

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

**CD154 als früher Aktivierungsmarker zur Detektion  
von antigenspezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen in  
mononukleären Zellen des peripheren Blutes von  
Pemphigus vulgaris-Patienten und  
Birkenpollenallergikern**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

Dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Leonie Kauter aus Filderstadt

Marburg, 2024

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

Referent: Herr Prof. Dr. R. Eming

1.Korreferent: Herr Prof. Dr. H. Garn

Angenommen durch den Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am 13.06.2024

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin

Originaldokument gespeichert auf dem Publikationsserver der  
Philipps-Universität Marburg  
<http://archiv.ub.uni-marburg.de>



Dieses Werk bzw. Inhalt steht unter einer  
Creative Commons  
Namensnennung  
4.0 Deutschland Lizenz.

Die vollständige Lizenz finden Sie unter:  
<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.de>



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Das Immunsystem</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 T-Lymphozyten</b> .....	<b>1</b>
1.2.1 CD4 <sup>+</sup> T-Zellen.....	2
1.2.1.1 Aktivierung von CD4 <sup>+</sup> T-Zellen.....	3
1.2.2 CD154 (CD40-Ligand).....	5
1.2.2.1 CD154-Expression.....	5
1.2.2.2 Die Rolle des CD40-CD154-Systems.....	6
1.2.2.3 CD40 und CD154 in der Autoimmunität.....	7
1.2.2.4 CD40 und CD154 bei allergischen Erkrankungen.....	9
1.2.2.5 CD4 <sup>+</sup> T-Zellanalyse mithilfe von CD154.....	9
<b>1.3 Pemphigus vulgaris</b> .....	<b>12</b>
1.3.1 Klinische Manifestation.....	12
1.3.2 Immunpathogenese.....	13
1.3.2.1 Desmosomale Autoantikörper gegen Dsg1 und Dsg3.....	14
1.3.2.2 Effektor T-Lymphozyten und deren Zytokine.....	16
1.3.2.3 T <sub>H</sub> 1- und T <sub>H</sub> 2-Zellen.....	18
1.3.2.4 T <sub>H</sub> 17-Zellen.....	19
1.3.2.5 Follikuläre T-Helferzellen.....	20
1.3.2.6 Die Rolle von CD4 <sup>+</sup> CD154 <sup>+</sup> T-Zellen.....	20
1.3.3 Diagnostik.....	21
1.3.4 Therapie.....	22
<b>1.4 Birkenpollenallergie</b> .....	<b>23</b>
1.4.1 Klinische Manifestation und Diagnostik.....	23
1.4.2 Pathophysiologie.....	24
1.4.2.1 T <sub>H</sub> 2/T <sub>H</sub> 1-Modell.....	25
1.4.3 Therapie.....	26
<b>1.5 Zielsetzung</b> .....	<b>27</b>
<b>2 Material</b> .....	<b>29</b>
<b>2.1 Antikörper für die Durchflusszytometrie</b> .....	<b>29</b>
<b>2.2 Stimuli</b> .....	<b>29</b>
2.2.1 Rekombinante Proteine.....	29

2.2.2	Peptide .....	30
2.2.3	Mitogene und Extrakte.....	30
<b>2.3</b>	<b>Chemikalien und Reagenzien.....</b>	<b>30</b>
<b>2.4</b>	<b>Puffer und Kulturmedien.....</b>	<b>31</b>
<b>2.5</b>	<b>Verbrauchsmaterial.....</b>	<b>32</b>
<b>2.6</b>	<b>Geräte.....</b>	<b>32</b>
<b>2.7</b>	<b>Software .....</b>	<b>33</b>
<b>3</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>34</b>
<b>3.1</b>	<b>Patienten und Einschlusskriterien.....</b>	<b>34</b>
3.1.1	Patientengruppe Pemphigus vulgaris.....	34
3.1.2	Patientengruppe Birkenpollenallergie.....	35
3.1.3	Kontrollgruppe.....	36
<b>3.2</b>	<b>Blutentnahme und serologische Diagnostik.....</b>	<b>36</b>
<b>3.3</b>	<b>Pricktest .....</b>	<b>37</b>
<b>3.4</b>	<b>Separation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes durch Dichtegradientenzentrifugation.....</b>	<b>37</b>
<b>3.5</b>	<b>Zellzahlbestimmung.....</b>	<b>39</b>
<b>3.6</b>	<b>Kryokonservierung und Auftauen von Zellen.....</b>	<b>39</b>
<b>3.7</b>	<b>Ex vivo-Stimulation von Zellen.....</b>	<b>40</b>
<b>3.8</b>	<b>Antikörperfärbung.....</b>	<b>42</b>
<b>3.9</b>	<b>Durchflusszytometrie.....</b>	<b>44</b>
<b>3.10</b>	<b>Statistik .....</b>	<b>47</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>48</b>
<b>4.1</b>	<b>Patientencharakteristik .....</b>	<b>48</b>
4.1.1	Pemphigus vulgaris.....	48
4.1.2	Birkenpollenallergiker und Kontrollen.....	50
<b>4.2</b>	<b>Etablierung des Protokolls zur Detektion von CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T-Zellen .....</b>	<b>50</b>
<b>4.3</b>	<b>Analyse der CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T-Zellen bei PV-Patienten .....</b>	<b>52</b>
4.3.1	Zytokinexpressionsmuster der Dsg3-reaktiven CD4 <sup>+</sup> CD154 <sup>+</sup> T-Zellen .....	55
4.3.2	CD154-Expression nach Stimulation mit PV-spezifischen Peptiden .....	57
4.3.3	Einflussfaktoren auf die antigenspezifische CD154-Expression der CD4 <sup>+</sup> T-Zellen .....	59
4.3.3.1	Einfluss des klinischen Status auf die antigenspezifische CD154-Expression .....	60
4.3.3.2	Einfluss des HLA-Typs auf die antigenspezifische CD154-Expression der CD4 <sup>+</sup> T-Zellen.....	62
4.3.3.3	Einfluss der Therapie auf die CD154-Expression des Patientenkollektivs .....	62

4.3.4	Korrelation Dsg3-spezifischer CD4 <sup>+</sup> CD154 <sup>+</sup> T-Zellen mit Anti-Dsg3-Autoantikörper.....	63
<b>4.4</b>	<b>Analyse der CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T-Zellen bei Birkenpollenallergikern.....</b>	<b>64</b>
4.4.1	Zytokinexpressionsmuster der BPE-reaktiven CD4 <sup>+</sup> CD154 <sup>+</sup> T-Zellen.....	66
4.4.2	Proportionale Veränderung der T-Zellsubpopulationen T <sub>H</sub> 1 und T <sub>H</sub> 2 .....	67
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>69</b>
<b>5.1</b>	<b>Etablierung der CD154-Methode zur Detektion antigenspezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei Pemphigus vulgaris und Birkenpollenallergie.....</b>	<b>70</b>
5.1.1	Kryokonservierung .....	70
5.1.2	Stimulationsassay.....	71
5.1.3	FACS-Analyse .....	72
5.1.4	Aktivierungsmarker CD154.....	72
<b>5.2</b>	<b>Die Rolle von CD154 bei der T-Zell-vermittelten Pathogenese des PV .....</b>	<b>74</b>
5.2.1	CD154-Expression der CD8 <sup>+</sup> T-Zellen bei PV .....	79
5.2.2	Auswirkung des Krankheitsstatus auf die CD154-Expression der CD4 <sup>+</sup> T-Zellen .....	79
5.2.3	Modulierende exogene Faktoren auf die CD154-Expression der CD4 <sup>+</sup> T-Zellen .....	81
5.2.4	Effekte der T-Zellaktivierung auf die Effektorfunktion .....	82
5.2.5	Bedeutung von Dsg3 epitopspezifischen Peptidsequenzen .....	87
<b>5.3</b>	<b>Die Rolle von CD154 bei der T-Zell-vermittelten Pathogenese der Birkenpollenallergie.....</b>	<b>89</b>
5.3.1	Effekte einer T-Zellaktivierung auf die Effektorfunktion .....	92
<b>5.4</b>	<b>Fazit und Ausblick .....</b>	<b>98</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>101</b>
<b>7</b>	<b>Summary.....</b>	<b>103</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>105</b>
<b>9</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>151</b>
9.1	Tabellenanhang .....	151
9.2	Abbildungen .....	156
9.3	Danksagung .....	159
9.4	Verzeichnis der akademischen Lehrer-/innen.....	i

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>Abb. S</b>	Abbildung Supplement/Anhang
<b>AF700</b>	Alexa Fluor 700
<b>AICD</b>	engl. <i>activation-induced cell death</i> (aktivierungsinduzierter Zelltod)
<b>AIT</b>	Allergen-Immuntherapie
<b>APC</b>	engl. <i>antigen presenting cell</i> (antigenpräsentierende Zelle)
<b>APC-Cy7</b>	Allophycocyanin + Cyanin
<b>AR</b>	Allergische Rhinitis
<b>BCR</b>	B-Zell-Rezeptor
<b>BPA</b>	1) Birkenpollenallergiker
<b>BPE</b>	Birkenpollenextrakt
<b>BSA</b>	engl. <i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
<b>BV</b>	Brilliant-Violet
<b>bzw.</b>	beziehungsweise
<b>CD</b>	engl. <i>cluster of differentiation</i> (Differenzierungskluster)
<b>CPDA</b>	Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin
<b>DC</b>	Dendritische Zellen
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>Dsg1</b>	Desmoglein 1
<b>Dsg3</b>	Desmoglein 3
<b>EAE</b>	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
<b>ECD</b>	engl. <i>extracellular domains</i> (extrazelluläre Subdomänen)
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat
<b>ELISA</b>	engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> (enzymgekoppelter Immunadsorptionstest)
<b>ELISpot</b>	engl. <i>enzyme-linked-immuno-spot</i> (enzymgekoppelter Immunospottest)
<b>et al.</b>	lat. <i>et alii</i> (und andere)
<b>ER</b>	Endoplasmatisches Retikulum
<b>Fab</b>	engl. <i>fragment antigen-binding</i> (Fab-Antikörper)
<b>FACS</b>	engl. <i>fluorescence activated cell sorting</i> (Durchflusszytometrie)
<b>FasL</b>	Fas-Ligand
<b>Fc</b>	engl. <i>fragment crystallisable</i> (Fc-Region)
<b>FCS</b>	engl. <i>fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
<b>FSC</b>	engl. <i>forward scatter</i> (Vorwärtsstreulicht)
<b>g</b>	Mittlere Erdbeschleunigung
<b>h</b>	engl. <i>hour</i>
<b>IA</b>	Immunadsorption
<b>ICS</b>	engl. <i>intracellular cytokine staining</i> (Intrazelluläre Zytokinfärbung)
<b>IL</b>	Interleukin
<b>Ig</b>	Immunglobulin
<b>IVIG</b>	Intravenöse Immunglobuline
<b>K</b>	Kontrolle
<b>Kap.</b>	Kapitel
<b>KR</b>	Komplette Remission

<b>MHC</b>	engl. <i>major histocompatibility complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)
<b>min.</b>	Minuten
<b>MS</b>	Multiple Sklerose
<b>NC1(1)</b>	Nicht kollagene Domäne 1 (NC1) des humanen Kollagen VII
<b>NK</b>	Natürliche Killerzelle
<b>P</b>	Peptid
<b>p</b>	Irrtumswahrscheinlichkeit
<b>PBMC</b>	engl. <i>peripheral blood mononuclear cells</i> (periphere mononukleäre Blutzellen)
<b>PBS</b>	engl. <i>phosphat buffered saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
<b>PCR</b>	engl. <i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
<b>PE-Cy7</b>	Phycoerythrin + Cyanin-7
<b>PHA</b>	Phytohämagglutinin
<b>PHS</b>	engl. <i>pooled human serum</i> (gepooltes Humanserum)
<b>PR</b>	Partielle Remission
<b>PV</b>	Pemphigus vulgaris
<b>R</b>	Rezidiv
<b>RA</b>	Rheumatoide Arthritis
<b>RICD</b>	engl. <i>restimulation-induced cell death</i> (Restimulationsinduzierter Zelltod)
<b>RPMI</b>	Rosewell Park Memorial Institute
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>SLE</b>	Systemischer Lupus erythematoses
<b>SPT</b>	engl. <i>skin prick test</i> (Pricktest)
<b>SSC</b>	engl. <i>side scatter</i> (Seitwärtsstreulicht)
<b>SSc</b>	Sklerodermie
<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>Tab. S</b>	Tabelle Supplement/Anhang
<b>TCR</b>	engl. <i>T-cell receptor</i> (T-Zell-Rezeptor)
<b>T<sub>H</sub></b>	CD4 <sup>+</sup> -T-Helferzellen
<b>T<sub>FH</sub></b>	Follikuläre T-Helferzellen
<b>T<sub>REG</sub></b>	Regulatorische T-Zellen
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
<b>vgl.</b>	vergleiche
<b>z.B.</b>	zum Beispiel
<b>°C</b>	Grad Celsius

In der Arbeit verwendete englische Bezeichnungen (z.B. Eigennamen) sind kursiv dargestellt. Aus Gründen der besseren Lesbarkeit wird in dieser Arbeit das generische Maskulinum verwendet. Weibliche und anderweitige Geschlechteridentitäten werden dabei ausdrücklich mitgemeint, soweit es für die Aussage erforderlich ist.

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	T-Zellaktivierung. ....	4
Abb. 2:	Klinische Manifestation des Pemphigus vulgaris (PV). ....	13
Abb. 3:	Aufbau von Desmosomen mit Darstellung der Autoantigene humaner autoimmuner bullöser Hauterkrankungen und ihrer Rolle bei der epidermalen Adhäsion.....	15
Abb. 4:	Immunregulation der Autoantikörperproduktion bei Pemphigus vulgaris.....	17
Abb. 5:	Therapiemöglichkeiten bei allergischen Erkrankungen vom Soforttyp. ....	26
Abb. 6:	Einteilung der Pemphigus vulgaris (PV)-Patienten gemäß klinisch etablierten Kriterien .....	35
Abb. 7:	Isolation von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) mithilfe der Dichtegradienten-zentrifugation aus Vollblut. ....	38
Abb. 8:	Ex vivo-Stimulation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) der Pemphigus vulgaris (PV)-Patienten und der Birkenpollenallergiker (BPA) mit ihrer jeweiligen gesunden Kontrolle (K).....	42
Abb. 9:	Exemplarische Übersicht der verwendeten Gatingstrategie für die Durchflusszytometrie.....	46
Abb. 10:	Patientencharakteristik der Pemphigus vulgaris (PV)- Patienten. (a)....	49
Abb. 11:	Vergleichende CD154-Expressionsanalyse von frischen und eingefrorenen (eingefr.) mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC).....	51
Abb. 12:	Analyse der CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T-Zell-Subpopulationen hinsichtlich ihrer Fähigkeit CD154 zu exprimieren. ....	53
Abb. 13:	Antigenspezifisch induzierte CD154-Expression bei Pemphigus vulgaris (PV)-Patienten und gesunden Kontrollen (K) infolge der ex vivo-Stimulation. ....	54
Abb. 14:	Desmoglein (Dsg)-3 induzierte Zytokinexpression von Interleukin (IL)-4, IL-17, IL-21 und Interferon (IFN)- $\gamma$ der CD4 <sup>+</sup> CD154 <sup>+</sup> T-Zellen bei Pemphigus vulgaris (PV)-Patienten und der gesunden Kontrollgruppe (K). ....	56
Abb. 15:	Lage der Desmoglein (Dsg)-3-Peptide innerhalb der extrazellulären Domäne (ECD) des Dsg3 und ihr Einfluss auf die CD154-Expression nach ex vivo-Stimulation. (a).....	58
Abb. 16:	Korrelation der CD154-Expression von Desmoglein (Dsg)3- und Peptid-spezifischen T-Zellen. ....	59

Abb. 17:	Individuelle Reaktivität der CD154-Expression auf verschiedene Pemphigus vulgaris (PV)-spezifische Stimulanzen mit Stratifizierung des klinischen Status. ....	60
Abb. 18:	Individuelle CD154-Expression stratifiziert nach dem klinischen Status. ....	61
Abb. 19:	Individuelle CD154-Expression stratifiziert nach dem humanen Leukozytenantigen (HLA)-Klasse II Haplotyp. ....	62
Abb. 20:	Korrelation der CD154-Expression mit Autoantikörper und Stratifizierung bezüglich des klinischen Status. ....	63
Abb. 21:	Analyse der CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T-Zell--Populationen hinsichtlich der Expression von CD154 nach spezifischer und unspezifischer Stimulation zu exprimieren. ....	64
Abb. 22:	CD154-Expression in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) bei Birkenpollenallergikern (BPA) und Kontrollen (K) nach antigenspezifischer ex vivo-Stimulation. ....	65
Abb. 23:	Birkenpollenextrakt (BPE)-induzierte Zytokinexpression der CD4 <sup>+</sup> CD154 <sup>+</sup> T-Zellen bei Birkenpollenallergikern (BPA) und der Kontrollgruppe (K). ....	67

Anhang:

Abb. S1:	Antigenspezifisch induzierte CD154-Expression bei Pemphigus vulgaris (PV)-Patienten, gesunden Kontrollen (K) und Birkenpollenallergiker (BPA) infolge der ex vivo-Stimulation. ....	156
Abb. S2:	Vergleichende Analyse der CD4 <sup>+</sup> T-Zellen hinsichtlich ihrer Fähigkeit CD154 nach Stimulation von Desmoglein (Dsg)-3 und Peptid (P)-2 zu exprimieren. ....	156
Abb. S3:	Individuelle CD154-Expression stratifiziert nach dem klinischen Status und der systemischen Therapiestufe. ....	157
Abb. S4:	Einfluss der Kryokonservierung bei Pemphigus vulgaris (PV)-Patienten und Birkenpollenallergikern (BPA) auf CD154-Expression nach diverser Stimulation. ....	158
Abb. S5:	Kinetische Analyse der CD154-Expression der T-Zellen nach unspezifischer ex vivo-Stimulation bei drei gesunden Kontrollen (K). ....	158

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Zusammensetzung der Antikörper für die Oberflächenfärbung und intrazelluläre Zytokinfärbung .....	43
---------	---	----

### Anhang:

Tab. S1:	Gesamtübersicht aller Teilnehmer dieser Arbeit .....	151
Tab. S2:	Klinik, Therapie, Autoantikörper und der Humane Leukozyten-Antigen-Typ der Pemphigus vulgaris-Patienten.....	152
Tab. S3:	Übersicht der gesunden Kontrollgruppen .....	154
Tab. S4:	Klinische bzw. serologische Parameter und Therapie der Birkenpollenallergikern .....	155

# **1 Einleitung**

## **1.1 Das Immunsystem**

Der Mensch steht als Lebewesen im ständigen Stoffaustausch mit der Umwelt. Sein Körper ist daher einer Vielzahl von verschiedenen potenziell pathogenen und toxischen Substanzen ausgesetzt. Zum Schutz und zur Aufrechterhaltung der Integrität dient ein komplexes Immunsystem mit vielen unterschiedlichen Mechanismen. Dessen zentrale Fähigkeit besteht in der Unterscheidung zwischen körperfremden und körpereigenen Substanzen (Immuntoleranz) und darin nur auf pathogene Antigene eine Immunreaktion einzuleiten (Chaplin 2010; Vollmar et al. 2012). Eine Aufhebung der Selbsttoleranz führt zur Autoimmunität, die durch eine gegen körpereigene antigene Substanzen (Autoantigene) gerichtete Immunisierung mit Bildung von Autoantikörpern gekennzeichnet ist. Wird eine überschießende Immunreaktion gegen ansonsten harmlose Umweltantigene ausgelöst, gegen die das Immunsystem tolerant sein sollte, wird von einer Allergie gesprochen (Janeway und Medzhitov 2002; Ring 2007).

Das Immunsystem kann in einen angeborenen und einen adaptiven Teil untergliedert werden, wobei beide Systeme zusammen interagieren und sich gegenseitig bedingen. Die Regulatoren dieser Interaktion sind Zytokine wie Interleukine und Interferone, die von Immunzellen produziert und sezerniert werden. Die angeborene Immunantwort beruht auf genetisch vorhandenen zellulären, humoralen, chemischen und physikalischen Abwehrmechanismen gegen Krankheitserreger und weist einen unspezifischen Charakter auf (Janeway und Medzhitov 2002). Das erworbene Immunsystem basiert hingegen überwiegend auf einer spezifischen Erkennung von Antigenen durch T- und B-Lymphozyten über Rezeptoren. Die verschiedenen anschließenden Reaktionswege der adaptiven Immunität sind eng an die Subtypen der T-Zellen gekoppelt.

## **1.2 T-Lymphozyten**

Einen wichtigen Teil der zellulären Abwehr des adaptiven Immunsystems stellen die T-Lymphozyten, auch T-Zellen genannt, dar. Die T-Vorläuferzellen werden im Knochenmark aus hämatopoetischen Stammzellen gebildet und migrieren über die Blutbahn anschließend in den Thymus. Dort durchlaufen sie eine doppelte Selektion, bevor sie zu selbsttoleranten, naiven T-

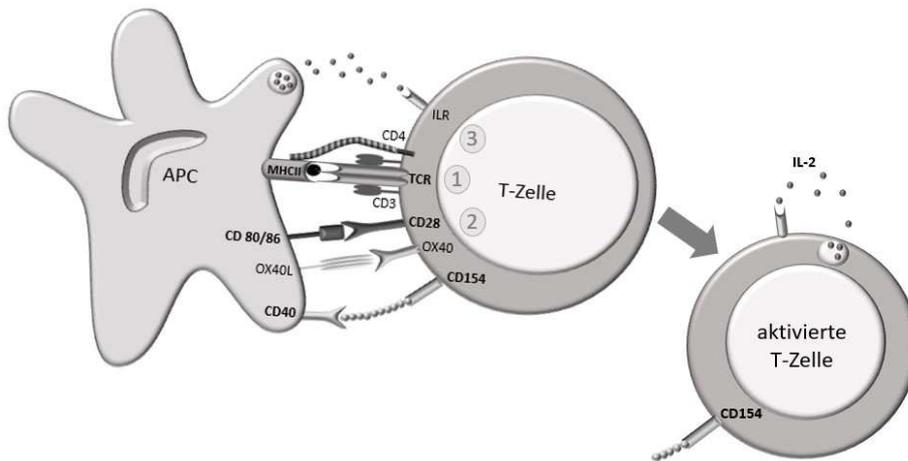
Zellen heranreifen. Diese Reifestadien umfassen die Ausbildung und Testung eines antigenerkennenden, aber selbsttoleranten T-Zell-Rezeptors (*T-cell receptor*, TCR) (Alam et al. 1996) sowie die Entwicklung der immunphänotypischen Oberflächenmerkmale (*cluster of differentiation*, CD) CD4 oder CD8 (van Ewijk 1991; Germain 2002). Durch die negative Selektion werden auf körpereigene Antigene ansprechende T-Zellen erkannt und aussortiert. Dieser Mechanismus spielt eine wichtige Rolle in der Prävention von T-Zellen, die potenziell Autoimmunerkrankungen auslösen können (Luckheeram et al. 2012). Die wenigen, aber selbsttoleranten positiven CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, wandern zur Aktivierung ins Blut und in sekundäre Lymphorgane ein. Die Aktivierung der T-Lymphozyten erfolgt über professionelle antigenpräsentierende Zellen (*antigen-presenting cell*, APC). Diese präsentieren den naiven T-Zellen in den sekundär lymphatischen Organen die in der Körperperipherie aufgenommenen Antigene. Die Antigenpräsentation verläuft mithilfe eines speziellen Haupthistokompatibilitätskomplexes (*major histocompatibility complex*, MHC)-Rezeptors. Dabei wird zwischen der MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II unterschieden. Die MHC-I-Rezeptoren kommen überwiegend auf kernhaltigen Zellen vor und präsentieren endogene Antigene, sodass CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit ihnen interagieren. Die CD8<sup>+</sup> schütten als zytotoxische Lymphozyten eine Vielzahl von Substanzen wie Granzyme und Perforin aus, die zur Apoptose der infizierten Zellen führen. Exogene Antigene werden vor allem über MHC-II-Rezeptoren der APC präsentiert und interagieren mit den CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Trombetta und Mellman 2005; Neefjes et al. 2011). Wichtige APC sind hierbei die dendritischen Zellen (DC) (Banchereau et al. 2000). Diese zentralen Prozesse der adaptiven Immunantwort sind allerdings viel flexibler, vielfältiger und Gegenstand aktueller Forschungen.

### 1.2.1 CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Die CD4<sup>+</sup> T-Zellen spielen durch ihre Aktivierung und der anschließenden Differenzierung in Effektorzellen eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung der adaptiven Immunität. Ihr breiter Tätigkeitsbereich beinhaltet die Unterstützung von B-Zellen bei der Antikörperproduktion, die Regulation der Makrophagenfunktion sowie die Vermittlung der Immunantwort im Kampf gegen eine große Anzahl pathogener Mikroben. Zudem verstärken und verarbeiten sie zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antworten (Luckheeram et al. 2012). Darüber hinaus stellen CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten einen kritischen Mediator des immunologischen Gedächtnisses dar und sind bei Autoimmunerkrankungen, Asthma, allergische Reaktionen und der Tumormunität involviert (Moreland 2004).

### 1.2.1.1 Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen

In den T-Zell-Zonen der sekundären Lymphorgane werden naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen Antigene auf der Oberfläche von APC über MHC-II-Moleküle präsentiert (Trombetta und Mellman 2005). Findet sich ein passender TCR einer CD4<sup>+</sup> T-Zelle für den MHC-II/Antigen-Komplex auf der APC, wird die Kommunikation intensiviert. Es benötigt anschließend mehrere Signale, um die CD4<sup>+</sup> T-Zelle zu aktivieren und die adaptive Immunantwort zu initiieren (Chen und Flies 2013). Das sogenannte zweite notwendige Signal wird über die Interaktion von vielen weiteren membrangebundenen oder löslichen Faktoren aus dem umgebenden Milieu geliefert (Bretscher 1999). So entsteht ein Dialog mit aktivierenden und inhibierenden Signalen zwischen einer T-Zelle und einer APC (Abb. 1 (1)). Des Weiteren führt die Bindung des TCR an den MHC-II/Antigen-Komplex zu einer transienten Hochregulierung des Oberflächenmoleküls CD154, auch CD40 Ligand (CD40L) genannt (Abb. 1 (2)) (Jin et al. 2012). Die Expression von CD154 auf den aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen vermittelt über die Ligation mit CD40 auf DC, B-Zellen und Makrophagen weitere wichtige und aktivierende kostimulatorische Signale (Banchereau et al. 1995; Grewal und Flavell 1998). Findet keine Kostimulation der CD4<sup>+</sup> T-Zelle statt, kann dies zu einem langlebigen Zustand funktioneller Unreaktivität (Anergie) oder zur Entwicklung einer Nichtreaktivität (Immuntoleranz) führen (Fathman und Lineberry 2007). Dies bietet die Möglichkeit durch eine Blockade der CD40 vermittelten Kostimulation eine immunologische Immuntoleranz zu bewirken (Suhlmann et al. 1995). Die aktivierte CD4<sup>+</sup> T-Zelle sezerniert darüber hinaus autokrine und parakrine Zytokine wie den Wachstumsfaktor Interleukin (IL)-2 und stimuliert die eigene bzw. benachbarte T-Zelle zur Proliferation und klonaler Expansion (Abb. 1 (3)) (Or et al. 1992; Zhu et al. 2010).



**Abb. 1: T-Zellaktivierung.** Schematische Darstellung einer Interaktion zwischen antigenpräsentierender Zelle (APC) und einer antigenspezifischen  $CD4^+$  T-Zelle. **(1)** Die Wechselwirkung wird durch das MHC-II/Antigen-TCR-Signal induziert. **(2)** Kostimulatorische Signale, wie die Bindung von CD28 auf T-Zellen mit CD80/86 auf APC, modellieren die Wirkung zusätzlich und stellen das zweite notwendige Signal zur Aktivierung dar (Moro-Garcia 2018). Erkennt die T-Zelle fremde Antigene stark und spezifisch, werden weitere Überlebenssignale von mehreren Wechselwirkungen, darunter OX40-OX40L, gesendet (Stüber 1996). **(3)** Weitere kostimulierende Moleküle sind im Anschluss diverse Zytokine. Bei Aktivierung via TCR exprimiert die antigenspezifisch aktivierte T-Zelle CD154 auf ihrer Oberfläche und kann durch die Bindung mit CD40 nicht nur die APC weiter aktivieren, sondern auch im Verlauf B-Zellen. Die aktivierte T-Zelle produziert darüber hinaus Interleukin (IL)-2 zur weiteren Proliferation und klonalen Expansion (modifiziert nach Jin et al. 2012). CD, *cluster of differentiation*; ILR, Interleukinrezeptor; MHC, *major histocompatibility complex*; TCR, T-Zell Rezeptor.

Die T-Zellen, die sowohl Aktivierungs- als auch Proliferationssignale erhalten, differenzieren sich je nach Zytokinmilieu in die verschiedenen Subtypen der T-Helferzellen ( $T_H$ -Zellen) (Zhu et al. 2010). Es sind mehrere Subtypen von  $T_H$ -Zellen, wie  $T_H1$ ,  $T_H2$ ,  $T_H17$ , regulatorische T-Zellen (Treg) und folliculäre T-Helferzellen ( $T_{FH}$ ) durch ihr Muster der Zytokinproduktion und ihre Funktion definiert (Abbas et al. 1996; Annunziato et al. 2007; Crotty 2014; Mosmann et al. 1986; Mosmann und Sad 1996; Romagnani 1994). Jede dieser Zellen erfüllt eine spezifische Aufgabe im Gewebe und bei der Entwicklung weiterer Immunantworten. Anschließend können so beispielsweise aktivierte T-Zellen in eine sekundäre CD40-CD154-abhängige Effektorerkennung mit B-Zellen eintreten, um einen Immunglobulin (Ig)-Klassenwechsel durchzuführen (Grewal und Flavell 1998).

## 1.2.2 CD154 (CD40-Ligand)

Das Oberflächenmolekül CD154 (CD40-L) ist ein Typ-II-Transmembranprotein, das zur Familie der Tumornekrosefaktoren (TNF) gehört. Hauptsächlich wird dieses auf aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert (Lederman et al. 1992). Auch anderen Immunzellen wie bestimmte CD8<sup>+</sup> T-Zellen, natürliche Killer (NK)-Zellen, DC und Subpopulationen der Granulozyten erweisen sich als CD154 exprimierend (Chen et al. 2019; Frentsch et al. 2013; Karnell et al. 2019b; Mackey et al. 1998). Das Spektrum der Funktionen von CD154 erweitert sich kontinuierlich. Dies demonstriert die essentielle Rolle des Oberflächenantigens CD154 und seiner Interaktion mit CD40 bei der Regulierung vielfältiger, zellvermittelter Immunantworten (Clark et al. 1996; Buhlmann und Noelle 1996; Cheng und Schoenberger 2002) und in der Pathogenese vieler Erkrankungen (Berner et al. 2000; Desai-Mehta et al. 1996; Karnell et al. 2019b).

### 1.2.2.1 CD154-Expression

Die Expression von CD154 wird in menschlichen CD4<sup>+</sup> T-Zellen dynamisch reguliert. Nach der T-Zell-Aktivierung wird innerhalb von wenigen Stunden (h, *engl. hour*) vorübergehend CD154 auf der Zelloberfläche exprimiert (Casamayor-Palleja et al. 1995) und kann daher als frühzeitiger Aktivierungsmarker angesehen werden. Im Verlauf zeigt sich nach 6-16 h ein Maximum der CD154-Expression, das nach 24 h wieder das ursprüngliche Expressionslevel erreicht (Chattopadhyay et al. 2005; Frentsch et al. 2005; Laman et al. 2017). Die Expression von CD154 wird über verschiedene Mechanismen eng reguliert. Die Interaktion mit dem membrangebundenen CD40 auf anderen Zellen kann zu einer Abwärtsmodulation durch proteolytische Spaltung, Endozytose und lysosomalen Abbau von CD154 führen. Hierbei wird außerdem über eine komplexe Signalkaskade CD154-kodierende mRNA in T-Zellen herunterreguliert (Yellin et al. 1994). Ein weiterer Mechanismus zur schnellen, aber vorübergehenden Expression stellt das endosomale Recycling dar (Casamayor-Palleja et al. 1995). Eine erneute Hochregulation von CD154 kann 48 h nach der Zellaktivierung beobachtet werden. Dies stellt allerdings eine CD28-abhängige Expression dar, die beim Menschen positiv durch IL-2 reguliert wird (Lee et al. 2002). Diese biphasische Expression von CD154 könnte verschiedene biologische Funktionen unterstützen. In Studien konnte gezeigt werden, dass die frühe CD154-Expression zu einer B-Zellaktivierung, Ig-Sekretion, Isotypenwechsel und Gedächtnisbildung führt (Lee et al. 2002; McDyer et al. 2002). Die CD40-CD154-Interaktionen

beeinflussen auch die Differenzierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Effektoruntergruppen (Kelsall et al. 1996). Eine induzierende Wirkung auf die CD154-Expression besitzen Lektine wie PHA (Phytohämagglutinin) und Con A (Concanavalin A), Phorbolester sowie die Zytokine IL-1 und TNF- $\alpha$  (van Kooten und Banchereau 1996).

### **1.2.2.2 Die Rolle des CD40-CD154-Systems**

In den letzten Jahren hat sich die CD40-CD154-Interaktion als immunpotenzierendes System herausgestellt, welches die Immunantwort des Wirts gegen unterschiedliche Krankheiten und Krankheitserreger steuert und reguliert. Die Funktionen des CD40-CD154-Systems sind nicht auf bestimmte Bereiche der Immunologie zu begrenzen, da es an verschiedenen inflammatorischen Funktionen angefangen von der B-Zell-Aktivierung bis hin zur Blutgerinnung beteiligt ist. Diese Vielfalt spiegelt sich auch in der Verteilung des Liganden und des Rezeptors auf diversen Zelltypen wider (Schönbeck und Libby 2001; van Kooten und Banchereau 2000). Eine Schlüsselrolle dieser Wechselwirkung wurde beim Priming und der Expression von antigenspezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen sowie der Aktivierung von APC zur Hochregulierung der kostimulatorischen Aktivität und der Zytokinproduktion nachgewiesen (Grewal und Flavell 1996a; Roy et al. 1993). Dies unterstreicht eine Studie von Roy und Kollegen, die nachweisen konnten, dass monoklonale Antikörper gegen CD154 die Aktivierung antigenspezifischer T-Zellen blockieren kann (Roy et al. 1995).

