dextramer-Moleküle bestehen aus zehn HLA-DRB1*04:02-Klasse II-Dsg3- Peptid-Komplexen; die gleichzeitige Bindung von zehn Komplexen auf der Zelloberfläche hebt die relative Avidität der Dextramer-TCR Interaktion im Vergleich zu den anderen Multimer-Molekülen an. Quelle: (<https://www.immudex.com/technology/dextramer-technology/mhc-dextramer.aspx>)

4.10 Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrie dient zur Unterscheidung und Analyse von Zelleigenschaften wie Größe, Granularität und Expression von Oberflächenmolekülen. Außerdem ermöglichen durchflusszytometrische Methoden eine hochsensitive und quantitative Analyse

membranständiger Oberflächenantigene und sind daher gut zur Untersuchung der an einem Entzündungsprozess beteiligten Immunzellen z.B. Lymphozyten geeignet. Um eine durchflusszytometrische Messung vorzunehmen, sind die Zellen als Suspension aufzubereiten. Die Zellen wurden durch mehrere hintereinander geschaltete Laser analysiert. Durch Filtereinheiten wird die Lichtemission geleitet und an nachgeschalteten Detektoren gemessen. Dabei kann das Fluoreszenzlichtsignal bestimmt werden wie die Intensität gebundener Oberflächenantikörper und intrazellulär gebundener Antikörper (**Adan et al**, 2017). Bei neuen Multicolor-Durchflusszytometern kann man meistens verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig verwenden. Das resultierende Signal wird durch Farbfilter getrennt und durch verschiedene Detektoren gemessen. Die meisten der Fluoreszenzfarbstoffe strahlen eine Farbe nicht streng aus, sondern ein ganzes Spektrum. Daher bewirkt das Fluoreszenzsignal eines Farbstoffs einen Impuls, der nicht nur in dem vorgesehenen Detektor, sondern auch in den anderen Detektoren (z.B. das Fluorochrom FITC führt nicht nur zur Emission von grünem Licht, sondern auch zur Emission von rotem Licht) bestimmt wird (**Maciorowski et al**, 2017). Dieser Effekt beeinträchtigt die Beurteilung der Ergebnisse, sodass man nicht erfassen kann, welcher Farbstoff das Signal des Detektors verursacht hat. Dies führt zu einer Verfälschung der einzelnen Parameter, da ein Detektor nicht nur das Signal eines Farbstoffs misst, sondern zu geringen Anteilen auch die der anderen Farbstoffe. Diese Art der Überlappung ist bei der Signalprozessierung elektronisch durch Kompensation zu vermindern, um eine richtige Auswertung der Messungen zu erreichen (**Roederer et al**, 2002). Durch die Kompensation ist es möglich, die Emissionsspektren der einzelnen Farbstoffe möglichst klar voneinander zu trennen. Zur Qualitätskontrolle und Erhaltung der Reproduzierbarkeit der Messungen ist es notwendig, eine Kalibrierung des Durchflusszytometers durchzuführen. Durch die Kalibrierung werden die Grundeinstellungen des Zytometers regelmäßig überprüft und justiert (**Kraan et al**, 2003).

5. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, die Dsg3-Peptid-Immunreaktivität peripherer spezifischer T-Zellen von PV-Patienten und gesunden Teilnehmenden mittels Multimer-Technologie zu untersuchen. Die Kohorte bestand aus 25 PV Patienten und 12 gesunden Probanden. Periphere mononukleäre Zellen wurden aus dem Blut durch Dichtegradientenzentrifugation-basierte Methode isoliert, in Kultur mit rekombinanten Dsg3_(aa1-566) stimuliert und nach der Dextramer-Färbung mittels Durchflusszytometrie untersucht. Im Wesentlichen basiert die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit auf zwei Hauptmotiven:

- Entwicklung eines *ex vivo* Assays, mit dessen Hilfe die Dsg3-Peptid-Immunreaktivität peripherer autoreaktiver T-Zellen überprüft werden kann.
- Untersuchung des Einflusses von Therapie und Krankheitsaktivität auf die Dsg3-Epitop Reaktivität peripherer T-Zellen.

Hierzu wurden HLA-Klasse II-DRB1*04:02-Dsg3-Peptid-Dextramere verwendet. Die Wahl der HLA-Klasse-II-Dextramere basiert auf epidemiologischen Studien, die zeigen, dass HLA- DRB1*04:02-Klasse II einer der häufigsten mit PV assoziierten Allele in der europäischen Bevölkerung ist, sowie auf einer Arbeit (**Eming et al**, 2014), in der die anti-Dsg3-Ig- Antikörper-Produktion nach Gaben von Dsg3-Peptiden getestet wurde und dadurch wurde indirekt die Stärke der Bindung zwischen TCR und HLA-Klasse II-Dsg3-Epitope untersucht. Durch die Anwendung von p-MHC-Dextrameren kann man die Antigen-spezifität von gegen Dsg3 gerichteten autoreaktiven T-Zellen und somit die Rolle einzelner Peptide bei der Entwicklung und der Erhaltung des PV untersuchen. Diese Arbeit könnte als Fundament zur weiteren Entwicklung der antigenspezifischen Immuntherapie dienen, wie z.B. Chimäre Antigenrezeptoren (CAR) Therapie. Dabei handelt es sich um eine Antigen-spezifische-Therapie, welche auf die Ausstattung der autologen T-Zellen mit synthetischen antigenspezifischen Rezeptoren CAR basiert.

6. Material und Methoden

6.1 Verbrauchsmaterial

Material	Firma
24- well Platte	Thermo Scientific, Denmark, Roskilde
Zentrifugationsröhrchen 15 ml	Sarstedt AG e Co. KG, Deutschland, Nümbrecht
Zentrifugationsröhrchen 50 ml	Sarstedt AG e Co. KG, Deutschland, Nümbrecht
Kryoröhrchen 2 ml	Greiner Bio-one, Deutschland, Frickenhausen
Serologische Pipette 5 ml	Sarstedt AG e Co. KG, Deutschland, Nümbrecht
Serologische Pipette 10 ml	Sarstedt AG e Co. KG, Deutschland, Nümbrecht
Serologische Pipette 25 ml	Sarstedt AG e Co. KG, Deutschland, Nümbrecht
DurchflusszytometrieRöhrchen 5 ml (FACS-Röhrchen)	Sarstedt AG e Co. KG, Deutschland, Nümbrecht
Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin (CPDA) Röhrchen 8,5 ml (S- Monovette)	Sarstedt AG e Co. KG, Deutschland, Nümbrecht
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld, Deutschland, Lauda-Königshofen
Gefrierbehälter, Thermo Scientific™ Mr. Frosty™	Fisher Scientific, Deutschland, Schwerte

6.2 Chemikalien

Gruppe	Produkt	Firma
PBMC isolation, Einfriere n und Auftauen von Zellen, Zellkultu ren	Dulbecco's Phosphate buffered saline (PBS) Ca/Mg, Phenol (steril/filtered)	Capricorn Ebsdorfergrund, Scientific Deutschland
	Roswell Park Memorial Institute (RPMI) Medium 1640	Capricorn Ebsdorfergrund, Scientific Deutschland

	Fetal Bovine Serum (FBS) Superior (Standardized tested for virus and mycoplasma tested for endotoxin)	Biochrom, Deutschland, Berlin
	Penicillin/Streptomycin with L-Glutamin (100x)	Capricorn Ebsdorfergrund, Scientific Deutschland
	Trypanblau (Gibco -Lösung, 0.4 %)	Fisher Scientific, Deutschland, Schwerte
	2-Propanol (≥ 99,8)	Sigma Aldrich, Deutschland, Steinheim
	Lymphocytes Separation Media (Density 1.077 g/ml)	Capricorn Ebsdorfergrund, Scientific Deutschland
	Dimethylsulfoxid (± 99,5 %)	Carl Roth, Deutschland, Karlsruhe
	Wasch Medium für PBMC (CTL Anti Aggregate Wash Medium)	Immun Spot, USA, Shaker Heights;
Dextramere-Färbung, FACS-Messung	Paraformaldehyde (PFA) pure	SERVA Electrophoresis, Deutschland, Heidelberg
	Proteinkinase-Inhibitor (PKI) (Dasatinib 99,9 %)	Axon Medchem, Niederlande, Groningen
	Zombie-NIR (Fixable Viability kit)	Biolegend, Deutschland, USA, San Diego
und ELISA-Assay	Fetal Bovine Serum (FBS) Superior (Standardized tested for virus and mycoplasma tested for endotoxin)	Biochrom, Deutschland, Berlin
	Dulbecco's Phosphate buffered saline (PBS) (9,55 g / L) Pulver	Applichem, Deutschland, Darmstadt
	FACS-Flow	BD, Deutschland, Heidelberg
	FACS-Rinse	BD, Deutschland, Heidelberg
	FACS-Clean	BD, Deutschland, Heidelberg

Kalibrierungsbeads (CS&T Research Beads)	BD, Deutschland, Heidelberg
Magermilchpulver (A0830,0500)	PanReac Applichem, Deutschland, Darmstadt

6.3 Puffer und Medien

Medien/ Puffer	Komposition
Medium für Kultur	RPMI 1640 (w/o L-Glutamin) + 10 % FBS + 1% Penicillin/Streptomycin with 1% L-Glutamin
Einfriermedium	90 % FBS + 10 % DMSO
FACS-Puffer	PBS + 5% FBS
PFA 1%	PBS + PFA 1%

6.4 Antikörper

Antigen	Konjugat	Klon	Isotyp	Firma
CD45	AF700	2D1	Maus IgG1	Biologend, USA, San Diego
CD19	FITC	Hib19	Maus IgG1	Biologend, USA, San Diego
CD14	APC	M5E2	Maus anti-Human	BD Pharmingen, Heidelberg
CD3	PerCP-Cy5.5	SK7	Maus IgG1	Biologend, USA, San Diego
CD4	BV510	RPA-T4	Maus IgG1	Biologend, USA, San Diego
Iso CD4	BV510	MOPC-	Maus IgG1	Biologend, USA, San Diego
CD8	PE / Cy7	SK1	Maus IgG1	Biologend, USA, San Diego

PE (phycoerytrin)	nicht konjugiert	PE001	Maus IgG1	Biolend, USA, San Diego
Human IgG4	- nicht konjugiert	G17-4	Maus IgG1	BD Pharmingen, Heidelberg
Human IgG1	- nicht konjugiert	G17-1	Maus IgG2b	BD Pharmingen, Heidelberg
Maus-IgG	HRP	polyklonal	Kaninchen IgG	DAKO, Denmark, Glostrup

6.5 Proteine

Protein	Herkunft
IL-2 (Rekombinant E.Coli)	Roche Diagnostic, Deutschland, Mannheim
Desmoglein 3 (Extrazelluläre Domäne aa 1-566)	Baculovirus Expression-System (Hertl M et al, 1998)

6.6 Kit

Name	Inhalt	Firma
Anti-Desmoglein 3-ELISA (IgG) (zur Detektion von Dsg3- extrazelluläre Domäne _(aa1-566))	Antigen-beschichtete Reagenzgefäße (Format 6 x 8)	Euroimmun, Deutschland, Lübeck
	Kalibrator 3; 2 RE/ml (IgG, human gebrauchsfertig)	
	Positive Kontrolle (IgG, human gebrauchsfertig)	
	Negative Kontrolle (IgG, human gebrauchsfertig)	
	Enzymkonjugat (Peroxidase-markiertes Anti-Human-IgG, aus Kaninchen, gebrauchsfertig)	
	Probenpuffer (gebrauchsfertig)	

Waschpuffer (10fach konzentriert)	
Chromogen/Substrat-Lösung(TMB/H ₂ O ₂ , gebrauchsfertig)	
Stopplösung (0,5 M Schwefelsäure, gebrauchsfertig)	

6.7 Dextramer

Name	Beschreibung	Firma
PE-Dextramer HLA-DRB1*04:02-Dsg3-Peptide	DRB1*04:02 / LNSKIAFKIVSQEPA / PE [als Peptid 1 (P1) in der vorliegenden Arbeit bezeichnet]	Immudex, Denmark, Kopenhagen
	DRB1*04:02 / TPMFLLSRNTGEVRT/ PE [als Peptid 2 (P2) in der vorliegenden Arbeit bezeichnet]	
	DRB1*04:02 / REGIAFRPASKTFTV/ PE [als Peptid 3 (P3) in der vorliegenden Arbeit bezeichnet]	
	DRB1*04:02 / NIKVKDVNDNFPMFR / PE [als Peptid 4 (P4) in der vorliegenden Arbeit bezeichnet]	
	DRB1*04:02 / PVSKMRMATPLLMQA / PE [als class-II-associated invariant chain peptide , (CLIP) in der vorliegenden Arbeit bezeichnet]	

6.8 Zellen

Zellen	Ursprung
Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)	Immun Spot, USA, Shaker Heights
	PV-Patienten, gesunde Spender, buffy coat

6.9 Laborausstattung

Gerät	Firma
Pipettboy (Pipetus-Akku)	Hirschmann Laborgeräte, Deutschland, Eberstadt
Binokular invertoskop (ID 03)	ZEISS, Deutschland, Jena
Binokular Durchlichtmikroskop (Axiostar)	ZEISS, Deutschland, Jena
Eppendorf-Zentrifuge (5415C)	Eppendorf, Deutschland, Wessling-Berzdorf
Zentrifuge (Rotina 420 R)	Andreas Hettich, Deutschland, Tuttlingen
Wasserbad (GFL 1083)	HERAEUS, Deutschland, Hanau
Incubator (Heracell 150)	HERAEUS, Deutschland, Hanau
Durchflusszytometer (BD LSRFortessa)	BD, Deutschland, Heidelberg
Microplatte Readers (Sunrise)	TECAN, Schweiz, Männedorf
Kühlschrank (+4°C) (Glass line)	Liebherr, Deutschland, Buseck
Gefrierschrank (-20°C) (Premium No Frost)	Liebherr, Deutschland, Buseck
Gefrierschrank (-80°C) (Herafreeze HFU-Basic Serie)	HERAEUS, Deutschland, Hanau
Stickstofftank Chronos 200 (-197°C)	Cryotherm, Deutschland, Kirchen (Sieg)

6.10 Software

Software	Firma
BD FACS Diva	BD, Deutschland, Heidelberg
MAGELLAN	TECAN, Schweiz, Männedorf
GraphPad Prism 6	GraphPad Software, USA, San Diego
Microsoft Office 2013	Microsoft, USA, Redmond

6.11 Studienaufbau

Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät Universität Marburg begutachtet und zugelassen (Az. Studie 20/14). Alle Patienten und gesunde Kontrollen gaben eine schriftliche

Einverständniserklärung zur Teilnahme, nach mündlicher und schriftlicher Aufklärung über die Studie, Ziele, Art der Untersuchung und mögliche Risiken. Diese Zustimmung konnten die Patienten und gesunde Spender jederzeit zurückziehen. Die Studie wurde in der Uniklinik der Universität Marburg durchgeführt. Insgesamt wurden 52 Patienten (Tabelle 1) mit PV rekrutiert, die nach EDF/EADV-Richtlinien diagnostiziert wurden (**Hertl et al**, 2015) aber nur PBMC von 25 PV Patienten wurden mittels Dextramer Färbung untersucht. Ferner nahmen vier Probanden als Kontrollgruppe an der Studie teil. Zur Erweiterung der Kontrollgruppe wurden periphere mononukleare Zellen (PBMC) von sechs HLA-typisierten und zwei HLA nicht typisierten gesunden Spendern verwendet (Tabelle 2). PBMC aller Probanden wurden mittels Dextramer Färbung untersucht. Von allen Studienteilnehmern wurden acht CPDA-Röhrchen pro Patienten (jeweils ca. 8 ml venöses Blut pro Röhrchen) im Rahmen von Routineuntersuchungen abgenommen. Im Folgenden werden die Ein- und Ausschlusskriterien, die bei der Auswahl des Probandenkollektivs zur Anwendung kamen, dargestellt.