Weiterhin vermitteln Wechselwirkungen zwischen CD40 auf B-Zellen und seinem Liganden CD154 auf aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu verschiedenen Zeiten im Leben einer B-Zelle eine Reihe von wichtigen Signalen. Die kritische in vivo-Rolle der CD40-CD154-Interaktion bei der humoralen Immunantwort auf T-Zell-abhängige Antigene wird durch die Entdeckung verdeutlicht, dass punktuelle Mutationen im CD40- oder CD154-Gen beim Menschen das X-chromosomale Hyper-IgM-Syndrom verursachen (Aruffo et al. 1993; Korthäuer et al. 1993; Splawski und Lipsky 1994). Das Vorliegen eines Hyper-IgM-Syndroms geht mit einer schweren Form der Immundefizienz einher, die durch sehr niedrige Serum-IgG-, IgA- und IgE-Spiegel und eine fehlerhafte Keimzentrumsbildung gekennzeichnet ist (Allen et al. 1993; Aruffo et al. 1993). Ein vergleichbarer Phänotyp wird bei Knock-out-Mäusen beobachtet, denen entweder ein intaktes CD40 oder CD154 fehlt (Xu et al. 1994). Zusammengefasst spielt die CD40-CD154-Interaktion eine entscheidende Rolle bei der Förderung der Keimzentrumsbildung, dem Ig-Klassenwechsel, der Antikörpersekretion sowie der

Proliferation, Selektion und Aktivierung von B-Zellen (Armitage et al. 1992; Garside et al. 1998; Grewal und Flavell 1998; Kawabe et al. 1994). Diese Schlüsselrolle bei B-Zellantworten und der Vermeidung von Autoimmunität bestätigt eine Studie mit Mäusen (Rathmell et al. 1996). Das Tiermodell zeigt, dass CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Lage sind sowohl klonale Expansion als auch Deletion von B-Zellen zu induzieren. Die Entscheidung über das Schicksal von B-Zellen wird durch die Wirkung der auf aktivierten T-Zellen befindlichen Oberflächenproteine CD154 und Fas-Ligand (FasL), deren Effekte durch Signale des B-Zell-Rezeptors (BCR) reguliert werden, bestimmt. Eine klonale Proliferation durchlaufen somit nur B-Zellen, deren BCR durch fremde Antigene stimuliert wurde und es dadurch zu einer akuten CD154- und FasL-Expression kommt. CD154 und FasL lösen jedoch eine klonale Deletion von B-Zellen aus, wenn der BCR durch chronische Stimulation mit Selbstantigenen desensibilisiert wird oder kein Antigen gebunden wurde (Rathmell et al. 1996). Die Notwendigkeit, dass sowohl Fas als auch CD154 das Schicksal der selbstreaktiven B-Zellen korrekt regulieren, könnte die schweren Autoantikörper-Störungen bei Kindern mit Fas- oder CD154-Mangel erklären (Aruffo et al. 1993; Rieux-Laucat et al. 1995).

### **1.2.2.3 CD40 und CD154 in der Autoimmunität**

Der CD40-CD154-Signalweg spielt bei vielen Autoantikörper-getriebenen und T-Zell-vermittelten Autoimmunerkrankungen, wie rheumatoider Arthritis (RA) (Berner et al. 2000), Multiple Sklerose (MS) (Jensen et al. 2001), experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE, Mausmodell für MS) (Girvin et al. 2002; Vaitaitis et al. 2017), systemischer Lupus erythematodes (SLE) (Desai-Mehta et al. 1996) und vielen weiteren eine entscheidende Rolle (Karnell et al. 2019b).

Eine positive Rückkopplungsschleife zwischen T- und B-Zellen ist entscheidend für die Initiierung und Verstärkung von Autoimmunreaktionen (Abb. 4) (Buhlmann und Noelle 1996; Cheng und Schoenberger 2002; Clark et al. 1996; Shlomchik et al. 2001). Diese Assoziationen konnten in verschiedenen Mausmodellen nachgewiesen werden (Durie et al. 1993; Gerritse et al. 1996; Mohan et al. 1995). In all diesen Modellen konnte eine Behandlung der Mäuse mit Anti-CD154-Antikörpern, allein oder in Kombination mit einer Blockade von B7-Molekülen (CD80,CD86) (Buhlmann und Noelle 1996; Griggs et al. 1996), die Entwicklung der Krankheit blockieren, indem sie die Schädigung des Zielgewebes reduzierte bzw. verhinderte oder die Infiltration von Leukozyten am Zielgewebe ermöglichte. Die Studie von Gerritse et al. konnte

zeigen, dass die Behandlung mit Anti-CD154-Antikörper nicht nur die Entwicklung von EAE in Gewebe von Mäusen sondern auch die Entwicklung von MS in humanem Gewebe verhindert (Gerritse et al. 1996). Zum einen kann durch die Blockade des Anti-CD154-Antikörpers das Priming von antigenspezifischen T-Zellen und damit auch die Entstehung von autoimmunspezifischen Plasmazellen verhindert werden (Gerritse et al. 1996). Zum anderen können auch nachgelagerte Effekte von CD154 auf Effektorfunktionen, die zum Beispiel Gewebeschäden vermitteln, durch diese Antikörper blockiert werden (Grewal und Flavell 1996b; Grewal und Flavell 1998). Eine neue Studie, die CD154-Bindungsproteine verwendet, zeigt ebenfalls eine reduzierte Anzahl an Autoantikörper und eine verringerte Krankheitsaktivität bei Patienten mit einer Autoimmunerkrankung (Karnell et al. 2019a). Klinische Studien mit Wirkstoffen, die gegen CD154 gerichtet sind, haben den potenziellen Nutzen einer Blockade des CD40-Signalwegs bei Autoimmunerkrankungen wie systemischer Lupus erythematoses (SLE) (Boumpas et al. 2003) und immunzytopenischer Purpura (Vazquez-Lombardi et al. 2015) gezeigt. Allerdings wurden diese aufgrund thromboembolischer Ereignisse im Zusammenhang mit einer Thrombozytenaggregation, die durch Quervernetzung von Anti-CD154-Antikörpern verursacht wurden, gestoppt. Um dieses Problem zu lösen, wurden neue Anti-CD154-Therapeutika ohne thromboembolische Nebenwirkungen entwickelt und in ersten klinischen Studien untersucht. Diese neueren Studien zeigen eine sichere Verabreichung und eine Verringerung der Krankheitsaktivität (Chamberlain et al. 2017; Espié et al. 2020; Karnell et al. 2019b).

Bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen der Haut wird den infiltrierenden Lymphozyten, insbesondere aktivierter T-Zellen, eine Schlüsselrolle in der Gewebspathogenese zugeschrieben. Die Expression von CD40 in Keratinozyten in der Haut von gesunden Spendern ist physiologisch (Grousson et al. 2000), allerdings kann dieses Oberflächenantigen bei Autoimmundermatosen, wie Sklerodermie (SSc) oder SLE, stark hochreguliert werden. Bei SLE, aber nicht bei den gesunden Probanden, sind CD154<sup>+</sup> infiltrierende Lymphozyten in Hautbiopsien vorhanden (Caproni et al. 2007b). Die Überexpression von CD154 auf aktivierten T-Zellen löst auf den B-Zellen eine Kaskade von Ereignissen aus, die zur Produktion vieler Autoantikörper und zur Expression des stimulierenden Oberflächenantigens CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2) anregt (Nagafuchi et al. 2003). Die starke Hochregulation von CD40 in Fibroblasten der Haut bei SSc, führt durch die Ligation mit CD154 zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen wie IL-6 und IL-8 sowie zur Induktion der CD80-Expression auf Hautfibroblasten (Fukasawa et al. 2003). CD154 wird darüber hinaus

ebenfalls von im Blut zirkulierenden T-Zellen und in läsionaler Haut bei Patienten mit SSc überexprimiert (Roumm et al. 1984). Auch die lösliche Variante des CD154 im Serum ist mit einer SSc und dem SLE assoziiert (Kato et al. 1999; Komura et al. 2007). Bei der blasenbildenden Autoimmundermatose bullöses Pemphigoid wurde ebenfalls erhöhtes zirkulierendes CD154 festgestellt (Watanabe et al. 2007).

#### **1.2.2.4 CD40 und CD154 bei allergischen Erkrankungen**

Bei der Typ-I-Allergie ist das Zusammenspiel zwischen CD40 auf B-Zellen und CD154 auf aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen von grundlegender Bedeutung für die Entwicklung von allergenspezifischen IgE-Antikörpern (Noelle et al. 1992; Poulsen und Hummelshoj 2007). Diese Interaktion zusammen mit den überwiegend von T<sub>H</sub>2-Zellen produzierten Zytokinen ist insbesondere für den IgE-Klassenwechsel der B-Zellen wesentlich (Geha et al. 2003). In einem Allergiemodell bei Mäusen wurde beobachtet, dass die Wechselwirkung nur während der allergischen Sensibilisierung erforderlich ist. Eine Blockade von CD154 führte zur Verhinderung der Sensibilisierung und zur Unterdrückung der T-Zell-Reaktion (Linhart et al. 2007). Die Blockade verhinderte zwar eine Sensibilisierung, wenn sie zum Zeitpunkt der Allergenexposition verabreicht wurde, konnte jedoch nicht eine dauerhafte Toleranz bei wiederholtem Kontakt mit dem Allergen aufbauen (Gattringer et al. 2016). Auch die kombinierte Blockierung verschiedener kostimulatorischer Interaktionen (OX40L, CD28) hatte keinen additiven Effekt (Gattringer et al. 2016). Um eine etablierte IgE-Reaktion bei Allergien zu behandeln, reicht die Unterdrückung von T-Zellen durch Blockierung von CD154 ohne weitere aktive Immunregulation oder Verschiebung des T<sub>H</sub>2/T<sub>H</sub>1-Gleichgewichts nicht aus (Linhart et al. 2007). Eine erhöhte CD154-Expression auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen von Allergikern gegenüber einer nicht allergischen Vergleichsgruppe wurde bereits in mehreren Studien gezeigt (Nakstad et al. 1999; Smith et al. 2013a; Wingett und Nielson 2003). Unter einer sublingualen Immuntherapie demonstrierten unterschiedliche Forschungsarbeiten im Bereich der Allergologie, dass nicht nur die klinische Krankheitsaktivität, sondern auch die Anzahl der CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T-Zellen abnahm (Keil 2006; Nomura et al. 2016).

#### **1.2.2.5 CD4<sup>+</sup> T-Zellanalyse mithilfe von CD154**

Die Detektion und die Beurteilung von antigenspezifisch aktivierten T-Zellen sind bei der Analyse einer Immunantwort von großer Bedeutung. Auf diese Weise können Informationen

über ihre Frequenz, ihren Phänotyp und ihre funktionellen Fähigkeiten helfen, physiologische Immunprozesse oder Immunpathologien besser zu verstehen. Infolge der hohen Diversität des T-Zell-Repertoires ist die Häufigkeit von T-Zellen, die spezifisch für einen einzelnen Peptid-MHC-Liganden sind, sehr gering. Die Frequenz antigenspezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen von Autoantigenen bzw. Allergenen liegen typischerweise im Bereich von einer Zelle innerhalb von 10<sup>3</sup> bis 10<sup>6</sup> menschlicher peripherer T-Zellen (Bacher et al. 2013; Kwok et al. 2010). Methoden zur Zählung solch seltener Zellpopulationen müssen daher die Verarbeitung großer Zellzahlen ermöglichen und genügend Zielereignisse für statistisch relevante Analysen sammeln. Dabei muss eine Häufung von Hintergrundereignissen verhindert werden.

Die Durchflusszytometrie zur Analyse von antigenspezifischen T-Zellen hat sich zur bevorzugten Methode in der klinischen Forschung entwickelt, da eine direkte Quantifizierung und Charakterisierung der Zellen mit minimaler ex vivo-Manipulation möglich sind (Bacher et al. 2013). Optionale Analysemethoden, die auf Grundlage der antigenspezifischen Proliferation z.B. mithilfe von <sup>3</sup>H-Thymidin-Inkorporation die T-Zellen messen, zeigen dahingehend deutliche Limitationen auf. Sie ermöglichen keine Beurteilung der spezifischen Zellsubpopulationen, die als Reaktion auf die Stimulation mit Antigenen proliferieren (Di Blasi et al. 2020). Eine Alternative zur Durchflusszytometrie stellt die etablierte Anwendung der ELISpot (enzyme-linked immunospot)-Technik dar. Das Aktivierungsmuster der zuvor stimulierten antigenspezifischen T-Zellen wird durch die Expression von Zytokinen mit einer hohen Sensitivität detektiert (Bacher und Scheffold 2013; Leehan und Koelsch 2015). Im Gegensatz zu der Durchflusszytometrie können Zellen, die ein spezifisches Zytokin generell synthetisieren und speichern, solange sie das Zytokin nicht sezernieren, nicht detektiert werden. Ein anderer Nachteil stellt die beschränkte Beurteilung des Phänotyps und die fehlende Möglichkeit einer Sortierung der antigensezernierenden T-Zellen dar (Chattopadhyay et al. 2006; Kalyuzhny 2005). Eine weitere Nachweismethode zur Detektion von antigenspezifischen T-Zellen mithilfe der Durchflusszytometrie stellt die direkte Markierung mittels spezifischer TCR-MHC-Multimere, wie z.B. Dextramere, dar. Diese ermöglicht eine hohe Spezifität ohne Einschränkung auf bestimmte funktionelle Parameter (Bacher und Scheffold 2013). Allerdings ist der Einsatz dieser Technologie häufig durch die fehlende Kenntnis immundominanter Epitope und eine ungenaue Charakterisierung der MHC-Allele eingeschränkt (Altman et al; Bacher und Scheffold 2013; Hackett und Sharma 2002). Des Weiteren liefert die MHC-Multimer-Methode keine Informationen über die Funktionalität der nachgewiesenen Zellen, benötigt vor der Analyse eine lange zu potentiellen Verfälschungen führende ex vivo-

Expansion und kann bei geringer Affinität des TCR zum Antigen funktionelle T-Zellen übersehen (Dolton et al. 2018; Tario et al. 2015). Da insbesondere T<sub>H</sub>-Zellen durch ihre spezifische Effektorfunktionen in zahlreiche Subtypen eingeteilt werden können, sind Methoden mit einer vorherigen ex vivo-Stimulation mit dem spezifischen Antigen bei Fragestellungen zur Funktionalität zu bevorzugen.

Ein alternativer Ansatz für die direkte Visualisierung antigenspezifischer T-Zellen mithilfe der Durchflusszytometrie ist der Nachweis von Aktivierungsmarkern, wie CD154, CD69 oder CD137, die bei einer antigenspezifischen Aktivierung auf der T-Zell-Oberfläche induziert werden. Die Expression einiger dieser Marker ist unabhängig von anderen Effektorfunktionen wie der Zytokinsekretion oder Zytotoxizität, die auf den Differenzierungszustand der T-Zellen oder bestimmte T-Zell-Subtypen beschränkt sein können. Daher erlauben Aktivierungsmarker die umfassende Charakterisierung aller spezifischen T-Zellen gegen ein bestimmtes Antigen, losgelöst von der funktionellen Spezialisierung, dem MHC-Allel oder der exakten Definition der antigenen Epitopen. Als zentraler Mediator der T-Zell-Hilfe wird CD154 von praktisch allen funktionell aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen unabhängig von ihrem Differenzierungsstatus kurzzeitig auf der Oberfläche exprimiert (Frentsch et al. 2013). Der Nachweis der CD154-Expression mithilfe der Durchflusszytometrie ist somit eine Vorgehensweise, welche eine quantitative Beurteilung antigenspezifisch aktivierter CD4<sup>+</sup> T-Zellen erlaubt (Chattopadhyay et al. 2006; Frentsch et al. 2005; Kirchhoff et al. 2007). Im Vergleich zu anderen gebräuchlichen Verfahren bietet die Analyse anhand des Aktivierungsmarkers CD154 diverse Vorteile. Er ermöglicht einen hochspezifischen Nachweis der antigeninduzierten CD154-Expression, da dieser aufgrund seiner schnellen Internalisierung und Degradation nach der Interaktion mit seinem Rezeptor CD40 eine geringe ex vivo-Hintergrundexpression aufweist (Bacher et al. 2013). Die antigenspezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen lassen sich dabei durch eine de novo-Expression von CD154 nach Stimulation identifizieren (Meier et al. 2008). Eine Stabilisierung der CD154-Expression kann auf der Oberfläche mithilfe eines monoklonalen Anti-CD40-Antikörpers oder intrazellulär durch Zugabe von einem Sekretionsinhibitor wie Brefeldin A in die Kultur erfolgen (Frentsch et al. 2005). Die schnelle Hochregulierung der CD154-Expression nach dem Antigenkontakt ermöglicht die Kombination mit weiteren Zytokin- und phänotypischen Marker-Färbungen (Meier et al. 2008). Dabei kann der Aktivierungsmarker alle antigenspezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen unabhängig von ihrer Funktion identifizieren (Chattopadhyay et al. 2006). Der Nachweis der CD154-Expression ist somit ein Verfahren, das sowohl eine quantitative als auch qualitative ex vivo-Beurteilung antigenspezifischer CD4<sup>+</sup>

T-Zellen erlaubt (Chattopadhyay et al. 2005; Chattopadhyay et al. 2006; Cohen et al. 2005; Frentsch et al. 2005; Kirchhoff et al. 2007).

### **1.3 Pemphigus vulgaris**

Beim Pemphigus vulgaris (PV) handelt es sich um eine seltene bullöse Autoimmunerkrankung der Haut und Schleimhäute mit einer Inzidenz von 0,1-0,5/10<sup>5</sup> Einwohner in Mitteleuropa ohne Geschlechtsprävalenz (Kneisel und Hertl 2011). Männer und Frauen leiden im gleichen Umfang an der Erkrankung. Es betrifft überwiegend Erwachsene mit Häufigkeitsgipfel im mittleren Alter zwischen 40-60 Jahren (Amagai et al. 1999; Nousari und Anhalt 1999). Der PV gehört zusammen mit dem Pemphigus foliaceus und dem paraneoplastischen Pemphigus zu den Pemphigus-Erkrankungen (griechisch: „pemphix“- die Blase), wobei der PV der häufigste Vertreter ist (Nousari und Anhalt 1999). Klinisch kennzeichnet sich der PV durch die Ausbildung von Blasen und großflächigen Erosionen der Schleimhäute. Pathophysiologisch wird die zugrunde liegende intraepidermale Blasenbildung durch zirkulierende Autoantikörper im Serum gegen die desmosomalen Zelladhäsionsproteine Desmoglein (Dsg)3 und/oder Dsg1 auf epidermalen Keratinozyten verursacht (Amagai et al. 1999; Kneisel und Hertl 2011). Zahlreiche Faktoren begünstigen die Entwicklung dieser Autoimmunerkrankung. Eine besondere Bedeutung kommt dabei der genetischen Prädisposition zu, die eine Assoziation mit Veränderungen in den hypervariablen Regionen der  $\beta$ 1-Kette bestimmter Klasse-II-Gene des humanen Leukozytenantigens (HLA) aufzeigt. Besonders die Haplotypen HLA-DR $\beta$ 1\*0402 und/oder HLA-DQ $\beta$ 1\*0503 sind in der zentraleuropäischen Bevölkerung mit der Erkrankung assoziiert und können bei einem Großteil der Betroffenen nachgewiesen werden (Svecova et al. 2015).

#### **1.3.1 Klinische Manifestation**

Die Mehrzahl aller PV-Patienten entwickelt lokalisiert oder generalisiert schlabbe Bläschen auf der Haut und Schleimhäuten, die sich aufgrund ihrer Fragilität schnell in großflächige Erosionen mit Progressionstendenz verwandeln (Amagai und Stanley 2012; Venugopal und Murrell 2011) (Abb. 2). Diese sind zunächst nässend und bilden im Verlauf das charakteristische hellrote, krustös belegte Erscheinungsbild. Zu den Initialsymptomen des PV gehören über einen langen Zeitraum hinweg persistierende, schmerzhafte Schleimhauterosionen. In den meisten Fällen ist die Mundschleimhaut (70 %) oder die

Genitalschleimhaut (20 %) initial betroffen (Eming 2015; Kneisel und Hertl 2011). Geht der PV ausschließlich mit Mundschleimhautläsionen einher, die sich auch über den Gaumen bis hin zum laryngopharyngealen Bereich ausbreiten können, wird vom mukosalen Typ gesprochen (Hertl und Schuler 2002a; Moll und Moll 1998). Bei einer zusätzlichen Beteiligung der Hautareale des Körpers, die Wochen nach dem initialen Befall der Schleimhäute auftreten kann, wird dies als mukokutaner Typ bezeichnet.



**Abb. 2: Klinische Manifestation des Pemphigus vulgaris (PV).** Klinischer Befund eines Patienten mit ausschließlicher Blasenbildung an der oralen Mukosa (mukosaler PV, links) und eines Patienten mit zusätzlicher Hautbeteiligung (mukokutaner PV, rechts). Quelle: Klinik für Dermatologie und Allergologie, Philipps Universität-Marburg.

Der PV ist eine chronische Erkrankung mit Phasen der Remission und Exazerbation. Ohne geeignete Behandlung kann der Krankheitsverlauf aufgrund der fehlenden epidermalen Barrierefunktion mit tödlichen Komplikationen einhergehen. Trotz jüngster Fortschritte bei der Behandlung von PV erleiden viele Patienten wiederholte Rückfälle und/oder Nebenwirkungen der Behandlungen. So ist die geschlechts- und altersadaptierte Mortalität bei PV im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung zwei- bis dreimal höher (Kridin 2018). Obwohl bereits viel Forschung in die Aufklärung der Pathomechanismen dieser Autoimmunerkrankung investiert wurde, ist das Verständnis der Faktoren, die der Entstehung und Fortschreitung zugrunde liegen, noch unvollständig.

### 1.3.2 Immunpathogenese

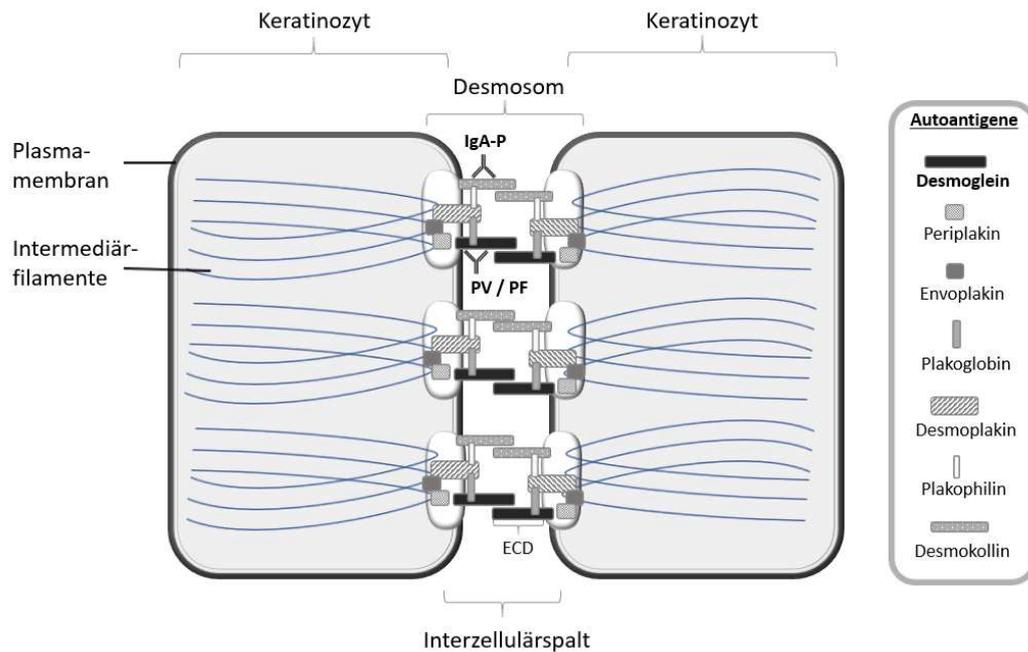
Der zentrale Punkt in der Immunpathogenese des PV stellt der Verlust der Immuntoleranz gegenüber den Autoantigenen Dsg3 und Dsg1 dar. Dies führt in Folge zur Ausbildung von pathogenen Autoantikörpern, die gegen desmosomale Adhäsionsproteine epidermaler

Keratinocyten gerichtet sind und zum klinischen Bild des PV führen. An diesem Prozess sind neben autoreaktiven B- auch T-Zellen entscheidend beteiligt, die durch Ihre Interaktion die pathogene Immunantwort initiieren, vorantreiben und aufrechterhalten (Amber et al. 2013; Eming et al. 2014; Yokoyama und Amagai 2010).

### **1.3.2.1 Desmosomale Autoantikörper gegen Dsg1 und Dsg3**

Die desmosomalen Cadherine Dsg1 und Dsg3 werden als zentrale, pathogenetisch relevante Autoantigene bei PV angesehen (Amagai et al. 1991; Koulu et al. 1984). Bei der Mehrheit der PV-Patienten können Autoantikörper gegen eines oder beide Autoantigene serologisch nachgewiesen werden (Lenz et al. 1999). In einigen Fällen können darüber hinaus auch Autoantikörper gegen weitere desmosomale Adhäsionsstrukturen, wie Desmocollin und Desmoplakin, gefunden werden (Nguyen et al. 2000; Rafei et al. 2011) (Abb. 3). Diese pathologischen Autoantikörper gegen die Komponenten der Desmosomen beeinträchtigen die intraepidermale Adhäsion, was zu Akantholyse und durch mechanische Reize zur Ablösung der Epidermis führt. Dies hat zur Folge, dass sich Blasen und Erosionen auf der Haut und/oder den Schleimhäuten bilden. Die Akantholyse bei PV scheint das Ergebnis einer kollektiven Wirkung von Autoantikörpern gegen verschiedene Keratinocyten-Selbstantigene zu sein (Porro et al. 2019; Payne et al. 2004). Die zirkulierenden IgG-Antikörper gegen Dsg1 und Dsg3 im Serum korrelieren mit der Krankheitsaktivität der PV-Patienten (Harman et al. 2001; Kwon et al. 2008). Der mukosale und mukokutane Phänotyp des PV sind dabei durch ein unterschiedliches Autoantikörperprofil charakterisiert. Bei der mukosalen Form können serologisch Autoantikörper gegen Dsg3 gefunden werden, wohingegen bei der mukokutanen Form Antikörper gegen Dsg3 und Dsg1 vorhanden sind. Die unterschiedlichen klinischen Erscheinungsformen werden nach heutigem Verständnis mit der Kompensationshypothese begründet, die auf der inhomogenen Expression von Dsg3 und Dsg1 innerhalb der Schleimhäute und der Haut basiert (Amagai et al. 1999; Mahoney et al. 1999).

Die pathologische Relevanz von Autoantikörpern gegen Dsg1 und Dsg3 konnte in einer Vielzahl von in vivo- und in vitro-Untersuchungen gezeigt werden (Amagai et al. 1994; Koch et al. 1997). So ist es möglich, durch den alleinigen Transfer von IgG-Autoantikörpern eines PV-Patienten in einen anderen lebenden Organismus die Erkrankung im Empfänger zu induzieren.



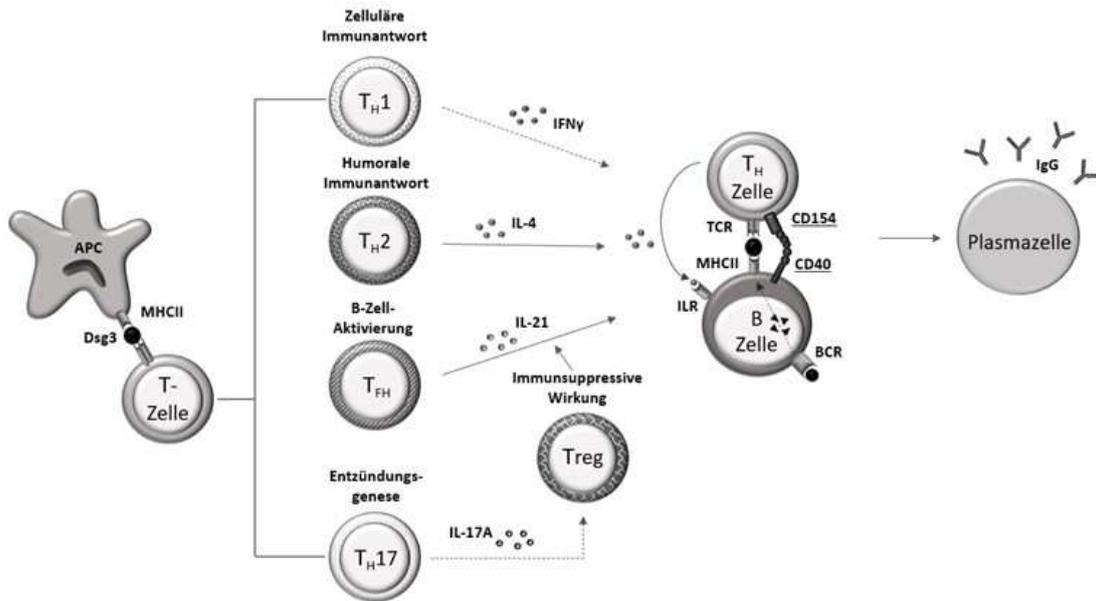
**Abb. 3: Aufbau von Desmosomen mit Darstellung der Autoantigene humaner bullöser Autoimmunerkrankungen der Haut und ihrer Rolle bei der epidermalen Adhäsion.** Die Integrität der epidermalen Zellkohäsion hängt weitgehend von Desmosomen ab. Diese sind plaqueähnliche interzellulären Adhäsionsstrukturen, die transmembranöse Adhäsionsmoleküle wie das Desmoglein und Desmocollin mit Keratinen des Zytoskeletts durch Interaktion mit intrazellulären Komponenten wie Desmoplakin, Plakoglobin, Plakophilin, Envoplakin und Periplakin verbinden. Zusätzlich zu Dsg3 und Dsg1, die Autoantigene bei Pemphigus vulgaris (PV, Dsg1 und Dsg3) und bei Pemphigus foliaceus (PF, nur Dsg1) sind, wurden alle anderen oben genannten Komponenten der Desmosomen als Autoantigene verschiedener klinischer Varianten von Pemphigus identifiziert. Desmocollin ist das Autoantigen des IgA-Pemphigus (IgA-P). Dargestellt ist auch die im Extrazellulärraum befindliche Desmoglein-Ektodomäne (ECD), die mit ihren pemphiguspezifischen Epitopen eine bedeutende Rolle in der Krankheitsgenese spielt (modifiziert nach Hertl et al. 2006).

Dies zeigt sich klinisch beim Pemphigus neonatorum, bei dem maternale Autoantikörper einer an Pemphigus erkrankten Schwangeren diaplazentar übertragen werden und beim Neugeborenen transiente bullös-erosive Hautläsionen verursachen (Sárdy und Kasperkiewicz 2014). Im experimentellen Tiermodell konnten die IgG-Autoantikörper eines erkrankten PV-Patienten durch den passiven Transfer in neonatale Mäuse eine Blasenbildung mit histologisch sichtbarem Adhäsionsverlust auslösen (Anhalt et al. 1982). Weiterhin konnte beobachtet werden, dass in vitro Dsg-spezifische IgG-Autoantikörper zum Verlust der desmosomalen Integrität und final zur Dissoziation von Keratinozyten führen können (Calkins et al. 2006; Heupel et al. 2008).

Wie andere Cadherine bestehen Dsg3 und Dsg1 aus fünf extrazellulären Subdomänen (*extracellular domains*, ECD) von annähernd gleicher Größe (ECD1-ECD5), die dominante Epitope für die Bindung von Pemphigus-Antikörpern enthalten (Futei et al. 2000; Sekiguchi et al. 2001). Beim Menschen werden einige Dsg3-Epitope, sowohl auf Populationsebene als auch bei einzelnen Personen, häufiger erkannt als andere. Diese liegen im N-terminalen Bereich auf der ECD1 und ECD2. Zu diesen immundominanten Epitopen gehören die Regionen DSG3 (97-111), DSG3 (190-204), DSG3 (206-220) und DSG3 (251-265), die im Zusammenhang mit den PV-assoziierten HLA-Allelen DRβ1\*0402 und DQβ1\*0503 präsentiert werden (Eming et al. 2014; Tong et al. 2006; Wucherpennig et al. 1995). Beide HLA-Allele weisen eine große Homologie in der Bindung von Epitopen der Dsg3-Ektodomäne auf, sodass diese die T-Zell-Erkennung identischer Dsg3-Epitope restringieren (Tong et al. 2006; Veldman et al. 2004). Eine Studie von Eming et al. zeigt in einem humanisierten HLA-DRB1\*0402-transgenen Mausmodell, dass die HLA-DRβ1\*0402-restringierte T-Zell-Erkennung von humanen, immundominanten Dsg3-Epitopen zur Induktion pathogener IgG-Autoantikörper führt, die den Verlust der epidermalen Adhäsion induzieren. Die Aktivierung von Dsg3-reaktiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch verschiedene humane Dsg3-Peptide, die an HLA-DRβ1\*0402 binden, wird durch das HLA-DRβ1\*0402-Allel streng reguliert. Im nächsten Schritt führt die CD40-CD154-abhängige T-/B-Zell-Interaktion zur Produktion von IgG-Autoantikörper, die sowohl N- als auch COOH-terminale Epitope der humanen Dsg3-ECD erkennen (Eming et al. 2014).

### **1.3.2.2 Effektor T-Lymphozyten und deren Zytokine**

Es konnten verschiedene immunologische Mechanismen und Immunzellen identifiziert und charakterisiert werden, die den Verlust der immunologischen Toleranz bewirken und zur Ausbildung der Autoimmunerkrankung PV durch Autoantikörper führen. So zeigen verschiedene *in vitro*- und *in vivo*-Studien, dass die Interaktion zwischen autoreaktiven T- und B-Zellen für die Produktion pathologischer Anti-Dsg-3-Antikörper erforderlich ist (Amber et al. 2013; Eming et al. 2014; Yokoyama und Amagai 2010) (Abb. 4).



**Abb. 4: Immunregulation der Autoantikörperproduktion bei Pemphigus vulgaris.** Eine Übersicht der verschiedenen T-Zellsubpopulationen, ihrer Zytokine und ihrer Hauptfunktion. Durch antigenpräsentierende Zellen (APC) wird das Autoantigen Desmoglein (Dsg3) bei PV-Patienten den T-Zellen präsentiert und aktiviert dieses. Dieser Prozess wird durch humanes Leukozytenantigen (HLA)-II, wie HLA-DR $\beta$ 1\*0402 und HLA-DQ $\beta$ 1\*0503, bestimmt. Daraufhin differenzieren sich die T-Zellen zu T-Helferzellen wie T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2, T<sub>H</sub>17 und folliculäre T-Helferzellen (T<sub>FH</sub>). Anschließend können die T-Zellen durch direkte Interaktion (TCR-MHC-II- und CD40-CD154-Signalweg) oder Sekretion von Zytokinen die B-Zellen aktivieren. Diese Zytokine sind entscheidend für die Regulation der B-Zell-Funktion und können die Aktivierung autoreaktiver B-Zellen negativ (gestrichelter Pfeil) oder positiv (durchgezogener Pfeil) beeinflussen. Die herunterregulierten T<sub>H</sub>1-Zellen fördern dabei die Immunantwort, dagegen regulieren die T<sub>H</sub>2-Zellen die Produktion pathogener Dsg3-spezifischer IgG-Antikörper. Die IL-17 sezernierenden T<sub>H</sub>17 begünstigen die Entzündungsreaktion und stehen im Ungleichgewicht zu den Treg-Zellen, die die Produktion autoreaktiver T-Zellen und die Antikörperproduktion hemmen. Auch die T<sub>FH</sub>-Zellen, die mit ihrer subsetspezifischen Sekretion an IL-21 mit B-Zellen interagieren, erleichtern die Produktion von Autoantikörpern. Die B-Zellen können weiter reifen und sich zu Plasmazellen entwickeln, die hochaffine Autoantikörper gegen Dsg3 sezernieren (moduliert in Anlehnung an Pan 2015). BCR, B-Zell Rezeptor; IFN- $\gamma$ , Interferon gamma; IL, Interleukin; Treg, regulatorische T-Zelle.

Die dafür notwendige T-Zell-Aktivierung hängt überwiegend von der Erkennung der Epitope der Dsg3-Ektodomäne ab, welche spezifisch an PV-assoziierte HLA-Klasse-II-Allele binden. Es wird angenommen, dass die in den Haplotypen kodierenden MHC-Moleküle eine erhöhte Bindungsaffinität gegenüber einzelnen Peptidsequenzen des Dsg3 aufweisen (Eming et al. 2014; Tong et al. 2006; Wucherpfennig et al. 1995). Dies hat eine gestörte Immuntoleranz zur Folge und begünstigt die Entstehung von Dsg3-spezifischen T-Zellen. In verschiedenen Studien konnten Dsg3- und Dsg1-spezifische autoreaktive CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten aus dem

peripheren Blut von PV-Patienten isoliert und hinsichtlich der Antigenspezifität und der funktionellen Eigenschaften analysiert werden (Amber et al. 2013; Hertl et al. 2006; Veldman et al. 2007). Diese Beobachtungen stärken die Hypothese, dass autoreaktive CD4<sup>+</sup> T-Zellen kritische Initiatoren und Fortsetzer der Autoimmunpathologie sind. Die zentrale Rolle der aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen bestätigen Nishifuji und Kollegen, die nach einer Depletion der peripheren CD4<sup>+</sup> T-Zellen keinen Nachweis von anti-Dsg3 IgG-produzierenden B-Zellen detektieren konnten. Das Phänomen der „verschwindenden“ Dsg3-reaktiven Autoantikörperproduktion durch B-Zellen wurde auch beim Hinzufügen von monoklonalen anti-HLA-DR- oder anti-HLA-DQ-Antikörper zu den Kulturen beobachtet (Nishifuji et al. 2000). Dies steht im Einklang mit Beobachtungen zweier Studien, die ebenfalls eine proliferative Antwort der autoreaktiven T<sub>H</sub>-Zellen durch Anti-DR- oder Anti-DQ-Antikörper blockieren konnten (Riechers et al. 1999; Veldman et al. 2007). Dies deutet auf die zentrale Rolle der HLA-Klasse II-restringierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei der Autoantikörperproduktion bei PV hin. Weitere Indizien für eine pathogenetisch relevante Interaktion autoreaktiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen und B-Zellen ergibt sich aus der klinischen Beobachtung, dass bei PV-Patienten die therapeutische B-Zell-Depletion mit dem monoklonalen anti-CD20-Antikörper Rituximab zu einer Herunterregulation Dsg3-spezifischer T-Zellen führt. Dies hat eine klinische Verbesserung zur Folge, bevor anti-Dsg3-IgG-Autoantikörper im Serum vermindert detektiert werden können (Eming et al. 2008). Dass bereits eine geringe Menge an potenten Dsg3-reaktiven T-Zellen ausreicht, zeigt eine Studie anhand eines Mausmodells. Die Dsg3-reaktiven T-Zell-Klone waren in der Lage, polyklonale naive B-Zellen zu binden, um pathogene anti-Dsg3-Antikörper zu produzieren und den PV-Phänotyp zu induzieren (Takahashi et al. 2009).

### **1.3.2.3 T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen**

Im peripheren Blut von PV-Patienten konnten bereits in vielen Studien Dsg3-spezifische T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2 detektiert werden (Veldman et al. 2003; Satyam et al. 2009). Das derzeitige Verständnis der Immunpathogenese des PV legt nahe, dass die von autoreaktiven T<sub>H</sub>2-Zellen produzierten Zytokine essenziell für die Entstehung von Autoantikörpern sind, wohingegen die T<sub>H</sub>1-assoziierten Zytokine keinen entscheidenden Einfluss auf die Immunpathogenese des PV haben (Di Zenzo et al. 2016; Giordano und Sinha 2012). So konnte beobachtet werden, dass bei PV-Patienten der T<sub>H</sub>2-Zytokin-Spiegel (IL-4 und IL-10) im Vergleich zu den gesunden Kontrollen (K) erhöht und die T<sub>H</sub>1-Zytokine (IL-2 und IFN- $\gamma$ ) verringert waren (Giordano und Sinha 2012; Satyam et al. 2009). Ein weiterer Beleg für die Hypothese, dass PV als eine T<sub>H</sub>2-

getriebene Autoimmunerkrankung betrachtet werden kann, sind die überwiegend zur Subklassen IgG4 gehörenden Autoantikörper (Lin et al. 1997; Nagel et al. 2010). So begünstigen die autoreaktiven  $T_{H2}$ -Zellen mit der Sekretion von IL-4, IL-6 und IL-10 hauptsächlich die Bildung des besonders PV-relevanten Subtyps IgG4. Der pathognomonisch für einen chronischen Verlauf des PV stehende Dsg3-reaktive IgG1-Subtyp wird dagegen überwiegend von  $T_{H1}$ -Zellen über die Freisetzung von IFN- $\gamma$  durch die Kooperation mit B-Zellen gebildet (Hertl 2000; Takahashi et al. 2007). Dies unterstützt die Hypothese, dass die PV-Pathogenese die Folge einer Autoantikörperproduktion ist, die aus einem Ungleichgewicht der Dsg3-sensibilisierten  $T_{H1}$ - und  $T_{H2}$ -Zellen resultiert. Es wurden Dsg3-reaktive  $T_{H1}$ - (Hertl et al. 1998a) und  $T_{H2}$ -Zellen (Rizzo et al. 2005) identifiziert, die Teile der extrazellulären Domäne von Dsg3 im Zusammenhang mit PV-assoziierten HLA-Klasse-II-Allelen (HLA-DR $\beta$ 1\*0402 und/oder HLA-DQ $\beta$ 1\*0503) erkannten. Die Dsg3-spezifischen autoaggressiven  $T_{H2}$ -Zellen wurden bevorzugt bei PV-Patienten mit aktiver Erkrankung nachgewiesen, während gesunde Träger der PV-assoziierten HLA-Klasse-II-Allele HLA-DR $\beta$ 1\*0402 und HLA-DQ $\beta$ 1\*0503 autoreaktive  $T_{H1}$ -Zell-Antworten gegen Dsg3 zeigten (Hertl et al. 1998a).

#### **1.3.2.4 $T_{H17}$ -Zellen**

Einige kürzlich veröffentlichte Arbeiten legen nahe, dass  $T_{H17}$ - und  $T_{FH17}$ -Zellen mit ihrer charakteristischen Zytokinexpression von IL-17 an der Pathogenese des PV beteiligt sein könnten (Asothai et al. 2015; Holstein et al. 2021; Kowalski et al. 2019; Timoteo et al. 2017). So zeigt sich nicht nur ein Anstieg des IL-17-Serumspiegels, sondern auch eine lokale Zunahme von IL-17-produzierenden  $T_{H17}$ -Zellen in Hautläsionen von PV-Patienten im Vergleich zu nicht erkrankten Kontrollpersonen (Arakawa et al. 2009; Giordano und Sinha 2012). Darüber hinaus konnte eine erhöhte Expression an IL-17 im akuten Stadium im Vergleich zu gesunden Kontrollen festgestellt werden (Xu et al. 2013). Dies unterstützt die Hypothese, dass IL-17 bzw.  $T_{H17}$ -Zellen eine gewisse Korrelation mit der Krankheitsaktivität aufweisen. Ein Anstieg der Expression von IL-17 durch Dsg3-spezifische autoreaktive T-Zellen im peripheren Blut im Vergleich zur Kontrollgruppe ist bereits gezeigt worden (Hennerici et al. 2016). Eine aktuelle Studie unterstützt, das Konzept der IL-17 produzierenden T-Zell-Subpopulationen als relevante Faktoren der Immunaktivität bei PV. Neben  $T_{H17}$ -Zellen waren insbesondere  $T_{FH17}$ -Zellen in der Lage die Sekretion von Dsg3-spezifischen Autoantikörpern durch B-Gedächtniszellen zu induzieren und unterstützen die Hypothese der direkten pathogenen Rolle von IL-17-produzierenden T-Zellen bei der akuten Pemphiguserkrankung (Holstein et al. 2021).

### 1.3.2.5 Follikuläre T-Helferzellen

Ein weiteres Zytokin, dessen pathogenetische Relevanz bei PV noch nicht hinreichend geklärt wurde, ist IL-21. Es wird hauptsächlich von T<sub>FH</sub>-Zellen gebildet, deren Hauptfunktion die B-Zell-Aktivierung und die Unterstützung der Antikörperproduktion während der humoralen Immunantwort ist (Spolski und Leonard 2014). Daneben können weitere T-Zell-Subpopulationen, wie T<sub>H</sub>17-Zellen, IL-21 produzieren (Lüthje et al. 2012; Ma et al. 2012). Bisherige Untersuchungen bei verschiedenen autoantikörpervermittelten Autoimmunerkrankungen legen nahe, dass eine Fehlfunktion der T<sub>FH</sub>-Zellen die Entstehung einer pathogenen Autoantikörperantwort begünstigen kann (Botti et al. 2012; Crotty 2014; Li et al. 2013; Tangye et al. 2013; Ueno 2016). Da IL-21 ein beschleunigender Faktor vieler Krankheiten sein könnte, wurde die Hemmung des Zytokins zur Kontrolle des Schweregrades einer Autoimmunerkrankung in mehreren Studien empfohlen (Ettinger et al. 2008; Yuan et al. 2011). Bei PV-Patienten konnten bereits Dsg3-spezifische autoreaktive T-Zellen nachgewiesen werden, die bei ex vivo-Stimulation mit Dsg3 das Zytokin IL-21 produzierten und auf eine Beteiligung von IL-21-produzierenden T-Zellen (T<sub>FH</sub> und/oder T<sub>H</sub>17) an der Pathogenese des PV hindeuten (Hennerici et al. 2016).

### 1.3.2.6 Die Rolle von CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T-Zellen

Obwohl Pemphigus als eine durch Autoantikörper vermittelte organspezifische Autoimmunerkrankung angesehen wird, deuten zunehmende Hinweise auf eine primäre Rolle einer T-Zell-vermittelte Pathogenese hin. Eine Studie von Aoki-Ota et al. haben diesbezüglich gezeigt, dass die frühe Verabreichung von monoklonalen Anti-CD154-Antikörpern die Produktion von pathogenen Anti-Dsg-3-Antikörpern in einem Mausmodell der PV hemmen konnte. Allerdings konnte die Anti-CD154-Behandlung bei stabiler Produktion von pathogenen Antikörpern mit Ausbildung eines PV-Phänotyps nur marginale Auswirkungen aufweisen (Aoki-Ota et al. 2006). Solche Befunde deuten darauf hin, dass bei Pemphigus die CD40-CD154-Wechselwirkung bei den frühen immunologischen Interaktionen entscheidend sein kann. So könnten der Antikörpersynthese vorausgehend das T-Zell-Priming durch APC und die T<sub>H</sub>-Zell-vermittelte B-Zell-Aktivierung eine wichtige Schlüsselrolle darstellen. Vergleichbare Beobachtungen wurden auch in anderen Modellen von Autoimmunerkrankungen gemacht (vgl. Kap. 1.2.2.3). In der oben genannten Studie wurde weiterhin beobachtet, dass die Toleranz gegenüber Dsg3 übertragbar war. Dies beruht darauf, dass der Co-Transfer von Splenozyten

aus Anti-CD154-Antikörper-behandelten Mäusen und naive Splenocyten aus Dsg3-knockout Mäusen die Anti-Dsg3 IgG-Produktion in den Empfänger-mäusen signifikant unterdrückte (Aoki-Ota et al. 2006). Dies deutet zum einen darauf hin, dass die CD40-CD154-Interaktion für die Induktion pathogener Anti-Dsg3-IgG-Antikörper wesentlich ist. Zum anderen können antigenspezifische immunregulatorische Zellen, die durch den monoklonalen CD154-Antikörper induziert werden, eine therapeutische Option für Autoimmunerkrankungen darstellen (Yokoyama et al. 2012). Eine Studie bei Patienten mit aktivem PV konnte sowohl in der läsionalen Haut als auch im Serum eine CD154-Hochregulation nachweisen (Caproni et al. 2007a). Diese Beobachtungen deuten auf eine zentrale Rolle des CD40-CD154-Systems hin. Die Aktivierung von Dsg3-reaktiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch verschiedene humane Dsg3-Peptide, die an HLA-DRβ1\*0402 binden, wird durch das HLA-DRβ1\*0402-Allel streng reguliert und führt über CD40-CD154-abhängige T-/B-Zell-Interaktion zur Produktion von IgG-Autoantikörper, die sowohl N- als auch COOH-terminale Epitope der humanen Dsg3-Ektodomäne erkennen. Diese entscheidende Rolle wurde unter anderem in der Studie von Eming et al. mit HLA-DRβ1\*0402-transgenen Mäusen, die mit einem monoklonalen Anti-CD154-Antikörper behandelt wurden und die Produktion von Anti-Dsg3-IgG-Antikörper dadurch vollständig gehemmt wurde, verdeutlicht (Eming et al. 2014). Dies zeigt, dass die T-/B-Zell-Interaktion in der Induktionsphase der Dsg3-spezifischen IgG-Produktion besonders kritisch ist. Für eine optimale CD154-Genexpression wird die Aktivierung der Proteinkinase C über eine Signalkaskade und die dadurch ansteigende intrazelluläre Kalziumkonzentration benötigt. Die CD154-Expression kann durch Vorbehandlung der T-Zellen mit dem Calcineurininhibitor Cyclosporin A gehemmt werden und weist auf einen möglichen Einfluss des Calcineurins auf die CD154-Expression hin (Fuleihan et al. 1994). Klinische Studien zum therapeutischen Ansatz mit Cyclosporin A bei PV-Patienten konnten diesen Einfluss nicht bestätigen (Barthelemy et al. 1988; Ioannides et al. 2000). Zusammenfassend ist die pathogenetische Relevanz der CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T-Zellen bei PV noch nicht hinreichend bekannt und erforscht.

### **1.3.3 Diagnostik**

Die initialen Läsionen des Pemphigus werden oft ohne Therapieerfolg als herpetische Infektion, Aphthose, erosiver Flechtenplanus, orale Candidosen oder Gingivitis fehl diagnostiziert (Pollmann et al. 2018). Aus diesem Grund ist neben dem klinischen Erscheinungsbild eine diagnostische Biopsie mit histologischer Untersuchung zum Ausschluss eines Pemphigus

unerlässlich. Die histologische Begutachtung erfolgt an periläsionaler Haut- und Schleimhautbiopsien, die sich histopathologisch durch eine Akantholyse in Folge eines Verlustes der epidermalen Keratinozytenadhäsion zeigt. Der Nachweis von Autoantikörpern, die an epidermalen Keratinozyten binden, wird mithilfe der direkten (DIF) und indirekten (IIF) Immunfluoreszenzuntersuchung durchgeführt (Hertl und Schuler 2002b; Moll und Moll 1998). Im Rahmen der Basisdiagnostik werden zudem Autoantikörper gegen die Autoantigene Dsg1 und Dsg3 durch immunserologische Diagnostik (*enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) detektiert. Da die Konzentrationen der Serum-IgG-Autoantikörper gegen Dsg1 und Dsg3 im Allgemeinen mit der klinischen Aktivität korrelieren, wird der Dsg-ELISA auch als guter serologischer Marker für die Krankheitsaktivität bei Pemphigus angesehen (Hertl et al. 2015).

### **1.3.4 Therapie**

Für den PV liegen derzeit noch keine kausalen Therapieformen vor, sodass das primäre Therapieziel darin besteht, durch Immunsuppression das Auftreten von neuen Blasen und Erosionen zu verhindern (Eming 2015). Eine Ergänzung stellen Schmerztherapie und lokale Therapie dar. In der Initialphase werden Patienten mit akutem Krankheitsverlauf systemisch mit hochdosierten Glukokortikoiden behandelt. Zur Einsparung von Steroiden kommt die Kombination mit adjuvanten Immunsuppressiva wie Azathioprin und Mycophenolat-Mofetil zum Einsatz (Murrell et al. 2020). Im weiteren Verlauf der Therapie wird die Dosierung langsam reduziert und an die klinischen Symptome angepasst (Eming 2015). Daneben rückt die zielgerichtete Depletion von B-Zellen mithilfe des therapeutischen Anti-CD20-Antikörpers Rituximab (RTX) zunehmend in den Vordergrund. Der chimäre Antikörper verhindert eine sechs bis zwölf Monate anhaltende Reifung von autoreaktiven B-Zellen bzw. Plasmazellen, sodass in vielen Fällen eine schnelle und länger andauernde Remission bei den Patienten erzielt werden kann (Joly et al. 2017; Colliou et al. 2013; Eming et al. 2008). In schweren oder therapierefraktären Fällen werden Immunadsorption (IA) oder hoch dosierte intravenöse Immunglobuline (IVIG) empfohlen (Murrell et al. 2020). Die vollständige klinische Remission mit Abheilung aller Blasen und Erosionen stellt das therapeutische Ziel beim PV dar. Dieses Stadium kann allerdings meist nur in unbefriedigtem Maße erreicht werden, da es bei der Reduktion oder Beendigung der Therapie in vielen Fällen zur erneuten Exazerbation der Krankheitsaktivität kommt. Diverse neue Therapeutika befinden sich derzeit in der klinischen Erprobung. So gibt es ein wachsendes Spektrum von zielgerichteten Molekülen für die Pemphigus-Therapie gegen CD20, die Bruton-Tyrosinkinase, die chimären Antigenrezeptor

(CAAR)-T-Zellen, den B-Zell-aktivierenden Faktor (BAFF), T-Zell-Immunkomponenten, den proliferationsinduzierenden Liganden (APRIL), CD25, die mitogen-aktivierte Proteinkinase p38 (p38MAPK) und Zytokin-Modulationstherapien (Anti-IL-4, Anti-IL-6) (Bilgic Temel und Murrell 2019).

## **1.4 Birkenpollenallergie**

Die Birkenpollenallergie ist eine der häufigsten saisonal auftretenden Soforttyp-Allergien in Europa, die sich klinisch durch Entzündung der Nasenschleimhaut mit Niesen, Nasenausfluss und Schwellung der Augenpartie manifestiert (D'Amato et al. 2007). Unter den allergieauslösenden Baumpollen haben Birkenpollen auch hier in Deutschland eine besondere klinische Relevanz. Mittlerweile sind 19-25 % der Pollenallergiker hierzulande gegenüber Birkenpollen sensibilisiert, wobei weiterhin eine ansteigende Tendenz der Prävalenz anzunehmen ist (Altmeyer et al. 2002; Fiocchi et al. 2015). In manchen Regionen Europas liegt der Prozentsatz der Probanden aus der Allgemeinbevölkerung mit einem positiven Pricktest auf Birkenallergene bei 54 % (D'Amato et al. 2007). Das hochpotente Allergen wird in der Pollenflugzeit zwischen März und Mai inhalativ aufgenommen und führt bei den Betroffenen zu den typischen Symptomen einer Typ-I-Allergie. Die Pollen werden dabei nicht gleichmäßig über die Zeit abgegeben, sondern sind den Schwankungen durch Temperatur, Luftdruck, Luftfeuchtigkeit und Luftverschmutzung unterlegen (Behrendt et al. 1997; Frenguelli et al. 1991; Peternel et al. 2004). Neben der produzierten Pollenmenge unterliegt auch der Allergengehalt der Pollen mit dem Hauptallergen (Majorallergen) der Birke, Bet v 1, saisonalen und jährlichen Schwankungen (Reid und Gamble 2009). Über 98 % der Birkenpollenallergiker in Europa sind dabei gegen Bet v 1 sensibilisiert (Jarolim et al. 1989; Movérare et al. 2002). Die Entwicklung einer IgE-vermittelten Sensibilisierung gegen spezifische Allergene der Birke, wie Bet v 1, ist für die Entstehung einer allergischen Erkrankung entscheidend. Die Allergie gegen Birkenpollen kann infolge der Sensibilisierung mit anderen Allergenen wie Hausstaubmilben sowie Gräsern- oder Baumpollen im Sinne einer polyvalenten Sensibilisierung hinzukommen (Eriksson und Holmen 1996; Peter und Albert 2012).

### **1.4.1 Klinische Manifestation und Diagnostik**

Zu den Symptomen, die mit einer Birkenpollenallergie einhergehen, gehören nasale Symptome wie Rhinorrhoe, Niesen sowie Augenbeschwerden wie Tränenfluss, Rötung oder

Konjunktivitis (Jantunen et al. 2012). Die Allergie kann aber auch saisonales allergisches Asthma bronchiale triggern (Biedermann et al. 2019; Schäppi et al. 1997). Bei der Mehrheit der Birkenpollenallergiker kann es unter anderem zur klinischen Manifestation von Kreuzaktivitäten mit Nahrungsmittelproteinen kommen. Die Ursache für ein sekundäres Pollen-Nahrungsmittelsyndrom ist die Homologie vieler pflanzlichen Nahrungsmittelallergene zu Bet v 1 (Rodriguez et al. 2000). Dieses Phänomen wird auch als orales Allergiesyndrom bezeichnet (Anhoj et al. 2001). Ausgehend von den charakteristischen Krankheitssymptomen basiert die Diagnose der Birkenpollenallergie hauptsächlich auf dem Pricktest (vgl. Kap.3.3) und der in vitro-Allergiediagnostik. Mit dem in vivo durchgeführten Pricktest am Unterarm lässt sich eine IgE-vermittelte Sensibilisierung nachweisen und zusammen mit der Klinik und der Anamnese interpretieren. Ein positives Pricktest-Ergebnis mit Rötung, Juckreiz oder Quaddelbildung ist nicht gleichbedeutend mit einer bestehenden Allergie, sondern weist lediglich auf eine Sensibilisierung hin. Zur Diagnostik einer Birkenpollenallergie zählt auch der in vitro-Nachweis von spezifischem IgE gegen rekombinantes Bet v 1.

#### **1.4.2 Pathophysiologie**

Die Birkenpollenallergie stellt eine IgE-vermittelte allergische Soforttypreaktion vom Typ I nach Coombs und Gell dar (Gell und Coombs 1963). Es wird zwischen einer Sensibilisierungs-, Effektor- und Spätphase unterschieden. Die Sensibilisierungsphase ist geprägt durch den ersten Allergenkontakt und die anschließende Aktivierung allergenspezifischer T<sub>H</sub>-Zellen. Die auf diese Weise stimulierten T-Zellen entwickeln sich mit dem umgebenden Zytokinmilieu mehrheitlich zu aktivierten T<sub>H</sub>2-Zellen (Mosmann und Sad 1996; Romagnani 1994; Wambre et al. 2012). Durch ihre Zytokine, wie IL-4, IL-5 und IL-13, tragen sie zur eosinophilen Infiltration und Aktivierung einer Entzündungsreaktion bei, spielen eine Schlüsselrolle bei der bronchialen Hyperreaktivität und sind an der allergietypischen IgE-Produktion beteiligt (Kay 2001; Smith et al. 2013a). Dabei induzieren die T<sub>H</sub>2-Zellen durch Sekretion von IL-4 und IL-13 einen Ig-Klassenwechsel von IgM zu IgE (Del Prete et al. 1988; Punnonen et al. 1993) und sind damit an der Synthese allergenspezifischer IgE-Antikörper durch B-Zellen bzw. Plasmazellen wesentlich beteiligt. Für die Aktivierung von B-Zellen und die Bildung von T-Zell-abhängigen IgE-Antikörpern, sind nicht nur die Zytokine der T<sub>H</sub>2-Zellen, sondern auch die Interaktion zwischen CD40 auf B-Zellen und dem Liganden CD154 auf der Zelloberfläche von CD4<sup>+</sup> T-Zellen relevant (Noelle et al. 1992; Poulsen und Hummelshoj 2007). Diese Wechselwirkung ist lediglich während der allergischen Sensibilisierung erforderlich, da die

IgE-Antikörper an hochaffine IgE-Rezeptoren (FcεRI) auf der Oberfläche von Effektorzellen, wie Mastzellen oder basophilen Granulozyten binden (Larché et al. 2006). Bei einem erneuten Allergenkontakt kommt es zu einer Quervernetzung der auf der Oberfläche von Granulozyten und Mastzellen befindlichen IgE-Antikörper mit konsekutiver Zellaktivierung und Freisetzung von Entzündungsmediatoren. Diese Effektorphase führt schließlich zur IgE-vermittelten Typ I-Reaktion, die sich durch klassische Symptome einer Allergie äußert (Ying et al. 1997). Im Verlauf der allergischen Immunreaktion werden mithilfe von Chemokinen und Zytokinen unter anderem T-Zellen an den Ort der Allergenexposition rekrutiert. Diese können nach sechs bis zwölf Stunden durch freigesetzte Zytokine zusätzliche allergische Beschwerden in Form einer Spätphase-Reaktion auslösen (Macfarlane et al. 2000).

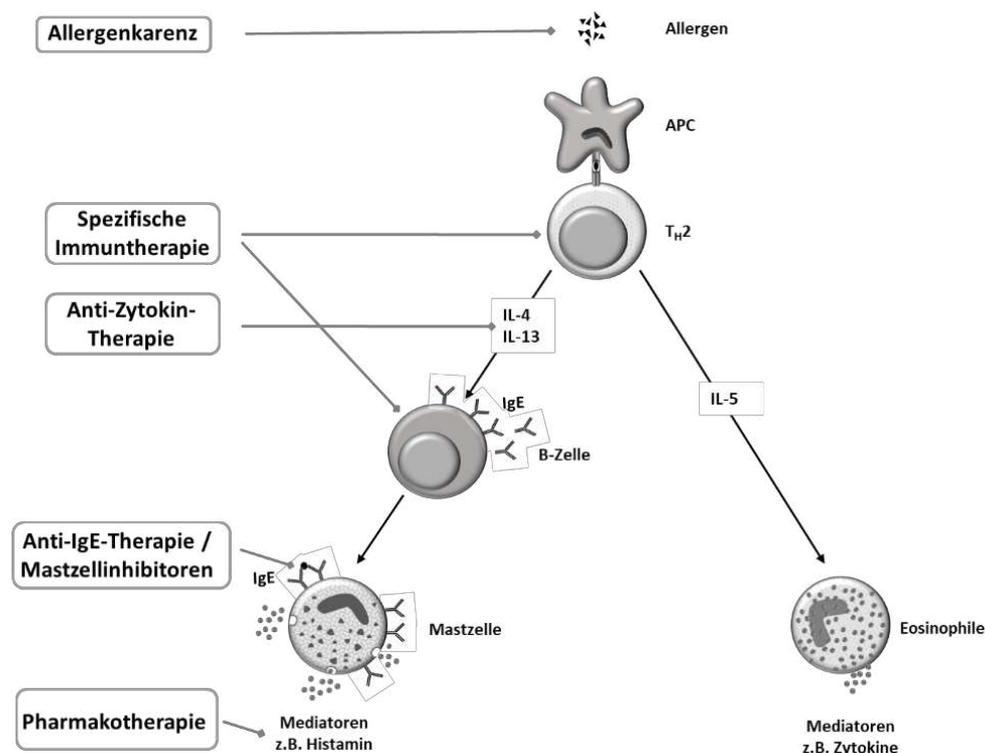
#### **1.4.2.1 T<sub>H</sub>2/T<sub>H</sub>1-Modell**

Lange Zeit wurde ein gestörtes Gleichgewicht zwischen allergenspezifischen T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen zugunsten des T<sub>H</sub>2-Phänotyps als primäre Ursache für das Auftreten von Allergien angesehen (Romagnani 2006). Die Veränderungen im Verhältnis von T<sub>H</sub>2- zu T<sub>H</sub>1-Zellen gehen zum einen auf die Zunahme von IL-4-produzierenden T<sub>H</sub>2-Zellen zurück (Lagier et al. 1995), andererseits wird eine Stagnation oder Abnahme der IFN-γ-sezernierenden T<sub>H</sub>1-Zellen nach Allergenexposition beobachtet (Leonard et al. 1997; Renzi et al. 1999). Dabei wirkt IFN-γ wie IL-4 ebenfalls auf die B-Zellen, indem es einen Klassenwechsel zu IgG fördert und die B-Zellaktivierung durch Hemmung der T<sub>H</sub>2-Zellen verhindert (Akdis et al. 2004). Durch diese Mechanismen kann die Freisetzung von entzündlichen T<sub>H</sub>2-Mediators reduziert und die klinische Symptomatik vermindert werden (Huang et al. 2001, Texeira et al 2005). Momentan ist Stand der Forschung, dass das T<sub>H</sub>2/T<sub>H</sub>1-Modell nicht ausreichend zur Erklärung der komplexen immunologischen Zusammenhänge ist und weitere immunpathologische Vorgänge erforscht werden müssen. Weitere Zytokine die eine Rolle spielen könnten sind IL-17-produzierende T<sub>H</sub>17-Zellen, deren Entzündungsfunktion über die neutrophilen Granulozyten als Zielzelle ausgeübt wird. Erhöhte IL-17-Konzentrationen wurden in der Lunge und im Blut von Patienten mit allergischem Asthma festgestellt und mit dem Schweregrad in Verbindung gebracht (Hashimoto et al. 2005; Lindén und Adachi 2002; Oboki et al. 2008). Bei Birkenpollenallergikern wurde bereits ein Anstieg von IL-17 innerhalb und außerhalb der Saison gegenüber gesunden Kontrollen festgestellt (Ciprandi et al. 2008). Auch das Zytokin IL-21 scheint in der Immunpathogenese der Allergien relevant zu sein, da das durch T<sub>FH</sub>-Zellen produzierte IL-21 die antigenspezifische IgE-Produktion im Serum herunterregulieren kann,

IL-4 vermindert und zu einer Verringerung der allergischen Symptome führen kann (Hiromura et al. 2007; Kishida et al. 2007; Ozaki et al. 2002).

### 1.4.3 Therapie

Die Therapie der IgE-vermittelten Sofortallergie bietet eine Vielzahl von Behandlungsansätzen (Abb. 5). In der Praxis bewährt hat sich neben der Allergenkarenz die rein symptomatische Therapie mit Medikamenten. Als einziges kausales Behandlungsverfahren hat sich bislang lediglich die Allergen-Immuntherapie (AIT) durchgesetzt.



**Abb. 5: Therapiemöglichkeiten bei allergischen Erkrankungen vom Soforttyp.** Potenzielle Therapieformen gliedern sich in symptomatische und kausale Maßnahmen. Kausale Therapieformen sind die Allergenkarenz mit strikter Vermeidung des Allergens sowie die Allergen-Immuntherapie, deren Ansatzpunkt die Immunmodulation auf humoraler und zellulärer Ebene darstellt und somit den Krankheitsverlauf positiv beeinflussen kann. Die symptomatisch wirkende Pharmakotherapie kann durch transiente Inhibition pathomechanistischer Effekte (Zytokine, Mediatoren und Immunzellen) die IgE-vermittelte allergische Typ-I-Reaktion reduzieren (modifiziert nach Douglass und O’Hehir, 2006). APC, antigenpräsentierende Zelle; Ig, Immunglobulin; IL, Interleukin.