6.11.1 Patienteneigenschaften

- Geschlecht: männlich oder weiblich
- Folgende Kriterien zur PV-Diagnose erfüllt:
 - Blasen und/oder Erosionen der Haut/Schleimhaut zum Zeitpunkt der Abnahme oder zu einem früheren Zeitpunkt.
 - Direkte Immunfluoreszenz der Haut bzw. Schleimhaut: in vivo gebunden anti- epitheliale IgG Antikörper
 - Detektion von anti-Ig-Dsg3 Antikörper-Titer im Serum von PV-Patienten mittels ELISA (<20 relative Einheiten (RE) / ml).
- Bei aktiven Patienten handelt es sich um akuten und chronischen Patienten, welche sich mit frischen Blasen und/oder Erosionen auf der Haut bzw. auf der Schleimhaut vorgestellt haben, unter oder ohne immunsuppressive Therapie (**Hertl et al**, 2015; **Veldman et al**, 2004).
- Als sich in Remission befindend wurden Patienten bezeichnet, die keine bereits untersuchte oder neue Blasen und/oder Erosionen

seit ≥ 6 Monaten aufwiesen, unter oder ohne immunsuppressive Therapie.

6.12 Studienablauf

Bei jedem Patienten wurden 8 CPDA-Röhrchen (jeweils ca. 8 ml peripheres venöses Blut) abgenommen. Am selben Tag wurde die Isolation peripherer mononuklearer Zellen (PBMC) durchgeführt, die über Nacht bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt und am Tag danach in flüssigem Stickstoff zur langfristigen Aufbewahrung gelagert wurde. Bei Bedarf wurden die PBMC aufgetaut und die Zellkultur mit rekombinanten Dsg-3₍₁₋₅₆₆₎ angesetzt. Zur Expansion der T-Zellpopulationen wurde IL-2 hinzugegeben. Am Tag 10 wurden die Zellen mittels Dextramer-Assay gefärbt und am darauf folgenden Tag wurde die durchflusszytometrische Messung durchgeführt (Abb. 8).

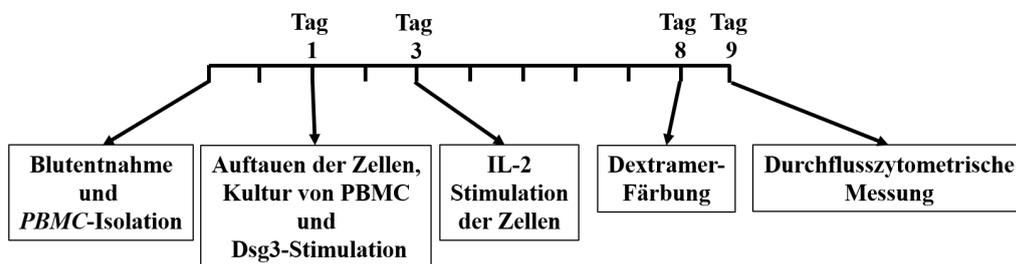


Abbildung 8. Versuchsaufbau

Die Abbildung veranschaulicht den zeitlichen Verlauf der Studie. Zunächst wurden acht CPDA-Röhrchen pro Patienten entnommen, am selben Tag wurde die PBMC-Isolation durchgeführt und die Zellen wurden mindestens einen Tag bei -80°C gelagert. Bei Bedarf wurden die Zellen aufgetaut (Tag 1), plattiert und dem rekombinanten Dsg-3_(aa1-566) hinzugegeben (Tag 3). Am Tag 3 erfolgte die Stimulation mit rekombinantem IL-2. Die Dextramer-Färbung erfolgte am Tag 8. Am Tag danach wurden die Proben in Durchflusszytometer gemessen.

6.13 Patientenkollektiv

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 25 PV-Patienten und 12 gesunde Probanden untersucht. Tabelle 1 und Tabelle 2 fassen alle für die Studie wichtigen Eigenschaften der Patienten und Probanden zusammen.

Tabelle 1. Übersicht der Pemphigus vulgaris Patienten

C	Krankheitsaktivität	anti-Dsg1 (RE/ml)	anti-Dsg3 (RE/ml)	Immunsuppressive Therapie (pro Tag)	HLA-DQB1*	HLA-DRB1*
1.	akut	0	1100	keine	n.b.	n.b.
2.	akut	n.b	n.b.	keine	n.b.	n.b.
3.	akut	n.b	n.b.	keine	n.b.	n.b.
4.	akut	0	1260	keine	n.b.	n.b.
5.	akut	n.b	n.b.	keine	n.b.	n.b.
6.	akut	65	1060	keine	n.b.	n.b.
7.	akut	29	1670	keine	n.b.	n.b.
8.	akut	0	95	keine	n.b.	n.b.
9.	akut	0	176	keine	n.b.	n.b.
10.	akut	63	990	keine	n.b.	n.b.
11.	akut	73	1160	keine	n.b.	n.b.
12.	akut	36	159	keine	n.b.	n.b.
13.	akut	0	1450	keine	n.b.	n.b.
14.	Remission	0	39	keine	n.b.	n.b.
15.	akut	22	880	keine	n.b.	n.b.
16.	Remission	0	30	keine	n.b.	n.b.
17.	akut	73	405	keine	n.b.	n.b.
18.	Remission	1	21	keine	05:03	13:01
19.	chronisch	3	210	Prednisone 5 mg	05:03	14:54
20.	chronisch	0	166	keine	01:02	07:01
21.	Remission	0	200	keine	03:02	04:02
22.	chronisch	0	72	Prednisone 30 mg	03:01	14:54
23.	Remission	0	191	keine	03:01	13:05
					04:02	08:04
24.	chronisch	2	35	Azathioprine 150 mg Prednisone 5 mg	05:03 06:03	13:01 14:01

25.	Remission	7	0	keine	05:01 05:02	01:02 14:01
26.	Remission	0	78	keine	05:03 06:03	13:01 14:01
27.	Remission	0	0	keine	06:03 03:02	04:02 03:01
28.	Remission	10	157	keine	05:03 03:02	04:02 14:01
29.	Remission	20	270	Prednisone 5 mg	03:01 03:02	04:02 11:01
30.	Remission	0	2	keine	03:01 03:02	04:02 11:01
31.	Remission	0	32	keine	03:01 03:02	04:02 11:04
32.	chronisch	0	20	keine	03:01 05:03	14:54 08:04
33.	Remission	5	4	keine	04:02 03:02	04:02 08:01
34.	Remission	2	3	keine	n.a.	n.a.
35.	Remission	3	683	keine	03:02 02:--	03:-- 14:--
36.	Remission	5	2	keine	03:02 05:03	14:-- 04:02
37.	akut	4	94	Prednisone 20 mg Azathioprine 100 mg	01:01 11:04	05:01 03:01
38.	chronisch	92	101	keine	n.b.	n.b.
39.	akut	11 7	20	Azathioprine 100 mg	05:03 06:03	13:01 14:04
40.	chronisch	0	0	Mycophenolate mofetil 2 g	03:01 03:02	04:02 11:04
41.	akut	18 6	178	Prednisone 25 mg	05:03 06:03	13:01 14:54

42.	Remission	7	153	Prednisone 7.5 mg	n.b.	n.b.
43.	Remission	3	334	keine	03:02 08:04	13:05 04:02
44.	Remission	n.b. .	n.b.	Rituximab 500 mg Prednisone 25 mg	n.b.	n.b.
45.	Remission	2	39	Prednisone 2 mg Methotrexate 15 mg per week	n.b.	n.b.
46.	Remission	n.b. .	n.b.	keine	n.b.	n.b.
47.	Remission	9	33	Prednisone 4 mg Mycophenolate	n.b.	n.b.
48.	Remission	4	66	Prednisone 5mg Ciclosporine 150 mg	n.b.	n.b.
49.	Remission	38 2	177	keine	05:03 05:01	01:01 14:54
50.	Remission	24 5	0	Prednisone 5 mg Mycophenolate mofetil 2 g	n.b.	n.b.
51.	Remission	9	643	keine	05:03 02:02	14:01 07:01
52.	n.b.	n.b. .	n.b.	n.b.	03:02 05:03	04:01 14:54

Tabelle 2. Übersicht der gesunden Spender

C	Ursprung	Alter	HLA-DQB1*	HLA-DRB1*
53	Buffy coat	n.b.	n.b.	n.b.
54	Buffy coat	n.b.	n.b.	n.b.
55	Rekrutierter Proband	73	n.b.	n.b.
56	Rekrutierter Proband	52	n.b.	n.b.
57	Rekrutierter Proband	54.	03:- 14:-	04:02 03:-

58	Rekrutierter Proband	80	03:02 02:-	04:02 14:01
59	Kommerziell erworbene PBMC	55	04:02 04:02	03:02 04:02
60	Kommerziell erworbene PBMC	55	04:02 04:02	13:05 04:02
61	Kommerziell erworbene PBMC	35	03:01 05:03	11:01 14:04
62	Kommerziell erworbene PBMC	43	05:03 06:04	13:02 14:54
63	Kommerziell erworbene PBMC	51	02:02 05:03	07:01 14:54
64	Kommerziell erworbene PBMC	40	03:01 05:03	04:05 12:02

6.14 Humanes Leukozyten Antigen- Klasse II- Allele- Bestimmung

Untersuchungen bezüglich der HLA-Klasse II-Allele der PV-Patienten und gesunder Spender erfolgten durch die Verwendung von DNA-Sequenzierung im Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin der Universität Gießen. Daneben verwendeten wir kommerziell erhältliche periphere mononukleare Zellen (PBMC), die vom Hersteller typisiert wurden (Probanden vom 59 bis 64 nach der Tabelle 2).

6.15 Blutentnahme

Die Blutentnahme bei den Patienten und gesunden Spendern erfolgte mittels CPDA- Blutröhrchen, die jeweils 1 ml Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin enthielten. Citrat verhindert eine vorzeitige Blutgerinnung. Phosphat-Dextrose-Adenin dient als Energielieferant für die Blutzellen.

6.16 Desmoglein 3-Antikörper-ELISA

Zur Bestimmung der anti-Dsg3 IgG Antikörper-Titer in Serumproben von PV Patienten wurden kommerziell erhältliche ELISA-Kits (Euroimmun, Anti-Desmoglein 3 ELISA) zum Einsatz gebracht. Als Cut-off für die anti-Dsg3-IgG Positivität wurde durch den Hersteller der Wert von 20 RE/ml festgesetzt. Zur Detektion von anti-Dsg3-IgG₁ und -IgG₄ bei PV-Patienten ohne Therapie wurde ein im Haus etablierter ELISA (Euroimmun, Anti-Dsg3_(aa1-566)-IgG) verwendet. Zusätzlich fanden murine anti-humane-IgG₁- und -IgG₄- IgG, die nicht an Enzyme gekoppelt sind, und HRP konjugierte anti-Mause-IgG-IgG (aus Kaninchen) als Detektion-Antikörper Anwendung. Je nachdem, ob die bereits gemessenen IgG-Titer von PV Patienten < 200 RE/ml oder > 200 RE/ml waren, wurden die Serum-Proben 1:101 bzw. 1: 400 mit Probenpuffer verdünnt. In jedes Well wurden 100 µl der jeweiligen Proben pipettiert und 30 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden alle Wells dreimal mit gebrauchsfertigem Waschpuffer gewaschen und nach dem letzten Dekantieren wurden die Platten ausgeklopft und die Wells-Ränder mit Papiertuch getrocknet. Infolgedessen wurden 100 µl anti-humane-IgG₁- und -IgG₄- IgG pro Well dazugegeben (6,25 ng/ml in PBS + 5 % Milch- Pulver). Nach einer erneuten 2 stündigen Inkubation bei Raumtemperatur, wurden die Wells noch dreimal wie bereits beschrieben gewaschen. Anschließend wurden 100 µl / anti-Mause- IgG (25 nM/L in Waschpuffer + 2% Magermilchpulver) pro Wells hinzugefügt und die Platten 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Entfernung nicht-gebundener Detektion- Antikörper wurden, wie oben erwähnt, alle Wells gewaschen. Als Substrat diente 100 µl Chromogen/Substrat-Lösung pro Well, die genau 15 Minuten im Dunkeln inkubiert wurde. Durch Zugabe von 100 µl Stopplösung wurde die Enzymreaktion beendet und die Proben direkt im Anschluss am Spektrophotometer bei 450 nm als Messwellenlänge und bei 650 nm als Referenzwellenlänge der Messung unterzogen.

6.17 Allgemeines hinsichtlich der Zellkultur

Zellkulturarbeit wird unter streng sterilen Bedingungen durchgeführt, um bakterielle Kontaminationen zu vermeiden. Die benutzten Verbrauchsmaterialien waren steril verpackt oder wurden autoklaviert und erst in der Sterilbank geöffnet. Benutzte Chemikalien entsprachen höchster Reinheit.

6.18 Produktion von rekombinantem Desmoglein 3-Protein

Das fertige rekombinante Dsg3-Protein lag bereits vor, seine Produktion wurde zuvor von Mitarbeitern des Labors „Dermatologische Forschung“ von Philipps-Universität Marburg durchgeführt. Zur Produktion von rekombinanten humanen Dsg-3_(aa1-566) wurden High-Five Insektenzellen mit einer Zelldichte von 3×10^8 plattiert, die Infektion der Zellen erfolgte mit PVhis baculovirus bei einer multiplicity of infection (MOI) von 10. Die Überstände der Baculovirus infizierten Zellkulturen wurden nach vier Tagen gesammelt, die Dsg3-Proteinaufreinigung erfolgte mittels nitriloacetic acid Agarose nach Herstellerhinweisen (Hertl et al, 1998).

6.19 Isolierung mononuklearer Zellen aus peripherem Blut

Alle folgenden Arbeitsschritte wurden unter der Sterilbank durchgeführt. Zunächst wurden die mit Blut von Patienten gefüllten CPDA-Röhrchen für 10 min bei 397 g und 22 °C mit Bremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation lagen folgende Phasen vor: Die obere Phase bestand aus Plasma, die untere Phase aus Zellsediment. Das Plasma wurde abpipettiert, aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Die untere Phase wurde mit PBS mit einem Verhältnis 1:1 verdünnt und langsam auf Lymphozyten-S-Media (Dichte: 1,077 g/ml) geschichtet. Durch die darauffolgende Zentrifugation bei 528 g,

30 min und 22 °C ohne Bremse wurden alle Bestandteile entsprechend ihrer Dichte aufgetrennt. Das Zellsediment bestand aus Erythrozyten und Granulozyten, die oberste Schicht aus Blutplasma und Thrombozyten. In der Mitte der obersten Schicht befand sich eine weiße Interphase, die PBMC-Schicht (Abbildung 9). Ferner wurden PBMC abpipettiert und zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Nach letztmaligem Dekantieren wurden die Zellen in RPMI resuspendiert und ausgezählt.

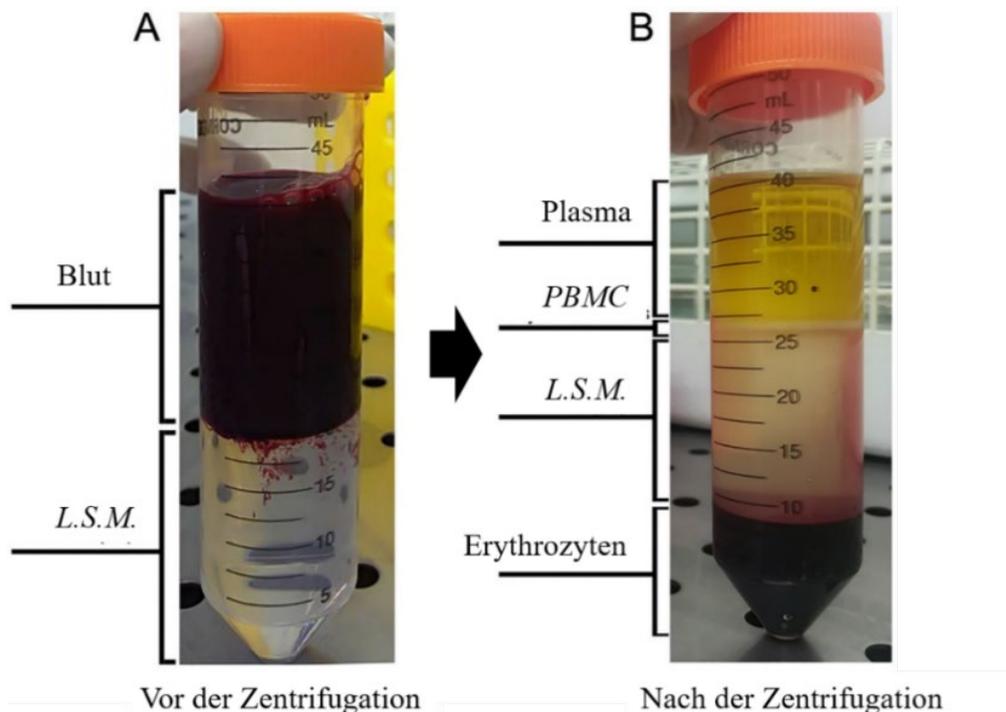


Abbildung 9. Isolierung von peripheren Blut-mononukleären Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation

A) Diluirtes Blut auf lymphocyte separation media vorsichtig geschichtet. B) Nach einer Zentrifugation bei 528 g, 22°C, 30 min lang mit ausgeschalteten Bremse erhielt man folgende Auftrennung (von unten nach oben): Erythrozytenpellet and Granulozyten, lymphocyte separation media-Schicht (L.S.M.), PBMC-Schicht, Plasma. PBMC-Schicht wurde vorsichtig abpipettiert und weiter bearbeitet. Quelle: (<https://bio-protocol.org/e3139>).