## 1.5 Zielsetzung

Die genauen zellulären und humoralen Mechanismen der an der Antikörperantwort des PV und der BPA beteiligten Immunzellen sind derzeit in vielen Einzelheiten noch nicht hinreichend untersucht. Zahlreiche Studien weisen auf eine essenzielle Rolle der antigenspezifisch aktivierten T-Zellen hin. Diese stellen zentrale Regulatoren in der adaptiven Immunantwort dar und können Immunpathologien wie Allergie und Autoimmunität verursachen. Allerdings sind die antigenspezifischen T-Zellen aufgrund ihrer niedrigen Frequenz in vielen klinisch relevanten Situationen bisher schwer nachweisbar und schlecht charakterisiert. Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit ist die Evaluation der CD154-Expression nach antigenspezifischer Aktivierung zur Charakterisierung von antigenspezifischen T-Zellen im peripheren Blut von Patienten mit PV und Birkenpollenallergie. Die nachfolgende Untersuchung der antigenspezifisch aktivierten T-Zellen und deren Zytokinexpression sollte über einen Vergleich der unterschiedlichen Patientengruppen (BPA, K, PV) zu einem besseren Verständnis der Aktivierungsfaktoren von antigenspezifischen T-Zellen und den damit verbundenen Pathomechanismen bei PV und Birkenpollenallergie beitragen. Das Kollektiv der PV-Patienten soll dabei unterschiedlichen Krankheitszuständen und genetische Dispositionen zur Erfassung einer großen Bandbreite aufweisen. Die BPA werden während der Birkenpollensaison aufgrund einer erhöhten klinischen Krankheitsaktivität und vermeintlich höherer Frequenzen an antigenspezifischer T-Zellen untersucht. Zur Detektion der aktivierten  $CD4^+CD154^+$  T-Zellen in peripheren mononukleären Blutzellen (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) der zu untersuchenden Patientengruppen soll im Rahmen dieser Arbeit ein Protokoll etabliert werden. Der methodische Fokus liegt auf der Optimierung der FACS (fluorescence activated cell sorting)-Analyse nach *ex vivo*-Zellstimulation und anschließender intrazellulärer und oberflächlicher Antikörperfärbung anhand eines neu etablierten Markerpanels. Mit der etablierten CD154-Methode erfolgt im Anschluss die Untersuchung der Verteilung von antigenspezifisch aktivierten T-Zellen im peripheren Blut der Teilnehmer. Ein Ziel dieser Arbeit ist die Spezifität der autoreaktiven  $T_H$ -Zellen zu charakterisieren, die vermutlich die Dsg3-spezifische Autoantikörperproduktion regulieren. Hierzu wird eine Reihe von antiinflammatorischen und proinflammatorischen intrazellulären Zytokinen wie IL-4, IL-21, IL-17 und IFN- $\gamma$  gemessen und auf eine Korrelation mit CD154 untersucht. Des Weiteren soll diese Arbeit beantworten, ob es bei PV-Patienten Unterschiede zwischen der Stimulation mit dem Vollproteinantigen Dsg3 oder mit spezifischen Peptiden, die bestimmte Epitope des Dsg3 darstellen, gibt. Schließlich soll in einem weiteren Schritt durch eine große

PV-Patientenkohorte geklärt werden, inwiefern das Vorkommen von antigenspezifisch-aktivierten T-Zellen mit der Krankheitsaktivität, dem Behandlungsstatus oder dem HLA-Klasse-II-Haplotyp korreliert.

## 2 Material

### 2.1 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Spezifität	Konjugat	Klon	Isotyp	Laser	Hersteller
anti-CD154	BV421	24-31	Mouse IgG1	Violett (405nm)	BioLegend, San Diego, USA
anti-CD4	AF700	RPA-T4	Mouse IgG1	Rot (640nm)	Becton Dickinson (BD) GmbH, Heidelberg
anti-CD8	PE-Cy7	SK1	Mouse IgG1	Gelb/Grün (561nm)	BioLegend, San Diego, USA
anti-IFN- $\gamma$	FITC	4S.B3	Mouse BALB/c IgG1	Blau (488nm)	BD GmbH, Heidelberg
anti-IL-4	BV786	MP4-25D2	Rat IgG1	Violett (405nm)	BD GmbH, Heidelberg
anti-IL-17A	BV650	N49-653	Mouse IgG1	Violett (405nm)	BD GmbH, Heidelberg
anti-IL-21	PE	3A3-N2.1	Mouse IgG1	Gelb/Grün (561nm)	BD GmbH, Heidelberg

### 2.2 Stimuli

#### 2.2.1 Rekombinante Proteine

Die beiden rekombinanten Proteine Dsg3 und NC1(1) wurden als lösliche Proteine in einem Baculovirus-Expressionssystem im Forschungslabor der Klinik für Dermatologie und Allergologie in Marburg produziert und durch Affinitätschromatografie aus dem Zellkulturüberstand von Insekten gereinigt (Ishii et al. 1997).

Spezifität	Erläuterung	Referenzen
Dsg3	Extrazelluläre Domäne von humanem Dsg3 (ECD1-5, Aminosäuresequenz 1-566)	Eming et al., 2008 Veldman et al., 2003a Veldman, et al., 2004 Hertl, Amagai, et al., 1998b

Spezifität	Erläuterung	Referenzen
NC1(1)	Nicht kollagene Domäne 1 (NC1) des humanen Kollagen VII	Müller,R et al., 2010 Jedlickova et al., 2012

### 2.2.2 Peptide

Name	Dsg3-Peptide*	Hersteller
P1	DSG3 (97-111)	Proimmune, Oxford, England
P2	DSG3 (190-204)	Proimmune, Oxford, England
P3	DSG3 (206-220)	Proimmune, Oxford, England
P4	DSG3 (251-265)	Proimmune, Oxford, England

\*Nach veröffentlichten Gensequenzen von humanem Dsg3 (Eming et al., 2014).

### 2.2.3 Mitogene und Extrakte

Name	Hersteller
BPE	BioMay AG, Wien, Österreich
PHA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf

## 2.3 Chemikalien und Reagenzien

Name	Hersteller
Brefeldin A 100X	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO; C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
Dulbecco's PBS ( <i>phosphat buffered saline</i> ) (ohne Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> )	Capricorn-Scientific GmbH, Ebsdorfergrund
Ethylendiamintetraacetat (EDTA, C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
FACSClean	BD GmbH, Heidelberg
FACSFlow	BD GmbH, Heidelberg
FACSRinse	BD GmbH, Heidelberg

Name	Hersteller
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin
Gepooltes humanes Serum (PHS)	Capricorn-Scientific GmbH, Ebsdorfergrund
Lymphocytes Separation Media	Capricorn-Scientific GmbH, Ebsdorfergrund
Pancoll®	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
PSG: L-Glutamin (200mM) Penicillin (10.000U/ml), Streptomycin (10.000mg/ml)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Rinderalbuminfraktion V (BSA)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
RPMI (Rosewell Park Memorial Institute) 1640	Capricorn-Scientific GmbH, Ebsdorfergrund
True Nuclear™ Transcription Factor Buffer Set	BioLegend, San Diego, USA
Trypanblau-Lösung 0,4 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf

## 2.4 Puffer und Kulturmedien

Name	Herstellung
Einfriermedium	FCS, sterilfiltriert (0,22 µm) + 10 % DMSO → Lagerung bei -20 °C
MACS-Puffer	Dulbecco's PBS + 0,5% BSA + 2 mM EDTA (Ethylendiamintetraazetat) → Sterilfiltration (0,22 µm) → Lagerung bei 4°C
RPMI <sup>++</sup>	RPMI 1640 + 100 U/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin + 2 mM Glutamin → Lagerung bei 4 °C
RPMI <sup>++</sup> + 10 % PHS	RPMI <sup>++</sup> + 10 % PHS → Sterilfiltration (0,22 µm) → Lagerung bei 4 °C

## 2.5 Verbrauchsmaterial

Name	Hersteller
6-Well-Kulturplatte	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
96-Well-Rundboden-Zellkulturplatten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Blutentnahmeröhrchen, CPDA (Monovette®)	Sarstedt, Nürnbrecht
Blutentnahmeröhrchen, Serum-Gel (Monovette®)	Sarstedt, Nürnbrecht
Einfrierröhrchen (Cryotube)	Sarstedt, Nürnbrecht
FACS-Röhrchen	Sarstedt, Nürnbrecht
Pasteurpipetten	Hirschmann GmbH, Eberstadt
Polypropylen-Röhrchen (Falcons), 15/50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Serologische Pipetten, 5/10/25 ml	Sarstedt, Nürnbrecht
Sterilfilter, 0,22 µm (Stericup)	Millipore GmbH, Schwalbach

## 2.6 Geräte

Name	Hersteller
CO <sub>2</sub> -Inkubator (HERAcell®)	Heraeus Kendro Laboratory Products GmbH, Darmstadt
Durchflusszytometer (LSRFortessa™)	BD GmbH, Heidelberg
Gefrierbehälter (Nalgene™)	ThermoFisher Scientific, Darmstadt
Gefrierschrank (-80 °C, HERAfreeze®)	Heraeus Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold
Kühlzentrifuge (Megafuge® 1.0R)	Heraeus Kendro Laboratory Products GmbH, Darmstadt
Laborautoklav, FVA3	Fedegari Autoclavi Spa, Albuzzano, Italien
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Reinstwassersystem (Astacus)	MembraPure GmbH, Hennigsdorf
Sterilbank	Heraeus Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold
Stickstofftank (Chronos 200)	Cryotherm GmbH & Co. KG, Kirchen
Tischzentrifuge (Eppendorf 5415C Centrifuge)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Vortex-Schüttler	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

## 2.7 Software

Name	Firma
BD FACSDiva™ Software	BD Biosciences, San Jose, USA
CellQuest Pro™ (5.2)	BD GmbH, Heidelberg
Citavi© (6.3)	Swiss Academic Software, Wädenswil, Schweiz
FlowJo© (7.6.3)	TreeStar Inc, Ashland, USA
GraphPad Prism© (9.01)	GraphPad Software Inc., San Diego, USA
Microsoft Office© 2010, 2013 (Word, Excel, Power Point)	Microsoft Corporation, Redmond, USA

## 3 Methoden

### 3.1 Patienten und Einschlusskriterien

Als Teilnehmer dieser Arbeit wurden 16 PV-Patienten (Durchschnittsalter 58 Jahre; Spannweite 41-81 Jahre), 15 BPA (Durchschnittsalter 41 Jahre; Spannweite 20-67 Jahre) sowie 14 gesunde Kontrollen (Durchschnittsalter 30 Jahre; Spannweite 22-47 Jahre) im Zeitraum zwischen Oktober 2019 bis Juni 2020 eingeschlossen (Tab. S 1). Für die Durchführung der Untersuchungen lag ein positives Votum (Az.: Studie 20/14) der Ethikkommission Marburg und eine schriftliche Einwilligung jedes Patienten vor. Diese Arbeit wurde gemäß den Prinzipien der Deklaration von Helsinki durchgeführt.

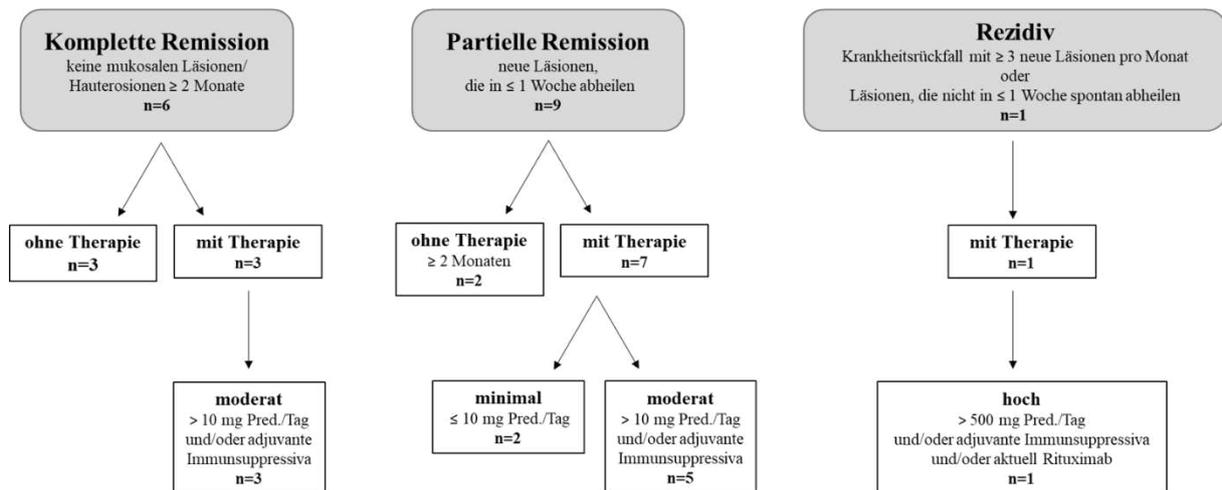
#### 3.1.1 Patientengruppe Pemphigus vulgaris

Die Diagnose der Autoimmunerkrankung PV erfolgte bei allen Patienten anhand etablierter diagnostischer Kriterien auf Basis des klinischen Phänotyps sowie des histologischen und immunserologischen Befunds (Tab. S 2). Die folgenden etablierten diagnostischen Kriterien stellten zugleich auch die Einschlusskriterien für PV-Patienten dar. Es musste mindestens das klinische Bild als Kriterium nachgewiesen werden.

Histopathologie	Nachweis einer intraepidermalen Akantholyse
Immunfluoreszenz	Epidermale intrazelluläre Ablagerungen von IgG und/oder Komplementfaktor C3 mithilfe einer direkten Immunfluoreszenz der periläsionalen Hautbiopsie und/oder indirekten Immunfluoreszenz mit Affenösoophagus
Klinisches Bild	Erosionen und schlawe Blasen der Haut und/oder Schleimhäute
Serologie	Nachweis von Dsg3/Dsg1-spezifischen IgG-Autoantikörper im Serum der Patienten mittels ELISA ( <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> )

Die PV-Patienten wurden zudem angesichts ihrer klinischen Krankheitsaktivität und der systemischen Therapie gemäß etablierten klinischen Kriterien (Murrell et al. 2008) in drei Krankheitsstadien eingeteilt. Es wurden Patienten mit aktiver Erkrankung in Form eines

Rezidivs (R) sowie Patienten mit verminderter Krankheitsaktivität in partieller Remission (PR) und kompletter Remission (KR) unterteilt (Abb. 6).



**Abb. 6: Einteilung der Pemphigus vulgaris (PV)-Patienten gemäß klinisch etablierten Kriterien** PV-Patienten (n=16) wurden anhand ihres klinischen Phänotyps in partielle bzw. komplette Remission und Rezidiv unterteilt und anhand ihrer systemischen Therapie weiter differenziert (Murrell et al. 2008). Pred, Prednisolon

### 3.1.2 Patientengruppe Birkenpollenallergie

Zum Einschluss von BPA in die Arbeit musste neben dem klinischen Verdacht einer Birkenpollenallergie mindestens ein Parameter der nachfolgenden diagnostischen Kriterien nachgewiesen werden. Patienten mit Symptomen einer mehrjährigen oder begleitenden Allergie auf andere saisonale Allergene mit überlappender Zeit des Symptomauftritts wurden ebenfalls in diese Arbeit aufgenommen. In kutan-vaskulären Testungen wie dem Prick- oder Intrakutantest (vgl. Kap. 3.3 3.3) sowie serologischen Testungen konnte eine IgE-vermittelte Sensibilisierung gegen Birkenpollen und demzufolge ein Zusammenhang zur klinischen Symptomatik eindeutig nachgewiesen werden. Die Untersuchung der Patienten erfolgte während der Birkenpollensaison zwischen April 2020 und Mai 2020 (Tab. S 4).

Die folgenden Einschlusskriterien zählen zu den diagnostischen Kriterien für BPA:

Klinischer Test	Positiver Prick- oder Intrakutantest
Serologischer Test	Nachweis spezifischer IgE-Antikörper gegen Bet v 1 oder Birke

### **3.1.3 Kontrollgruppe**

Für die Kontrollgruppe galt als Einschlusskriterium, dass die Probanden keinen klinischen Anhaltspunkt einer Birkenpollenallergie oder eines PV aufwiesen. So zeigten die gesunden Kontrollen keine Zeichen einer autoimmunen Entzündung der Haut. Zudem hatten sie keine Vorgeschichte von atopischen Erkrankungen gegen gewöhnliche Aeroallergene und/oder keinen Nachweis von spezifischen IgE-Antikörper gegen Bet v 1 im Serum. Im Anhang wurde eine Übersicht aller Teilnehmer dieser Arbeit mit ihren klinischen und serologischen Charakteristika erstellt (Tab. S 1, Tab. S 2, Tab. S 3, Tab. S 4).

## **3.2 Blutentnahme und serologische Diagnostik**

Die Entnahme der peripheren venösen Blutproben (~50 ml) von PV, BPA und gesunden Kontrollen erfolgte durch das klinische Personal der Klinik für Dermatologie und Allergologie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg (Standort Marburg). Für die anschließende Isolation der mononukleären Zellen (vgl. Kap. 3.4) wurde das Blut in Entnahmeröhrchen, die das Antikoagulans Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin (CPDA) enthielten, abgenommen. Die Detektion von IgG-Autoantikörper gegen Dsg1 und/oder Dsg3 im Serum von PV-Patienten erfolgte mithilfe eines kommerziell verfügbaren ELISA Kits (EUROIMMUN Dermatology Profile, Lübeck) durch Mitarbeiter der Klinik für Dermatologie und Allergologie gemäß des Herstellerprotokolls. Die Konzentration der Autoantikörper wurde in relative Einheiten (RE)/ml angegeben, wobei die Nachweisgrenze bei 5 RE/ml lag und Ergebnisse von > 20 RE/ml als positiv gewertet wurden. Die HLA-Klasse-II-Typisierung wurde von Prof. Dr. med. Gregor Bein, Zentrum für Transfusionsmedizin und Hämatotherapie des Universitätsklinikums Gießen, vorgenommen. Die Analyse erfolgte aus EDTA (Ethylendiamintetraacetat)-Vollblut durch eine Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*, PCR). Die Immunglobulinmessungen für spezifisches IgE gegen Birkenpollenextrakt und Bet v 1 wurden mit dem ImmunoCAP System (Phadia, Uppsala, Schweden) nach Herstellerangaben von Mitarbeitern der Klinik für Dermatologie und Allergologie Marburg umgesetzt.

### 3.3 Pricktest

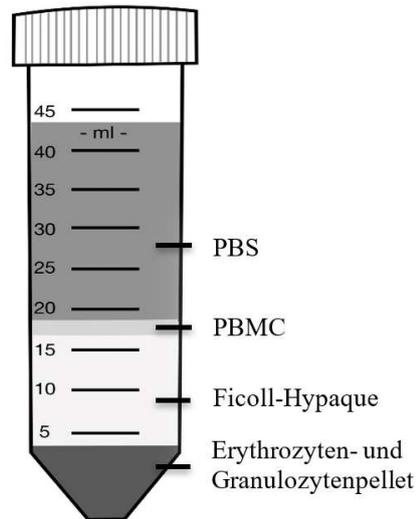
Die Durchführung des Pricktests erfolgte von den Mitarbeitern der Klinik für Dermatologie und Allergologie durch Applikation eines Tropfens einer standardisierten Birkenpollenlösung auf der Volarseite des Unterarms. Mit einer Pricklanzette wurde durch den Tropfen hindurch leicht in die Epidermis gestochen und nach 20 Minuten (min) die Hautreaktion beurteilt. Für die Interpretation der Hautreaktion wurde eine Negativkontrolle (physiologische Kochsalzlösung NaCl 0,9 %) und eine Positivkontrolle (0,1 % Histaminlösung) mitgeführt. Aufgrund der Rötung und Quaddelbildung wurde der Pricktest relativ zu den Kontrolllösungen mit „keine Reaktion“ (0) bis zu einer vierfach positiven Reaktion (4) eingeteilt. Ab einer Reaktion mit Rötung mit mindestens 5 mm und einer Quaddelbildung von mindestens 3 mm wurde von einem positiven Pricktest (1-4) gesprochen.

### 3.4 Separation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes durch Dichtegradientenzentrifugation

#### *Prinzip*

Das Verfahren der Dichtegradientenzentrifugation ermöglicht die Auftrennung der zellulären Bestandteile des peripheren Blutes entsprechend ihrer unterschiedlichen Dichte, sodass humane PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*) aus dem Vollblut der Teilnehmer separiert werden können. Für die Fraktionierung des humanen Blutes wurde die Ficoll-Hypaque-Dichtegradientenzentrifugation angewandt. Hierfür wird das Blut mit einer phosphatgepufferten Salzlösung (*phosphat buffered saline, PBS*) versetzt und über die hier eingesetzte Ficoll-Hypaque-haltige gebrauchsfertige Lösung Pancoll® mit einer Dichte von  $1,077 \text{ g/cm}^3$  geschichtet. Die Ficoll-Hypaque-Lösung besitzt eine geringere Dichte als Erythrozyten ( $1,090\text{-}1,110 \text{ g/cm}^3$ ) sowie die meisten Granulozyten ( $1,075\text{-}1,099 \text{ g/cm}^3$ ) und eine größere Dichte als Monozyten ( $1,059\text{-}1,068 \text{ g/cm}^3$ ), Lymphozyten ( $1,066\text{-}1,077 \text{ g/cm}^3$ ) und Thrombozyten ( $1,040\text{-}1,060 \text{ g/cm}^3$ ) (Luttmann et al. 2014). Dadurch kommt es bei der anschließenden Zentrifugation zur Sedimentation von Erythrozyten und Granulozyten, wobei die Thrombozyten, Lymphozyten und Monozyten sich aufgrund ihres geringeren Dichteverhaltens an der Grenzschicht zwischen PBS und der Ficoll-Hypaque-Lösung ansammeln (Abb. 7). Die Zellen dieser milchigen Interphase werden anschließend abpipettiert

und die Thrombozyten durch weitere Zentrifugationsschritte entfernt. Die so gewonnenen PBMC bestehen zum größten Anteil aus Monozyten und Lymphozyten.



**Abb. 7: Isolation von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) mithilfe der Dichtegradientenzentrifugation aus Vollblut.** Mit Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin (CPDA) versetztes Blut wird mit einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) im Verhältnis 1:1 gemischt und auf Ficoll-Hypaque geschichtet. Die PBMC werden nach der Zentrifugation aufgrund ihrer Dichte von den übrigen Blutzellen getrennt und reichern sich in der Interphase zwischen Separationsmedium und PBS an.

#### *Durchführung*

Das in CPDA- Röhrchen befindliche venöse Blut der Teilnehmer wurde im ersten Schritt in seine zellulären (Blutzellen) und nicht zellulären Bestandteile (Blutplasma) aufgetrennt. Die Auftrennung der Suspension erfolgte mithilfe der Zentrifugation des Vollbluts für 10 min bei Raumtemperatur (RT) und 350 g ( $1g/mittlere\ Erdbeschleunigung = 9,81\ ms^{-2}$ ). Nach der Entfernung des Plasmas wurden die Blutzellen im Verhältnis 1:1 mit PBS in einem Gesamtvolumen von 30 ml gemischt und vorsichtig auf 15 ml Ficoll-Hypaque-Lösung geschichtet. Der dadurch entstandene Dichtegradient wurde anschließend für 30 min bei 450 g und RT zentrifugiert. Die Bremse wurde bei diesem Zentrifugationsschritt deaktiviert, um ein langsames Auslaufen zu ermöglichen. Nach der Zentrifugation wurden die PBMC als Grenzschicht zwischen dem PBS und der Ficoll-Hypaque-Lösung vorsichtig mit einer Glas-Pasteurpipette abgesaugt und in 50 ml PBS (4 °C) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde anschließend bei 550 g und zuletzt nochmals bei 350 g für jeweils 10 min bei 4 °C mit PBS gewaschen und der Überstand nach jedem Zentrifugationsschritt entfernt. Nach den Waschvorgängen erfolgte das Resuspendieren des Pellets in 20 ml RPMI<sup>++</sup> und nachfolgend

die Bestimmung der Zellzahl (vgl. Kap. 3.5). Anschließend wurden die so gewonnenen PBMC direkt weiterverwendet oder für eine spätere Benutzung bei -170 °C im Stickstofftank eingefroren (vgl. Kap. 3.6).

### **3.5 Zellzahlbestimmung**

#### *Prinzip*

Zur Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität innerhalb der Suspension wurde standardmäßig eine Trypanblau-Färbung durchgeführt und die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die Verwendung dieses anionischen Farbstoffs erlaubt nicht allein die Zellquantifizierung, sondern gleichzeitig auch eine Unterscheidung zwischen vitalen und avitalen Zellen. Dies beruht auf der Eigenschaft der lebenden Zellen mit ihrer intakten Zellwand keinen Farbstoff aufzunehmen, sodass nur die toten Zellen sich dunkelblau anfärben lassen. Auf diese Weise kann durch die Zählung der lebenden Zellen innerhalb eines definierten Volumens mit der Neubauer-Zählkammer die Zellkonzentration gemäß folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Zellen pro Großquadrat} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

#### *Durchführung*

Für die Quantifizierung wurde die Zellsuspension im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau-Lösung (0,4 %) verdünnt und 10 µl davon in eine Neubauer-Zählkammer überführt. Die lichtmikroskopische Auszählung der lebenden Zellen erfolgte manuell in allen vier jeweils 1 mm<sup>2</sup> großen Quadranten der Zählkammer. Die Berechnung der Zellzahl der untersuchten Zellsuspension konnte anschließend nach oben dargestellter Formel vollzogen werden.

### **3.6 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen**

#### *Prinzip*

Die Kryokonservierung dient der Lagerung der Zellen unter Aufrechterhaltung der Zellvitalität über einen längeren Zeitraum. Dabei werden Zellen in einem mehrstufigen Prozess in flüssigen Stickstoff bei -170 °C überführt. Diese werden im ersten Schritt in einem Einfriermedium, bestehend aus Kälberserum (*fetal calf serum, FCS*) mit Zugabe von 10 % des

Gefrierschutzmittels Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgenommen. Daran anschließend erfolgt die langsame Herunterkühlung (-1 °C pro Minute) auf eine Temperatur von -80 °C. Das DMSO stellt ein penetrierendes Frostschutzmittel dar, welches zur Verhinderung der zellschädigenden Kristallbildung eingesetzt wird. Allerdings sollte bei der Exposition gegenüber menschlichen PBMC beachtet werden, dass hohe Konzentrationen des DMSO und eine Inkubation von über zwei Stunden die T-Zell-Reaktion beeinträchtigen können (Kloverpris et al. 2010).

#### *Durchführung*

Für das Einfrieren wurden die Zellen zunächst in PBS für 10 min (350 g, 4 °C) zentrifugiert und gewaschen. Nach der Entfernung des Überstands wurden die Zellen in 500 µl FCS (4 °C) aufgenommen und 1:1 mit dem bereits in einem Kryoröhrchen vorgelegten Einfriermedium (4 °C) vermischt. Anschließend mussten die Kryoröhrchen in einen Isopropanol-Einfrierbehälter überführt werden, um eine schrittweise Herunterkühlung auf -80 °C zu gewährleisten. Am Folgetag konnten die Kryoröhrchen in den -170 °C Stickstofftank umgelagert und dort für einen größeren Zeitraum konserviert werden. Es wurden  $1 \times 10^6$  bis  $10 \times 10^6$  Zellen je Kryoröhrchen eingefroren.

Für das Auftauen wurden die Kryoröhrchen in ein Wasserbad (37 °C) überführt. Zur schnellen Entfernung des DMSO wurden die Zellen nach dem Auflösen der Eiskristalle im Medium und dem Erreichen der Zieltemperatur von 4 °C sofort tropfenweise und kreisförmig in RPMI<sup>++</sup> (4 °C) aufgenommen. Der sich daran anschließende Zentrifugationsschritt erfolgte für 10 min bei 350 g, ca. 4 °C. Danach wurde das Pellet in RPMI<sup>++</sup> und 10 % PHS (*pooled human serum*) resuspendiert, gezählt (vgl. Kap.3.5) und in ein Well einer 6-Well Platte ausgesät. Final mussten die zuvor kyrokonservierten Zellen für eine 20-24 h andauernde *resting*-Phase im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubieren, bevor sie im nächsten Schritt weiterverarbeitet wurden.

### **3.7 Ex vivo-Stimulation von Zellen**

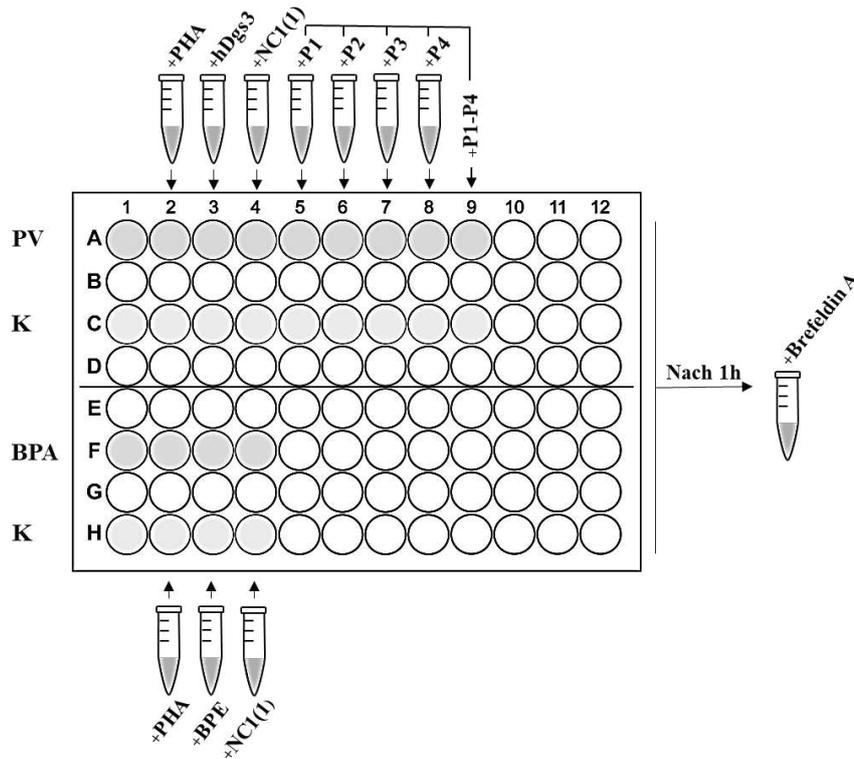
#### *Prinzip*

Durch die mehrstündige ex vivo-Stimulation von PBMC mit humanem Dsg3 und BPE können die antigenspezifisch aktivierten Zellen von PV-Patienten und BPA anhand des frühen Aktivierungsmarkers CD154 untersucht werden. Zur weiteren Charakterisierung der Subpopulationen wird, neben der Expression von den Oberflächenantigenen CD4 und CD8, die Ausprägung der Zytokinexpression bzw. -produktion nach Stimulation analysiert. Zur besseren

Detektion dieser zu untersuchenden Proteine eignet sich der Sekretionsinhibitor Brefeldin A (Frentsch et al. 2005; Jung et al. 1993). Dieser stört die Struktur und Funktion des Golgi-Apparates und verhindert damit den vesikulären Proteintransport zum endoplasmatischen Retikulum (ER). Dies hat zur Folge, dass die produzierten Proteine im ER akkumulieren und die Zytokinausschüttung gehemmt wird (Klausner et al. 1992). Auf diese Weise kann die Proteinproduktion in den Zellen stabilisiert werden, um sie nach intrazellulärer Färbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern und anschließender Durchflusszytometrie (vgl. Kap. 3.9) nachzuweisen. Da Brefeldin A einen ER-Stress auslösen und bei langer Inkubation apoptotisch wirken kann, sollten die Zellen nicht länger als 24 h mit der Substanz in Kontakt kommen (Moon et al. 2012; Shao et al. 1996).

### *Durchführung*

Kryokonservierte PBMC wurden zunächst aufgetaut und für einen Zeitraum von 20-24 h inkubiert (vgl. Kap. 3.6), bevor sie wie die frisch aufbereiteten Zellen in RPMI<sup>++</sup>+10 % PHS aufgenommen und gezählt wurden (vgl. Kap. 3.5). Nach der Bestimmung der Zellzahl mussten die in RPMI<sup>++</sup>+10 % PHS aufgenommenen Zellen zuerst für 10 min bei 350 g und 4 °C abzentrifugiert und anschließend für die Stimulation mit einer Zellkonzentration von  $3 \times 10^5$  Zellen/Well erneut in RPMI<sup>++</sup>+10 % PHS aufgenommen werden. Dann wurde die Zellsuspension in eine 96-Well-Rundboden-Platte ausgesät. Anschließend erfolgte eine Stimulation der Zellen mit verschiedenen konzentrierten Antigenen, die jeweils abgestimmt auf die zu untersuchende Teilnehmergruppe waren (Abb. 8). Die Zellen der PV-Patienten wurden mit dem Vollprotein Dsg3 und vier verschiedenen Peptiden (P), die unterschiedliche Epitope der Dsg3-Ektodömäne darstellen, stimuliert. Diese in PBS gelösten Peptide wurden jeweils einzeln und kombiniert in einem Peptidpool (P1-4) appliziert. Bei den BPA ist das antigenspezifische Stimulans das BPE. Für alle Teilnehmer diente die unspezifische Stimulation der T-Lymphozyten durch das Mitogen Phytohämagglutinin (PHA) als Positivkontrolle. Die Negativkontrolle stellte die Stimulation mit NC1(1), welches die nicht kollagene 1(NC1)-Domäne des humanen Kollagens VII abdeckt (*non-collagenous domain of type VII collagen*), dar. Diese Negativkontrolle dient dem Ausschluss einer unspezifischen Aktivierung nach Stimulation durch rekombinante Proteine, die in einem Baculovirus-System hergestellt wurden. Ein Teil der Zellen wurde unstimuliert gelassen. Eine Stunde nach der Stimulation erfolgte die Hinzugabe von Brefeldin A. Abschließend inkubierten die Zellen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 14-16 h.



**Abb. 8: Ex vivo-Stimulation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) der Pemphigus vulgaris (PV)-Patienten und der Birkenpollenallergiker (BPA).** Schematische Übersicht der Stimulation von PBMC zum Nachweis antigenspezifisch aktivierter T-Zellen anhand des Aktivierungsmarkers CD154. Die Zellen wurden in einer Konzentration von  $3 \times 10^5$  Zellen/Well in eine 96-Well-Rundboden-Platte ausgesät und anschließend spezifisch stimuliert. Die ex vivo-Stimulation erfolgte bei den PV-Patienten mit humanem Desmoglein 3 (Dsg3) (40  $\mu\text{g/ml}$ ) und vier verschiedenen Peptiden (P1, P2, P3, P4; je 20  $\mu\text{g/ml}$ ). Diese wurden sowohl jeweils einzeln als auch zusammen in einem Peptidpool (P1-4; je 20  $\mu\text{g/ml}$ ) appliziert. Bei den Birkenpollenallergikern (BPA) wurde Birkenpollenextrakt (BPE ; 15  $\mu\text{g/ml}$ ) als spezifisches Stimulans verwendet. Als Positivkontrolle diente bei allen Teilnehmern Phytohämagglutinin (PHA; 10  $\mu\text{g/ml}$ ) und als Negativkontrolle NC1(1) (*non-collagenous domain of type VII collagen*); (40  $\mu\text{g/ml}$ ). Ein Teil der Zellen wurde unstimuliert gelassen (Reihe 1). Die Kontrollen (K) wurden simultan stimuliert. Eine Stunde (h) nach Applikation der verschieden konzentrierten Stimulanzen erfolgte die Zugabe von Brefeldin A (12  $\mu\text{g/ml}$ ).