6.20 Zellzahlbestimmung

Im Anschluss erfolgte die Zellzahlbestimmung durch die Verwendung einer Neubauer Zählkammer. Die Zellen wurden mit einer Pipette unter sterilen Bedingungen durchmischt und 10 μ L der Zellsuspension wurde zu 10 μ l Trypanblau in einem Well (96 Plate-Wells) pipettiert, so dass die Verdünnung 1:2 betrug. Daraufhin wurden 10 μ l dieser Mischung auf eine Neubauer Zellzählkammer mit aufgelegtem Deckglas aufgetragen. Die Zellzahl wurde unter dem Lichtmikroskop in vier großen Quadranten bestimmt und dann die Mittelwerte errechnet. In der Berechnungsformel musste der Verdünnungsfaktor durch die Zugabe von Trypanblau berücksichtigt werden. Anschließend wurde die Zellzahl mit der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Mittelwerte} \times F \times 10^4 \times V$$

F= Verdünnungsfaktor (1:2)

V = Volumen (ml)

6.21 Kryokonservierte periphere Blut-Lymphozyten

Isolierte PBMC wurden in einer Konzentration von 1×10^7 /ml in Einfriermedium (RPMI + 10% DMSO) eingefroren. Nach der Bestimmung der Zellzahl folgte die Zentrifugation der Zellen für 10 min bei 397 g und 4 °C. Die zentrifugierten Zellen wurden in eiskaltem FCS resuspendiert. 0,5 ml des Einfriermediums wurden jeweils in Kryoröhrchen bei -20-°C vorgekühlt und mit 0,5 ml der PBMC-Suspension (= 1×10^7 Zellen) aufgefüllt. Die kryoröhrchen wurden zunächst über Nacht in einem mit 2-Propanol gefüllten Gefrierbehälter (Kühlungsrate von -1 °C/Minute) bei -80 °C gelagert. Am nächsten Tag wurden die Kryoröhrchen zur langfristigen Aufbewahrung in flüssigen Stickstoff überführt.

6.22 Auftauen der peripheren mononukleäre Blutzellen

Bei Bedarf wurden die PBMC folgendermaßen aufgetaut: da DMSO in flüssigem Zustand zelltoxisch wirkt, musste beim Auftauen der Zellen darauf geachtet werden, dass sie rasch in das Kulturmedium aufgenommen wurden. Nachdem die Kryokonservierröhrchen aus dem flüssigen Stickstofftank entnommen wurden, wurden sie zum Arbeitsplatz transportiert und sofort im Wasserbad bei 37°C für einige Minute so belassen, bis keine Kristalle mehr erkennbar war. Nach Desinfektion der Röhrchen wurde der gesamte Inhalt eines Kryoröhrchens in ein 50 ml Röhrchen überführt. Die Zellen wurden über 10 Minuten bei 397 g und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Danach wurde das Zellsediment in 2 ml RPMI + 1% Penicillin/Streptomycin + 1% L-Glutamin vorsichtig resuspendiert, und die Zellen wurden mittels einer Neubauer Zellzählkammer, wie unter 6.20 beschrieben, ausgezählt. Das Auftauen von kommerziell erworbenen eingefrorenen PBMC erfolgte gemäß Bedienungsanleitung des Herstellers und die Zellkultur wurde wie bereits oben beschrieben angesetzt. Kurz nach dem Auftauen von Kryoröhrchen im Wasserbad wurden die Zellen mit „CTL Anti Aggregate Wash Medium“ zweimal gewaschen, bei den gleichen Kulturbedingungen angesetzt, mittels Dextramer-Dsg3-Peptide gefärbt und am Durchflusszytometer gemessen.

6.23 In-vitro-Stimulation von antigenspezifischen CD4+ T- Zellen

Die kryokonservierten PBMC von Patienten und gesunden Spendern wurden wie schon beschrieben aufgetaut und unter dem Mikroskop ausgezählt. Nach dem Auftauen der Zellen betrug die effektive Ausbeute zwischen ca. 4×10^6 und 7×10^6 Zellen. In 24-Well-Platte wurden die Zellen in einer Dichte von 2×10^6 in 2 ml RPMI-Medium / pro Well ausgesät. Rekombinantes humanes Dsg-3_(aa1-566) Protein wurde am selben Tag in einer Konzentration von 10 mg/ml hinzugegeben. Die Zugabe von 10 U/ml

IL-2 als Wachstumsfaktor erfolgte nach 48 Stunden. Am Tag 7 wurden die Dextramer-Färbung (Paragraph 6.25) und die darauffolgende Fixation mit PFA durchgeführt.

6.24 Humane Leukozyten Antigen-Klasse II-Dextramer

Die eingesetzten Dextramere wurden von der Firma Immudex bezogen. In der untenstehenden Tabelle sind alle Dextramere-Eigenschaften und die entsprechenden Dsg3-Peptide zusammengefasst.

Tabelle 3. HLA-Klasse II- Desmoglein 3-Peptid-Dextramer- Eigenschaften

DSG3-Peptide	HLA	Aminosäure-sequenz	Fluoro chrom	Cat. No.
P1 Dsg3 _(aa190-204)	DRB1* 0402	LNSKIAFKIVSQEPA	PE	FJ1004 0-PE
P2 Dsg3 _(aa206-220)	DRB1* 0402	TPMFLLSRNTGEVRT	PE	FJ1004 1-PE
P3 Dsg3 _(aa254-268)	DRB1* 0402	NIKVKDVNDNFPMFR	PE	FJ1004 3-PE
P4 Dsg3 _(aa378-392)	DRB1* 0402	REGIAFRPASKTFTV	PE	FJ1004 2-PE
CLIP	DRB1* 0402	PVSKMRMATPLLMQ A	PE	FJ1000 2-PE

6.25 Dextramer-Färbung

Parallel zur Färbung der T-Zellen mit den Dextramer-HLA-Peptiden fand die Detektion verschiedener Oberflächenmarker statt, sodass die Dextramer positiven T-Zellen dann auf verschiedene Markerkombinationen gated werden konnten. Pro Patient und gesunden Spender erfolgen 9 Ansätze:

Tabelle 4. Durchflusszytometrischer Vorgang

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ungefärbt	P1 Dsg3 (aa190-204)	P2 Dsg3 (aa206-220)	P3 Dsg3 (aa254-268)	P4 Dsg3 (aa378-392)	Dsg3 (Peptide-Pool)	CL IP1 Negative Kontrolle (für Peptide-Pool)	CL IP2 Negative Kontrolle (für einzelne Peptide)	Iso- CD4+

Dem Auftauen und der Bestimmung von der Zellzahl folgte das Pipettieren der in RPMI resuspendierten Zellen in einer Konzentration von 10^6 Zellen/ml in FACS-Röhrchen, die nachfolgend bis 2 ml mit RPMI +1% Penicillin/Streptomycin mit 1% L-Glutamin aufgefüllt wurden. Nach einer Zentrifugation bei 601 g und 4 °C für 5 min wurde der Überstand verworfen und alle Proben mit PBS + 5 % FCS gewaschen. Unter den gleichen Bedingungen führte man eine erneute Zentrifugierung der Zellen durch, der Überstand wurde sorgfältig verworfen und der Rand der FACS-Röhrchen vorsichtig mit einem fusselfreien Tuch trockengetupft. Das verbliebene FACS-Puffer-Volumen betrug hiernach ca. 50 Microliter (μ l). Nach einer Zugabe von 50 μ l Protein-Kinase-Inhibitor (PKI) (50nM) wurden die Röhrchen 30 min lang bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Dextramer- Röhrchen wurden bei 1207 g in einer Eppendorf-Zentrifuge für 1 min zentrifugiert. Darauffolgend wurden 4 μ l (Tubes 2-3-4-5 jeweils mit der entsprechenden Dextramer-Dsg3-Peptide) und 16 μ l (4 μ l jeder Dextramer-Peptide ins Tubes 6) hinzugegeben und alle Proben 30 min lang bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Da die Dextramer-Dsg3-Peptide-Reaktivität von der Dextramer-Menge abhängig ist, bestand Notwendigkeit zweier negativen Kontrollen, einmal für die einzelne Dextramer-Peptide (4 μ l CLIP, Tube 7) und einmal für das Dextramer-Peptide-pool (16 μ l CLIP, Tube 8). Alle Proben wurden nach 30 min zweimal mit 2 ml PBS + 5% FCS gewaschen und zweimal zentrifugiert. Nachdem der Überstand beim letzten Schritt dekantiert wurde, wurden 1 μ l anti-PE-Antikörper (10 μ g/ml) hinzugefügt und 20 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Der nächste Schritt beinhaltete das Waschen mit 3 ml PBS und die darauffolgende Zentrifugation 5 min lang bei 601 g und 4 °C. Nach der

Entsorgung des Überstandes und dem Trockentupfen der Röhren- Ränder mit einem fusselfreien Tuch wurden 70 µl Zombie-Lösung [Stock-Lösung 1:350 in PBS (9,55 g / L)] und 1 µl aller oberflächlichen- Marker zur Detektion von T-Zellen (CD45, CD19, CD14, CD3, CD4) in 5ca 70µl verbleibende Lösung dazugegeben und die Röhren für 20 min bei 4 °C im Dunkeln liegen gelassen. Am Ende der Inkubation wurde 1 ml PBS + 5% FCS in alle Röhren pipettiert. Die letzte Waschung mit 1 ml PBS erfolgte nach der 5-minütigen Zentrifugation bei 601 g und 4°C. Nach dem letzten Dekantieren wurden die Zellen anschließend mit 500 µl PFA 1% fixiert. Die Messung am Durchflusszytometer fand am folgenden Tag statt. Um die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse zu überprüfen, wurden bei 10 Patienten mehrere FACS-Messungen durchgeführt. Die Tabelle 5 zeigt die Rohdaten verschiedener Messungen zur Überprüfung der Dextramer-Reproduzierbarkeit.

6.26 Durchflusszytometrische Messung

Das optische System des Durchflusszytometers „BD LSRFortessa“ besteht aus 16 Fluoreszenzdetektoren sowie einem Vorwärts- und einem Seitwärtsstreulichtdetektor:

- 405 nm (violett) Diodenlaser (6 Fluoreszenzdetektoren)
- 488 nm (blau) Diodenlaser (2 Fluoreszenzdetektoren)
- 561 nm (gelb/grün) Diodenlaser (5 Fluoreszenzdetektoren)
- 635 nm (rot) Diodenlaser (3 Fluoreszenzdetektoren)

Die Grundeinstellungen des Durchflusszytometers wurden anhand von fluoreszierenden Kalibrierungs- Beads regelmäßig 1 Mal pro Woche überprüft. Eine maximale Flussrate von 400 Ereignissen wurde festgelegt, und die Einstellung am Zytometer gegebenenfalls manuell reguliert. Neben den oberflächlichen Markern von T-Zellen wurde eine Zombie-Lösung verwendet, um lebendige von toten Zellen zu unterscheiden. Nach jeder Messung erfolgte die Reinigungsroutine mittels FACS-Clean, FACS-Rinse und Millipore-Wasser jeweils 5 Min lang. Zunächst wurden die Zellaggregaten ausgeschlossen. Möglich war dies durch

die Verwendung von FSC-A und FSC-H. Anhand der FSC-A und SSC-A wurde die Lymphozytenpopulation markiert. Abbildung 11 zeigt die Strategie, die in der vorliegenden Arbeit angewendet wurde. Ferner wurde dem Lymphozyten-Gate auf die T-Zellpopulation gegatet, welche als CD3+ CD19- CD14- Zellen definiert wurde. Aus der hieraus definierten T-Zell-Population wurden CD4+ Dextramer+ / Zell-Subpopulationen abgegrenzt und deren prozentualer Anteil bestimmt. Durch die CD4+ Isotypenkontrolle kann das Ausmaß der unspezifischen Bindung von Antikörpern abgeschätzt werden. In Abbildung 10 ist die Gating-Strategie dargestellt.

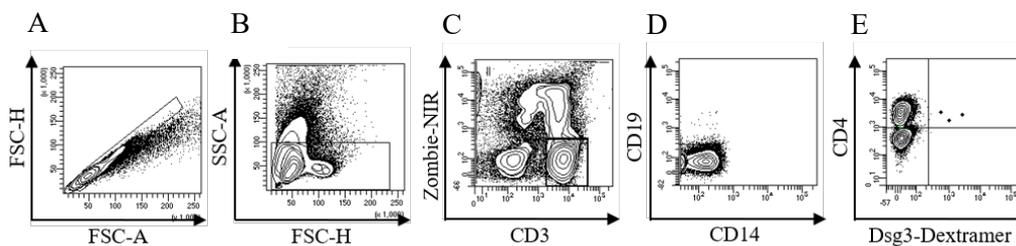


Abbildung 10. Gating-Strategie zur Identifizierung der Dextramer + peripherer CD4+ T Zellen

A) FSC-H gegen FSC-A, Ausgrenzung von Zellenaggregaten. B) SSC-A gegen FSC-H; Auswahl von Lymphozytenpopulation. C) Zombie APC-Cy7-A gegen CD3 PerCP-Cy5-5-A, Ausschluss von toten Zellen. D) CD19 FITC-A gegen CD14 APC-A, Differenzierung verschiedener T-Zellen-Populationen. E) CD4 BV510-A gegen Dsg3 - Dextramer PE-A, Identifizierung von CD4+ Dextramere+ Zellen.

In der Abbildung 11 ist das Aussehen von Dextramer-CD4+-Gates dargestellt, d.h. für den Dextramer-Dsg3-Pool- (A) und die einzelnen Dsg3-Peptide (B-E). Als Iso-CD4-Gate (F) wurde die Isotypen-Kontrolle zur richtigen Identifikation von CD4+ Zellen angesetzt. Dextramer- CLIP1-Gate ist eine Kontrolle für den Dextramer-Dsg3-Peptid-Pool (G), die Dextramer-Dsg3- CLIP2-Färbung (H) eine Kontrolle für die Dextramer-Dsg3-Peptide (B, C, D, E). Ungefärbt- Gates (I) dient als negative Kontrolle sowohl für

Dextramer-Dsg3-Pool und die einzelne Peptid-Dsg3-Peptide als auch für Dextramer-CLIP1 und -CLIP2 Färbungen.