### 3.8 Antikörperfärbung

#### Prinzip

Die Färbung mit fluorochrommarkierten Antikörpern ermöglicht durch die Antigen-Antikörper-Bindung spezifisch und direkt Antigene zu detektieren. Die Antikörperbindung erfolgt zum einen über das antigenspezifische Fab-Fragment (*fragment antigen-binding*) an Proteine, zum anderen unspezifisch über ihr konstantes Fc-Fragment (*fragment crystallisable*).

Um sicherzustellen, dass nur die antigenspezifischen Bindungen beobachtet werden und die Antikörper nicht unspezifisch binden können, kann zusätzlich ein Fc-Block vor der Färbung appliziert werden. In dieser Arbeit wurden sowohl Oberflächenantigene als auch intrazellulär gelegene Antigene mit Antikörpern markiert. Zur Unterscheidung zwischen toten und lebenden Zellen wurde speziell für die kinetische Analyse ein „*Fixable Viability Dye*“ mithilfe des Zombie NIR™ Fixable Viability kit, eingesetzt.

#### *Durchführung (Oberflächenfärbung)*

Die Zellen wurden 12-16 h nach Stimulation aus dem Brutschrank entnommen und zunächst für 10 min bei 350 g und 4 °C zentrifugiert. Nach dem Entsorgen des Überstandes, wurde das Pellet mit 10 µl Fc-Block (Verdünnung 1:100) beschichtet und im Dunkeln bei RT für 10 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Markierung von Oberflächenantigenen mithilfe von direkten fluorochromkonjugierten Antikörpern. Hierzu wurde ein Mastermix mit verschiedenen Konzentrationen an anti-humanen CD4- und CD8-Antikörpern angewandt: Alexa Fluor 700, PE/Cy7 (Tab. 1).

**Tab. 1: Zusammensetzung der Antikörper für die Oberflächenfärbung und intrazelluläre Zytokinfärbung**

α: Anti, APC-Cy7: Allophycocyanin + Cyanin-7, BV: Brilliant Violet, FITC: Fluoresceinisothiocyanat, IFN: Interferon, IL: Interleukin, PE: Phycoerythrin, PE/Cy7: Phycoerythrin + Cyanin-7

#### *Oberflächenfärbung*

Antikörper	Konjugat	Verdünnung
α-CD4	Alexa Fluor 700	1:400
α-CD8	PE/Cy7	1:200
Zombie	APC-Cy7	1:1000

#### *Intrazelluläre Zytokinfärbung*

Antikörper	Konjugat	Verdünnung
α-CD154	BV 421	1:40
α-IFN-γ	FITC	1:100
α-IL-4	BV 786	1:40
α-IL-17A	BV 650	1:40
α-IL-21	PE	1:100

#### *Durchführung (Intrazelluläre Zytokinfärbung)*

Die anschließende intrazelluläre Zytokinfärbung wurde dem Protokoll „FACS Nuclear Staining bei Tregs“ aus unserem Forschungslabor der Klinik für Dermatologie und Allergologie

Marburg entnommen. Die grundlegenden Schritte der Zellfixierung und der nachfolgenden Permeabilisierung der Zellmembran erfolgten mithilfe des True-Nuclear™ Transcription Factor Buffer Set. Der Fixationsschritt wurde anhand der Transcription Factor Fix working solution, welche im Verhältnis 1:4 aus 4X Fix Concentrate und Fix Diluent gemischt wurde, durchgeführt. Die Fixierung sollte die exprimierten Antigene über einen längeren Zeitraum stabilisieren und die Auswirkung auf die vorab durchgeführte Oberflächenfärbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern minimieren. Nach der 45-minütigen Inkubation folgte die Permeabilisierung der Zellmembran mithilfe von 10X Permeabilization Buffer, der zuvor im Verhältnis 1:10 mit PBS verdünnt wurde. Die nun permeabel gewordene Zellmembran ermöglichte im nächsten Schritt den zugeführten Antikörpern Zugang zu den innerhalb der Zelle gelegenen Antigenen. Die intrazelluläre Färbung erfolgte durch die Inkubation der Zellen im Dunkeln bei RT mit verschiedenen Konzentrationen an anti-humanen Antikörpern: CD154-BV421, IFN- $\gamma$ -FITC, IL-4-BV786, IL-17-BV650, IL-21-PE (vgl. Kap. 2.1). Nach einer Inkubation mit den fluorochrommarkierten Antikörpern von 30 min im Dunkeln bei RT, erfolgten zwei weitere Waschgänge mit dem True Nuclear™ 1X Permeabilization Buffer mithilfe der Zentrifuge für 10 min (350 g, 4 °C).

### 3.9 Durchflusszytometrie

#### *Prinzip*

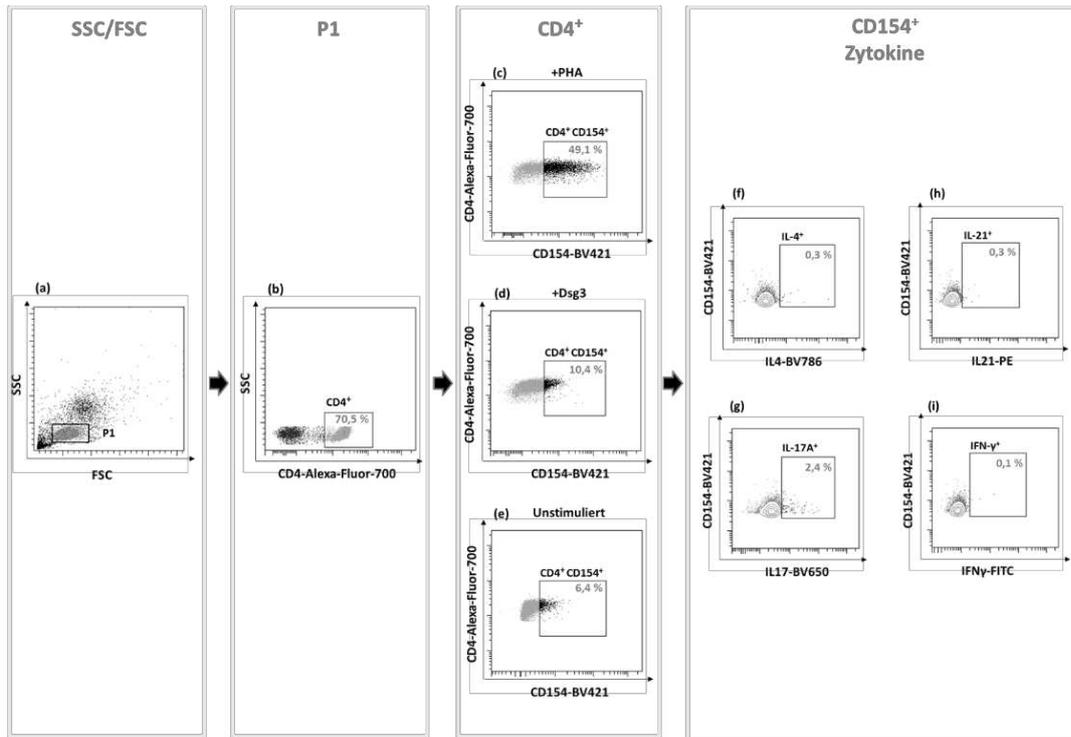
Die Durchflusszytometrie stellt ein laboranalytisches Verfahren zur Charakterisierung und Quantifizierung einzelner Zellen innerhalb einer Zellsuspension dar. FACS wird oft synonym verwendet und ist eine spezielle Form der Durchflusszytometrie, die eine differenziertere Analyse der morphologischen Merkmale einer Zellpopulation ermöglicht. Das in dieser Arbeit verwendete Durchflusszytometer (BD FACSCalibur™) verfügt über zwei Laserstrahlen mit spezifischer Wellenlänge (488 nm, 635 nm) zur gleichzeitigen Anregung von insgesamt sechs Farbspektren. Die zu messenden Zellen werden in einem laminaren Flüssigkeitsstrom mithilfe hydrodynamischer Fokussierung einzeln an einem gebündelten Laserstrahl mit geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Beim Passieren des Lichtstrahls verursachen die Zellen eine entsprechende Lichtstreuung und -beugung, die detektiert wird und Informationen über die Zellgröße, die Granularität des Zytoplasmas sowie die Größe und Struktur des Zellkerns liefern kann. Eines der hierfür verwendeten Parameter ist das Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, *FSC*), welches die Beugung des Lichts misst und vom Zellvolumen abhängig ist. Ein Maß für

die Brechung des Lichts stellt das Seitwärtsstreulicht (*side scatter, SSC*) dar. Zur weiteren Charakterisierung der Zellen werden fluorochrommarkierte Antikörper eingesetzt. Diese sind spezifisch für einzelne extra- oder intrazelluläre Antigene, wie beispielsweise Oberflächenmoleküle von T-Zellen oder Zytokine. Diese emittieren Licht einer bestimmten Wellenlänge und ermöglichen für jedes detektierte Lichtsignal eine Zuordnung zu dem jeweiligen Antigen, sodass auch quantitative Aussagen möglich sind. Das erzeugte Fluoreszenz- und Streulicht wird durch ein System von Linsen gesammelt und gefiltert, bevor spezifische Photodetektoren die optischen Signale in elektrische Impulse verarbeiten und als Signal weiterleiten. Durch verschiedene Emissionsspektren der Fluorochrome sowie den Einsatz von zwei Lasern mit variablen Wellenlängen kann eine Mehrfarbenfluoreszenzanalyse durchgeführt werden (vgl. Kap. 2.1). Die polychromatische Durchflusszytometrie ermöglicht eine zunehmende Anzahl von Antigenen gleichzeitig auf einer Zelle zu detektieren. Allerdings nehmen unerwünschte spektrale Überschneidungen und Kompensationsprobleme mit der Anzahl der Marker zu. Diese Probleme können jedoch minimiert werden, wenn die Färbekombinationen sorgfältig ausgewählt werden (McLaughlin et al. 2008).

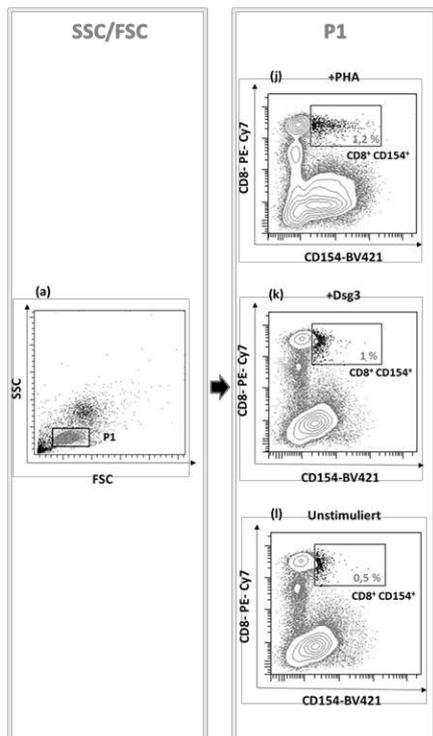
### *Durchführung*

Nach Beendigung der Waschvorgänge der gefärbten Zellen (vgl. Kap. 3.8) wurden diese anschließend in 200 µl MACS-Puffer aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt. Bis zur Messung wurden die Zellen auf Eis im Dunkeln gelagert. Die Durchführung der Messung erfolgte mithilfe des Durchflusszytometers FACSCalibur™ und der Software CellQuest Pro™. Die Kompensation und Auswertung der Messwerte erfolgte anschließend mit dem Programm FlowJo®. Für jede Probenmessung wurden jeweils  $1 \times 10^5$  Zellen durch das Durchflusszytometer gezählt und analysiert. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die antigenspezifisch aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen anhand des Aktivierungsmarkers CD154 innerhalb der PBMC von PV-Patienten, BPA und gesunden Kontrollgruppen untersucht werden. Im ersten Schritt wurde die Lymphozytenpopulation auf Basis der Zellgröße (FSC) und der Zellgranularität (SSC) definiert und vorselektiert. Anschließend erfolgte die Analyse des Expressionsmusters der fluorochrommarkierten Antikörper (Tab. 1) an bestimmten Oberflächenmoleküle oder intrazellulären Proteine, die eine Einteilung der T-Zellen erlaubte. Die hierbei verwendete Gatingstrategie kann der Abbildung 9 entnommen werden (Abb. 9).

## CD4<sup>+</sup>



## CD8<sup>+</sup>



**Abb. 9: Exemplarische Übersicht der verwendeten Gatingstrategie für die Durchflusszytometrie.** Frische PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*) von einem Patienten mit Pemphigus vulgaris. **(a)** Die Lymphozyten wurden zunächst im SSC/FSC-Plot gated und in Form von Punktdiagrammen (dot plots) visualisiert. **(b)** Aus der Population P1 wurde der Anteil der CD4<sup>+</sup> Lymphozyten bestimmt. **(c-e)** Im nächsten Schritt wurde anschließend die CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> Zellpopulation definiert. Vergleich der CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> Population nach **(c)** Phytohämagglutinin (PHA)-Stimulation, **(d)** Dsg3-Stimulation sowie **(e)** unstimuliert. Die Population der aktivierten Zellen (CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup>) wurde weiterhin anhand der spezifischen fluorochrommarkierten Antikörperfärbung bezüglich der Zytokinproduktion von **(f)** IL-4, **(g)** IL-17A, **(h)** IL-21 und **(i)** IFN- $\gamma$  gated. **(j-l)** Aus der P1-Population wurde zudem die CD8<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> Population bestimmt. Vergleich der CD8<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> Population nach Stimulation mit **(j)** PHA, **(k)** Dsg3 sowie **(l)** unstimuliert. FSC: *forward scatter*, IFN: Interferon, IL: Interleukin, SSC: *side scatter*.

### 3.10 Statistik

Die in den Abbildungen dieser Arbeit erfassten Messwerte der Patienten und gesunden Kontrollen werden größtenteils als individuelle Werte in Form von Punktdiagrammen (*scatter dot plot*) dargestellt. Die statistische Auswertung der aus der Durchflusszytometrie-Analyse gewonnenen Daten wurden mithilfe der Statistiksoftware GraphPad Prism© (9.01) durchgeführt. Für den Vergleich einer Variablen zwischen zwei Gruppen mit geringer Stichprobengröße, die nicht miteinander in Verbindung stehen, wurde der nicht parametrische, zweiseitige Test zum Vergleich von ungepaarten Stichproben (Mann-Whitney-U-Test) gewählt. Ein statistischer Zusammenhang einzelner Messparameter untereinander (Korrelation) wurde durch die Berechnung des Spearman Rangkorrelationskoeffizienten ( $r_s$ ) bestimmt. Das Signifikanzniveau wurde bei beiden statistischen Tests mit  $\alpha=0,05$  festgesetzt. Es ergaben sich somit signifikante Unterschiede bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  (\*).

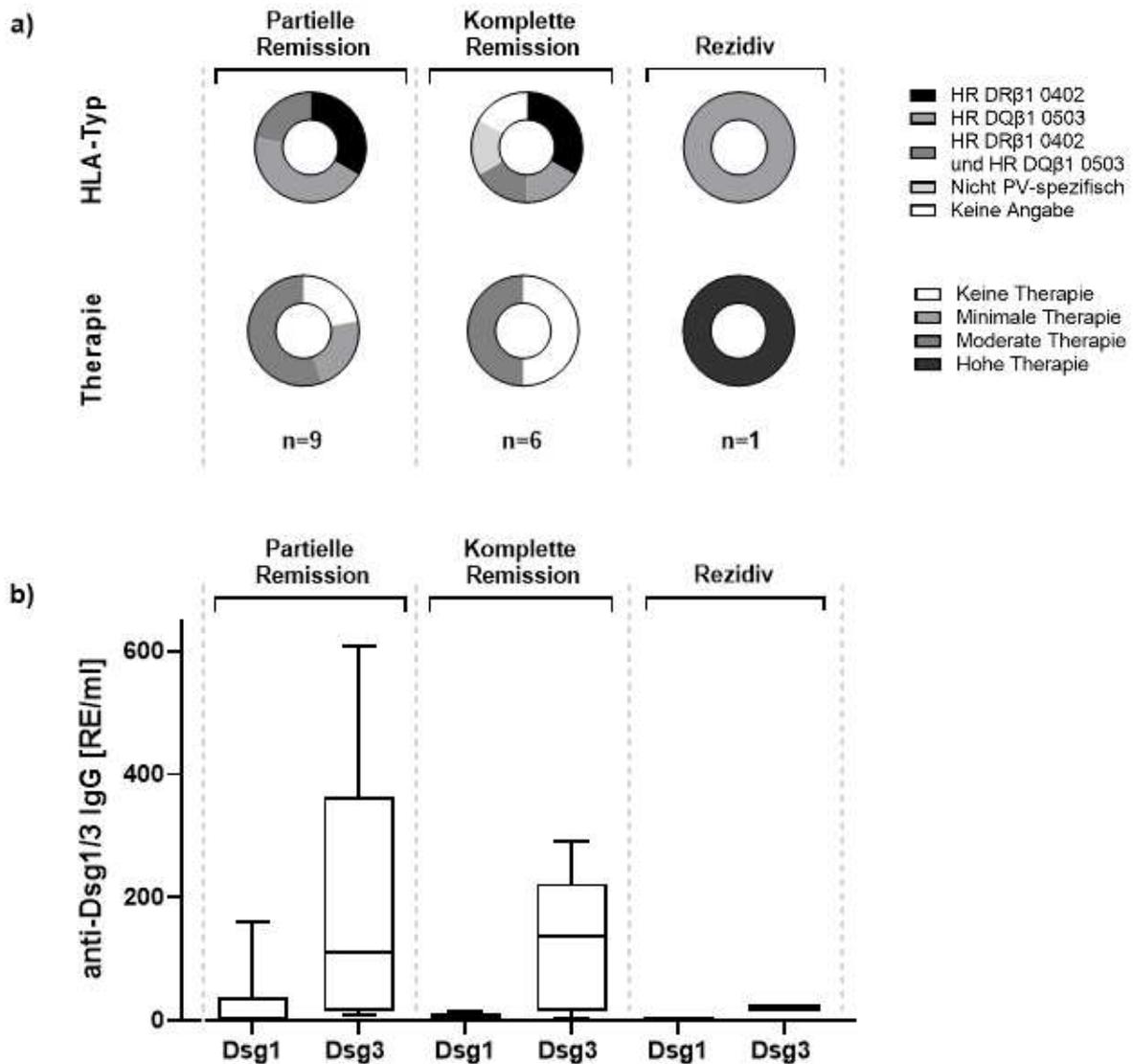
## 4 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Detektion von antigenspezifisch aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen anhand des frühen Aktivierungsmarkers CD154 bei Patienten mit PV und BPA etabliert und analysiert. Die CD154-Expression wurde nach ex vivo-Stimulation (vgl. Kap.3.7) von überwiegend frisch separierten PBMC (frisch: n=11, eingefroren: n=5; vgl. Kap.3.4) experimentell mit einer Antikörperfärbung und anschließender durchflusszytometrischer Analyse (vgl. Kap.3.9) untersucht. Die nachfolgende Untersuchung der antigenspezifisch aktivierten T-Zellen und deren Zytokinexpression wurde über einen Vergleich der unterschiedlichen Patientengruppen (BPA, K, PV) durchgeführt, um zu überprüfen ob mit der CD154-Methode antigenspezifisch aktivierte T-Zellen detektiert werden können. Zudem soll diese Arbeit zu einem besseren Verständnis der CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T-Zellen und deren Subpopulationen und den damit verbundenen Pathomechanismen bei PV und Birkenpollenallergie beitragen.

### 4.1 Patientencharakteristik

#### 4.1.1 Pemphigus vulgaris

Die immunologischen Parameter wurden in einem Kollektiv aus insgesamt 16 PV-Patienten mit unterschiedlichen Krankheitszuständen untersucht (Abb. 10). Dabei wurden PV-Patienten mit dem klinischen Phänotyp einer aktiven Erkrankung in Form eines Rezidivs (R) sowie Patienten mit verminderter Krankheitsaktivität als partielle (PR)- und komplette Remission (KR) gemäß etablierten klinischen Kriterien (Murrell et al. 2008) eingeschlossen. Eine weitere Differenzierung folgte in einem zweiten Schritt mit der Unterteilung in die verschiedenen systemischen Therapiestufen „minimal“, „moderat“, „hoch“ sowie „keine Therapie“ (vgl. Kap. 3.1.1). Während 50 % der Patienten mit KR frei von jeglicher immunsuppressiven Behandlung waren, wiesen über 75 % der Patienten mit PR (7 von 9) eine minimale oder moderate systemische Therapiestufe auf. Die PV-Patienten in Remission erhielten überwiegend eine immunsuppressive Behandlung vorrangig in Form von Kortikosteroiden (Prednisolon) und mit zum Teil zusätzlichen Adjuvantien (Azathioprin, Mycophenolat-Mofetil). Bei dem Patienten mit einem Rezidiv kam eine deutlich höhere Dosis der genannten Immunsuppressiva und zudem Rituximab zum Einsatz.



**Abb. 10: Patientencharakteristik der Pemphigus vulgaris (PV)- Patienten.** (a) Darstellung der humanen Leukozytenantigen (HLA)-Klasse II Haplotypen und der systemischen Therapie der untersuchten PV-Patienten (n=16), unterteilt in Patienten mit partieller und kompletter Remission sowie Patienten mit einem Rezidiv. (b) Die Konzentration der Desmoglein (Dsg)1- und Dsg3-Autoantikörper (anti-Dsg1/3 IgG) im Serum der PV-Patienten zum Zeitpunkt der Messung. RE, relative Einheiten.

Zur weiteren Charakterisierung der PV-Patienten wurden die drei klinisch eingeteilten Subtypen KR, PR und R neben den PV-spezifischen humanen Leukozytenantigen (HLA)-Klasse II Haplotypen, auch hinsichtlich der systemischen Therapie (Abb. 10 a) und der Konzentration der Dsg1- und Dsg3-Autoantikörper im Serum untersucht (Abb. 10 b). Der Patient mit Rezidiv (n=1) zeigte eine ausgeprägte klinische Manifestation mit starker Haut- und Schleimhautbeteiligung sowie einen niedrigen Dsg3-spezifischen Antikörpertiter im Serum. Die Patienten in partieller Remission (n=9) entwickelten einen schwächer ausgeprägten

klinischen Phänotyp des PV mit individuell nur vereinzelt vorkommende Blasen und Erosionen, die vorrangig an den Schleimhäuten auftraten. Dagegen zeigten PV-Patienten mit KR keinerlei Blasen an Haut und Schleimhäuten sowie im Vergleich zu PR eine tendenziell niedrigere Serumkonzentration von Dsg1- und Dsg3-Autoantikörpern. Die über alle Teilnehmer in dieser Arbeit hinweg häufigsten HLA-Typen waren HLA-DQβ1 0503 (n=6) und HLA-DQβ1 0402 (n=5). Als Autoimmunerkrankung, die überwiegend ältere Menschen betrifft, lag das Durchschnittsalter der gesamten PV-Kohorte bei 58 Jahren. Das Verhältnis von Männern zu Frauen befand sich bei vier zu zwölf (Tab. S 1, Tab. S 2).

#### **4.1.2 Birkenpollenallergiker und Kontrollen**

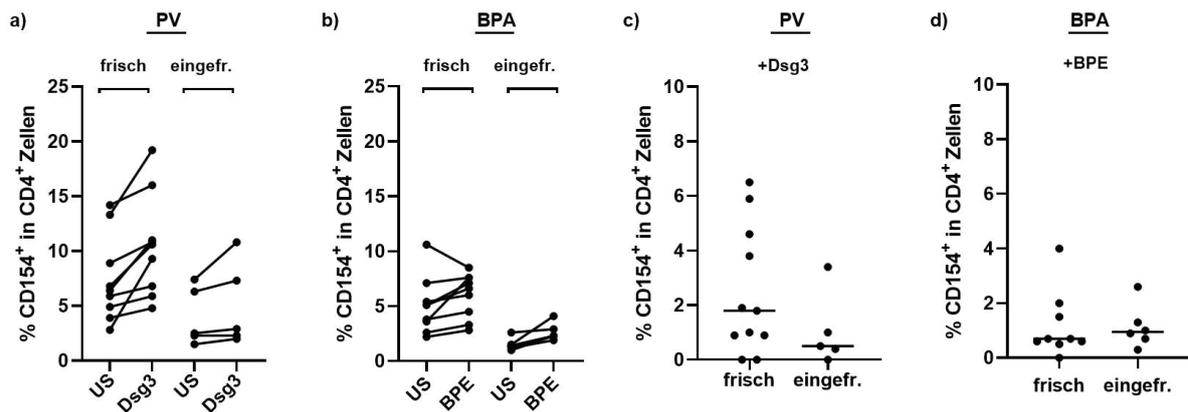
Um die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse für PV anhand der CD154-Methode auf eine Allgemeingültigkeit bezüglich anderer Erkrankungen zu verifizieren, wurden 15 BPA in der Birkenpollensaison sowie 14 gesunde Probanden als Kontrollgruppen untersucht. Da bei den BPA allergen-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen anhand des Aktivierungsmarkers CD154 bereits erfolgreich detektiert werden konnten (Smith et al. 2013a; Smith et al. 2013b), dienten diese als positive Kontrollgruppe. Das Vorliegen einer Sensibilisierung gegen Bet v 1 bei den BPA, wurde entweder anhand eines positiven Pricktests und/oder über das Vorliegen Bet v1-spezifischer IgE-Antikörper ermittelt. Zudem erfolgte die Erfassung der aktuellen Medikation zum Zeitpunkt der Blutentnahme. Das Durchschnittsalter der gesamten BPA-Kohorte lag bei 41 Jahren. Das Verhältnis von Männern zu Frauen befand sich bei drei zu zwölf (Tab. S 1, Tab. S 4). Bei den gesunden Kontrollen wurden bis auf Geschlecht und Alter keine weiteren Daten erhoben (PV m=9, w=5; BPA m=4, w=3; Tab. S 3). Eine Übersicht der Teilnehmer dieser Arbeit kann dem Anhang (Tab. S 1) entnommen werden.

## **4.2 Etablierung des Protokolls zur Detektion von CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T-Zellen**

In diesem Teil der Arbeit wurde auf Grundlage bereits existierender Protokolle die Bedingungen für die Detektion von CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T-Zellen nach antigenspezifischer ex vivo-Stimulation für Patienten mit PV und Birkenpollenallergie optimiert.

Zunächst wurde der Einfluss der Kryokonservierung hinsichtlich der CD154-Expression näher betrachtet. Um eine mögliche Auswirkung der Kryokonservierung auf die CD154-Expression der CD4<sup>+</sup> T-Zellen beurteilen zu können, wurde im ersten Schritt der Anteil der CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup>

PBMC nach frischer Isolation (vgl. Kap. 3.4) und nach Kryokonservierung mit anschließendem Auftauen (vgl. Kap.3.6) untersucht. Damit ein unterschiedliches Ansprechen auf die spezifische Stimulation (Dsg3/BPE) und polyklonale Stimulation (PHA) untersucht werden konnte, wurden alle PBMC sowohl im unstimulierten Zustand (US) als auch nach spezifischer Stimulation analysiert. Hierbei zeigte sich gegenüber US überwiegend ein Anstieg der CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> nach spezifischer Stimulation. Dieser war unabhängig von dem Patientenkollektiv oder Status der PBMC (eingefroren vs. frisch; Abb. 11 a+b). Bemerkenswert war, dass die Frequenz der CD154-Expression innerhalb der CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei den frisch aufbereiteten PBMC bei beiden zu untersuchenden Patientenkollektiven im Vergleich zu den eingefrorenen Zellen größer war.



**Abb. 11: Vergleichende CD154-Expressionsanalyse von frischen und eingefrorenen (eingefr.) mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC).** Eingefrorene und frisch aufbereitete PBMC von (a+c) Pemphigus vulgaris (PV)-Patienten (frisch: n=11, eingefr.: n=5) und (b+d) Birkenpollenallergiker (BPA; frisch: n=9, eingefr.: n=6) wurden ex vivo spezifisch mit Desmoglein (Dsg)-3 bzw. mit Birkenpollenextrakt (BPE) stimuliert. (a+b) CD154-Expressionsniveau ohne (US) und mit spezifischer Stimulation (Dsg3/BPE) von frischen bzw. eingefrorenen PBMC der Patienten mit PV sowie Birkenpollenallergie. Zur Berechnung der prozentualen Veränderung der CD154-Expression innerhalb der CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden in (c+d) die individuellen Werte der unstimulierten (US) von den jeweiligen stimulierten Proben subtrahiert.

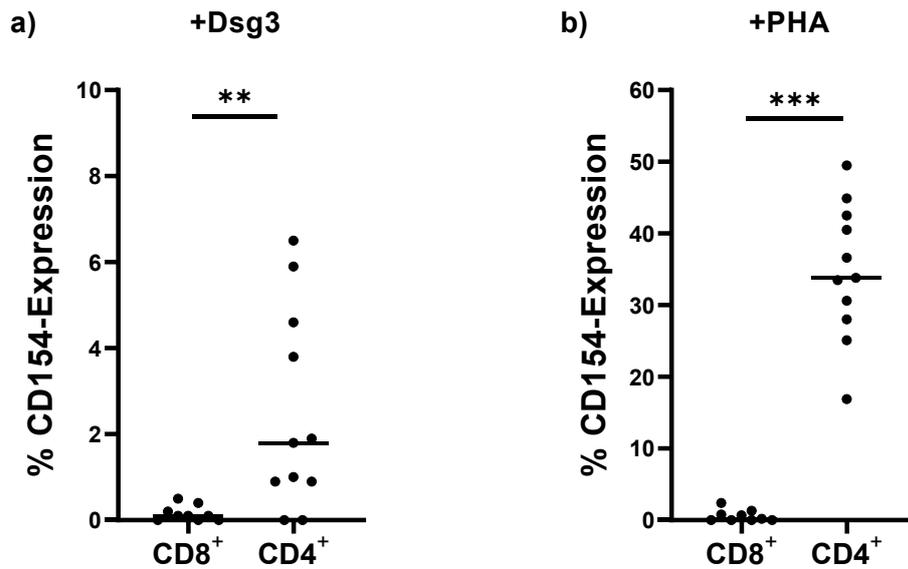
Zur Berechnung der prozentualen Veränderung der CD154-Expression innerhalb der CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden die Werte der US von den stimulierten Proben subtrahiert (Abb. 11 c+d). Negative Werte wurden als null betrachtet/gleich „0“ gesetzt, da negative Werte rein rechnerisch möglich sind, diese aber physiologisch nicht vorkommen können. Hierbei zeigte sich eine individuell stark unterschiedlich ausgeprägte Expression des Aktivierungsmarkers CD154 bei den frisch aufbereiteten PBMC von PV-Patienten (0 bis 6,5 % CD154<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup> T-

Zellen), welche im Vergleich zu den eingefrorenen PBMC keine Unterschiede aufwiesen (Median: frisch 1,8 % vs. eingefr. 0,5 %;  $p=0,2289$ ). Bei dem Kollektiv der BPA war sowohl die individuell stark ausgeprägte CD154-Expression bei den frisch isolierten PBMC (0,3 bis 3,6 % CD154<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup> T-Zellen) als auch der Unterschied zwischen den frischen und eingefrorenen Zellen geringer (Median: frisch 0,95 % vs. eingefr. 0,7 %;  $p=0,5836$ ). Die Analyse zeigte, dass große Differenzen im Hinblick auf die CD154-Expression nach Kryokonservierung im Vergleich zu frisch isolierten PBMC feststellbar waren. Es konnte gezeigt werden, dass die frisch aufbereiteten Zellen auf eine spezifische Stimulation im Verhältnis zu ihrer maximalen, unspezifischen Stimulation durch PHA tendenziell mehr als die eingefrorenen Zellen reagierten (Abb. S 4). Um dennoch Unterschiede auf die CD154-Expression der CD4<sup>+</sup> T-Zellen und deren Zytokinsynthese in Abhängigkeit von der Präparationsmethode zu vermeiden, wurden für weitere Analysen nur die frisch nach der Blutentnahme isolierten PBMC berücksichtigt. Für die CD154-Expression konnte zudem in Vorversuchen anhand polyklonaler Stimulation mit PHA gezeigt werden, dass sich ein 16-stündiges Stimulationsintervall für frische PBMC in Kombination mit BrefeldinA zur Stabilisierung der intrazellulären Proteine optimal für die Detektion CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T-Zellen eignet (Abb. S 5).

### **4.3 Analyse der CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T-Zellen bei PV-Patienten**

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung von antigenspezifisch aktivierten T-Zellen bei PV-Patienten, um ein besseres Verständnis der Rolle von Dsg3-spezifischen T-Zellen am Pathomechanismus des PV zu erhalten. Um Informationen über das Verhalten der spezifischen CD154-Expression auf T-Zellen bei PV-Patienten zu bekommen, wurden vorerst sowohl CD8<sup>+</sup> also auch CD4<sup>+</sup> T-Zellen hinsichtlich einer CD154-Expression nach Stimulation mit Dsg3 und PHA untersucht.