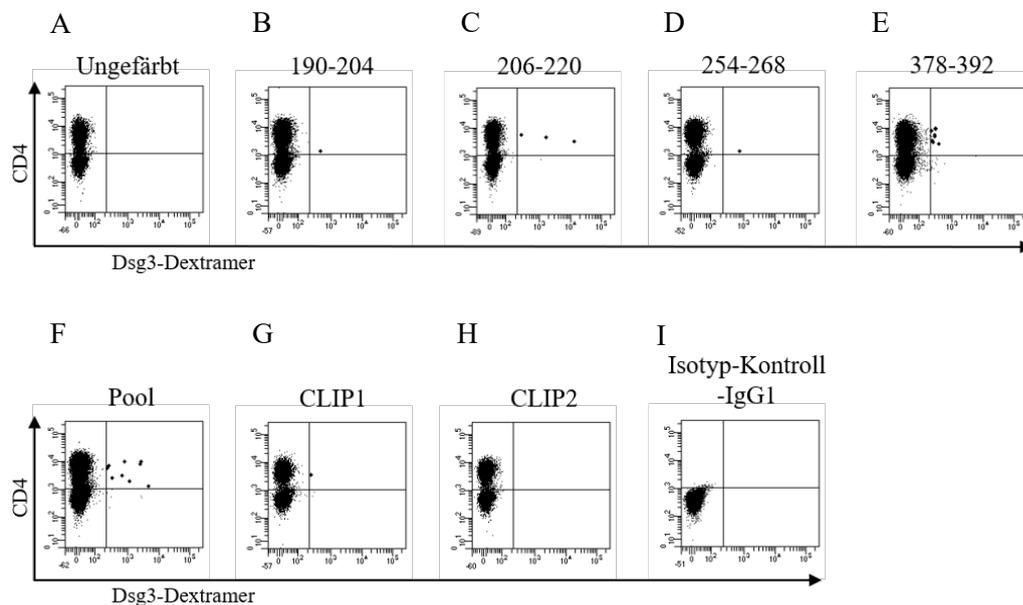


Abbildung 11. Darstellung der Dextramer-Dsg3-Peptide Färbungen von peripheren CD4+ T-Zellen

In der Abbildung sind Dextramer + CD4 + T-Zellen (in den rechten oberen Quadranten jedes Gate) angezeigt. Dargestellt sind die Gates für ungefärbte Kontrolle (A), Dextramer-Dsg3-Peptide (aa190-204 (B), aa206-220 (C), aa254-268 (D), aa378-392 (E)), Dextramer-Dsg3-Peptid- Pool (F) sowie die Gates von negativen Kontrollen Dextramer-CLIP1 (G), Dextramer-CLIP2 (H) und Isotyp-Kontrolle CD4+ (I).

6.27 Statistik

Die Datenerfassung und die statistische Auswertung erfolgten unter der Verwendung von Excel- Version 2013 bzw. Graph Pad Prism Version 6.0. Ein unpaarig-t-Test nach Mann-Whitney wurde als statistischer Test zum Vergleich von verschiedenen Gruppen (PV-Patienten vs. gesunde Kontrollen) herangezogen. Als statistisch signifikant wurden p-Werte < 0,05

festgelegt und das Signifikanzniveau ist mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ angegeben. Zur Darstellung der einzelnen Ergebnisse bediente man sich in der vorliegenden Arbeit der Scatter-Plots.

7. Ergebnisse

7.1 Detektion autoreaktiver Desmoglein-3-spezifischer T Zellen bei Pemphigus vulgaris Patienten und gesunden Spendern

Die Daten aus Abbildung 12 zeigen die mittels Durchflusszytometrie untersuchte Dextramer-Dsg3- Reaktivität peripherer CD4+ T-Zellen von PV Patienten und gesunden Spendern. Dabei setzt sich die PV Gruppe aus Patienten ohne und unter Therapie sowie aus Patienten mit aktiver Erkrankung und sich in Remission befindenden Patienten zusammen. Genotypisch weisen 6 PV Patienten und 4 gesunde Spender HLA-DRB1*04:02 auf, 6 PV Patienten und 4 gesunde Spender besitzen HLA-DRB1*05:03 und lediglich 2 PV Patienten sind HLA-DRB1*04:02 und HLA-DRB1*05:03 positiv. Die verbleibenden Patienten und gesunden Spender wurden nicht typisiert bzw. besitzen andere Allele, bei denen sich keinerlei Bezug auf PV-Pathogenese herleiten lässt. Die phänotypische Untersuchung hinsichtlich der Reaktivität der Dextramer-Dsg3-Peptide brachte hervor, dass diese bei den PV Patienten im Vergleich zu den gesunden Spendern erhöht ist. Bezeichnend ist hierbei die Tatsache, dass, obwohl bei der Reaktivität einzelner Dextramer-Dsg3-Peptide in den beiden Gruppen kein statistisch signifikanter Unterschied vorlag, dieser sich jedoch bei der Betrachtung der Reaktivität der Dextramer-Dsg3-Pools feststellen ließ und bei den PV Patienten signifikant höher ist als bei gesunden Spendern (*p = 0,0263). Kein Unterschied zeigte sich jedoch auch bei der statistischen Auswertung der genotypisch identischen PV-Patienten und gesunden Spender.

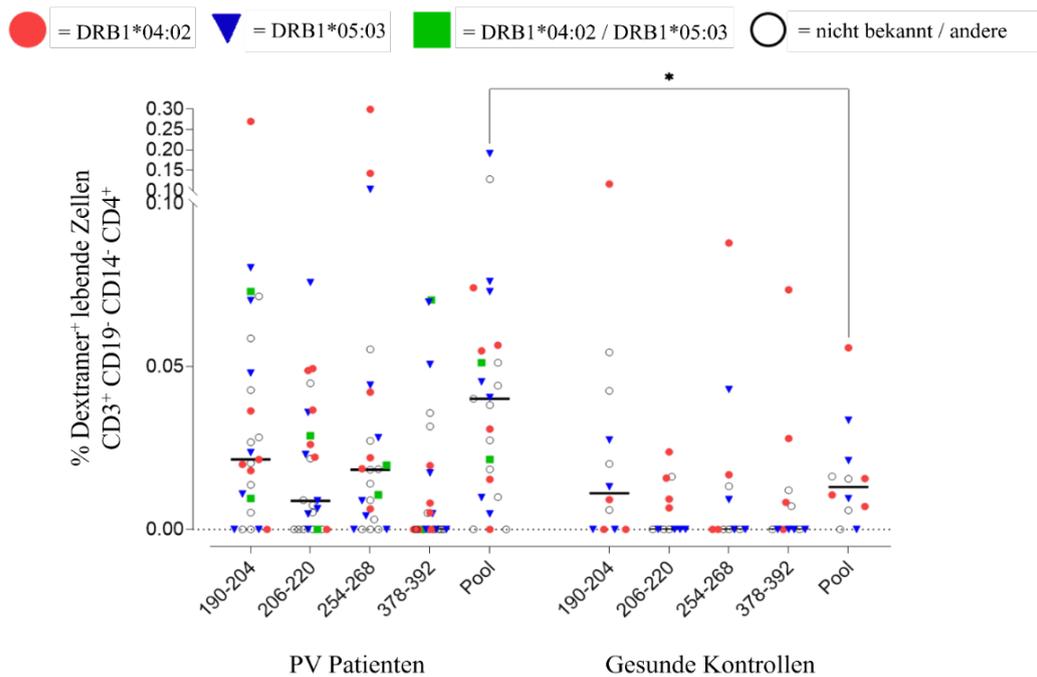


Abbildung 12. Dextramer-Dsg3-Peptide-Reaktivität bei PV-Patienten und gesunden Kontrollen

In der Graphik wurde die Dextramer-Dsg3-Peptide-Reaktivität lebendiger peripherer CD4+ T-Zellen dargestellt. Der prozentuale Anteil von CD4+ Dextramer + T-Zellen wurde in der Y-Achse dargestellt. In der y-Achse sind die Dsg3- Peptide angezeigt. Rot und blau wurden Patienten positiv für HLA-DRB1*04:02 bzw. HLA-DQR1*05:03 markiert. Die 2 PV Patienten positiv für HLA-DRB1*04:02 und HLA-DRB1*05:03 wurden als grün dargestellt. Pool= Dextramer-Dsg3-Dsg3₍₁₉₀₋₂₀₄₎ + Dextramer-Dsg3₍₂₀₆₋₂₂₀₎ + Dextramer-Dsg3₍₂₅₄₋₂₆₈₎ + Dextramer-Dsg3₍₃₇₈₋₃₉₂₎. PV-Patientenzahl = 25; Gesunde Kontrollanzahl = 12.

7.2 Einfluss der Therapie auf autoreaktive T-Zellen bei Pemphigus Vulgaris Patienten

Ferner wurde eine Stratifikation nach Therapie vorgenommen (Abb.13). Die Behandlung der unter medikamentöser Therapie stehenden Patientengruppe belief sich auf immunsuppressive Maßnahmen (Steroid ± adjuvante immunmodulatorische Therapie, wie in der Tabelle 1 angezeigt, s.o. Seite 29, 30, 31), hingegen lag bei der Patientengruppe ohne Therapie die Einnahme

immunsupprimierender Medikation seit mehr als sechs Monaten zurück. Insgesamt lässt sich beobachten, dass die Reaktivität gegen Dextramer-Dsg3-Peptide bei sich in Remission befindenden PV Patienten unter Therapie, im Vergleich zu Patienten ohne Therapie, abnimmt. Genauer genommen zeigt sich bei HLA-DRB1*04:02 PV Patienten eine höhere Dextramer-Dsg3-Peptid Reaktivität in der Gruppe der Patienten mit remittierender Erkrankung ohne Therapie als bei HLA-DRB1*05:03 PV Patienten derselben Gruppe. Obwohl PV Patienten mit remittierender Erkrankung ohne Therapie eine insgesamt höhere Dsg3-Dextramere Reaktivität zeigen, ist jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied nachweisbar.

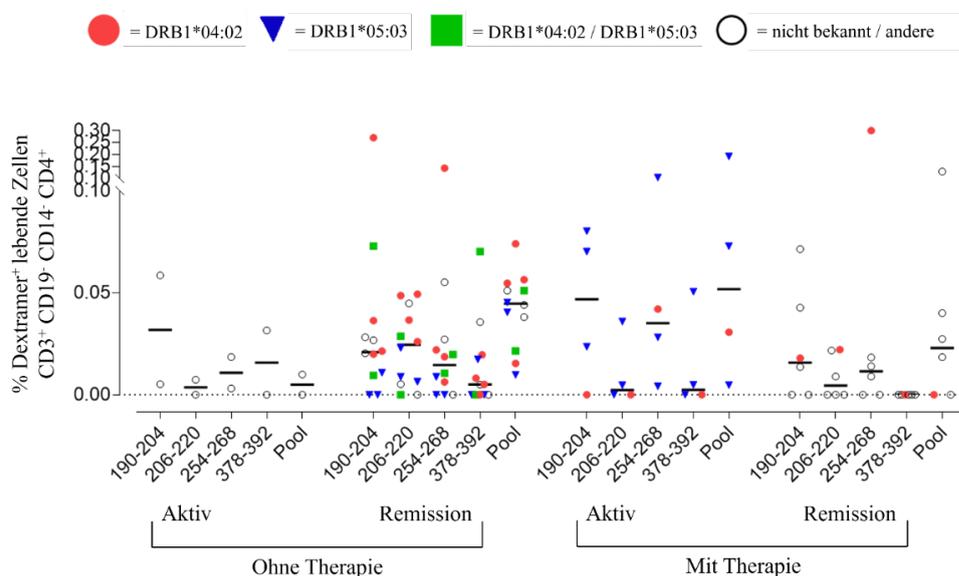


Abbildung 13. Einfluss der immunsuppressiven Therapie auf die Dextramer-Reaktivität peripherer Dsg3 spezifischen T-Zellen

In der Abbildung werden PV Patienten unter Therapie, ohne Therapie, in Remission und aktive PV Patienten dargestellt. HLA:DRB1:0402 positive Patienten und Kontrolle wurden rot markiert, HLA:DQR1:0503 blau markiert und nur 2 PV Patienten wurden grün angezeigt, die positiv für HLA:DRB1:0402 und HLA:DQR1:0503 sind. Pool= Dextramer-Dsg3-Dsg3₍₁₉₀₋₂₀₄₎ + Dextramer-Dsg3₍₂₀₆₋₂₂₀₎ + Dextramer-Dsg3₍₃₇₈₋₃₉₂₎ + Dextramer-Dsg3₍₂₅₄₋₂₆₈₎. Ohne Therapie aktive PV-Patientenanzahl = 2; Ohne Therapie remission PV-Patientenanzahl = 12; Mit Therapie aktive PV-Patientenanzahl = 4; Mit Therapie remission PV-Patientenanzahl = 6.

7.3 Krankheitsaktivität und autoreaktive T-Zellen beim Pemphigus Vulgaris

Infolge der Stratifikation nach Krankheitsaktivität wurden PV-Patientengruppen mit aktiver und remittierender Erkrankung verglichen. (Abb. 14). Die Definitionskriterien von aktiver und remittierender PV-Erkrankung wurden bereits im Paragraph 6.11.1 (s.o. Seite 27) erwähnt.

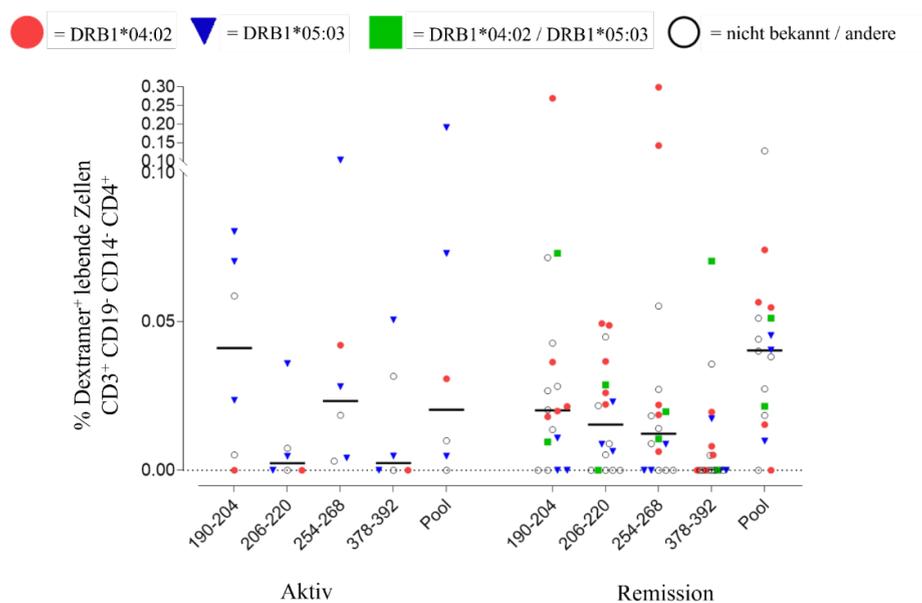


Abbildung 14. Dextramer-Dsg3-Reaktivität von aktiven und in Remission Patienten

Dextramer-Dsg3-Peptide-Positivität wurde als prozentuale Anteil peripherer CD4 + T-Zellen bei aktiven und in Remission PV Patienten dargestellt. Rot und blau wurden Patienten positiv für HLA-DRB1*04:02 bzw. HLA-DQB1*05:03 markiert, grün wurden Patienten positiv für HLA-DRB1*04:02 und HLA-DRB1*05:03 dargestellt. Pool= Dextramer-Dsg3-Dsg3₍₁₉₀₋₂₀₄₎ + Dextramer-Dsg3₍₂₀₆₋₂₂₀₎ + Dextramer-Dsg3₍₃₇₈₋₃₉₂₎ + Dextramer-Dsg3₍₂₅₄₋₂₆₈₎. Aktive PV Patientenanzahl = 6; In Remission PV Patientenanzahl = 18;

Grundsätzlich zeigte sich in der Remissionsgruppe eine höhere Dextramer-Dsg3-Reaktivität. Die Reaktivitätsdifferenz ließ sich jedoch nicht in jeder

genotypischen Gruppe gleichermaßen feststellen – so war in der Gruppe der HLA:DRB1*04:02 positiven Patienten, bei den sich in Remission befindenden Patienten eine höhere Reaktivität nachweisbar ist als bei den Patienten mit aktiver Erkrankung. HLA-DRB1*05:03 positive PV Patienten beider Gruppen wiesen hingegen eine ähnliche Dextramer Reaktivität auf.

7.4 CLIP (Class-II-associated invariant chain peptide) Reaktivität

Anschließend wurde die CLIP- Reaktivität bei PV Patienten und gesunden Spendern untersucht.