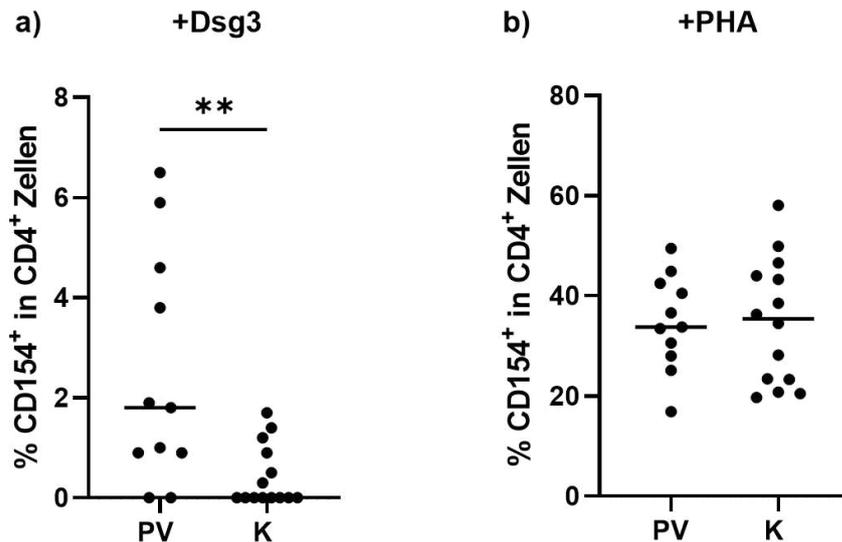
Hierbei zeigte die Analyse der T-Zell-Subpopulationen, in Hinblick auf ihre Fähigkeit CD154 nach spezifischer (Dsg3) und unspezifischer (PHA) Stimulation zu exprimieren, dass der Aktivierungsmarker CD154 auch auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen detektiert werden kann (Abb. 12 a+b). Der Anteil der antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen innerhalb des übertragenden Lymphozytenkompartiments betrug im Median für Dsg3 0,1 % (0 bis 0,5 % CD154<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen) bzw. für PHA 0,2 % CD154<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen (0 bis 2,4 % CD154<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen) und war gegenüber dem Hintergrund kaum abzugrenzen (Abb. 12 a+b).



**Abb. 12: Analyse der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zell-Subpopulationen hinsichtlich ihrer Fähigkeit CD154 zu exprimieren.** Frisch aufbereitete mononukleäre Zellen des peripheren Blutes von Pemphigus vulgaris (PV)-Patienten (CD4<sup>+</sup>: n=11; CD8<sup>+</sup>: n=9) wurden ex vivo spezifisch (a) mit humanem Desmoglein (Dsg)-3 und (b) unspezifisch mit Phytohämagglutinin (PHA) stimuliert. Zur Berechnung der prozentualen Veränderung der CD154-Expression innerhalb der CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden die Werte der unstimulierten von den stimulierten Proben subtrahiert und statistisch signifikante Unterschiede anhand des nicht parametrischen, zweiseitigen Mann-Whitney-U-Test ermittelt. \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

Im Gegensatz dazu zeigen CD4<sup>+</sup> T-Zellen sowohl nach unspezifischer als auch nach spezifischer Stimulation einen Anstieg der CD154-Expression. Sowohl nach Dsg3- (Median: 1,8 % CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen; 0 bis 6,5 % CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen; p=0,0067) als auch PHA-Stimulation (Median: 33,8 % CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen; 16,9 bis 49,5 % CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen; p=0,001) war ein signifikanter Zuwachs der CD4<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup>-Population im Vergleich zum unstimulierten Zustand zu verzeichnen (Abb. 12 a+b).

Zur anschließenden Validierung der Antigen-spezifität des CD154-Assay wurden frisch aufbereitete PBMC von 11 PV-Patienten und zusätzlich 14 gesunde Kontrollen spezifisch (Dsg3) und unspezifisch (PHA) stimuliert (Abb. 13 a+b).



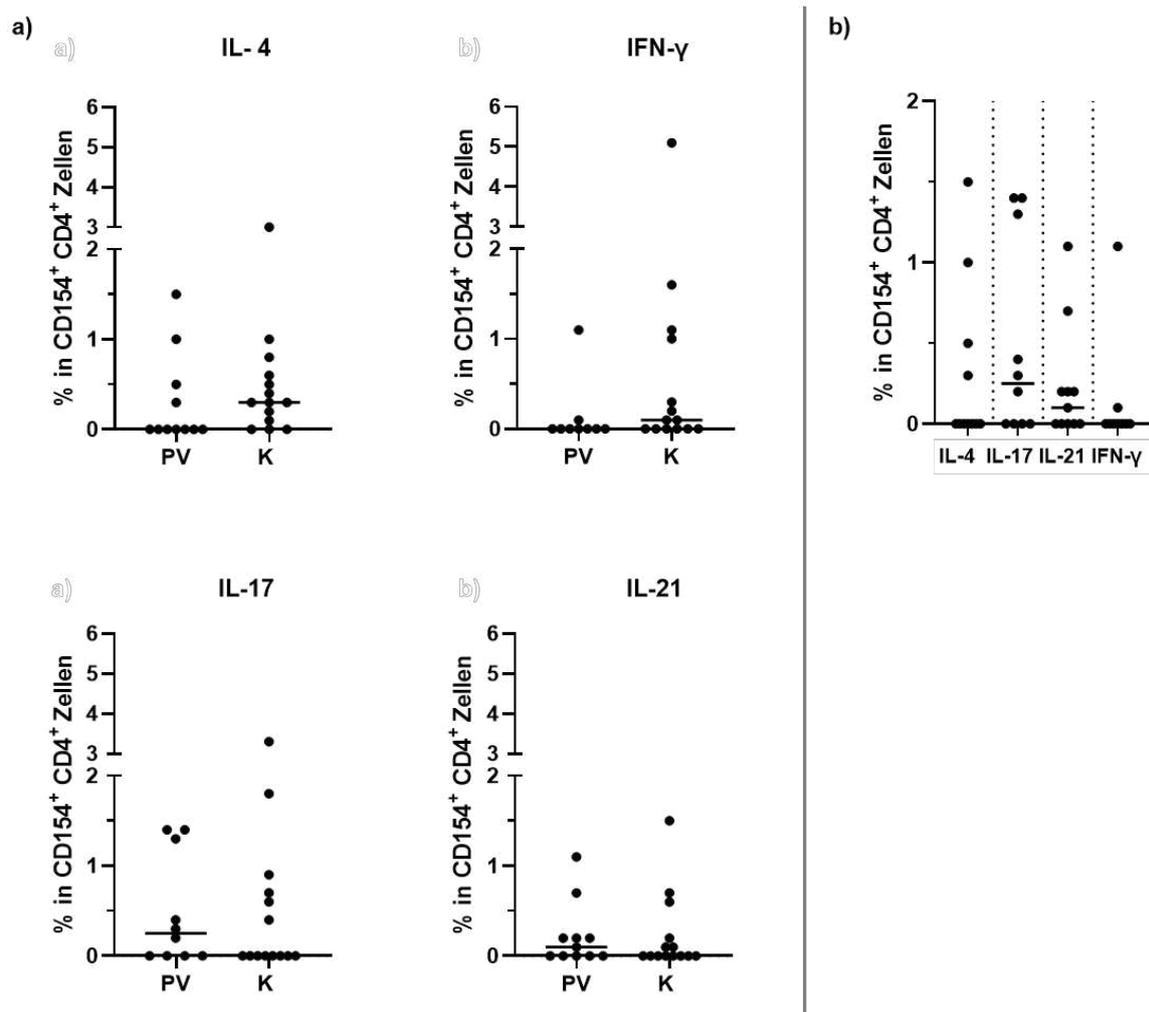
**Abb. 13: Antigen-spezifisch induzierte CD154-Expression bei Pemphigus vulgaris (PV)-Patienten und gesunden Kontrollen (K) infolge der ex vivo-Stimulation.** Frisch aufbereitete mononukleäre Zellen des peripheren Blutes von PV-Patienten (n=11) und den Kontrollen (n=14) wurden ex vivo mit (a) humanem Desmoglein (Dsg)-3 und (b) polyklonal mit Phytohämagglutinin (PHA) stimuliert. Zur Berechnung der prozentualen Veränderung der CD154-Expression innerhalb der CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden die Werte der unstimulierten von den stimulierten Proben subtrahiert. Es wurde der nicht parametrische, zweiseitige Mann-Whitney-U-Test angewendet. \*\*p<0,01.

In der durchflusszytometrischen Analyse zeigte sich bei den PV-Patienten eine signifikante Zunahme der CD154-Expression in der CD4<sup>+</sup> T-Zell-Population nach spezifischer Stimulation (Median: 1,8 % CD154<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup>) gegenüber den gesunden Kontrollen (Median: 0 % CD154<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup>; p=0,0066). Die polyklonale PHA-Stimulation führte sowohl bei den PV-Patienten als auch bei den Kontrollen zu einer starken CD154-Expression der CD4<sup>+</sup> T-Zell-Population (Abb. 13b, Median: PV= 33,8% vs. K= 35,4% CD154<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup>; p>0,9999), was eine individuelle PBMC-Integrität/Viabilität sicherstellte. Durch die PHA-Stimulation konnte gezeigt werden, dass es sich bei den ermittelten Frequenzunterschieden auf individueller Ebene nach Stimulation mit Dsg3 um eine antigenspezifische Aktivierung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei PV-Patienten handelt. Als Negativkontrolle für die Antigen-spezifität der Stimulation mit Dsg3 diente nicht nur die gesunde Kontrollgruppe, sondern auch die Kohorte der BPA. Diese reagierten ebenfalls nicht auf Dsg3 mit einer erhöhten CD154-Expression der CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Abb. S 1a). Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass die Expression von CD154 nach antigenspezifischer Stimulation mit Dsg3 zunimmt und damit für den Nachweis von Dsg3-reaktiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei Patienten mit PV geeignet ist.

### 4.3.1 Zytokinexpressionsmuster der Dsg3-reaktiven CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T-Zellen

Die durch die Aktivierung antigenspezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen induzierten Veränderungen der T-Zellantworten hinsichtlich ihrer Zytokinproduktion, wurden anschließend mithilfe durchflusszytometrischer Analysen bestimmt. Das Ziel war hierbei die Frage zu klären, ob ein Zusammenhang von antigenspezifischen bzw. reaktiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen über die CD154-Expression mit bestimmten Zytokinexpressionsmustern hergestellt werden kann. Das PV-Kollektiv wies dabei unterschiedliche Krankheitsaktivitäten, genetische Prädispositionen und Therapien auf und sollte weiteren Aufschluss über die Verteilung autoreaktiver T-Zellantworten im Verlauf einer Pemphiguserkrankung geben. Um die Distribution der Dsg3-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen innerhalb der Subtypen zu beurteilen, wurde die Expression von CD154 als Marker der antigenspezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellaktivierung (Frentsch et al. 2005; Kirchhoff et al. 2007) in Kombination mit unterschiedlichen Markerzytokinen verwendet. Durch die angewandte durchflusszytometrische Analyse konnten vier Subpopulationen T<sub>H</sub>1 (CD4<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>), T<sub>H</sub>2 (CD4<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> IL-4<sup>+</sup>), T<sub>H</sub>17 (CD4<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup>) und IL-21-sezernierende T<sub>FH</sub>-Zellen (CD4<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> IL-21<sup>+</sup>) anhand der jeweiligen Zytokinexpression voneinander abgegrenzt werden (Abb. 14 a+b, vgl. Kap. 3.8).

Für ein besseres Verständnis der T<sub>H</sub>2-Zellen und ihrer Rolle nach antigenspezifischer T-Zellaktivierung wurde die Population an CD4<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup>-Zellen in dieser Arbeit bestimmt. Die Analyse der antigenspezifischen IL-4-Konzentration (Abb. 14 a links oben) zeigte keine Veränderung der CD154-Expression bei PV-Patienten (Median: 0 % CD154<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup> T-Zellen) im Vergleich zur Kontrolle. Ein Anstieg der Expression von IL-17 durch Dsg3-spezifische autoreaktive T-Zellen im Serum ist bereits in vielen Studien gezeigt worden (Hennerici et al. 2016; Kowalski et al. 2019). Da eine bedeutsame Rolle dieses Zytokins bei PV-Patienten diskutiert wird, sollte dies im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich betrachtet werden. Ein leichter, wenn auch nicht signifikanter Anstieg der CD4<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>-Population konnte bei PV-Patienten nach Dsg3-Stimulation in PBMC (Median: 0,25 %; 0 bis 1,4 % CD154<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup> T-Zellen) im Vergleich zu den Kontrollen (Median: 0 % CD154<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup> T-Zellen) detektiert werden (Abb. 14 a links unten).



**Abb. 14: Desmoglein (Dsg)-3 induzierte Zytokinexpression von Interleukin (IL)-4, IL-17, IL-21 und Interferon (IFN)- $\gamma$  der CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T-Zellen bei Pemphigus vulgaris (PV)-Patienten und der gesunden Kontrollgruppe (K). (a) Die Zytokinexpression von IL-4, IL-17, IL-21 und IFN- $\gamma$  der CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> Zellen wurde in frisch aufbereiteten mononukleären Zellen des peripheren Blutes bei PV-Patienten (IL-4: n=11, IL-17: n=10, IL-21: n=11, IFN- $\gamma$ : n=9) und den gesunden Kontrollen (n=14) durchflusszytometrisch bestimmt. (b) Übersicht der Zytokinexpression der CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T-Zellen bei PV-Patienten nach antigenspezifischer ex vivo-Stimulation mit Dsg3. Zur Berechnung der prozentualen Veränderung der Zytokinexpression innerhalb der CD154<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden die Werte der unstimulierten von den jeweils stimulierten Proben subtrahiert.**

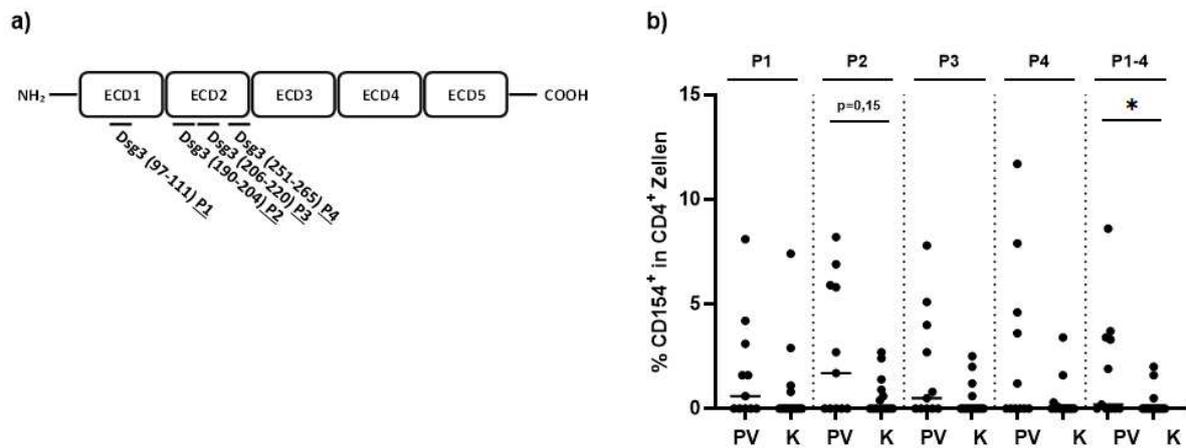
In einigen Studien konnte unabhängig von der Antigen-spezifität ein erhöhtes Vorkommen von IL-21-produzierenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei PV-Patienten beobachtet werden (Huang et al. 2019; Tavakolpour et al. 2020), sodass zur weiteren Klärung die Anzahl an antigenspezifischen T-Zellen, die nach Stimulation mit Dsg3 neben ihrem Aktivierungsfaktor CD154 auch IL-21 produzieren, bestimmt wurde. Die Analyse (vgl. Kap. 3.9) ergab sowohl für die Kontrollen (Median 0,1 % CD154<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup> T-Zellen) als auch die PV-Patienten (Median 0 % CD154<sup>+</sup> in

CD4<sup>+</sup> T-Zellen) eine sehr geringe Frequenz an IL-21-sezernierenden Zellen, die kaum vom unspezifischen Hintergrund zu unterscheiden war (Abb. 14a rechts unten). Die Frequenzanalyse der antigenspezifisch IFN- $\gamma$ -produzierenden CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T-Zellen zeigte ebenfalls im Vergleich zum unstimulierten Zustand bei PV-Patienten und bei der Kontrollkohorte keine vermehrte Zytokinproduktion (Abb. 14a rechts oben). Mit Aktivierung der CD4<sup>+</sup> T-Zelle und Expression von CD154 konnte in allen Kohorten ein Anstieg der Zytokinproduktion gegenüber den CD4<sup>+</sup> CD154<sup>-</sup> beobachtet werden (Daten nicht abgebildet).

#### **4.3.2 CD154-Expression nach Stimulation mit PV-spezifischen Peptiden**

Neben der Analyse der spezifischen Antwort der CD154-exprimierenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit dem Dsg3-Protein wurde im nächsten Schritt überprüft, ob sich der Assay auch zur Detektion peptidspezifischer T-Zellantworten anwenden lässt. Mit dem Einsatz von epitopspezifischen Peptiden des Dsg3 als Stimulanzien wurde die T-Zell-Aktivierung über den CD40-CD154-Signalweg, die zur Induktion von pathogenen IgG-Autoantikörpern durch die Erkennung von Epitopen der Dsg3-Ektodomäne führen kann, erfasst. Hierfür wurden vier verschiedene Peptide (P; Abb. 15 a), die sich bereits in früheren Studien bezüglich einer Assoziation mit PV als relevant herausgestellt haben (Eming et al. 2014; Veldman et al. 2004; Wucherpfennig et al. 1995), ausgewählt. Das humane Dsg3 besteht aus fünf ECD, von denen ECD1 und ECD2, die in dieser Arbeit vorgestellten immundominanten Peptide P1-4 enthalten (Abb. 15a). Entsprechend der veröffentlichten Sequenz von Dsg3 sind die Peptide und ihre Position in Abb. 15 a dargestellt (Veldman et al. 2004). Nach der Peptidstimulation der frisch aufbereiteten PBMC von PV-Patienten und der Kontrollen (vgl. Kap. 3.7), zeigte sich in der durchflusszytometrischen Analyse ein unterschiedliches Ansprechen sowohl zwischen PV-Patienten und Kontrollen als auch auf individueller Ebene (Abb. 15b). Bei den PV-Patienten reagierte rund die Hälfte der Patienten mit einer Erhöhung der CD154-Expression auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Peptidstimulation. Der größte Anstieg der CD154<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen zeigte sich innerhalb der PV-Patienten für P2 (Median: 1,7 % CD154<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup> T-Zellen), wenn auch im Vergleich zur Kontrollkohorte nicht signifikant ( $p=0,15$ ). Nach Stimulation mit P1 (Median: 0,6 % CD154<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup> T-Zellen) und P3 (Median: 0,5 % CD154<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup> T-Zellen) konnte ebenfalls eine Erhöhung der CD154-Expression beobachtet werden. Interessant war, dass P1 (ECD1) sowohl von der Mehrheit der PV-Patienten (Median: 0,6 % CD154<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup> T-Zellen) als auch von Dsg3-reaktive Kontrollen erkannt wurde. Die größte Spannweite unterschiedlicher

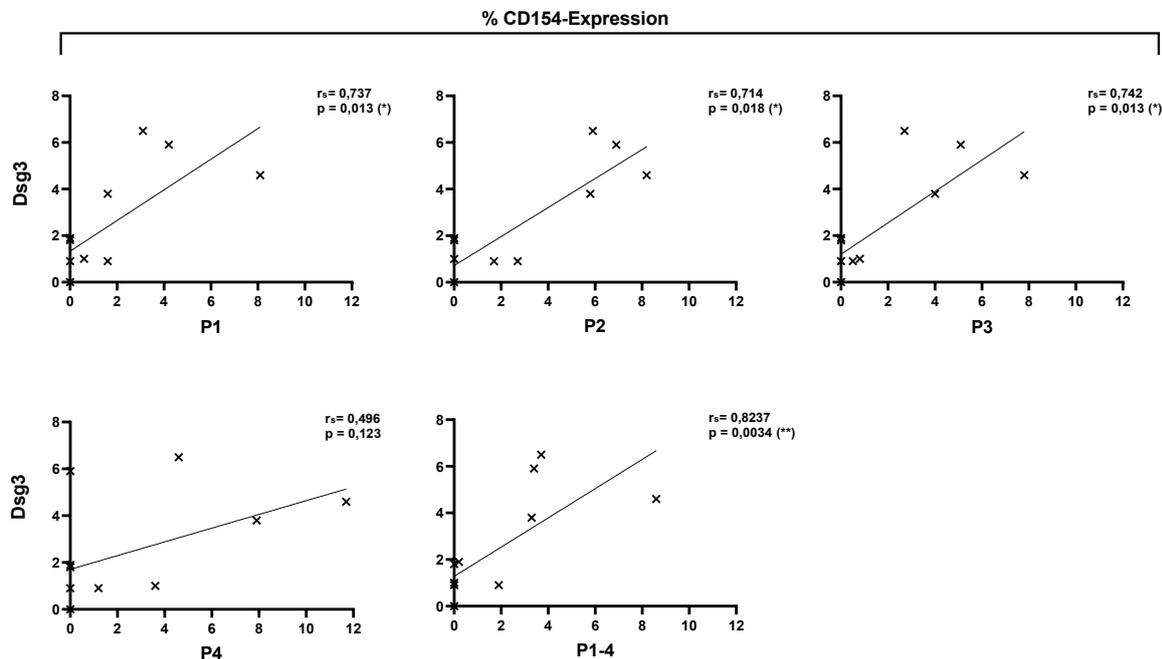
Frequenzen von CD154<sup>+</sup> innerhalb der CD4<sup>+</sup> T-Zellen, wurde bei den PV-Patienten durch P4 hervorgerufen (0 bis 11,6 % CD154<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup> T-Zellen).



**Abb. 15: Lage der Desmoglein (Dsg)-3-Peptide innerhalb der extrazellulären Domäne (ECD) des Dsg3 und ihr Einfluss auf die CD154-Expression nach ex vivo-Stimulation. (a)** Schematische Darstellung der Lage der epitopspezifischen Peptide des Dsg3 innerhalb der ECD. Der extrazelluläre Teil des Dsg3 ist in fünf Domänen (ECD1-5) unterteilt, von denen die angegebenen Peptide (P1-4) Epitope von Dsg3-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen darstellen (nach Veldmann et al. 2004). **(b)** Analyse der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) von Pemphigus vulgaris (PV)-Patienten (n=11) und Kontrollen (K; n=14) nach ex vivo-Stimulation mit PV-epitopspezifischen Peptiden (P1, P2, P3, P4) bzw. einem Mix (P1-4). Zur Berechnung der prozentualen Veränderung der CD154-Expression innerhalb der CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden die Werte der unstimulierten von den stimulierten Proben subtrahiert. Es wurde der nicht parametrische, zweiseitige Mann-Whitney-U-Test angewendet. \*p<0,05; P1-4, Peptidpool

Bei gleichzeitiger Stimulation mit Gabe aller Peptide (P1-P4) reagierten die PV-Patienten (Median: 0,2 % CD154<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup> T-Zellen) im Vergleich zu den Kontrollen mit einer signifikant höheren CD154-Expression innerhalb der CD4<sup>+</sup> T-Zellen (p=0,0489). Die Kontrollen zeigten über alle Peptidstimulationen hinweg keine erhöhte Expression von CD154<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Median: jeweils 0%). Zur Bewertung der CD154-Expression nach Stimulation mit den immundominanten Dsg3-Peptiden (P1, P2, P3, P4) wurden die PBMC vergleichend mit Dsg3 stimuliert. Bemerkenswert war, dass die PV-Patienten sowohl auf die Stimulation mit dem Protein Dsg3 als auch auf das Peptid P2 eine vergleichbar hohe CD154-Expression auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen aufzeigten (Abb. S 2). Dies zeigt, dass P2 ein immundominantes Peptid bei PV darstellt. Die CD154-Expression der Dsg3-spezifischen T-Zellen in PBMC von PV-Patienten wurde zudem bezüglich eines Zusammenhangs mit der CD154-Expression der Dsg3-epitopspezifischen Peptiden (P1, P2, P3, P4) untersucht.

Eine positive Korrelation der CD154-Expression auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Dsg3-Stimulation mit der Expression nach Peptid-Stimulation (P1, P2, P3, P4 und P1-4) konnte für P1, P2, P3 und P1-4 mithilfe des Spearmans Rangkorrelationskoeffizienten (rs) gezeigt werden (P1:  $r_s=0,737$ ,  $p=0,013$ ; P2:  $r_s=0,714$ ,  $p=0,018$ ; P3:  $r_s=0,742$ ,  $p=0,013$ ; P1-4:  $r_s=0,8237$ ,  $p=0,0034$ ; Abb. 16).



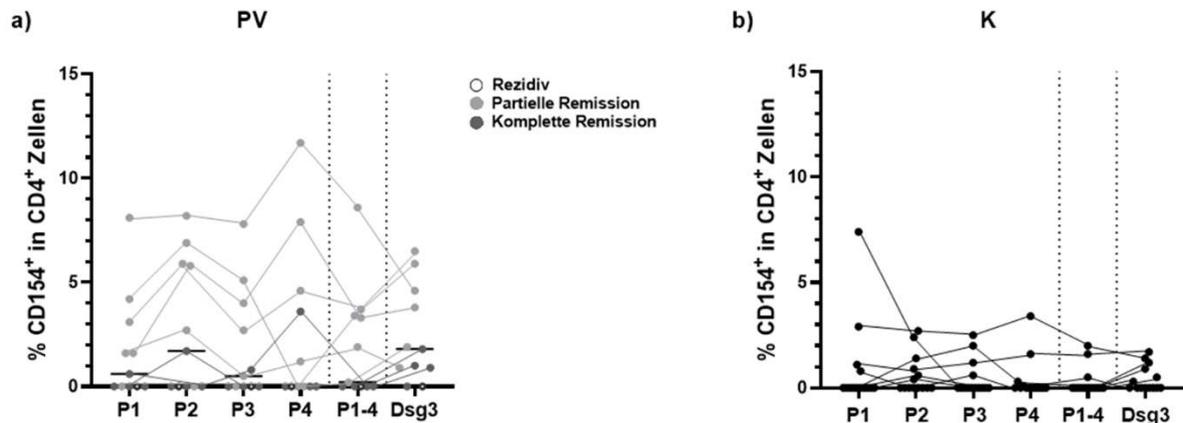
**Abb. 16: Korrelation der CD154-Expression von Desmoglein (Dsg)3- und Peptid-spezifischen T-Zellen.** Die CD154-Expression der Dsg3-spezifischen T-Zellen im Blut von Pemphigus vulgaris (PV)-Patienten (n=11) wurde hinsichtlich eines Zusammenhangs mit Dsg3-epitopspezifischen Peptiden (P1, P2, P3, P4 und P1-4) untersucht. Angegeben sind die Spearmans Rangkorrelationskoeffizienten (rs) und statistische Signifikanzen (p-Wert). \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$  P1-4, Peptidpool.

### 4.3.3 Einflussfaktoren auf die antigenspezifische CD154-Expression der CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Da sich innerhalb der PV-Patientenkohorte die individuelle antigenspezifische CD154-Expression der CD4<sup>+</sup> T-Zellen stark unterschied, folgte eine detaillierte Analyse anhand der Stratifizierung der Krankheitsaktivität, genetischen Prädisposition und Therapie. Dies könnte Hinweise über die Verteilung autoreaktiver T-Zellantworten im Verlauf einer Pemphiguserkrankung geben.

#### 4.3.3.1 Einfluss des klinischen Status auf die antigenspezifische CD154-Expression

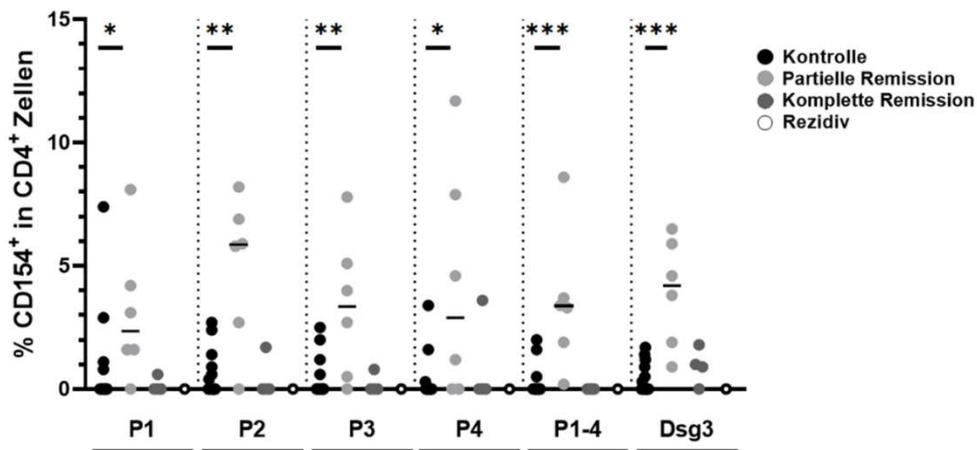
Zur Analyse des klinischen Status in Bezug auf die antigenspezifische CD154-Expression der CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurde auf die individuelle Reaktivität fokussiert und eine Stratifizierung in Hinblick auf die klinisch etablierte Einteilung (R, PR, KR; vgl. Abb. 6) durchgeführt.



**Abb. 17: Individuelle Reaktivität der CD154-Expression auf verschiedene Pemphigus vulgaris (PV)-spezifische Stimulanzen mit Stratifizierung des klinischen Status.** (a) Darstellung des individuellen CD154-Expressionsniveaus der CD4<sup>+</sup> T-Zellen innerhalb der frisch aufbereiteten mononukleären Zellen des peripheren Blutes von PV-Patienten (n=11) nach Stimulation mit Dsg3-Peptiden (P1, P2, P3, P4, Peptidpool P1-4) und Desmoglein (Dsg)-3. Die Stratifizierung hinsichtlich des klinischen Status (Rezidiv, partielle Remission, komplette Remission) wurde in Graustufen hervorgehoben. (b) Individuelle Reaktivität der Kontrollgruppe (n=14).

Der Anteil der CD154<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup> T-Zellen eines PV-Patienten blieb in den meisten Fällen über die einzelnen Stimulationsvarianten hinweg auf einem ähnlichen Expressionsniveau (Abb. 17a). Die Höhe des Expressionsniveaus war allerdings abhängig vom klinischen Status des Patienten (R, PR, KR). Den größten medianen Anstieg der antigenspezifisch aktivierten Zellen (CD154<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) zeigte sich bei P2 und Dsg3 (Median: 1,8 % CD154<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup>). Die Individuen mit einer PR (n=6) exprimierten gegenüber den KR (n=4) mehr CD154 innerhalb der CD4<sup>+</sup> Zellpopulation. Der PV-Patient mit einem Rezidiv zeigte keinerlei antigenspezifische Aktivierung anhand einer Hochregulation von CD154. Beachtenswert war, dass vier PV-Patienten, die nach Stimulation mit Dsg3 antigenspezifisch CD154 auf ihren CD4<sup>+</sup> T-Zellen exprimierten, durch keines der verwendeten Dsg3 epitopspezifischen Peptide ebenfalls stimuliert werden konnten.

Die Kontrollen entwickelten ebenso ein individuell nur leicht schwankendes, aber im Vergleich zu PV-Patienten niedrigeres Expressionsniveau. Das CD154-Expressionsniveau der Kontrollen lag für alle Stimulanzen im Median bei 0 % CD154 innerhalb der CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Abb. 17 b).

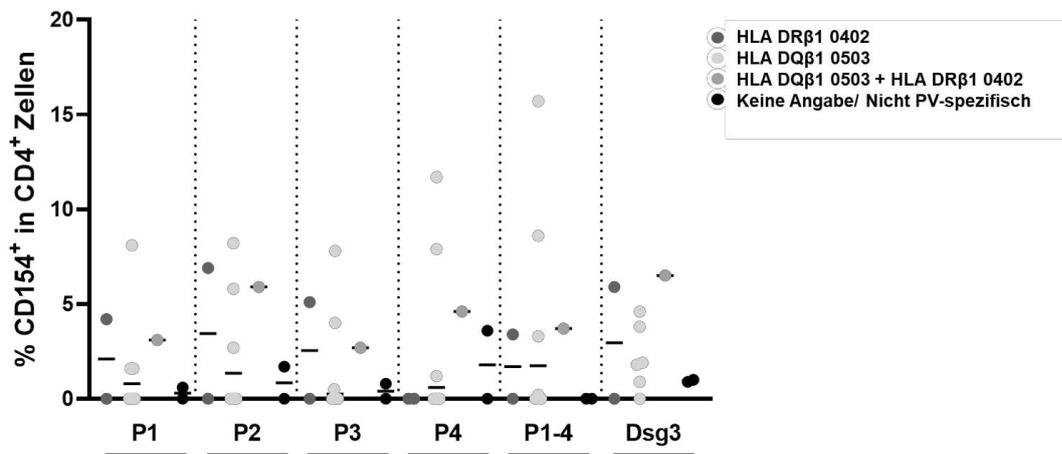


**Abb. 18: Individuelle CD154-Expression stratifiziert nach dem klinischen Status.** Darstellung des individuellen CD154-Expressionsniveau der CD4<sup>+</sup> T-Zellen innerhalb der frisch aufbereiteten mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) von PV-Patienten (n=11) nach ex vivo-Stimulation mit Desmoglein (Dsg)-3 und epitopspezifischen Dsg3-Peptiden (P1, P2, P3, P4, Peptidpool P1-4). Vergleich der CD154-Expression zwischen den Untergruppen partielle Remission (n=6), komplette Remission (n=4) sowie der gesunden Kontrollkohorte (n=14). Für die Analyse statistischer Unterschiede wurde der nicht parametrische, zweiseitige Mann-Whitney-U-Test angewendet. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

Die Patienten mit einer PR (n=6) exprimierten gegenüber den KR (n=4) und den Kontrollen (n=14) nach Stimulation mit PV-spezifischen Antigenen (P1, P2, P3, P4, Dsg3) im Median mehr CD154 auf CD4<sup>+</sup> Zellen (Abb. 18). Der Unterschied der PR gegenüber der Kontrollkohorte war nach allen Stimulationen (P1, P2, P3, P4, P1-4 und Dsg3) signifikant (p<0,05). Aufgrund der geringen Anzahl an KR bzw. R und der damit einhergehenden nicht repräsentativen Aussagekraft, wurde eine statistische Untersuchung hinsichtlich eines Unterschieds zu PR oder Kontrollen nicht durchgeführt. Die größte Expression von CD154<sup>+</sup> innerhalb der CD4<sup>+</sup> T-Zellen war bei PR für P2 (Median: 5,8 % CD154<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup>) und bei KR für Dsg3 (Median: 0,95 % CD154<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup>) zu sehen.