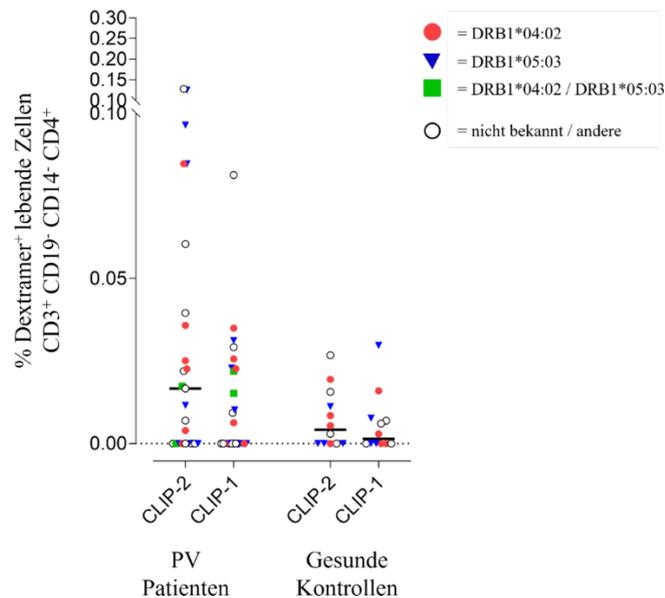


Abbildung 15. CLIP (Class-II-associated invariant chain peptide) Reaktivität bei PV Patienten und gesunden Kontrollen

CLIP-Reaktivität wurde als prozentuale Anteil peripherer CD4 + T-Zellen bei PV Patienten und gesunden Kontrollen dargestellt. Rot und blau wurden Patienten und Probanden positiv für HLA-DRB1*04:02 bzw. HLA-DQB1*05:03 markiert. Die 2 PV Patienten positiv für HLA-DRB1*04:02 und HLA-DRB1*05:03 wurden als grün dargestellt. CLIP 1 = negative Kontrolle für Dsg3 Pool Gruppe. CLIP 2 = negative Kontrolle für einzelne Dsg3 Peptide. PV Patientenanzahl = 25; Gesunde Kontrollenanzahl = 12.

In der Graphik sind 2 CLIP Gruppen dargestellt. CLIP 1 ist die negative Kontrolle für die Dextramer-Dsg3-Pool Gruppe und CLIP 2 ist die negative Kontrolle für die Dextramer-Dsg3-einzelne Peptide Gruppe. Interessanterweise zeigen die PV Patienten eine unspezifische CLIP-Reaktivität, wobei es bei CLIP 2 Gruppe ausgeprägter ist als bei CLIP 1. Insgesamt zeigen die HLA-DRB1*04:02 Patienten und gesunde Spender eine höhere Reaktivität als HLA-DRB1*05:03 Patienten und gesunde Spender. Es ist jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den PV Patienten und gesunden Spendern nachweisbar.

8. Diskussion

8.1 Dextramer-Assay als Gold Standard zur Detektion peripherer autoreaktiver T-Zellen

In der vorgelegten Arbeit wurden Dsg3 spezifische periphere T-Zellen von PV Patienten mittels Dextramer-Dsg3-Peptide-Färbung untersucht. Nach der PBMC Isolation wurden antigenspezifische T-Zellen durch die Zugabe rekombinanter Dsg3_(aa1-566) stimuliert. Das in dieser Arbeit angewandte Baculovirus-System hat ermöglicht, ein rekombinantes Dsg3-Protein zu produzieren, welches eine ähnliche Immunogenität wie das native Dsg3-Protein aufweist. (Hertl et al, 1998, Ishii et al, 1997, Müller et al, 2006, Müller et al, 2008). Darüber hinaus wurden die Zellen mit IL-2 stimuliert, um eine ausreichende Dsg3 spezifische Zellen Population zur FACS Untersuchung zu haben.

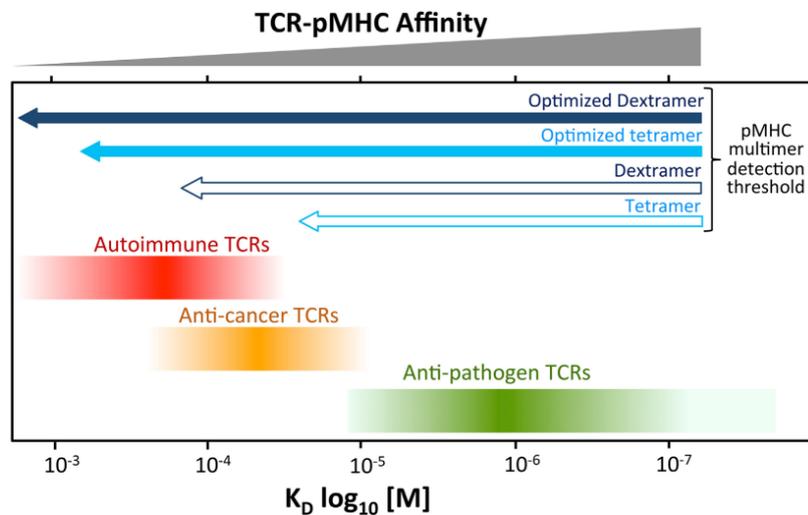


Abbildung 16. TZR-HLA-Bindungsaffinität bei Krebs, infektiösen und autoimmunen Krankheiten

Die Affinität ist als Binding Energy Threshold (BE) angezeigt. Je weniger das BE, desto höher die Affinität zwischen HLA-Peptid-Komplex und TZR. Die Autoimmunkrankheiten weisen die geringste Bindungsaffinität zwischen TZR und HLA-Allel auf. Quelle: (Dolton et al, 2018).

Während die Anwendung von HLA-Klasse I-Dextramer, und ganz allgemein von HLA-Klasse I-Multimer, zur Untersuchung unphysiologischer Antigene beim Krebs, wie z.B. Melanoma (**Wang et al**, 2015) gängig ist, wird HLA-Klasse II- Multimer-Technologie zur Detektion und Überwachung der von T-Zellen abhängigen Immunantwort bei Autoimmunerkrankungen (**Kwok et al**, 2000) verwendet. Wie in Abbildung 16 angezeigt ist die T-Zellen-Rezeptor (TZR)-HLA Bindungsaffinität vor allem beim Krebs und bei den infektiösen Krankheiten relativ stark, deshalb ist es da nahezu problemlos, die Antigen-Spezifität vorherzusagen (**Dolton et al**, 2018). Wenn HLA-Klasse-II-Multimere im Bereich der Autoimmunkrankheiten angewandt werden, treten Schwierigkeiten aufgrund der geringen Bindungsfähigkeit zwischen TZR und HLA-Klasse-II Molekülen auf. Bei allen Menschen gibt es zentrale und periphere Immuntoleranzmechanismen, welche fremde und Selbst-Antigene erkennen, um die Selbsttoleranz sicherzustellen (**Daniel et al**, 2009; **Vanikar et al**, 2012). Es wird zwischen einer zentralen und einer peripheren Toleranz unterschieden (**Theofilopoulos et al**, 2017). Während der Entwicklung von Thymozyten (Vorläuferzellen der T-Lymphozyten) im Thymus, werden diese einer Positiv- und Negativselektion ausgesetzt, die im Kortex bzw. in der Medulla von Thymus stattfinden. Die Positivselektion besteht in der Entfernung der Zellen, die keinen HLA-Peptid-Komplex binden können (**Kisielow et al**, 2019). Bei der Negativselektion überleben nur die Thymozyten, die einen T-Zell Rezeptor (TZR) exprimieren und einen MHC-Klasse II-Peptid-Komplex erkennen (**Tsunoda et al**, 2002). Bei der Positivselektion präsentieren die medullären Zellen nahezu alle Antigene den Thymozyten, infolge der Aktivierung spezifischer Transkriptionsfaktoren (Autoimmune Regulator (AIRE)), die in Assoziation mit HLA-Klasse II-Allele im ganzen Körper exprimiert werden. Thymozyten, die mit einer zu hoher Affinität Selbst-Antigen-HLA-Klasse II-Allele-Komplexen binden, werden durch die Apoptose-Mechanismen beseitigt. Da einige autoreaktive T-Zellen der Selektion entgehen können, existieren periphere Toleranzmechanismen, bei denen autoreaktive T-Zellen durch die Tätigkeit regulatorischer T-Zellen inaktiviert werden (**Wada et al**, 2011). Autoreaktive T-Zellen weisen eine sehr geringe Bindungsaffinität zu TZR auf, um der negativen Selektion im Thymus entgehen zu können (**Reijonen et al**, 2002). Aus diesem Grund wurde in der

vorgelegten Arbeit eine Dextramer-HLA-Klasse II-Dsg3-Peptide Färbung angewandt, deren Prozedur die Zugabe von PKI, zur Maximierung von TZR auf der Zelloberfläche, und von anti-PE, zur Kreuzbindung zwischen anliegenden Dextramer-Molekülen, vorsieht (**Dolton et al**, 2018).

Die Selbst-Antigene bei Autoimmunerkrankungen werden in Assoziation mit HLA-Klasse II auf der Zelloberfläche von Antigenpräsentierenden Zellen (APZ) präsentiert (**Lu et al**, 2019; **Lipski et al**, 2017). Es wurde bereits darauf hingewiesen, dass PV ethnische Unterschiede hinsichtlich der genetischen Prädisposition aufweist (**Carcassi et al**, 1996; **Lee E et al**, 2006; **Lombardi et al**, 1996; **Scharf et al**, 1988; **Tron F et al**, 2006). Die in der vorgelegten Arbeit rekrutierten PV-Patienten und gesunde Spender gehören zur europäischen Population, bei der eine Prädisposition für PV vorliegt, wenn die Probanden HLA-DRB1*04:02- und /oder HLADRB1*05:03-Allele besitzen. Wie in den Graphiken (s.o. Paragraph 7 Ergebnisse) aufgeführt sind sechs PV-Patienten HLA-DRB1*04:02 positiv, sechs PV-Patienten HLA-DQB1*05:03 positiv und nur zwei Patienten HLA-DRB1*04:02 und HLA-DQB1*05:03 positiv.

8.2 Dextramer-Technologie vs funktionelle Assays

Andere Arbeitsgruppen haben bereits gezeigt, dass die HLA-Klasse II-Dextramere eine hohe Sensitivität zur Detektion antigenspezifischer T-Zellen besitzen (**Massilamany et al**, 2015). In der Literatur ist der Einsatz der Dextramer-Färbung bereits erwähnt, vor allem im Bereich der Impfungen (**Obara et al**, 2017), des Krebs (**Bethune et al**, Nov 2018) und der neurologischen Erkrankungen wie z.B. Multiple Sclerosis (**Lolli et al**, 2013). Zur Untersuchung autoreaktiver T-Zellen stehen zusätzlich andere funktionelle Methoden zur Verfügung, wie z.B. ELISpot und H3-Proliferationsassay. Beim ELISpot handelt es sich um eine Untersuchung, mit der die Zytokinproduktion der Immunzellen untersucht werden kann. Nach Coating der Wells-Platten mit dem primären Anti-Zytokin-Antikörper werden die Zellen darauf ausgesät und durch die Zugabe eines Antigens mehrmals

stimuliert. Nach ausreichender Expansion der Zellen werden die mit Enzym konjugierten anti-Zytokin-Detektionsantikörper hinzugegeben und die sich daraus ergebende Spots mittels eines ELISpot-Reader-Systems detektiert (Möbs et al, 2016, Eming et al, 2000). Mit Hilfe des H3-Proliferationsassays kann man die Proliferationsrate antigenspezifischer T-Zellen nach ausreichender Stimulation und Expansion durch die Verwendung von radioaktiven Isotopen (wie z.B. H3) bestimmen (Stern et al, 2008). Einerseits besitzen die oben beschriebenen Techniken eine hohe Sensitivität, andererseits benötigen sie eine optimale vorbereitende Zellenexpansion und eine genügende Zellenaktivierung.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Intra-Assay-Reproduzierbarkeit der Dextramer-Dsg3-Peptide als erster Schritt bestimmt. Aus Mangel an PBMC-Proben wurden zwei bzw. drei Kryoröhrchen pro Patient aufgetaut und getrennt weiter bearbeitet. Die prozentuale Anteile der Dextramer + CD4+ T-Zellen sind sehr gering und die Referenzbereiche liegen im Bereich 0 – 0,985 %. Aufgrund der erhobenen Werte kann man behaupten, dass die Messungen insgesamt gesehen homogen sind, es lässt sich aber keine Aussage über die Reproduzierbarkeit machen. Hierbei sollte man die Zellen-Stimulation optimieren und dadurch eine größere Anzahl antigenspezifischer T-Zellen mittels Durchflusszytometrie detektieren. Eine Möglichkeit bestünde in der Erhöhung der Antigenkonzentration durch ein sorgfältiges Titrieren der Dsg3-Konzentration. Eine andere Möglichkeit beläuft sich darauf, sowohl mehrere Zugaben von Interleukinen als auch eine Kombination unterschiedlicher Interleukine einzusetzen (Möbs et al, 2016; McCutcheon et al, 1997).

8.3 Autoreaktive T-Zellen beim Pemphigus vulgaris

Eine der wichtigsten Rolle in der Pathogenese von PV kommt den CD4+ T-Zellen zu, welche die IgG-Produktion in Zusammenhang mit anderen Zellen Subpopulationen regulieren. Es lassen sich zwei Phänotypen der T-Helfer Zellen erkennen: T-Helfer-1- (Th1) und T-Helfer-2-Zellen (Th2) (Ambe et al, 2013; Veldman et al, 2003). Bei PV-Patienten sind sowohl (Th1) als auch

(Th2) nachweisbar und beide spielen eine Rolle bei der Immunantwort gegen Dsg3. In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass Th2 für die Dsg3_(aa378-392)-Erkennung zuständig sind. Hingegen werden Dsg3_(aa190-204)- und Dsg3_(aa206-220)-Peptide von Th1-Immunantwort erkannt. Dsg3_(aa254-268) wird sowohl von Th1- als auch von TH2-Zellen erkannt. Aus diesem Grund können wir behaupten, dass unser PV-Patienten-Kollektiv ein Mix von Th1 und Th2 Immunantwort besitzen, da eine höhere Reaktivität gegen Dextramer-Pool-Dsg3 im Vergleich zu gesunden Kontrollen nachweisbar ist (Aoki-Ota et al, 2006; Veldaman et al, 2004).

8.4 Einfluss der Krankheitsaktivität und immunmodulatorischen Therapie auf die Dextramer-Dsg3-Peptide-Reaktivität

Das Ausmaß der Beeinflussung der Dextramer-Dsg3-Peptide-Reaktivität spezifischer T-Zellen durch eine immunmodulatorische Therapie stellt eine weitere Fragestellung der vorliegenden Arbeit dar. Zur Gruppe „unter Therapie“ gehören alle Patienten, welche Steroide ± andere immunmodulatorische Therapie, wie z.B. MTX, MMF, AZA (s.o. Tabelle 1, Seite 29-30-31) erhielten. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die immunmodulatorische Therapie eine generelle Abnahme der Dextramer-Dsg3-Peptide-Reaktivität bewirkt. Um alle Mechanismen nachzuvollziehen, die hinter dem Abfall der T-Zell-Reaktivität stehen, sind Untersuchungen auf intrazellulären Ebene erforderlich, welche Modifizierungen bei intrazellulären Signalkaskaden untersuchen können. Den bereits veröffentlichten Manuskripten zufolge, wäre eine Vermutung zulässig, dass eine immunsuppressive Therapie zur Verminderung der TZR-Rezeptoranzahl führt, daher zur Abnahme der Dextramer-Dsg3-peptide-Bindung und anschließend zu einem Abfall der Dextramer-Dsg3-Peptide-Reaktivität (Migliorati et al, 1997; Van Laethem et al, 2001). Des Weiteren wurde eine Stratifizierung nach Krankheitsaktivität durchgeführt. Obwohl kein signifikanter Unterschied nachweisbar ist, weisen in Remission Patienten einen Anstieg der Reaktivität

gegen Dextramer-Dsg3_(aa206-220) im Vergleich zu den aktiven PV Patienten auf. Über die Ursache lässt sich aber nur spekulieren. Möglicherweise handelt es sich um intramolekulares Epitop-Spreading (**Didona et al**, 2018). Unter diesem Begriff versteht man die Ausbreitung der Immunantwort auf andere Epitope derselben Antigene im Rahmen einer Antigenanerkennung durch polyklonale CD4⁺ T-Zellen. Intermolekulares Epitop Spreading bezieht sich hingegen auf die Immunreaktion gegen endogene Epitope, die vom primären Epitop unterschiedlich sind und mit diesem keine Kreuzreaktivität aufweisen (**Brossart et al**, 2020). Die gesteigerte Reaktivität von PV-Patienten gegen CLIP-Peptide lässt sich in dieser Arbeit nicht erklären, man kann aber spekulieren, dass diese unspezifische Reaktivität der PV Patienten auf die polyklonalen Immunantwort des PV zurückzuführen ist.

8.5 Ausblick

Dextramer-Technologie stellt eine zuverlässige Methode zur Identifikation und Bestimmung der Epitope-Immunogenität dar. Die Epitope-Untersuchung erweist sich als entscheidend, wenn man die Immuntherapie berücksichtigt, wie z.B. Chimäre Antigenrezeptoren (CAR) Therapie. Unter CAR-Therapie versteht man eine innovative Therapie zur Krebsbehandlung, bei der die Funktion gentechnisch hergestellter chimären Antigen Rezeptoren an die Effektorfunktion der Immunzellen gekoppelt ist. T-Zellen werden vom Patienten mittels Leukaphorese isoliert, im Labor mit CAR ausgestattet und dem Patienten wieder infundiert (**Benmebarek et al**, 2019). Diese Art von Immuntherapie wird bereits in der Onkologie (**Miliotou et al**, 2018) angewandt und die Anwendung in weiteren Kontexten, wie z.B. in Rheumatologie (**Mackensen et al**, 2022), wird heutzutage untersucht.

Zur Einschätzung der Aussagekraft der erhobenen Daten werden im Folgenden alle Stärken und Limitationen der vorliegenden Arbeit beschrieben. Eine Stärke der Studie ist die Alters-Homogenität zwischen PV-Patienten und gesunden Spendern. Somit kann davon ausgegangen werden, dass das Alter die Aussagekraft der Ergebnisse nicht beeinflusst hat. Die Erhebung zusätzlicher klinischer und laboratorischer Daten war nicht bei allen PV-Patienten und

Probanden möglich, daher wurde keine statistische Analyse hinsichtlich klinischer Parameter und Dextramer-Dsg3-Peptide-Reaktivität aufgebaut. Die Rekrutierung von aktiven und in Remission PV-Patienten hat ermöglicht, den Vergleich zwischen zwei unterschiedlichen Krankheitsstadien in Bezug auf die Dextramer-Dsg3 T-Zellen-Reaktivität aufzustellen, bisher noch nicht mittels Multimer-Technologie bestimmt. Außerdem wurde untersucht, wie sich eine Therapie auf die Dextramer-Positivität antigenspezifischer T-Zellen auswirkt.

Es gab jedoch auch einige limitierende Faktoren. Eine geringe Patienten- und Probandenanzahl stellen eine mögliche Schwachstelle dar, da keine weitere Stratifikation möglich war. Außerdem war die HLA-Typisierung bei PV Patienten unvollständig, es konnte nicht untersucht werden, in welchem Ausmaß sich die Besetzung von unterschiedlichen HLA auf die Dextramer-Dsg3- Reaktivität auswirkt.

9. Zusammenfassung

Pemphigus vulgaris (PV) gehört zur Gruppe der bullösen Autoimmunerkrankungen. Autoreaktive Dsg3 spezifische T-Zellen spielen eine zentrale Rolle in der PV Pathogenese durch die Anpassung der gegen Dsg3 gerichteten Antikörper-Produktion. Vor allem wird die Erhaltung der immunologischen Selbst-Toleranz von regulatorischen T-Zellen kontrolliert, deren Reduktion der Anzahl oder Funktionalität zu einer autoreaktiven Immunantwort führt. Der Fokus vorliegender Arbeit ist die Anwendung der Dextramer-Dsg3-Peptide-Färbung zur Detektion lebendig peripherer CD45 + CD19 - CD14 - CD3 - CD4 + Dsg3-Peptide-spezifischer T-Zellen. Nach der Stimulation mit rekombinantem Dsg3_(aa1-566) von aus PV-Patienten und Probanden erworbenen PBMC wurde die Reaktivität der letztgenannten T-Zellen-Subpopulation gegen Dextramer-Dsg3-Peptide-Mix (Dsg3_(aa190-204), Dsg3_(aa206-220), Dsg3_(aa254-268), Dsg3_(aa378-392)) und gegen einzelne Dextramer-Dsg3-Peptide mittels durchflusszytometrischen Messung untersucht. Insgesamt gesehen ist das Ausmaß der Dextramer-Dsg3-Peptide-Reaktivität bei PV-Patienten höher als bei gesunden Probanden, man kann jedoch nur einen signifikanten Unterschied (*p=0,0263) zwischen diesen zwei Gruppen beobachten, wenn die Dextramer-Pool Färbung angewandt wird. Infolge der Stratifizierung nach Therapie ist die Reaktivität gegen Dextramer-Dsg3-Peptide-pool bei PV Patienten ohne Therapie nicht signifikant höher als bei Patienten unter Therapie. Der Vergleich zwischen aktiven PV Patienten und in Remission PV Patienten zeigt ebenfalls keinen signifikanten Unterschied. Interessanterweise zeigen PV Patienten eine höhere Reaktivität gegen „Class_II-associated invariant chain peptide“ (CLIP) als gesunde Kontrollen. Einerseits stellt die Dextramer-Färbung eine hervorragende Methode zur Detektion antigenspezifischer T-Zellen dar, andererseits ermöglicht die Dextramer-Technologie, spezifische HLA-restringierte Epitope zu untersuchen. Infolgedessen kann es zu einem vollständigeren Verständnis der Rolle von autoreaktiven CD4+ T-Zellen hinsichtlich der Pathogenese der Autoimmunantwort kommen und zusätzlich verfolgt werden, wie das Epitop-Spreading unterschiedliche Krankheitsstadien charakterisiert. Darüber hinaus ermöglicht die mittels Dextramer Antigen-Spezifizität-Bestimmung den Erhalt

wichtiger Informationen hinsichtlich der T-Zellen Reaktivität, die für die Entwicklung der Immuntherapie mit regulatorischen T-Zellen verwendet werden könnte, wie z.B. Chimäre Antigenrezeptoren (CAR) Therapie.

10. Literaturverzeichnis

Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow Cytometry: Basic Principles and Applications. *Crit Rev Biotechnol*. 2017 Mar;37(2):163-176.

Ahmed AR, Yunis EJ, Khatri K, Wagner K, Notani G, Awdeh Z, Alper CA. Major histocompatibility complex haplotype studies in Ashkenazi Jewish patients with pemphigus vulgaris. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990; 87: 7658-7662.

Ahmed AR, Wagner R, Khatri K, Notani G, Awdeh Z, Alper CA, Yunis EJ. Major histocompatibility complex haplotypes and class II genes in non-Jewish patients with pemphigus vulgaris. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 88: 5056-5061.

Amagai M, Koch P, Nishikawa T, Stanley J: Pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3) is localized in the lower epidermis, the site of blister formation in patients. *J Invest Dermatol*. 1996 Feb;106(2):351-5.

Amagai M. Autoimmunity against desmosomal cadherins in pemphigus. *J Dermatol Sci*. 1999 Jun;20(2):92-102.

Amagai M, Tsunoda K, Suzuki H, Nishifuji K, Koyasu S, Nishikawa T. Use of autoantigen-knockout mice in developing an active autoimmune disease model for pemphigus. *J Clin Invest*. 2000 Mar;105(5):625-31.

Amber KT, Staropoli P., Shiman M.I., Elgart G.W., Hertl M. Autoreactive T Cells in the Immune Pathogenesis of Pemphigus Vulgaris. *Exp Dermatol*. 2013 Nov;22(11):699-704.

Amber KT, Maglie R, Solimani F, Eming R, Hertl M. Targeted Therapies for Autoimmune Bullous Diseases: Current Status. *Drugs*. 2018 Oct;78(15):1527-1548.

Anhalt GJ. Paraneoplastic pemphigus. *J Investig Dermatol Symp Proc*. 2004 Jan;9(1):29-33.

Aoki-Ota M, Kinoshita M, Ota T, Tsunoda K, Iwasaki T, Tanaka S, Koyasu S, Nishikawa T, Amagai M. Tolerance induction by the blockade of CD40/CD154 interaction in pemphigus vulgaris mouse model. *J Invest Dermatol*. 2006 Jan;126(1):105-13.

Baroni A, Perfetto B, Ruocco E, Greco R, Criscuolo D, Ruocco V. Cytokine pattern in blister fluid and sera of patients with pemphigus. *Dermatology*. 2002;205(2):116-21.

Benmebarek MR, Karches CH, Cadilha BL, Lesch S, Endres S, Kobold S. Killing Mechanisms of Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cells. *Int J Mol Sci*. 2019 Mar 14;20(6):1283.

Bethune MT, Comin-Anduix B, Hwang Fu YH, Ribas A, Baltimore D. Preparation of peptide–MHC and T-cell receptor dextramers by biotinylated dextran doping. 16 Mar 2018, *Biotechniques* vol. 62, no. 3 reports.

Bethune MT, Li XH, Yu J, McLaughlin J, Cheng D, Mathis C, Moreno BH, Woods K, Knights AJ, Garcia-Diaz A, Wong S, Hu-Lieskovan S, Puig-Saus C, Cebon J, Ribas A, Yang L, Witte ON, Baltimore D. Isolation and Characterization of NY-ESO-1-specific T Cell Receptors Restricted on Various MHC Molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 Nov 6;115(45):E10702-E10711.

Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature*. 1987 Oct 8-14;329(6139):512-8.

Brandt O, Rafei D, Podstawa E, Niedermeier A, Jonkman MF, Terra JB, Hein R, Hertl M, Pas HH, Müller R. Differential IgG recognition of desmoglein 3 by paraneoplastic pemphigus and pemphigus vulgaris sera. *J Invest Dermatol*. 2012 Jun;132(6):1738-41.

Brossart P. The Role of Antigen Spreading in the Efficacy of Immunotherapies. *Clin Cancer Res*. 2020 Sep 1;26(17):4442-4447.

Carcassi C, Cottoni F, Floris L, Vacca A, Mulargia M, Arras M, Boero R, La Nasa G, Ledda A, Pizzati A, Cerimele D, Contu L. HLA Haplotypes and Class II Molecular Alleles in Sardinian and Italian Patients With Pemphigus Vulgaris. *Tissue Antigens*. 1996 Dec;48(6):662-7.

Chan PT, Ohyama B, Nishifuji K et al. Immune response towards the amino-terminus of desmoglein 1 prevails across different activity stages in nonendemic pemphigus foliaceus. *Br J Dermatol*. 2010 Jun;162(6):1242-50.

Cho A, Caldara AL, Ran NA, Menne Z, Kauffman RC, Affer M, Llovet A, Norwood C, Scanlan A, Mantus G, Bradley B, Zimmer S, Schmidt T, Hertl M,

Payne AS, Feldman R, Kowalczyk AP, Wrammert J. Single-Cell Analysis Suggests That Ongoing Affinity Maturation Drives the Emergence of Pemphigus Vulgaris Autoimmune Disease. *Cell Rep.* 2019 Jul 23;28(4):909-922.e6.

Daniel C, Nolting J, von Boehmer H. Mechanisms of self-nonsel self discrimination and possible clinical relevance. *Immunotherapy.* 2009 Jul;1(4):631-44.

Didona D, Di Zenzo G. Humoral Epitope Spreading in Autoimmune Bullous Diseases. *Front Immunol.* 2018; 9: 779.

Didona D, Maglie R, Eming R, Hertl M. Pemphigus: Current and Future Therapeutic Strategies. *Front Immunol.* 2019 Jun 25;10:1418.

Didona D, Fania L, Didona B, Eming R, Hertl M, Di Zenzo G. Paraneoplastic Dermatoses: A Brief General Review and an Extensive Analysis of Paraneoplastic Pemphigus and Paraneoplastic Dermatomyositis. *Int J Mol Sci.* 2020 Mar 21;21(6):2178.

Ding X, Aoki V, Mascaro Jr J, Lopez-Swidorski A, Diaz L, Fairley J: Mucosal and mucocutaneous (generalized) pemphigus vulgaris show distinct autoantibody profiles. *J Invest Dermatol.* 1997 Oct;109(4):592-6.

Dolton G, Zervoudi E, Rius C, Wall A, Thomas HL, Fuller A, Yeo L, Legut M, Wheeler S, Attaf M, Chudakov DM, Choy E, Peakman M, Sewell AK. Optimized Peptide-MHC Multimer Protocols for Detection and Isolation of Autoimmune T-Cells. *Front Immunol.* 2018 Jun 29;9:1378.

Durdu M, Baba M, Seekin D. The value of Tzanck smear test in diagnosis of erosive, vesicular, bullous and pustular skin lesions. *J Am Acad Dermatol.* 2008;59:958–64.

Edwards G, Diercks GFH, Seelen MAJ, Horvath B, van Doorn MBA and Damman J. Complement Activation in Autoimmune Bullous Dermatoses: A Comprehensive Review. *Front Immunol.* 2019 Jun 26;10:1477.

Eming R, Sticherling M, Hofmann SC, Nicolas Hunzelmann Johannes S. Kern Harald Kramer Christiane Pfeiffer Volker Schuster Detlef Zillikens Matthias Goebeler Michael Hertl Alexander Nast Hans-Dieter Orzechowski Miklós Sárdy Enno Schmidt Cassian Sitaru Birte Sporbeck Margitta Worm. S2k guidelines for the treatment of pemphigus vulgaris/foliaceus and bullous

pemphigoid. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2015 Aug;13(8):833-44. **Ferm MT**, Grönberg A. Human MHC Class I Antigens Are Associated With a 90-kDa Cell Surface Protein. *Scand J Immunol.* 1991 Aug;34(2):221-7.

Eming R, Büdinger L, Riechers R, Christensen O, Bohlen H, Kalish R, Hertl M. Frequency Analysis of Autoreactive T-helper 1 and 2 Cells in Bullous Pemphigoid and Pemphigus Vulgaris by Enzyme-Linked Immunospot Assay. *Br J Dermatol.* 2000 Dec;143(6):1279-82.

Eming R, Hennerici T, Bäcklund J, Feliciani C, Visconti KC, Willenborg S, Wohde J, Holmdahl R, Sønderstrup G, Hertl M. Pathogenic IgG Antibodies Against Desmoglein 3 in Pemphigus Vulgaris Are Regulated by HLA-DRB1*04:02-restricted T Cells. *J Immunol.* 2014 Nov 1;193(9):4391-9.

Futei Y, Amagai M, Ishii K, Kuroda-Kinoshita K, Ohya K, Nishikawa T. Predominant IgG4 Subclass in Autoantibodies of Pemphigus Vulgaris and Foliaceus. *J Dermatol Sci.* 2001 May;26(1):55-61.

Gascoigne NRJ, Zal T, Yachi PP, and Hoerter JAH. Co-Receptors and Recognition of Self at the Immunological Synapse. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2010; 340: 171–189.

Gershon RK, Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology.* 1970 May;18(5):723-37.

Grievink HW, Luisman T, Kluft C, Moerland M, Malone KE. Comparison of Three Isolation Techniques for Human Peripheral Blood Mononuclear Cells: Cell Recovery and Viability, Population Composition, and Cell Functionality. *Biopreserv Biobank.* 2016 Oct;14(5):410-415.

Gupta LK, Singhi MK. Tzanck smear: a useful diagnostic tool. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* Jul-Aug 2005;71(4):295-9.

Hammers CM, Stanley JR. Mechanisms of Disease: Pemphigus and Bullous Pemphigoid. *Annu Rev Pathol.* 2016 May 23;11:175-97.

Harman KE, Seed PT, Gratian MJ, Bhogal BS, Challacombe SJ, Black MM. The Severity of Cutaneous and Oral Pemphigus Is Related to Desmoglein 1 and 3 Antibody Levels. *Br J Dermatol.* 2001 Apr;144(4):775-80.