### 4.3.3.2 Einfluss des HLA-Typs auf die antigenspezifische CD154-Expression der CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Um neben dem klinischen Status noch einen weiteren Einflussfaktor, der sich auf die antigenspezifische CD154-Expression der CD4<sup>+</sup> T-Zellen auswirken könnte, zu untersuchen, wurde in Bezug auf die HLA-Klasse-II-Haplotypen stratifiziert. Mehrere Studien konnten bereits nachweisen, dass PV-assoziierte HLA-Klasse-II-Allele an der Aktivierung von Dsg3-reaktiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen beteiligt sind. Auf der Grundlage des Peptidbindungsalgorithmus für HLA-DRB1\*04:02, das vergleichbare Bindungsmotive wie HLA-DQB1\*05:03 aufweist, wurden mehrere immundominante Peptide bei Pemphigus identifiziert (Eming et al. 2014; vgl. Kap. 2.2.2). Hier konnte, bei einer lediglich geringen Anzahl von PV-Patienten, kein Zusammenhang zwischen den untersuchten genetischen Faktoren und der antigenspezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellaktivität identifiziert werden (Abb. 19).



**Abb. 19: Individuelle CD154-Expression stratifiziert nach dem humanen Leukozytenantigen (HLA)-Klasse II Haplotyp.** Stratifizierung verschiedener PV-spezifischer HLA-Haplotypen, d.h. HLA-DRβ1\*0402 (n=2), HLA-DQβ1\*0503 (n=6), die Kombination (HLA-DRβ1\*0402 + HLA-DQβ1\*0503; n=1) und nicht PV-spezifische bzw. nicht ermittelter HLA-Typen (n=2) zum Vergleich der CD154-Expression.

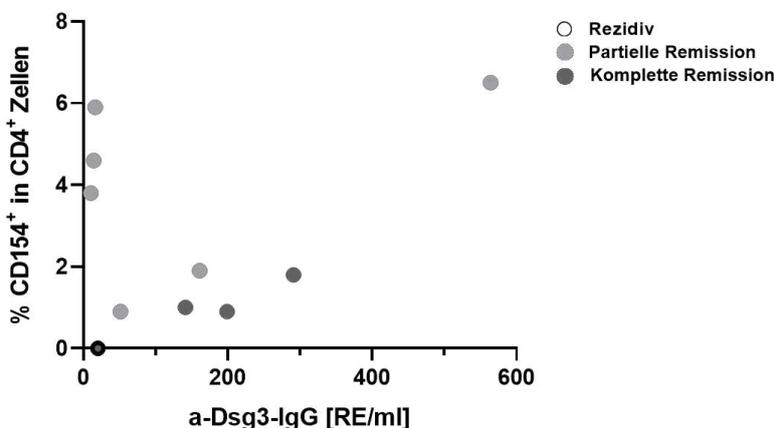
### 4.3.3.3 Einfluss der Therapie auf die CD154-Expression des Patientenkollektivs

Um einen möglichen Einfluss von systemischen Therapien bestehend aus Kortikosteroiden und adjuvanten Immunsuppressiva auf Dsg3-spezifische CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T-Zellen zu bestimmen, wurden die PV-Patienten in die drei Gruppen „keine Therapie“ (n=2), „minimale Therapiestufe“ (<10mg Prednisolon/Tag; n=6), „moderate Therapiestufe“ (>10mg

Prednisolon/Tag und/oder weitere Immunsuppressiva; n=2) eingeteilt. Die „hohe Therapiestufe“ (n=1) wurde nur bei einem Patienten mit Rezidiv erreicht (vgl. Kap. 3.1.1, Abb. 6). Es zeigte sich, dass die zuvor beobachtete erhöhte Anzahl an CD154<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen vor allem bei Patienten mit minimaler oder moderater Therapie beobachtet werden konnte (Abb. S 3). Dagegen wiesen Patienten mit keiner bzw. hoher Therapie nur eine sehr niedrige Anzahl von Dsg3-spezifischen CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T-Zellen auf, wobei aufgrund der kleinen Anzahl der Patienten hier die Aussagekraft zu hinterfragen ist.

#### 4.3.4 Korrelation Dsg3-spezifischer CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T-Zellen mit Anti-Dsg3-Autoantikörper

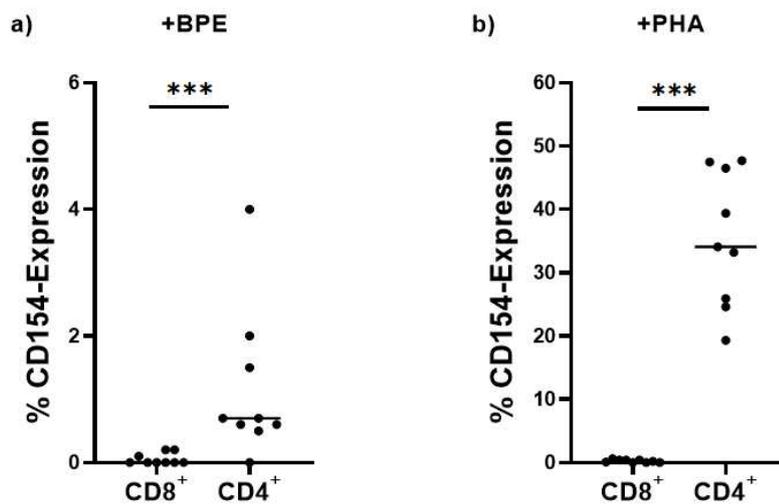
Innerhalb des untersuchten Kollektivs der PV-Patienten konnte in Abhängigkeit vom jeweiligen Krankheitsstatus unterschiedlich hohe bis überhaupt keine Dsg3-Autoantikörper im Blut nachgewiesen werden (Abb. 10b). Um eine Korrelation zwischen dem erhöhten Vorkommen von CD154-exprimierenden reaktiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen und dem Vorhandensein von Autoantikörpern im Serum der PV-Patienten zu überprüfen, wurden die Dsg3-spezifische CD154-Expression der CD4<sup>+</sup> T-Zellen hinsichtlich eines Zusammenhangs mit Dsg3-Autoantikörper untersucht (Abb. 20) Dabei konnte keine Korrelation festgestellt werden ( $r_s = -0.01831$ ,  $p = 0,9591$ ). Auch die Stratifizierung mit Bezugnahme auf den klinischen Status lieferte keine weiteren Erklärungsansätze (Abb. 20).



**Abb. 20: Korrelation der CD154-Expression mit Autoantikörper und Stratifizierung bezüglich des klinischen Status.** Desmoglein (Dsg)3-spezifische CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T-Zellen in frisch aufbereiteten mononukleären Zellen des peripheren Blutes von Pemphigus vulgaris (PV)-Patienten (n=11) wurden hinsichtlich einer Korrelation mit Anti-Dsg3-IgG untersucht. Die Analyse nach Spearman ergab einen Korrelationskoeffizient von  $r_s = -0.0183$  und eine p-Wert von  $p = 0,9591$ . RE, relative Einheiten.

#### 4.4 Analyse der CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T-Zellen bei Birkenpollenallergikern

Zusätzlich zur Analyse des Aktivierungsmarkers CD154 auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen in PBMC von PV-Patienten, erfolgte eine vergleichende Untersuchung in einer Patientenkohorte von BPA. Diese Analyse des Aktivierungsmarkers CD154 wurde während der Birkenpollensaison April-Mai 2020 durchgeführt. Um die immunologischen Veränderungen der natürlichen Allergenexposition und deren Auswirkung auf die CD154-Expression untersuchen zu können, wurden gesunde Kontrollpersonen ohne bekannte Allergie entgegengestellt. Zunächst wurde sowohl die antigenspezifisch aktivierten CD8<sup>+</sup> als auch die CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit einer Induktion der CD154-Expression nach Stimulation mit BPE und PHA quantitativ erfasst (Abb. 21a+b).

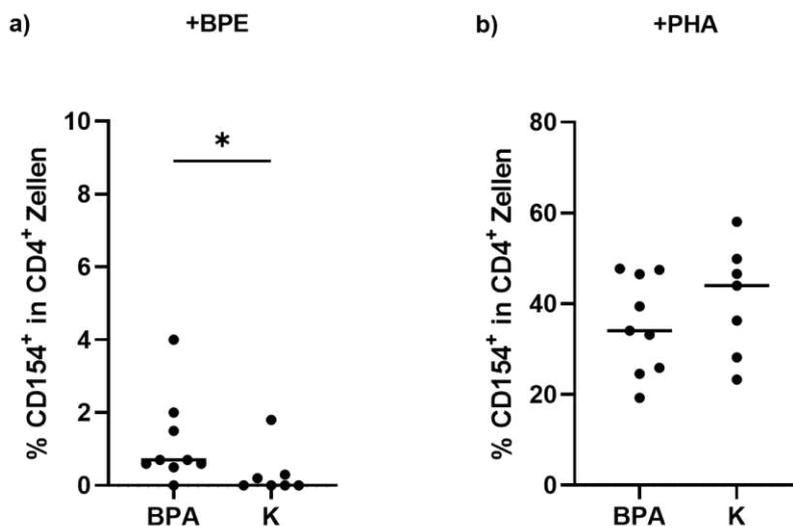


**Abb. 21: Analyse der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zell--Populationen hinsichtlich der Expression CD154 nach spezifischer und unspezifischer Stimulation zu exprimieren.** Frisch aufbereitete mononukleäre Zellen des peripheren Blutes von Birkenpollenallergikern (BPA; n=9) wurden ex vivo (a) spezifisch (antigenspezifisch) mit Birkenpollenextrakt (BPE) und (b) unspezifisch (polyklonal) mit Phytohämagglutinin (PHA) stimuliert. Nach der Stimulation erfolgten die Antikörperfärbung und die anschließende Analyse mittels Durchflusszytometrie. Zur Berechnung der prozentualen Veränderung der CD154-Expression innerhalb der CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden die jeweiligen Werte der unstimulierten von den stimulierten Proben subtrahiert. Es wurde der nicht parametrische, zweiseitige Mann-Whitney-U-Test angewendet. \*\*\*p<0,001.

Hierbei zeigte die Analyse der T-Zell-Subpopulationen in Hinblick auf die Expression von CD154 nach spezifischer (antigenspezifisch, BPE) und unspezifischer (polyklonal, PHA) Stimulation, dass im Gegensatz zu CD8<sup>+</sup> T-Zellen hauptsächlich CD4<sup>+</sup> T-Zellen den Aktivierungsmarker nach einer Stimulation exprimierten. Die CD4<sup>+</sup> T-Zellen wiesen sowohl nach spezifischer (Abb. 21a) als auch nach unspezifischer Stimulation (Abb. 21b) einen Anstieg

der CD154-Expression auf. Diese Zunahme der CD4<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup>-Population war im Median nach BPE- (0,7 %) sowie nach PHA-Stimulation (34,1 % CD154<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup> T-Zellen) zu beobachten (Abb. 21 a+b). Der Anteil der antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen innerhalb des Lymphozytenkompartiments betrug dagegen im Median 0 % (BPE) bzw. 0,2 % CD154<sup>+</sup> in CD8<sup>+</sup> T-Zellen (PHA) der Zellen und war gegenüber dem Hintergrund nicht abzugrenzen. Die unterschiedliche CD154-Expression der beiden Subpopulationen war sowohl nach BPE- (p=0,0009) als auch nach PHA-Stimulation (p<0,0001) signifikant. Gegenüber den Kontrollen gab es in Bezug auf die CD8<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup>-Expression keinen Unterschied (Daten nicht gezeigt).

Im nächsten Schritt wurde zur Etablierung der antigenspezifischen Analyse der CD4<sup>+</sup> T-Zellen frisch aufbereitete PBMC von 9 BPA sowohl spezifisch mit BPE als auch unspezifisch mit PHA stimuliert (Abb. 22 a+b).



**Abb. 22: CD154-Expression in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) bei Birkenpollenallergikern (BPA) und Kontrollen (K) nach antigenspezifischer ex vivo-Stimulation.** Während der Birkenpollensaison frisch aufbereitete PBMC von BPA (n=9) und den Kontrollen (n=7) wurden ex vivo mit (a) Birkenpollenextrakt (BPE) und (b) Phytohämagglutinin (PHA) stimuliert. Zur Berechnung der prozentualen Veränderung der CD154-Expression innerhalb der CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden die jeweiligen Werte der unstimulierten von den stimulierten Proben subtrahiert. Es wurde der nicht parametrische, zweiseitige Mann-Whitney-U-Test angewendet. \* p<0,05.

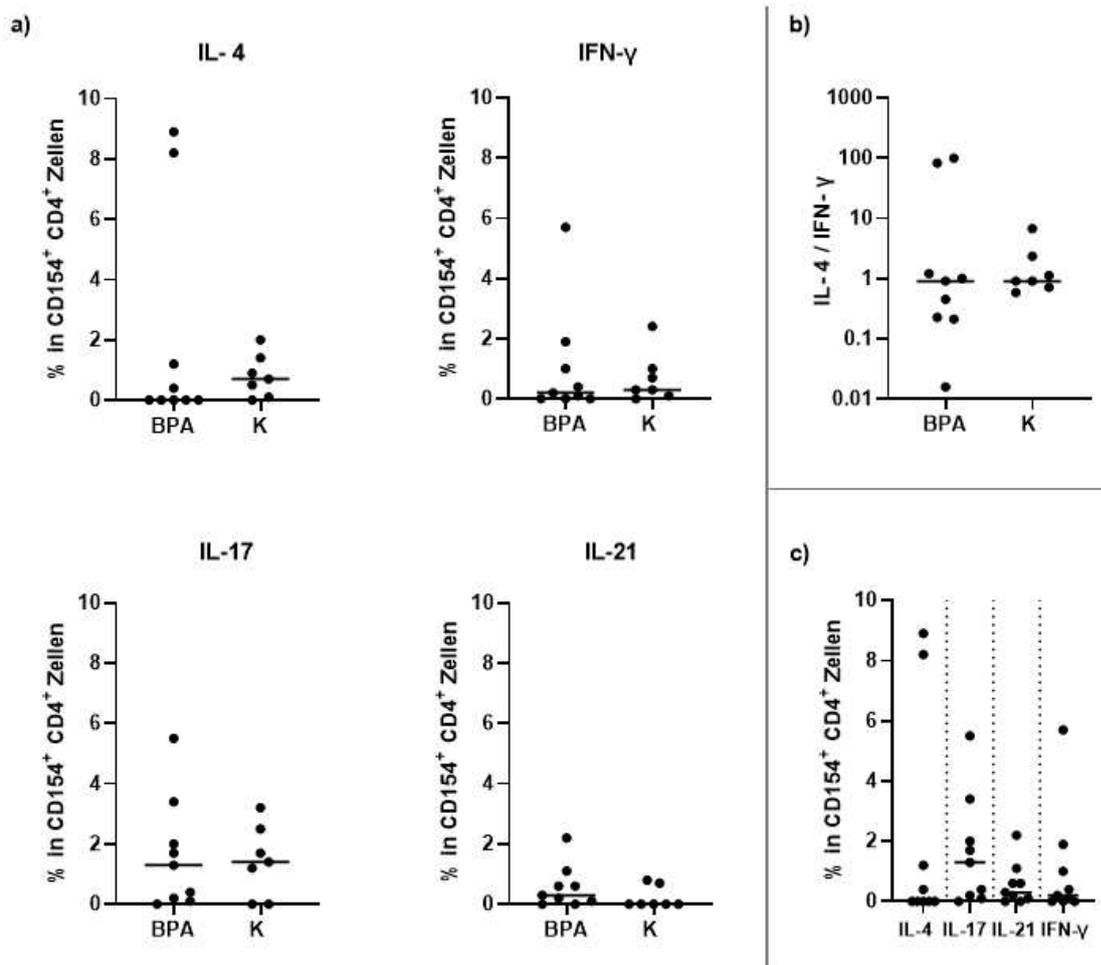
In der durchflusszytometrischen Analyse zeigte sich bei 89 % der BPA (8 von 9) ein Anstieg nach Stimulation mit BPE bezüglich der CD154-Expression in der CD4<sup>+</sup> T-Zell-Population (Median: 0,7 % CD154<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup>, Abb. 22 a). Gegenüber der Kontrollkohorte (Median: 0 % CD154<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup>) wiesen die BPA eine signifikant höhere Frequenz von CD154<sup>+</sup> T-Zellen auf (p=0,0267, Abb. 22 a). Die T-Zell-Reaktion auf das Kontrollmitogen PHA führte sowohl bei

den BPA als auch bei den Kontrollen zu einer wesentlich erhöhten CD154-Expression der CD4<sup>+</sup> T-Zell-Population (Median: BPA= 34 % vs. K= 44 % CD154<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup>, p =0,4079; Abb. 22b).

#### 4.4.1 Zytokinexpressionsmuster der BPE-reaktiven CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T-Zellen

Ein zusätzliches Ziel dieser Arbeit stellte die Phänotypisierung von antigenspezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Allergenstimulation von BPA dar. Um die Verteilung der BPE-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen innerhalb der Subtypen zu beurteilen, wurde die Expression von CD154 als Marker der antigenspezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellaktivierung (Chattopadhyay et al. 2006; Frensch et al. 2005) in Kombination mit intrazellulären Markerzytokinen verwendet. Mithilfe der durchflusszytometrischen Analyse wurden, wie schon in Kap. 3.8 beschrieben, die vier Subpopulationen T<sub>H1</sub> (CD4<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> IFN-γ<sup>+</sup>), T<sub>H2</sub> (CD4<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> IL-4<sup>+</sup>), T<sub>H17</sub> (CD4<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup>) und IL-21-sezernierenden T<sub>FH</sub>-Zellen (CD4<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> IL-21<sup>+</sup>) anhand der Zytokinexpression unterschieden (Abb. 23).

Nach ex vivo-Stimulation mit BPE konnten CD154<sup>+</sup> T-Zellpopulationen mit den oben genannten Subpopulationen sowohl bei BPA als auch bei den Kontrollen nachgewiesen werden (Abb. 23 a). Dabei zeigte sich bei beiden zu untersuchenden Gruppen variable T-Zellantworten bezüglich ihrer Zytokinsekretion. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Häufigkeit von IL-4, IL-17, IL-21 und IFN-γ auf CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> zwischen BPA und Kontrollen als Reaktion auf das BPE beobachtet werden (Abb. 23a). Die durch das BPE maximal induzierte CD154<sup>+</sup> T-Zellantwort zeigte sich bei der Zytokinexpression des IL-4. Bei zwei BPA wurde auf 8,9 % bzw. 8,2 % der gesamten CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T-Zell-Population IL-4 exprimiert. Das im Median am häufigsten exprimierte Zytokin bei BPA zeigte sich bei IL-17 (Median: 1,3 % in CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup>; Abb. 23c). Mit der Aktivierung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurde nicht nur der Oberflächenmarker CD154 induziert, sondern auch die Frequenz der Zytokinproduktion nahm bei allen Zytokinen gegenüber den CD4<sup>+</sup>CD154<sup>-</sup> T-Zellen zu. Dies konnte bei jedem Teilnehmer detektiert werden (Daten nicht dargestellt).



**Abb. 23: Birkenpollenextrakt (BPE)-induzierte Zytokinexpression der CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T-Zellen bei Birkenpollenallergikern (BPA) und der Kontrollgruppe (K).** (a) Die Zytokinexpression von Interleukin (IL)-4, IL-17, IL-21 und Interferon (IFN)- $\gamma$  der CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> Zellen wurde während der Birkenpollensaison in frisch aufbereiteten mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) bei BPA (n=9) und den gesunden Kontrollen (n=7) durchflusszytometrisch bestimmt. (b) Für die Bestimmung des T<sub>H</sub>2/T<sub>H</sub>1-Verhältnisses wurden für T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen deren entsprechende Markerzytokine IFN- $\gamma$  und IL-4 verwendet und grafisch dargestellt. (c) Übersicht der Zytokinexpression der CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T-Zellen bei BPA nach antigenspezifischer ex vivo-Stimulation mit BPE. Zur Berechnung der prozentualen Veränderung der Zytokinexpression innerhalb der CD154<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden die Werte der unstimulierten von den stimulierten Proben subtrahiert.

#### 4.4.2 Proportionale Veränderung der T-Zellsubpopulationen T<sub>H</sub>1 und T<sub>H</sub>2

Die aktuelle Forschung geht davon aus, dass nicht nur die Quantität einer bestimmten Zellpopulation zur Ausprägung eines Krankheitsbildes beiträgt, sondern vielmehr das Verhältnis einzelner Subpopulationen zueinander und deren Reaktivität den Schweregrad der Erkrankung bestimmt. Bei der Ausbildung einer IgE-vermittelten Allergie, wie der Birkenpollenallergie, zeigt sich eine Vergesellschaftung mit einem immunologischen

Ungleichgewicht von allergenspezifischen  $T_{H1}$ - und  $T_{H2}$ -Zellen (Romagnani 2006). Aus diesem Grund wurde das Verhältnis zwischen potenziell protektiven allergenspezifischen  $T_{H1}$ -Zellen zu den pathogenetisch relevanten  $T_{H2}$ -Zellen bestimmt. Das  $T_{H2}/T_{H1}$ -Verhältnis (berechnet durch die Division der Häufigkeit von  $CD154^+IL-4^+$   $T_{H2}$ -Zellen durch  $CD154^+IFN-\gamma^+$   $T_{H1}$ -Zellen) zwischen BPA und Kontrollen wies keinen Unterschied auf (Abb. 23b). Interessanterweise wiesen die Individuen der BPA eine große Spannweite bezüglich des Verhältnisses der zwei T-Zellsubpopulationen zueinander sowohl zugunsten von  $T_{H2}$  als auch vereinzelt von  $T_{H1}$  auf (Abb. 23b).

## 5 Diskussion

Die vorliegende Arbeit stellt eine detaillierte Querschnittsanalyse zur gezielten Untersuchung antigenspezifischer bzw. reaktiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen in PBMC mithilfe des Aktivierungsmarkers CD154 dar. Dieses Transmembranprotein zeigt eine Schlüsselrolle in der Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Nach Antigenkontakt wird über den CD40-CD154-Signalweg die Aktivierung und Reifung der CD4<sup>+</sup> T-Zelle, unabhängig von späteren Effektorfunktionen, induziert. Der frühe Aktivierungsmarker CD154 ist folglich ein spezifischer und sensitiver Marker für antigenspezifisch aktivierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen. In dieser Arbeit wurde die Anwendbarkeit dieser Methode zur Detektion antigenspezifischer aktivierter CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach ex vivo-Stimulation anhand des de novo synthetisierten CD154 bei 1) PV-Patienten und 2) BPA evaluiert. Während es bei den BPA derzeit schon Studien (Smith et al. 2013a) gibt, die die aktivierten T-Zellen unter Anwendung der CD154-Methode untersucht haben, wurde dieser Assay für die Detektion autoreaktiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei PV-Patienten bislang noch nicht angewandt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die antigenspezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen ex vivo durch die Expression von CD154 trotz ihrer niedrigen Frequenz innerhalb humaner peripherer T-Zellen detektiert werden können. Die Identifizierung mithilfe der Durchflusszytometrie ermöglicht den direkten Nachweis von Zellen, die durch eine Vielzahl von antigenen Epitopen (Proteinantigene oder einzelne Peptide) aktiviert werden. Durch die kombinierte Anwendung von Oberflächen- und intrazellulären Markerfärbungen konnte eine detaillierte Analyse zum weiteren Verständnis der Rolle antigenspezifischer CD4<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> T-Zellen beim Pathomechanismus des PV beitragen. Mithilfe der CD154-Methode zeigte sich sowohl bei PV-Patienten als auch BPA eine erhöhte Frequenz antigenspezifisch aktivierter T-Zellen (CD4<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup>) in der PBMC-Fraktion. Eine ähnliche Induktion nach antigenspezifischer Stimulation konnte bei den Kontrollen nicht gesehen werden. Bei allen in die Studie eingeschlossenen Patienten und Probanden waren die antigenspezifisch aktivierten CD154<sup>+</sup> Zellen innerhalb der peripheren T-Zellen mehrheitlich CD4<sup>+</sup>. Im Gegensatz dazu konnte der Aktivierungsmarker auf der Oberfläche von CD8<sup>+</sup> T-Zellen kaum detektiert werden.

## **5.1 Etablierung der CD154-Methode zur Detektion antigenspezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei Pemphigus vulgaris und Birkenpollenallergie**

Zur Detektion der aktivierten CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T-Zellen in den PBMC der zu untersuchenden Patientengruppen wurde initial anhand von Voruntersuchungen ein spezifisches Protokoll etabliert und sollte im Rahmen dieser Arbeit verfeinert werden. Die Methode ermöglicht eine schnelle, spezifische und sensitive Charakterisierung, welche anhand einer gut charakterisierten Anzahl an Patientenproben in dieser Arbeit wissenschaftlich verifiziert werden konnte.

### **5.1.1 Kryokonservierung**

Bei allen in diese Studie inkludierten Patienten (PV: n=16, BPA: n=15) konnte zwischen den frisch isolierten und kryokonservierten PBMC eine unterschiedliche Expression von CD154 auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen beobachtet werden (Abb. 13; Abb. 22 ). Es zeigte sich, dass die frisch isolierten PBMC im Vergleich zu den eingefrorenen Zellen mehr CD154 exprimieren konnten. Die Kryokonservierung der Zellen ermöglicht zwar ein flexibleres und damit standardisiertes Vorgehen, allerdings konnte in dieser und diversen anderen Veröffentlichungen beobachtet werden, dass dadurch Auswirkungen in verschiedenen Bereichen der Zellen ausgelöst werden können. So zeigten sich signifikante Veränderungen der Zellviabilität (Hodge et al. 2000; Weinberg et al. 2000), der Zytokinproduktion (Ford et al. 2017; Kvarnström et al. 2004), der Oberflächenmarker (Capelle et al. 2021; Costantini et al. 2003; Kreher et al. 2003; Reimann et al. 2000) und Kinetik der Zellviabilität (Jeurink et al. 2008). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten keine Auswirkung auf die Frequenz der CD4<sup>+</sup> T-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Kryokonservierung auf. Lemieux et al. beobachteten, dass der Prozess der Kryokonservierung die Fähigkeit verschiedene T-Zell-Phänotypen (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) mithilfe der Durchflusszytometrie zu erkennen, beeinträchtigen kann (Lemieux et al. 2016). Dieses Phänomen kann aber verringert werden, indem die aufgetauten Zellen vor der Färbung, wie in dieser Arbeit, für die phänotypische Analyse einer Ruhephase ausgesetzt werden (Sleasman et al. 1997; Tompa et al. 2018). Zusammengefasst könnten die Erkenntnisse dieser Studien über die Auswirkung der Kryokonservierung für die hier beobachtete geringere CD154-Expression in den gefrorenen PBMC verantwortlich sein. Ob CD154 zu den Markern zählt, die durch die Verarbeitung besonders beeinträchtigt werden, sollte in Zukunft näher untersucht werden. Daher ist die Interpretation der Ergebnisse kryokonservierter PBMC derzeit mit Vorsicht zu erfolgen, sodass für die Auswertung der Ergebnisse dieser Arbeit und zur besseren Vergleichbarkeit nur die

frisch nach der Blutentnahme isolierten PBMC zur Detektion von antigenspezifisch aktivierten CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> berücksichtigt wurden.

### 5.1.2 Stimmulationsassay

Da die Messergebnisse von den Stimulationsbedingungen beeinflusst werden, war ein standardisiertes Vorgehen zur Vergleichbarkeit unerlässlich. Ziel war es, durch die Stimulation eine größtmögliche Zellaktivierung zu erreichen und dabei unphysiologische Veränderungen der Zellen zu vermeiden. Es wurden unspezifische polyklonale Stimulationen mit PHA und spezifische Stimulationen mit Dsg3, P1, P2, P3, P4 und BPE gegenübergestellt. Um die Ergebnisse vergleichbar zu halten, wurde auf eine konstante Inkubationszeit innerhalb des Experiments geachtet. Die zuvor durch Voruntersuchungen (Polakova et al. 2022; Smith et al. 2013a) etablierte optimale Stimulationsdauer von 16 h wurde in der Praxis mit einem Zeitraum von 14-18h prinzipiell eingehalten. Der Grund für die Zeitspanne war die zeitliche Variabilität beim Eintreffen der Patienten mit anschließender Stimulation von frisch isolierten PBMC. Unsere Ergebnisse stehen damit im Einklang mit mehreren Untersuchungen, die nach 6-16 h ein Maximum der CD154-Expression beobachten konnten (Chattopadhyay et al. 2005; Frensch et al. 2005; Laman et al. 2017). Nach einer Stimulationsdauer von 16 h und der Zugabe von Brefeldin A, konnte eine ausgeprägte und stabile Zellaktivierung erreicht werden. Einige Studien konnten mit einer Stimulationsdauer von 6-21h und gleichzeitiger Zugabe von Brefeldin A/Monensin ebenfalls eine stabile Aktivierung CD4<sup>+</sup> T-Zellen erreichen (Chattopadhyay et al. 2005; Smith et al. 2013a). Die vorübergehende Natur der CD154-Expression erfordert die Stabilisierung und die Steigerung der Intensität der CD154-Expression durch Brefeldin A und ermöglicht somit die kombinierte Identifizierung von seltenen antigenspezifischen- und zytokinproduzierenden T-Zellen (Jung et al. 1993). Während die Hinzugabe von Brefeldin A nach Stimulation mit Peptiden laut Meier et al. sofort durchgeführt werden kann, sollte bei Proteinen aufgrund der längeren Prozessierung mindestens 2 h gewartet werden (Meier et al. 2008). Ob dies einen entscheidenden Einfluss auf die Detektion von antigenspezifisch aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen hat, müsste in zukünftigen Experimenten eingehender untersucht werden.

Die Zelldichte im Ansatz der 96er Rundboden-Platte ist ein wichtiger Faktor für die Stärke der Stimulation, denn nicht nur durch wiederholte Stimulation des TCR, sondern auch Zell-Zell-Kontakt-abhängig kann das Überleben der Zellen durch *activation-induced cell death* (AICD) beeinflusst werden (Gorak-Stolinska et al. 2002). Mit der in den vorliegenden Versuchen

gewählten Zelldichte von  $3 \times 10^5$  Zellen/Well ( $1,5 \times 10^5$  Zellen/ml) konnte eine starke Zellaktivierung durch die jeweilige Stimulation hervorgerufen werden. Da in Studien mit ähnlichem Versuchsaufbau eine Zellzahl von mehr als  $2 \times 10^6$  Zellen/ml verwendet wurden, könnte zukünftig durch eine erhöhte Anzahl an Events eine bessere Messung der seltenen Zellen ermöglicht werden (Chattopadhyay et al. 2005; Meier et al. 2008; Smith et al. 2013a).

### **5.1.3 FACS-Analyse**

Ein methodischer Fokus dieser Arbeit lag auf der Verfeinerung der FACS-Analyse nach ex vivo-Zellstimulation und anschließender intrazellulärer und oberflächlicher Färbung mit den entsprechenden Antikörpern anhand eines neu etablierten Markerpanels. Ein Multicolor Flow Cytometry Färbepanel zur Charakterisierung von antigenspezifisch aktivierten T-Zellen mithilfe von CD154 wurde etabliert und anhand von Testmessungen überprüft. Im ersten Schritt wurde auf Grundlage der Fragestellung eine Kombination aus geeigneten Fluorochrom-konjugierten Antikörpern ermittelt. Die Auswahl der Antikörper erfolgte anhand einer Kombination aus theoretischen Vorüberlegungen und wie von McLaughlin et al. vorgestellter empirischer Testung (McLaughlin et al. 2008). In die Vorüberlegungen wurde neben dem Wissen über die Expressionsstärke der untersuchten Antigene sowohl die Leuchtintensität als auch die spektrale Überlappung der Fluorochrome miteinbezogen.