Hennerici T, Pollmann R, Schmidt T, Seipelt M, Tackenberg B, Möbs C, Ghoreschi K, Hertl M, Eming R. Increased Frequency of T Follicular Helper

Cells and Elevated Interleukin-27 Plasma Levels in Patients with Pemphigus. PLoS One. 2016 Feb 12;11(2):e0148919.

Hertl M, Amagai M, Sundaram H, Stanley J, Ishii K, Katz SI. Recognition of Desmoglein 3 by Autoreactive T Cells in Pemphigus Vulgaris Patients and Normals. J Invest Dermatol. 1998 Jan;110(1):62-6.

Hertl M, Riechers R. Analysis of the T cells that are potentially involved in autoantibody production in pemphigus vulgaris. J Dermatol. 1999 Nov;26(11):748-52.

Hertl M Humoral and cellular autoimmunity in autoimmune bullous skin disorders. Int Arch Allergy Immunol. 2000 Jun;122(2):91-100.

Hertl M, Schuler G: Bullous autoimmune dermatoses. 1: Classification. Hautarzt. 2002 Mar;53(3):207-19.

Hertl M, Eming R, Veldman C. T cell control in autoimmune bullous skin disorders. J Clin Invest. 2006 May;116(5):1159-66.

Hertl M, Jedlickova H, Karpati S, Marinovic B, Uzun S, Yayli S, Mimouni D, Borradori L, Feliciani C, Ioannides D, Joly P, Kowalewski C, Zambruno G, Zillikens D, Jonkman MF. Pemphigus. S2 Guideline for diagnosis and treatment--guided by the European Dermatology Forum (EDF) in cooperation with the European Academy of Dermatology and Venereology (EADV). J Eur Acad Dermatol Venereol. 2015 Mar;29(3):405-14.

Heupel WM, Zillikens D, Drenckhahn D, Waschke J. Pemphigus vulgaris IgG directly inhibit desmoglein 3-mediated transinteraction. J Immunol. 2008 Aug 1;181(3):1825-34.

Hoffmann K, Hertl M, Sitaru C. [Molecular diagnosis of autoimmune dermatoses]. Hautarzt. 2016 Jan;67(1):33-9.

Hofmann SC, Hazem A. Juratli, Rüdiger Eming. Bullöse Autoimmundermatosen. J Dtsch Dermatol Ges. 2018 Nov;16(11):1339-1360.

Holm TL, Markholst H. Confirmation of a disease model of pemphigus vulgaris: characterization and correlation between disease parameters in 90 mice. Exp Dermatol. 2010 Aug;19(8):e158-65.

Ishii K, Amagai M, Hall RP, Hashimoto T, Takayanagi A, Gamou S, Shimizu N, Nishikawa T. Characterization of Autoantibodies in Pemphigus Using Antigen-Specific Enzyme-Linked Immunosorbent Assays With Baculovirus-

Expressed Recombinant Desmogleins. *J Immunol.* 1997 Aug 15;159(4):2010-7.

Joly P, Maho-Vaillant M, Prost-Squarcioni C, Hebert V, Houivet E, Calbo S, Caillot F, Golinski ML, Labeille B, Picard-Dahan C, Paul C, Richard MA, Bouaziz JD, Duvert-Lehembre S, Bernard P, Caux F, Alexandre M, Ingen-Housz-Oro S, Vabres P, Delaporte E, Quereux G, Dupuy A, Debarbieux S, Avenel-Audran M, D'Incan M, Bedane C, Bénétou N, Jullien D, Dupin N, Misery L, Machet L, Beylot-Barry M, Dereure O, Sassolas B, Vermeulin T, Benichou J, Musette P, French study group on autoimmune bullous skin diseases. First-line Rituximab Combined With Short-Term Prednisone Versus Prednisone Alone for the Treatment of Pemphigus (Ritux 3): A Prospective, Multicentre, Parallel-Group, Open-Label Randomised Trial. *Lancet.* 2017 May 20;389(10083):2031-2040.

Karpati S, Amagai M, Prussick R, Cehrs K, Stanley J: Pemphigus vulgaris antigen, a desmoglein type of cadherin, is localized within keratinocyte desmosomes. *J Cell Biol.* 1993 Jul;122(2):409-15.

Kasperkiewicz M, Ellebrecht CT, Takahashi H, Yamagami J, Zillikens D, Payne AS, Amagai M. Pemphigus. *Nat Rev Dis Primers.* 2017 May 11;3:17026.

Kisielow P. How does the immune system learn to distinguish between good and evil? The first definitive studies of T cell central tolerance and positive selection. *Immunogenetics.* 2019 Sep;71(8-9):513-518.

Koch PJ, Mahoney MG, Cotsarelis G, Rothenberger K, Lavker RM, Stanley JR. Desmoglein 3 Anchors Telogen Hair in the Follicle. *J Cell Sci.* 1998 Sep;111 (Pt 17):2529-37.

Kraan J, Gratama JW, Keeney M, D'Hautcourt JL. Setting Up and Calibration of a Flow Cytometer for Multicolor Immunophenotyping. *J Biol Regul Homeost Agents.* Jul-Sep 2003;17(3):223-33.

Kwok WW, Liu AW, Novak EJ, Gebe JA, Ettinger RA, Nepom GT, Reymond SN, Koelle DM. HLA-DQ tetramers identify epitope-specific T cells in peripheral blood of herpes simplex virus type 2-infected individuals: direct detection of immunodominant antigen-responsive cells. *J Immunol.* 2000 Apr 15;164(8):4244-9.

Lee E, Lendas KA, Chow S, Pirani Y, Gordon D, Dionisio R, Nguyen D, Spizuoco A, Fotino M, Zhang Y, Sinha AA. Disease relevant HLA class II alleles isolated by genotypic, haplotypic, and sequence analysis in North American Caucasians with pemphigus vulgaris. *Hum Immunol*. Jan-Feb 2006;67(1-2):125-39.

Li Z, Zhang J, Xu H, Jin P, Feng S, Wang B. Correlation of Conventional and Conformational Anti-Desmoglein Antibodies With Phenotypes and Disease Activities in Patients With Pemphigus Vulgaris. *Acta Derm Venereol*. 2015 Apr;95(4):462-5.

Lipski DA, Dewispelaere R, Foucart V, Caspers LE, Defrance M, Bruyns C, Willermain F. MHC class II expression and potential antigen-presenting cells in the retina during experimental autoimmune uveitis. *J Neuroinflammation*. 2017 Jul 18;14(1):136.

Lissina A, Ladell K, Skowera A, Clement M, Edwards E, Seggewiss R, van den Berg HA, Gostick E, Gallagher K, Jones E, Melenhorst JJ, Godkin AJ, Peakman M, Price DA, Sewell AK, Wooldridge L. Protein kinase inhibitors substantially improve the physical detection of T-cells with peptide-MHC tetramers. *J Immunol Methods*. 2009 Jan 1;340(1):11-24.

Lolli F, Martini H, Citro A, Franceschini D, Portaccio E, Amato MP, Mechelli R, Annibali V, Sidney J, Sette A, Salvetti M, Barnaba V. Increased CD8+ T Cell Responses to Apoptotic T Cell-Associated Antigens in Multiple Sclerosis. *J Neuroinflammation*. 2013 Jul 27;10:94.

Lombardi ML, Mercurio O, Tecame G, Fusco C, Ruocco V, Salerno A, Pirozzi G, Manzo C. Molecular analysis of HLA DRB1 and DQB1 in Italian patients with pemphigus vulgaris. *Tissue Antigens*. 1996 Mar;47(3):228-30.
Ma S, Wang C, Mao X, Hao Y. B Cell Dysfunction Associated With Aging and Autoimmune Diseases. *Front Immunol*. 2019 Feb 27;10:318.

Lu JG, Ji P, French SW. The Major Histocompatibility Complex Class II-CD4 Immunologic Synapse in Alcoholic Hepatitis and Autoimmune Liver Pathology: The Role of Aberrant Major Histocompatibility Complex Class II in Hepatocytes. *Am J Pathol*. 2020 Jan;190(1):25-32.

Maciorowski Z, Chattopadhyay PK, Jain P. Basic Multicolor Flow Cytometry. *Curr Protoc Immunol*. 2017 Apr 3;117:5.4.1-5.4.38.

Mackensen A, Müller F, Mougiakakos D, Böltz S, Wilhelm A, Aigner M, Völkl S, Simon D, Kleyer A, Munoz L, Kretschmann S, Kharboutli S, Gary R, Reimann H, Rösler W, Uderhardt S, Bang H, Herrmann M, Ekici AB, Buettner C, Habenicht KM, Winkler TH, Krönke G, Schett G.

Anti-CD19 CAR T cell therapy for refractory systemic lupus erythematosus. *Nat Med.* 2022 Oct;28(10):2124-2132.

Massilamany C, Krishnan B, Reddy J. Major Histocompatibility Complex Class II Dextramers: New Tools for the Detection of antigen-Specific, CD4 T Cells in Basic and Clinical Research. 01 Nov 2015, 82(5):399-408.

McCutcheon M, Wehner N, Wensky A, Kushner M, Doan S, Hsiao L, Calabresi P, Ha T, Tran TV, Tate KM, Winkelhake J, Spack EG. A sensitive ELISPOT assay to detect low-frequency human T lymphocytes. *J Immunol Methods.* 1997 Dec 29;210(2):149-66.

Mergler R, Kerstan A, Schmidt E et al. Atypical clinical and serological manifestation of pemphigus vegetans: A case report and review of the literature. *Case Rep Dermatol.* 2017 Apr 27;9(1):121-130.

Migliorati G, Bartoli A, Nocentini G, Ronchetti S, Moraca R, Riccardi C. Effect of dexamethasone on T-cell receptor/CD3 expression. *Molecular and Cellular Biochemistry.* 167, pages135–144(1997)

Mijnheer G, van Wijk F. T-Cell Compartmentalization and Functional Adaptation in Autoimmune Inflammation: Lessons From Pediatric Rheumatic Diseases. *Front Immunol.* 2019 May 9;10:940.

Miliotou AN, Papadopoulou LC. CAR T-cell Therapy: A New Era in Cancer Immunotherapy. *Curr Pharm Biotechnol.* 2018;19(1):5-18.

Möbs C, Schmidt T. Research Techniques Made Simple: Monitoring of T-Cell Subsets using the ELISPOT Assay. *J Invest Dermatol.* 2016 Jun;136(6):e55-e59.

Müller R, Svoboda V, Wenzel E, Gebert S, Hunzelmann N, Müller HH, Hertl M. IgG reactivity against non-conformational NH2-terminal epitopes of the desmoglein 3 ectodomain relates to clinical activity and phenotype of pemphigus vulgaris. *Exp Dermatol.* 2006 Aug;15(8):606-14.

Müller R, Svoboda V, Wenzel E, Müller HH, Hertl M. IgG Against Extracellular Subdomains of Desmoglein 3 Relates to Clinical Phenotype of Pemphigus Vulgaris. *Exp Dermatol*. 2008 Jan;17(1):35-43.

Murrell DF, Peña S, Joly P, Marinovic B, Hashimoto T, Diaz LA, Sinha AA, Payne AS, Daneshpazhooh M, Eming R, Jonkman MF, Mimouni D, Borradori L, Kim SC, Yamagami J, Lehman JS, Saleh MA, Culton DA, Czernik A, Zone JJ, Fivenson D, Ujiie H, Wozniak K, Akman-Karakaş A, Bernard P, Korman NJ, Caux F, Drenovska K, Prost-Squarcioni C, Vassileva S, Feldman RJ, Cardones AR, Bauer J, Ioannides D, Jedlickova H, Palisson F, Patsatsi A, Uzun S, Yayli S, Zillikens D, Amagai M, Hertl M, Schmidt E, Aoki V, Grando SA, Shimizu H, Baum S, Cianchini G, Feliciani C, Iranzo P, Mascaró JM Jr, Kowalewski C, Hall R, Groves R, Harman KE, Marinkovich MP, Maverakis E48, Werth VP. Diagnosis and management of pemphigus: Recommendations of an international panel of experts. *J Am Acad Dermatol*. 2020 Mar;82(3):575-585.e1.

Musette P, Bouaziz JD. B Cell Modulation Strategies in Autoimmune Diseases: New Concepts. *Front Immunol*. 2018 Apr 13;9:622.

Navegantes KC, de Souza Gomes R, Pereira PAT, Czaikoski PG, Azevedo CHM, Monteiro MC.

Immune modulation of some autoimmune diseases: the critical role of macrophages and neutrophils in the innate and adaptive immunity. *J Transl Med*. 2017 Feb 15;15(1):36.

Nguyen VT, Ndoye A, Grando SA. Pemphigus vulgaris antibody identifies pemphaxin. A novel keratinocyte annexin-like molecule binding acetylcholine. *J Biol Chem*. 2000 Sep 22;275(38):29466-76.

Obara W, Sato F, Takeda K, Kato R, Kato Y, Kanehira M, Takata R, Mimata H, Sugai T, Nakamura Y, Fujioka T. Phase I clinical trial of cell division associated 1 (CDCA1) peptide vaccination for castration resistant prostate cancer. *Cancer Sci*. 2017 Jul;108(7):1452-1457.

Papakonstantinou E, Kapp A, Jonkman MF, Raap U. Intraepidermal neutrophilic dermatosis type of IgA pemphigus with circulating linear IgA disease antibodies associated with ulcerative colitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2018 Jan;32(1):e10-e11.

Pierce SK, Morris JF, Grusby MJ, Kaumaya P, van Buskirk A, Srinivasan M, Crump B, Smolenski LA. Antigen-presenting Function of B Lymphocytes. *Immunol Rev.* 1988 Dec;106:149-80.

Pollmann R, Schmidt T, Eming R, Hertl M. Pemphigus: a Comprehensive Review on Pathogenesis, Clinical Presentation and Novel Therapeutic Approaches. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2018 Feb;54(1):1-25.

Pollmann R, Walter E, Schmidt T, Waschke J, Hertl M, Möbs C,1 and Eming R. Identification of Autoreactive B Cell Subpopulations in Peripheral Blood of Autoimmune Patients With Pemphigus Vulgaris. *Front Immunol.* 2019 Jun 14;10:1375.

Rappazzo CG, Huisman BD, Birnbaum ME. Repertoire-scale determination of class II MHC peptide binding via yeast display improves antigen prediction. *Nat Commun.* 2020 Sep 4;11(1):4414.

Reijonen H, Novak EJ, Kochik S, Heninger A, Liu AW, Kwok WW, Nepom GT. Detection of GAD65-specific T-cells by major histocompatibility complex class II tetramers in type 1 diabetic patients and at-risk subjects. *Diabetes.* 2002 May;51(5):1375-82.

Rius C, Attaf M, Tungatt K, Bianchi V, Legut M, Bovay A, Donia M, Straten PT, Peakman M, Svane IM, Ott S, Connor T, Szomolay B, Dolton G, Sewell AK. Peptide-MHC Class I Tetramers Can Fail To Detect Relevant Functional T Cell Clonotypes and Underestimate Antigen-Reactive T Cell Populations. *J Immunol.* 2018 Apr 1;200(7):2263-2279.

Robinson N, Hashimoto T, Amagai M, Lawrence S: The new pemphigus variants. *J Am Acad Dermatol.* 1999 May;40(5 Pt 1):649-71. quiz 672-3.

Roederer M. Compensation in Flow Cytometry. *Curr Protoc Cytom.* 2002 Dec;Chapter 1:Unit 1.14.

Rossetti RAM, Lorenzi NPC, Yokochi K, de Faria Rosa MBS, Benevides L, Margarido PFR, Baracat EC, Carvalho JP, Villa LL, Lepique AP. B Lymphocytes Can Be Activated to Act as Antigen Presenting Cells to Promote Anti-Tumor Responses. *LoS One.* 2018 Jul 5;13(7):e0199034.

Sadegh-Nasseri S, Kim A. Exogenous Antigens Bind MHC Class II first, and Are Processed by Cathepsins Later. *Mol Immunol.* 2015 Dec; 68(2 0 0): 81–84.

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. 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. *J Immunol.* 1995 Aug 1;155(3):1151-64.

Saito M, Stahley SN, Caughman CY, Mao X, Tucker DK, Payne AS, Amagai M, Kowalczyk AP. Signaling Dependent and Independent Mechanisms in Pemphigus Vulgaris Blister Formation. *PLoS One.* 2012;7(12):e50696.

Sajda T and Sinha AA. Autoantibody Signaling in Pemphigus Vulgaris: Development of an Integrated Model. *Front Immunol.* 2018 Apr 19;9:692.

Scharf SJ, Friedmann A, Brautbar C, Szafer F, Steinman L, Horn G, Gyllenstein U, Erlich HA.

HLA class II allelic variation and susceptibility to pemphigus vulgaris. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 May;85(10):3504-8.

Shawar SM, Cook RG, Rodgers JR, Rich RR. Specialized Functions of MHC Class I Molecules. I. An N-formyl Peptide Receptor Is Required for Construction of the Class I Antigen Mta. *J Exp Med.* 1990 Mar 1;171(3):897-912.

Schmidt E, Bröcker E-B, Zillikens D: Pemphigus: Loss of desmosomal cell-cell adhesion. *Hautarzt.* 2000 May;51(5):309-18.

Sloan JM, Kershaw MH, Touloukian CE, Lapointe R, Robbins PF, Restifo NP, and Hwu P. MHC class I and class II Presentation of Tumor Antigen in Retrovirally and Adenovirally Transduced Dendritic Cells. *Cancer Gene Ther.* 2002 Nov; 9(11): 946–950.

Solimani F, Maglie R, Pollmann R, Schmidt T, Schmidt A, Ishii N, Tackenberg B, Kirschbaum A, Didona D, Pickert J, Eming R, Hashimoto T, Hertl M. Thymoma-Associated Paraneoplastic Autoimmune Multiorgan Syndrome—From Pemphigus to Lichenoid Dermatitis. *Front Immunol.* 2019 Jun 21;10:1413.

Spear TT, Wang Y, Smith TW Jr, Simms PE, Garrett-Mayer E, Hellman LM, Baker BM, Nishimura MI. Altered Peptide Ligands Impact the Diversity of Polyfunctional Phenotypes in T Cell Receptor Gene-Modified T Cells. *Mol Ther.* 2018 Apr 4;26(4):996-1007.

Spindler V, Rötzer V, Dehner C, Kempf B, Gliem M, Radeva M, Hartlieb E, Harms GS, Schmidt E, Waschke J. Peptide-mediated desmoglein 3 crosslinking prevents pemphigus vulgaris autoantibody-induced skin blistering. *J Clin Invest*. 2013 Feb;123(2):800-11.

Splinder V, Eming R, Schmidt E, Amagai M, Grando S, Jonkman MF, Kowalczyk AP, Müller EJ, Payne AS, Pincelli C, Sinha AA, Sprecher E, Zillikens D, Hertl M, Waschke J. Mechanisms Causing Loss of Keratinocyte Cohesion in Pemphigus. *J Invest Dermatol*. 2018 Jan;138(1):32-37.

Stern JN, Keskin DB, Barteneva N, Zuniga J, Yunis EJ, Ahmed AR. Possible role of natural killer cells in pemphigus vulgaris - preliminary observations. *Clin Exp Immunol*. 2008 Jun;152(3):472-81.

Sugiyama H, Matsue H, Nagasaka A, Nakamura Y, Tsukamoto K, Shibagaki N, Kawamura T, Kitamura R, Ando N, Shimada S. CD4+CD25high Regulatory T Cells Are Markedly Decreased in Blood of Patients With Pemphigus Vulgaris. *Dermatology*. 2007;214(3):210-20.

Sung YC. The HLA System: Genetics, Immunology, Clinical Testing and Clinical Implications. *Yonsei Med J*. 2007 Feb 28;48(1):11-23.

Takahashi H, Kouno M, Nagao K, Wada N, Hata T, Nishimoto S, Iwakura Y, Yoshimura A, Yamada T, Kuwana M, Fujii H, Koyasu S, Amagai M. Desmoglein 3-specific CD4+ T cells induce pemphigus vulgaris and interface dermatitis in mice. *J Clin Invest*. 2011 Sep;121(9):3677-88.

Terasaki PI, editor. History of HLA: Ten recollections. Los Angeles: UCLA Tissue Typing Laboratory Press. 1990:121-49.

Theofilopoulos AN, Kono DH, Baccala R. The multiple pathways to autoimmunity. *Nat Immunol*. 2017 Jun 20;18(7):716-724.

Tirado-Sánchez A, Vázquez-González D, Ponce-Olivera RM, López-Lozano HE. Acetylcholine receptor antibodies in patients with pemphigus vulgaris: correlation with disease extent at the time of diagnosis and during follow-up. *Dermatol Online J*. 2012 May 15;18(5):14.

Tokuyasu TA, *Huang JD*. A primer on recent developments in cancer immunotherapy, with a focus on neoantigen vaccines. *J Cancer Metastasis Treat* 2018;4:2.

Tong JC, Tan TW, Sinha AA, Ranganathan S. Prediction of desmoglein-3 peptides reveals multiple shared T-cell epitopes in HLA DR4- and DR6-associated Pemphigus vulgaris. *BMC Bioinformatics*. 2006; 7(Suppl 5): S7.

Tron F, Gilbert D, Joly P, Mouquet H, Drouot L, Ayed MB, Sellami M, Masmoudi H, Makni S. Immunogenetics of pemphigus: an update. *Autoimmunity*, 01 Nov 2006, 39(7):531-539

Tsang SM, Liu L, The MT, Wheeler A, Grose R, Hart IR, Garrod DR, Fortune F, Wan H. Desmoglein 3, via an Interaction with E-cadherin, Is Associated with Activation of Src. *PLoS One*. 2010; 5(12): e14211.

Tsang SM, Brown L, Lin K, Liu L, Piper K, O'Toole EA et al. Non-junctional human desmoglein 3 acts as an upstream regulator of Src in E-cadherin adhesion, a pathway possibly involved in the pathogenesis of pemphigus vulgaris. *J Pathol*. 2012 May;227(1):81-93.

Tsunoda K, Ota T, Suzuki H, Ohyama M, Nagai T, Nishikawa T, Amagai M, Koyasu S. Pathogenic autoantibody production requires loss of tolerance against desmoglein 3 in both T and B cells in experimental pemphigus vulgaris. *Eur J Immunol*. 2002 Mar;32(3):627-33.

Tungatt K, Bianchi V, Crowther MD, et al. Antibody stabilization of peptide-MHC multimers reveals functional T cells bearing extremely low-affinity TCRs. *J Immunol*. 2015;194:463–74.

Tzanck A. Le cytodagnostic immediate en dermatology. *Ann Dermatol Syphiligr*. 1947;7:68.

Vanikar AV, Trivedi HL, Patel RD, Kanodia KV, Modi PR, Shah VR. Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Pemphigus Vulgaris: A Single-Center Experience. *Indian J Dermatol*. 2012 Jan-Feb; 57(1): 9–11.

Van Laethem F, Baus E, Smyth LA, Andris F, Bex F, Urbain J, Kioussis D, Leo O. Glucocorticoids attenuate T cell receptor signaling. *J Exp Med*. 2001 Apr 2;193(7):803-14.

Veldman C, Stauber A, Wassmuth R, Uter W, Schuler G, Hertl M. Dichotomy of autoreactive Th1 and Th2 cell responses to desmoglein 3 in patients with pemphigus vulgaris (PV) and healthy carriers of PV-associated HLA class II alleles. *J Immunol*. 2003 Jan 1;170(1):635-42.

Veldman CM, Gebhard KL, Uter W, Wassmuth R, Grötzinger J, Schultz E, Hertl M. T cell recognition of desmoglein 3 peptides in patients with pemphigus vulgaris and healthy individuals. *J Immunol.* 2004 Mar 15;172(6):3883-92.

Veldman C, Höhne A, Dieckmann D, Schuler G and Hertl M. Correction: Correction: Type I Regulatory T Cells Specific for Desmoglein 3 Are More Frequently Detected in Healthy Individuals than in Patients with Pemphigus Vulgaris. *J Immunol* October 1, 2012, 189 (7) 3778.

Vodo D, Sarig O, Sprecher E. The Genetics of Pemphigus Vulgaris. *Front Med (Lausanne).* 2018 Aug 14;5:226.

Wada N, Nishifuji K, Yamada T, Kudoh J, Shimizu N, Matsumoto M, Peltonen L, Nagafuchi S, Amagai M. Aire-dependent thymic expression of desmoglein 3, the autoantigen in pemphigus vulgaris, and its role in T-cell tolerance. *J Invest Dermatol.* 2011 Feb;131(2):410-7.

Wang S, Paweletz K, Chastain M, Loberg R, Juan G. A novel MHC-dextramer assay to identify melanoma antigen-specific CD8⁺ T cells from solid tumor disaggregates and matched peripheral blood. *J Immunother Cancer.* 2015; 3(Suppl 2): P109.

Waschke J. The desmosome and pemphigus. *Histochem Cell Biol.* 2008 Jul;130(1):21-54.

Wieczorek M, Abualrous ET, Sticht J, Álvaro-Benito M, Stolzenberg S, Noé F, Freund C. Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and MHC Class II Proteins: Conformational Plasticity in Antigen Presentation. *Front Immunol.* 2017; 8: 292.

Wu H, Wang ZH, Yan A, Lyle S, Fakharzadeh S, Wahl JK, Wheelock MJ, Ishikawa H, , Uitto J, Amagai M, and Stanley JR. Protection against Pemphigus Foliaceus by Desmoglein 3 in Neonates. *N Engl J Med.* 2000 Jul 6;343(1):31-5.

Wucherpfennig KW, Wu B, Bhol K, Monos DS, Argyris E, Karr RW, Ahmed AR, Stromingert JL. Structural basis for major histocompatibility complex (MHC)-linked susceptibility to autoimmunity: Charged residues of a single MHC binding pocket confer selective presentation of self-peptides in pemphigus vulgaris. December 1995. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 92, pp. 11935-11939.

- Xu RC**, Zhu HQ, Li WP, Zhao XQ, Yuan HJ, Zheng J, Pan M. The Imbalance of Th17 and Regulatory T Cells in Pemphigus Patients. *Eur J Dermatol*. Nov-Dec 2013;23(6):795-802.
- Yan L**, Wang JM, Zeng K. Association between HLA-DRB1 polymorphisms and pemphigus vulgaris: a meta-analysis. *Br J Dermatol*. 2012 Oct; 167(4): 768–777.
- Yeoh SC**, Byth-Wilson K, Murrell DF, Schifter M, Lin MW, Fulcher DA. Pemphigus Vulgaris Disease Activity: The Role of Antibodies to Desmogleins and Their Isotype. *J Oral Pathol Med*. 2019 Aug;48(7):619-625.
- Yokoyama T**, Matsuda S, Takae Y, Wada N, Nishikawa T, Amagai M, Koyasu S. Antigen-independent development of Foxp3+ regulatory T cells suppressing autoantibody production in experimental pemphigus vulgaris. *Int Immunol*. 2011 Jun;23(6):365-73.
- Yuan H**, Zhou S, Liu Z, Cong W, Fei X, Zeng W, Zhu H, Xu R, Wang Y, Zheng J, Pan M. Pivotal Role of Lesional and Perilesional T/B Lymphocytes in Pemphigus Pathogenesis. *J Invest Dermatol*. 2017 Nov;137(11):2362-2370.
- Zhang SY**, Zhou XY, Zhou XL, Zhang Y, Deng Y, Liao F, Yang M, Xia XY, Zhou YH, Yin DD, Ojaswi P, Hou QQ, Wang L, Zhang DY, Xia DM, Deng YQ, Ding L, Liu HJ, Yan W, Li MM, Ma WT, Ma JJ, Yu Q, Liu B, Yang L, Zhang W, Shu Y, Xu H, Li W. Subtype-specific inherited predisposition to pemphigus in the Chinese population. *Br J Dermatol*. 2019 Apr;180(4):828-835.
- Zivanovic D**, Bojic S, Medenica L, Andric Z, Popadic D. Human leukocyte antigen class II (DRB1 and DQB1) alleles and haplotypes frequencies in patients with pemphigus vulgaris among the Serbian population. *HLA*. 2016 May;87(5):367-74.

11.2 Verzeichnis der akademischen Lehrer/-innen

Amicosante Gianfranco, Amicucci Gianfranco, Barile Antonio, Biordi Assunta Leda, Bozzi Argante, Calvisi Vittorio, Carolei Antonio, Carta Gaspare, Casacchia Massimo, Cecconi Sandra, Ciancaglini Marco, Cifone Maria Grazia, Continenza Maria Adelaide, Crisci Roberto, Cutilli Tommaso, D'Alessandro Elvira, D'Andrea Gabriele, De Cesaris Paola, Della Longa Stefano, Desideri Govambattista, Di Cesare Ernesto, Di Orio Ferdinando, Di Staso Silvio, Di Stefano Leonardo, Dolo Vincenza, Domenici Luciano, Famulari Antonio, Farello Giovanni, Fargnoli Maria Concetta, Ferri Claudio, Ficorella Corrado, Francavilla Sandro, Gallucci Massimo, Galzio Renato, Gatto Roberto, Giacomelli Roberto, Ginaldi Lia, Giuliani Maurizio, Grimaldi Alessandro, Guadagni Stefano, Latella Giovanni, Lauriello Maria, Leardi Sergio, Leocata Pietro, Macchierelli Guido, Maggio Roberto, Marinangeli Franco, Marini Carmine, Mascaretti Giulio, Masciocchi Carlo, Mattei Antonella, Nardecchia Elio, Necozone Stefano, Palermo Patrizia, Passafiume Domenico, Penco Maria, Pistoia Maria Antonietta, Pisani Francesco, Properzi Gianfranco, Frea Silvio, Romano Silvio, Rossi Alessandro, Schietroma Mario, Spartera Carlo, Vetuschi Antonella, Zani Bianca Maria.

11.3 Danksagung

Zuallererst möchte ich mich ganz besonders bei meinem Betreuer Herr Prof. Dr. med. Michael Hertl bedanken. Danke für Ihres Vertrauen und Ihre außergewöhnliche Unterstützung, die es mir erlaubt hat, einen mitreißenden Blick in der wissenschaftlichen Arbeit zu erhalten.

Auch bei dem Laborteam möchte ich mich für die kollegiale Atmosphäre und Hilfestellung bedanken. Ich danke herzlich Prof. Dr. Rüdiger Eming und Dr. med. Hazem Juratli für die Bereitstellung der Abbildungen hinsichtlich der Immunfluoreszenz bzw. der Histopathologie. Darüber hinaus möchte ich dem gesamten klinisches Team von der Dermatologie und Allergologie Abteilung meinen Dank aussprechen. Vielen Dank für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre!

Ich möchte mich ebenso bei dem Personal der Verwaltung des Fachbereichs für ihre wertvollen und unterstützenden Beistand bedanken.

Einen herzlichen Dank möchte ich an meiner Familie ausrichten, die mir immer Kraft und Motivation für meine Arbeit vermittelt haben. Nicht zuletzt möchte ich meine Freunde, insbesondere Dott. Dr. med. Dario Didona für die außerordentliche Zusammenarbeit danken.

11.4 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich bei dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Identifizierung autoreaktiver T-Zellen bei Patienten mit Pemphigus Vulgaris mittels MHC-II-Dextramere,, in der Klinik für Dermatologie und Dermatologie ,des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg, unter Leitung von Prof. Dr. med. Michael Hertl mit Unterstützung durch Herr Pollmann, ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion (Dr.med.) eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Ich versichere, dass ich sämtliche wörtlichen oder sinngemäßen Übernahmen und Zitate kenntlich gemacht habe.

Mit dem Einsatz von Software zur Erkennung von Plagiaten bin ich einverstanden.

Vorliegende Arbeit ist zur Veröffentlichung der Publikation unter dem Titel „Type 2 T cell responses against distinct epitopes of the desmoglein 3 ectodomain in active pemphigus vulgaris“ vorgesehen.

Ort, Datum, Unterschrift Doktorand

„Die Hinweise zur Erkennung von Plagiaten habe ich zur Kenntnis genommen“.

Ort, Datum, Unterschrift Referent