### **5.1.4 Aktivierungsmarker CD154**

Bei der Auswahl eines passenden Korrelats der Aktivierung (Aktivierungsmarker) müssen bestimmte Anforderungen beachtet werden, um antigenspezifische von nicht-antigenspezifischen Zellen zu unterscheiden. Neben der Kinetik des Markers spielt die Sensitivität und Spezifität eine entscheidende Rolle. Zum einen wurde in dieser Arbeit der Oberflächenmarker CD154 auf seine kinetische Eignung bezüglich des Versuchsaufbaus überprüft. Wie zuvor in anderen Studien gezeigt, eignet sich für  $CD4^+$  T-Zellen CD154 durch seine starke und schnelle Reaktion sehr gut (Chattopadhyay et al. 2005; Frensch et al. 2005; Smith et al. 2013a). Die bereits in Voruntersuchungen unserer Forschungsgruppe (Polakova et al. 2022) etablierte Stimulationsdauer von 16 h weist eine maximale CD154-Expression auf  $CD4^+$  T-Zellen. Zum anderen stellt sich die Frage ob bestimmte Zellpopulationen bevorzugt markiert wurden (Spezifität). Es zeigte sich durch die hier angewendete Kombination aus Aktivierungsmarker und intrazellulärer Zytokinfärbung, dass der Marker CD154 aktivierte  $CD4^+$  T-Zellen unabhängig von der Zellsubset-spezifischen Zytokinsekretion identifizieren

konnte. Dies steht im Einklang mit Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen (Chattopadhyay et al. 2005; Frensch et al. 2005; Kirchhoff et al. 2007). Diese Eigenschaft in Kombination mit einem geringen Hintergrundrauschen zeigt die hohe Spezifität von CD154 unter den Aktivierungsmarkern (Bacher und Scheffold 2013). Van Hemelen et al. konnten nachweisen, dass die CD154-Methode im Vergleich zu kultivierten T-Zell-Systemen mit Allergenstimulation über einen längeren Zeitraum ähnliche Ergebnisse liefert, wobei die Anzahl unspezifisch aktivierter T<sub>H</sub>-Zellen bei einer Kultivierung über die Zeit zunimmt (van Hemelen et al. 2011). Des Weiteren sollte ein sensitiver Aktivierungsmarker viele der aktivierten Zellen als solche markieren. Allerdings bleibt in dieser Arbeit die Frage offen, wie viele Zellen nicht berücksichtigt wurden. Hierfür wäre eine Kombination mit anderen Aktivierungsmarkern (bspw. CD69 oder CD137; Annunziato et al. 2021) oder der vergleichende Einsatz von MHC-Multimeren oder einem ELISpot möglich. Allerdings bringen diese alternativen Methoden auch Nachteile mit sich. So kann die Zahl antigenspezifischer T<sub>H</sub>-Zellen durch den Einsatz von MHC-Multimeren unabhängig von der Aktivierung bestimmt werden, jedoch sind die Abhängigkeit zum HLA-Haplotyp und die geringe Aussagekraft der Rezeptoraffinität über die Funktionalität nachteilig zu bewerten (Dolton et al. 2018; Tario et al. 2015). Weiterhin muss vor der kostenintensiven Herstellung der Reagenzien die individuellen MHC-Allele bestimmt werden sowie immundominanten Peptidepitope bereits bekannt und definiert sein (Boelen et al. 2016; Hackett und Sharma 2002). Bei einem ELISpot würde die differenzierte Phänotypisierung anhand der charakteristischen Sekretion spezifischer Zytokine einzelner Subpopulationen fehlen. Mit der im Rahmen dieser Arbeit etablierten und angewandten Methode lassen sich die Limitationen der herkömmlichen Nachweisverfahren umgehen. Allerdings ist die Durchflusszytometrie trotz ihrer hohen Sensitivität durch die Akkumulation eines Hintergrundrauschens limitiert. Dieses liegt normalerweise im Bereich 0,01-0,1%, sodass die Analyse auf Populationen mit größeren Frequenzen begrenzt ist (Bacher und Scheffold 2013). Der Nachweis antigenspezifischer T-Zellen anhand funktioneller Parameter durch die vorherige ex vivo-Stimulation mit dem jeweils spezifischen Antigen hat einige Vorteile. So bietet die Stimulation mit Proteinen die Möglichkeit, unabhängig von MHC-Allelen oder einer genauen Definition der antigenen Epitopen, antigenspezifische T-Zellen zu detektieren. Besonders die Analyse von T-Zell-Reaktionen gegen komplexe Antigene (z. B. Allergene), die verschiedene T-Zell-Epitope enthalten, wird dadurch möglich. Durch die Stimulation mit Peptiden können die Immunantworten auf Peptidebene detektiert und spezifiziert werden können. Dies erlaubt in dieser Arbeit eine detailliertere Identifikation und Bestimmung bereits bekannter Zielepitope der Immunantwort bezüglich ihrer CD154-

Expression bei PV. Der Nachweis mithilfe von CD154 stellt daher eine einfache Methode dar, Zielpeptide der Immunantwort zuverlässig nach Stimulation mit den entsprechenden Antigenen umfassen zu charakterisieren.

Eine Gesamtbeurteilung antigenspezifisch aktivierter CD4<sup>+</sup> T-Zellen konnte in dieser Arbeit mit der CD154-Methode erreicht werden. Die während der Aktivierung induzierte Expression von CD154 detektiert die antigenspezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Chattopadhyay et al. 2005; Frensch et al. 2005; Kirchhoff et al. 2007; Meier et al. 2008). In Kombination mit der mehrfarbigen intrazellulären Zytokinfärbung kann eine gleichzeitige quantitative und qualitative Auswertung der antigenspezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen erfolgen (Meier et al. 2008). Ein weiterer Vorteil der CD154-Methode ist die einfache Handhabung und Kombination mit anderen Oberflächenmarkern. In der Gesamtbetrachtung war CD154 für CD4<sup>+</sup> T-Zellen für die vorgestellten Versuchsbedingungen am besten geeignet.

## **5.2 Die Rolle von CD154 bei der T-Zell-vermittelten Pathogenese des PV**

Der PV ist eine Autoimmunerkrankung der Haut, bei der es aufgrund einer gestörten Immuntoleranz gegenüber epidermalen Autoantigenen, wie Dsg1 und Dsg3, zur Entstehung autoreaktiver T-Zellen kommt (Amagai et al. 1994; Bystryk und Rudolph 2005; Hertl et al. 1998a; Kasperkiewicz et al. 2012; Koch et al. 1997; Lin et al. 1997). In verschiedenen in vitro- und in vivo-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Dsg3-reaktive CD4<sup>+</sup> T-Zellen eine entscheidende Rolle in der Initiierung und Aufrechterhaltung der beim PV pathogenetisch bedeutsamen Autoantikörperproduktion spielen (Aoki-Ota et al. 2006; Eming et al. 2014; Lin et al. 1997; Nishifuji et al. 2000; Veldman et al. 2003; Veldman et al. 2004; Wucherpfennig et al. 1995). Bei der Aktivierung der autoreaktiven B-Zellen weisen die T<sub>H</sub>-Zellen durch ihre kostimulatorische Moleküle und die Ausschüttung von Zytokinen eine wichtige Helferfunktion auf. Mehrere Studien unterstreichen die Annahme, dass die B-Zellen als APC für Dsg3-spezifische T-Zellen eine wesentliche Bedeutung haben (Colliou et al. 2013; Eming et al. 2014; Nishifuji et al. 2000). Zwei unabhängige Studien zeigten im Tiermodell für PV, dass ein einzelner Dsg3-reaktiver T-Zellklon ausreicht, um naive B-Zellen zur Produktion von Dsg3-spezifischen IgG-Autoantikörpern anzuregen (Takahashi et al. 2009; Zhu et al. 2012). Daher ist die Verwendung eines Analyseinstruments zum Nachweis von antigenspezifischen T-Lymphozyten und deren proliferativer Reaktion bei PV von großer Bedeutung. Zum einen könnte die in dieser Arbeit vorgestellte Methode zukünftig in der Diagnosestellung eingesetzt

werden zum anderen wäre es ein neues Instrument zur Überwachung der Wirksamkeit von immunmodulatorischen Therapien. Ein mögliches Therapieansprechen könnte so durch das Auftreten von Unterschieden in der Frequenz oder Zusammensetzung bestimmter antigenspezifischer T-Zellsubpopulationen vor, während oder nach einer Therapie analysiert werden.

Der genaue Pathomechanismus der Entstehung des PV mit den beteiligten immunologischen Mechanismen ist bis heute noch überwiegend ungeklärt und aktuell Gegenstand vieler Forschungsbemühungen. In den letzten Jahren mehrten sich Hinweise, dass die T-/B-Zell-Interaktion über den Signalweg CD40-CD154 an der Entstehung vieler Autoimmunerkrankungen beteiligt ist (Berner et al. 2000; Desai-Mehta et al. 1996; Karnell et al. 2019b; Peters et al. 2009). Auch bei PV sind bereits Studien bezüglich einer möglichen Schlüsselfunktion des CD40-CD154-Signalweges durchgeführt worden (Aoki-Ota et al. 2006; Caproni et al. 2007a; Eming et al. 2014; Nishifuji et al. 2000). Ein Ziel dieser Arbeit war es, die beteiligten immunologischen Mechanismen mit Hinblick auf autoantigenspezifische T-Zellen und deren Subpopulationen anhand von Zytokinen näher zu untersuchen. Die Ergebnisse zeigen ein signifikant gesteigertes Vorkommen von antigenspezifisch aktivierten  $CD4^+ CD154^+$  T-Zellen in PBMC von PV-Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen (Abb. 13). Die Frequenzen der  $CD4^+$  T-Zellen unterschieden sich dagegen zwischen PV-Patienten und Kontrollen nicht. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit den Ergebnissen von Caproni und Kollegen, die eine Hochregulation von löslichem CD154 im Serum und  $CD154^+$  Lymphozyten in läsionaler Haut von Patienten mit aktivem PV beobachten konnten (Caproni et al. 2007a). Eine weiterführende Analyse von antigenspezifisch aktivierten  $CD4^+ CD154^+$  T-Zellen in PBMC von PV-Patienten in unserer Forschungsgruppe bestätigte die signifikant gesteigerte CD154-Expression gegenüber den gesunden Kontrollen (Polakova et al. 2022). Eine Erklärung für die vermehrte CD154-Oberflächenexpression nach Aktivierung von  $CD4^+$  T-Zellen mit Dsg3 bei PV-Patienten, könnte die wichtige Rolle von aktivierten autoreaktiven  $CD4^+$  T-Zellen in der Pathogenese des PV sein. Dieses Ergebnis bekräftigt die Ansicht mehrerer Studien, dass durch antigenspezifisch aktivierte  $CD4^+ CD154^+$  T-Zellen eine Interaktion der T- mit der B-Zelle über den CD40-CD154-Signalweg zur Produktion von IgG-Autoantikörper gegen humane Dsg3-Ektodomäne und zur Proliferation von Dsg3-reaktiven B-Zellen führen kann (Aoki-Ota et al. 2006; Eming et al. 2014). Durch die Induktion pathogener Anti-Dsg3-IgG-Antikörper kann anschließend direkt der Adhäsionsverlust epidermaler Keratinozyten initiiert werden (Nishifuji et al. 2000). Eine mögliche Erklärung für die höhere

Anzahl an Dsg3-spezifischen CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T-Zellen in PBMC bei PV-Patienten gegenüber den gesunden Kontrollen könnte eine Rückkopplungsschleife zwischen T- und B-Zellen sein. Diese konnte bereits bei PV beobachtet werden (Eming et al. 2008). Die Dsg3-reaktiven B-Zellen können die autoreaktiven T-Zellen aktivieren, sodass die Dsg3-reaktiven B-Zellen im Gegenzug über den CD40-CD154-Signalweg zur erneuten Autoantikörperproduktion und Proliferation angeregt werden. Somit entsteht vermutlich ein „Teufelskreis“, der zur Potenzierung der autoreaktiven Prozesse führt. Derartige positive Rückkopplungsmechanismen zwischen T- und B-Zellen, die zur Initiierung und Amplifikation der Autoimmunantwort führen, wurde bereits bei anderen Autoimmunerkrankungen beobachtet (Buhlmann und Noelle 1996; Cheng und Schoenberger 2002; Clark et al. 1996; Shlomchik et al. 2001) und in verschiedenen Mausmodellen nachgewiesen (Durie et al. 1993; Gerritse et al. 1996; Mohan et al. 1995). Dies könnte eine Teilerklärung für die bisher noch nicht hinreichend bekannte und erforschte pathogenetische Relevanz der autoantigen-spezifischen CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T-Zellen bei PV darstellen.

Unter möglichen zukünftigen Therapieansätzen wird in der Literatur auch die Blockade der CD40-CD154-Interaktion diskutiert. Neben der Annahme, dass diese Wechselwirkung eine wesentliche Rolle bei der hemmenden Wirkung von dem CD20-Antikörper Rituximab auf die Kostimulation autoreaktiver B- und T-Zellen durch B-Depletion spielt (Cooper und Arnold 2010; Eming et al. 2008), zeigte die therapeutische Ausrichtung auf CD154 in einem aktiven Maus-PV-Modell Wirksamkeit. So lieferten Aoki-Ota et al. den Nachweis, dass die CD40-CD154-Interaktion für die Aktivierung und Expansion von Dsg3-spezifischen B-Zellen im Splenozytentransfermodell des PV bedeutsam ist (Aoki-Ota et al. 2006). Die frühe Verabreichung von monoklonalen Anti-CD154-Antikörpern konnte die Produktion von pathogenen Anti-Dsg-3-Antikörpern im Mausmodell des PV hemmen. Allerdings zeigte die Anti-CD154-Behandlung nur noch marginale Auswirkungen, wenn bereits eine stabile Produktion von pathogenen Antikörpern erreicht war. In der Studie von Eming et al. mit HLA-DRβ1\*0402-transgenen Mäusen, die mit einem monoklonalen Anti-CD154-Antikörper behandelt, konnte die Produktion von Anti-Dsg3-IgG-Antikörpern dadurch vollständig gehemmt werden (Eming et al. 2014). Diese Befunde legen nahe, dass die CD40-CD154-Bindung bei PV entscheidend für die frühen immunologischen Interaktionen, die der Antikörpersynthese vorausgehen, z. B. T-Zell-Priming durch antigenpräsentierende Zellen und B-Zell-Aktivierung durch T<sub>H</sub>-Zellen ist. Unklar bleibt, ob die Behandlung bei PV-Patienten in Remission wirksam wäre, um ein zukünftiges Rezidiv zu verhindern oder zu Beginn der Erkrankung therapeutisch

eingesetzt werden könnte (Eming et al. 2014; Mao und Payne 2008). Eine Behandlung mit Anti-CD154-Antikörpern, allein oder in Kombination mit einer Blockade von B7-Molekülen (Buhlmann und Noelle 1996; Griggs et al. 1996), konnte bereits im Rahmen von Tiermodellen die Entwicklung von PV blockieren. Die Umsetzung in die Anwendung beim Menschen ist noch ein unerreichtes Ziel. Menschliche Anti-CD154-Antikörper wurden in einer klinischen Phase-I-Studie mit schweren thromboembolischen Komplikationen in Verbindung gebracht (Kawai et al. 2000). Allerdings zeigen sich vielversprechende Fortschritte in der Entwicklung (Karnell et al. 2019a).

Der in dieser Arbeit verwendete Versuchsansatz zur Analyse der Dsg3-reaktiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen ermöglicht die Beurteilung der CD4<sup>+</sup> Population anhand der de novo CD154-Expression. Diese Analyse weist insofern Limitationen auf, da nicht sicher ausgeschlossen werden kann, dass Untergruppen von CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch antigenspezifische Stimulanzen die Fähigkeit der CD154-Expression modulieren oder herunterregulieren können. Solche Phänomene sind bisher aber noch nicht beschrieben worden. Der Einfluss auf den Oberflächenmarker CD4 ist zum heutigen Stand ebenfalls nicht vollständig geklärt. Da CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD154<sup>+</sup> Zellen detektiert werden konnten, kann die Vermutung aufgestellt werden, dass ein Großteil der CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD154<sup>+</sup> Zellen tatsächlich CD4<sup>+</sup> T-Zellen sind, deren Oberflächenantigen internalisiert wurde. Diese Vermutung basiert auf vorherigen Studien, die einen Rückgang des TCR mit seinen Korezeptoren wie CD4 nach Stimulation gesehen haben (Cossarizza et al. 2019; Liu et al. 2000; Petersen et al. 1992). Nach Stimulation mit PHA ist der Effekt der zunehmenden Anzahl CD4<sup>-</sup>CD154<sup>+</sup> T-Zellen in dieser Arbeit besonders stark. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die das Phänomen der überwiegend CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup> Zellen nach Stimulation festgestellt haben (Eming et al. 2014; Yang et al. 2018). Auch weitere Faktoren, wie das hier verwendete Brefeldin A, haben in einer Studie bereits gezeigt, dass sie zu einer Herunterregulierung des CD4-Oberflächenantigens führen können (O'Neil-Andersen und Lawrence 2002). Eine Möglichkeit das internalisierte Oberflächenantigen CD4 zukünftig durchflusszytometrisch sicher zu detektieren, wäre eine intrazelluläre Färbung nach der Fixation und Permeabilisierung zusammen mit den Zytokinen. Eine weitere Vorgehensweise wäre die Verwendung des Transmembranproteins CD3, welches auf allen T-Lymphozyten exprimiert wird. Mit der Annahme alle CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> Zellen nach der Stimulation sind CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>-Zellen, die ihr Oberflächenantigen herunterreguliert haben, könnten auf diese Weise die CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>-Zellen in ihrer Gesamtheit betrachtet werden (Chattopadhyay et al. 2006; Rostaing et al. 1999). Dies wäre

auch bezüglich doppelt negativer ( $CD4^-CD8^-CD3^+$ ) T-Zellen interessant, die nach chronischer Stimulation entstehen und bei einer Immunhyperaktivierung im Rahmen von Autoimmunerkrankungen wie dem SLE oder Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome vermehrt vorhanden sein können (Grishkan et al. 2013; Lim et al. 1998). In dieser Arbeit konnten bei den frisch isolierten PBMC eine große Anzahl unspezifisch aktivierten antigenspezifischen  $CD4^+$  T-Zellen detektiert werden (Abb. 11). Dies ist wahrscheinlich auf das Präparationsverfahren zurückzuführen (Frentsch et al. 2005). Deshalb sind zur Berechnung der prozentualen Veränderung der CD154-Expression innerhalb der  $CD4^+$  T-Zellen für die ganze Arbeit die Werte der US von den stimulierten Proben abgezogen und negative Werte werden als „null“ betrachtet.

Nach der Rekrutierung von 16 PV-Patienten, wurden die Ergebnisse analysiert, da es sich um eine seltene Erkrankung handelt und für die Erfassung eines relevanten Unterschieds die Anzahl nach den Erfahrungen von anderen Autoren für eine Bewertung ausreicht. Diese Aussage stützt sich auf die Ergebnisse zweier Studien mit Fallzahlen in der gleichen Größenordnung (Frentsch et al. 2005; Smith et al. 2013a). Bei dieser geringen Stichprobengröße sind normalverteilten Daten allerdings nicht gewährleistet und die Erkenntnisse müssen in einer größeren Kohorte untersucht werden. So zeigt sich in dieser Arbeit ein Verhältnis Männern zu Frauen von 1:3, während in der Bevölkerung Männer und Frauen gleichermaßen betroffen sind. Die Altersverteilung der Probanden (41-81 Jahre, Tab. S 2) ähnelt jedoch dem Manifestationsalter von PV in normalverteilten Untersuchungen (Amagai et al. 1999; Nousari und Anhalt 1999). Ein weiterer zu diskutierender Punkt dieser Arbeit stellt der Altersunterschied der gesunden Kontrollen (22-47 Jahre, Tab. S 3) und der PV-Patienten (41-81 Jahre, Tab. S 2) dar. Eine Rekrutierung älterer gesunden Menschen als Kontrolle, gestaltete sich aufgrund der zunehmenden Anzahl diverser Erkrankungen und Medikamente als mögliche Einflussfaktoren als schwierig. Des Weiteren beeinflussen physische, psychische und soziale Veränderungen die Bereitschaft zur Teilnahme an Studien, welche im Alter kontinuierlich abnimmt (Motel-Klingebiel et al. 2019). Zudem wurde nur eine Kontrollgruppe für beide zu untersuchenden Erkrankungen PV und Birkenpollenallergie mit jeweils unterschiedlichen Altersverteilungen (BPA 20-67 Jahre, Tab. S 4) als Referenz rekrutiert. Diese vielen Faktoren könnten zudem die große Spannbreite antigenspezifischer Reaktionen innerhalb des PV-Patientenkollektivs erklären. Zukünftig sollte ein homogenes Probandenkollektiv mit vergleichbarer Kontrollgruppe angestrebt werden.

### **5.2.1 CD154-Expression der CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei PV**

Neben der entscheidenden Rolle autoreaktiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei der Pathogenese des PV (Hertl et al. 1998b; Wucherpfennig et al. 1995) wird auch die Funktion der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antworten im Krankheitsgeschehen diskutiert (Giurdanella et al. 2013; Hertl und Veldman 2003; Lin et al. 1997; Rizzo et al. 2005; Takahashi et al. 2007). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass nach antigenspezifischer Aktivierung der Oberflächenmarker CD154 auf den CD4<sup>+</sup> T-Zellen mehrheitlich exprimiert wird, wobei dieser auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen nicht über das Hintergrundrauschen hinweg detektiert werden konnte. Dieser Unterschied war sowohl nach spezifischer als auch unspezifischer Stimulation signifikant. Diese Beobachtung spricht dafür, dass die CD8<sup>+</sup> T-Zellen keine relevante CD154-Expression aufweisen, die zur Pathogenese des PV beitragen könnte. Frentsch et al. zeigten, dass jede vierte menschliche Gedächtniszelle CD154<sup>+</sup> exprimiert. Der Phänotyp, die immunogenetische Restriktion, das Zytokinprofil und die Epitopspezifität dieser autoreaktiven T-Zell-Antworten variierten jedoch. Diese CD8<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T-Zellen ähneln funktionell den CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>-Zellen (Frentsch et al. 2013). Eine weitere Studie konnte zeigen, dass eine Dysregulation mit pathologischer Erhöhung der CD8<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> Zellen zu einem Ausfall der B-Zell-Toleranz und einer Autoantikörperproduktion führen kann (Chen et al. 2019). Viele Studien zu anderen Autoimmunerkrankungen haben bereits in vitro (Sad et al. 1997; Xydia et al. 2011) und in vivo (Hernandez et al. 2008) gezeigt, dass CD8<sup>+</sup> in der Lage sind Helferfunktionen auszuüben und eine neue wesentliche CD154-Quelle darstellen. Dies konnte am vorliegenden Patientenkollektiv anhand der CD154-Methode bei PV nicht beobachtet werden.

### **5.2.2 Auswirkung des Krankheitsstatus auf die CD154-Expression der CD4<sup>+</sup> T-Zellen**

Bezüglich der klinischen Status können unsere Ergebnisse eine erhöhte antigenspezifische CD154-Expression der CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei PV-Patienten mit PR im Vergleich zu den gesunden c feststellen. Dieser Unterschied ist über alle PV-spezifischen Stimulationsantigene (Dsg3, P1, P2, P3, P4, P1-4) hinweg signifikant (Abb. 18). Die antigenspezifische CD154-Expression der CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei PV-Patienten in KR ist jeweils deutlich geringer im Vergleich zu den PR. Dies könnten Hinweise sein, dass es einen Zusammenhang zwischen den Dsg3-spezifischen CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T-Zellen und der klinischen Krankheitsaktivität geben könnte. Darüber hinaus könnte sich ableiten, dass aktivierte antigenspezifische B-Zellen ihre Produktion pathogener Autoantikörper in einer T-Zell und von kostimulatorischen Signalen abhängigen Weise aufrechterhalten müssen. Bei einigen Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis

oder SLE korreliert die erhöhte Expression von CD154 auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit dem Schweregrad der Erkrankung (Berner et al. 2000; Tesch et al. 2020). Einen Zusammenhang zwischen den Dsg3-spezifischen CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T-Zellen und der Dsg3-Antikörper im Serum der PV-Patienten konnte in dieser Arbeit allerdings nicht festgestellt werden. Eine Erklärung könnte die geringe Anzahl von PV-Patienten insbesondere im aktiven Status sein. So konnte eine fortführende Studie in unserer Forschungsgruppe mit einer größeren Anzahl von PV-Patienten eine Korrelation zwischen den Dsg3-spezifischen CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T-Zellen und der Dsg3-Antikörper im Serum der PV-Patienten feststellen (Polakova et al. 2022). Bei PV wird angenommen, dass der Dsg-spezifische Autoantikörpertiter mit der Krankheitsaktivität bei Pemphigus korreliert (Amagai et al. 1999; Daneshpazhooh et al. 2007; Schmidt et al. 2010). Die Beobachtungen der fortführenden Studie in unserer Forschungsgruppe geben daher zu der Vermutung Anlass, dass auch bei PV die erhöhte Expression von CD154 auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit dem Schweregrad der Erkrankung zusammenhängen könnte. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen Zweifel an dem alleinigen Parameter der CD154 auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen zur Beurteilung der Krankheitsaktivität aufkommen, da keine Korrelation Dsg3-spezifischer CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T-Zellen mit Anti-Dsg3-Autoantikörper festgestellt werden konnte. Zudem sehen viele neuere Studien den Anti-Dsg3-IgG-Antikörper als alleinigen Parameter zur Beurteilung der Krankheitsaktivität skeptisch und betrachten dafür eine Kombination aus diversen Kriterien, wie z.B klinische Scores (autoimmune bullous skin disorder intensity score; ABSIS) und Prednisolonäquivalent, als geeigneter (Belloni-Fortina et al. 2009; Chernyavsky et al. 2019). Zur abschließenden Klärung dieser Frage sind weitere Untersuchungen einzelner Patienten bezüglich der CD154-Expressin auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen über einen längeren Zeitraum mit zusätzlicher Erfassung möglicher Einflussfaktoren und ein Ausschluss multimorbider Patienten nötig. Insbesondere der Aspekt der Beurteilung des Schweregrades durch die Anzahl antigenspezifisch aktivierter CD4<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> T-Zellen mit einer potenziellen Überwachung der Krankheitsaktivität sollte zukünftig geklärt werden. Die Untersuchung der antigenspezifischen T-Zell-Antwort könnte zukünftig einen Einblick in die Art der vollständigen Immunantwort von Patienten geben und auf diese Weise den Erfolg von bestimmten Immuntherapien vorhersagen. So könnten die Patienten identifiziert werden, die am ehesten von einer Behandlung profitieren könnten. Ein möglicher Therapieerfolg könnte durch das Auftreten von Unterschieden vor, während oder nach einer Therapie analysiert werden. Dieses Vorgehen konnte schon bei der Therapieumstellung zur Behandlung von MS durch die Überwachung der T-Zell-spezifischen Immunreaktion erfolgreich genutzt werden (Grau-López et al. 2011). In der oben genannten Studie wurde nach Isolierung von frischen PBMC eine Stimulation mit einem

Mix aus mehreren MS-spezifischen, immundominanten Peptiden durchgeführt und die antigenspezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen mittels der <sup>3</sup>H-Thymidin-Inkorporation analysiert. Die longitudinale Analyse der antigenspezifischen T-Zellen zeigte, dass diese mit der Krankheitsaktivität, der Remissions- und der Rezidivrate korrelieren und besonders bei Patienten mit einer hohen Rezidivrate als Strategie zur Überwachung der Therapie fungieren kann. Gezielte Zell- bzw. Immuntherapien könnten so zukünftig im Rahmen der personalisierten Medizin idealerweise nicht nur bei MS-Patienten mit einer abnormen ex vivo T-Zell-Reaktion auf spezifische Antigene, sondern auch bei anderen Patienten mit Autoimmunerkrankungen wie PV, angewendet werden.

### **5.2.3 Modulierende exogene Faktoren auf die CD154-Expression der CD4<sup>+</sup> T-Zellen**

Eine Einschränkung in der Interpretation der Ergebnisse besteht darin, dass neun von elf PV-Patienten systemische Glukokortikoide und immunsuppressive Adjuvantien erhielten (Tab. S 2). Es ist bekannt, dass Kortikosteroide wie Prednisolon unterschiedliche Wirkungen auf verschiedene Komponenten des Immunsystems ausüben können (Franchimont 2004). Die Auswirkungen von immunsuppressiven Medikamenten, wie Kortikosteroiden, auf die CD154-Biosynthese werden in der Literatur kontrovers diskutiert. Jabara et al. beobachteten eine Induktion der CD154-Transkription und Oberflächenexpression in PBMC und aufgereinigten T-Zellen (Jabara et al. 2001), während andere eine reversibel gehemmte CD154-Antwort in Dexamethason exponierten CD4<sup>+</sup>Zellen fanden (Bischof und Melms 1998). In den Ergebnissen dieser Arbeit konnte keine Veränderung der CD154<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Stratifizierung hinsichtlich der Einnahme von Kortikosteroiden gesehen werden. Diese Beobachtung kann bei der Vielzahl an möglichen modulierenden exogenen Faktoren und verschiedenen Therapieschemata nicht objektiv geklärt werden. Bemerkenswert ist, dass bei einem PV-Patient mit Rezidiv und unter Rituximabgabe keine PV-antigenspezifischen CD154<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen detektiert werden konnten. Diese Beobachtung stützt die Annahme, dass die medikamentöse B-Zell-Depletion und damit verbundene Reduzierung der Anti-Dsg1/3-IgG Antikörper (Eming et al. 2008) zu einer verminderten Anzahl autoreaktiver CD154<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen führt. Weitere Studien unterstützen die Hypothese, dass die Wechselwirkung zwischen CD40-CD154 bei der hemmenden Wirkung von Rituximab eine wesentliche Rolle zu spielen scheint (Cooper und Arnold 2010; Mao und Payne 2008). Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe, die über bis zu einem Jahr anhaltende abnehmende T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Funktionen nach Rituximab berichteten (Didona et al. 2019; Eming et al. 2014). Ähnliche Ergebnisse

wurden in einer Studie von Leshem et al. gefunden, die bestätigte, dass Rituximab die autoreaktive und nicht die globale T-Zell-Funktion bei Pemphigus beeinträchtigt (Leshem et al. 2014). Der in dieser Studie verwendete Versuchsansatz zur Frequenzanalyse der Dsg3-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen weist insofern eine Limitation auf, dass durch die Rituximab-induzierte B-Zell-Depletion und die damit verbundene Eliminierung eines APC-Typs in einer fehlenden ex vivo-Stimulation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen resultieren könnte. Dies könnte jedoch die in vivo-Situation widerspiegeln, in der es analog zu einer ausbleibenden Dsg3-spezifischen Aktivierung und somit fehlender CD154-Expression der CD4<sup>+</sup> T-Zellen käme. Weitere Untersuchungen bezüglich des Einflusses der Medikamente auf die CD154-Expression müssten in zukünftigen Studien folgen, um eine Verzerrung durch das Therapieschema detektieren zu können.

#### **5.2.4 Effekte der T-Zellaktivierung auf die Effektorfunktion**

Viele in vitro- und in vivo-Untersuchungen unterstützen die Hypothese, dass Dsg3-reaktive CD4<sup>+</sup> T-Zellen entscheidend für die Initiierung und Aufrechterhaltung der beim PV pathogenetisch bedeutsamen Autoantikörperproduktion sind (Aoki-Ota et al. 2006; Eming et al. 2014; Lin et al. 1997; Pan et al. 2015). Dabei spielen die T<sub>H</sub>-Zellen eine wichtige modulierende Funktion bei der Aktivierung autoreaktiver Gedächtnis-B-Zellen (Giordano und Sinha 2012; Nishifuji et al. 2000). Die in diesem Zusammenhang für die Aktivierung der autoreaktiven B-Zellen essenziellen Signale der T<sub>H</sub>-Zellen werden durch die Ausschüttung von Zytokinen und kostimulatorische Moleküle vermittelt (Das et al. 2019). Die bei der Pathogenese des PV beteiligten Zytokine, welche sich vereinfacht in anti-inflammatorische (immunregulativ) und pro-inflammatorische (immunaktivierende) Zytokine einteilen lassen, wurden durch in vitro-, in vivo- sowie serologische Untersuchungen bereits analysiert (Kowalski et al. 2019; Tavakolpour et al. 2020). Trotz jüngster Fortschritte ist die Charakterisierung des krankheitsunterstützenden Zytokinnetzwerks bei PV noch nicht vollständig geklärt.

Mehrere Studien nehmen an, dass T<sub>H</sub>2- Zytokine bedeutsam für die Pathogenese des PV sind (Hertl et al. 2006; Huang et al. 2019; Satyam et al. 2009). Es wird vermutet, dass insbesondere Dsg3-spezifische, IL-4 produzierende, d. h. T<sub>H</sub>2-Zellen für die Interaktion zwischen T- und B-Zellen beim PV von Bedeutung sind (Takahashi et al. 2008). Da die Induktion einer T<sub>H</sub>2-Immunantwort bei PV-Patienten eine bestimmende Funktion zugeschrieben wird, wurde eine Veränderung der Expression nach spezifischer Stimulation anhand des Zytokins IL-4

analysiert. Die Analyse der Zytokinexpression auf CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T-Zellen ergab im Median keinen statistisch signifikanten Unterschied des IL-4 gegenüber den Kontrollen. Die eigenen Daten stehen im Einklang mit den Ergebnissen weiterer Studien (Lee et al. 2017; Masjedi et al. 2017; Timoteo et al. 2017). Allerdings zeigt sich in einer Metaanalyse bezüglich des IL-4-Levels im Serum unterschiedliche Beobachtungen (Kowalski et al. 2019). Einige Studien zeigten eine erniedrigte Serumkonzentration (Das et al. 2019; Hertl et al. 1998a), wohingegen andere ein vermehrtes Vorliegen von IL-4 im Serum bei PV detektieren konnten (Satyam et al. 2009). Ein Grund für die ähnliche Reaktion der gesunden Kontrollen und der PV bezüglich der CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup> Population auf die Stimulation könnte am Patientenkollektiv liegen. Mehrere Studien konnten Dsg3-spezifische T<sub>H</sub>2-Zellen insbesondere bei PV-Patienten mit aktiver Erkrankung nachweisen (Amagai et al. 1999; Veldman et al. 2003). Rizzo et al. beschrieben in einer Veröffentlichung ebenfalls, dass es keinen Unterschied in der Präsenz von autoreaktiven T<sub>H</sub>2-Zellen zwischen PV-Patienten in Remission und der Kontrollgruppe gab (Rizzo et al. 2005). Dies kann eine Erklärung für die Ergebnisse bezüglich IL-4 in dieser Arbeit sein, da überwiegend PV-Patienten in Remission teilnahmen. Ein weiterer Einflussfaktor scheint die Therapie zu sein. Bei Untersuchungen von Eming et al. führte die Behandlung mit dem Anti-CD20-Antikörper Rituximab bei PV-Patienten neben einer Depletion der B-Zellen auch zu einem Rückgang der peripheren IL-4-sezernierenden Dsg3-reaktiven T<sub>H</sub>2-Zellen (Eming et al. 2014). Da T<sub>H</sub>2-assoziierte Zytokine für die Steuerung der Antikörperproduktion notwendig sind, kann die Hypothese aufgestellt werden, dass die Dsg3-spezifische T<sub>H</sub>2-Aktivität mit der aktiven Erkrankung assoziiert ist. Um die Annahme zu überprüfen, dass die von autoreaktiven T<sub>H</sub>2-Zellen produzierten Zytokine essenziell für die Entstehung von Autoantikörpern sind, könnte zukünftig das in vielen Studien signifikant erhöhte IL-10 hinsichtlich einer Koexpression mit CD154 analysiert werden (Kowalski et al. 2019).

Die Studienlage bezüglich der T<sub>H</sub>1-Zytokine, wie IFN- $\gamma$ , weist unterschiedliche Ergebnisse im Serum von PV-Patienten auf. Einige Studien beobachten eine verringerte Serumkonzentration von IFN- $\gamma$  (Lee et al. 2017; Satyam et al. 2009), andere hingegen zeigten ein vermehrtes Vorliegen des Zytokins bei PV (Das et al. 2019; Hertl et al. 1998a; Timoteo et al. 2017). Inwiefern die T<sub>H</sub>1-Antwort eine potenzielle Rolle in der Pathogenese spielt, wurde hier überprüft. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen keinen signifikanten Unterschied der CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>-Population im Vergleich zu den gesunden Kontrollen und stehen damit im Einklang mit weiteren Studien (Keskin et al. 2008; Masjedi et al. 2017). Eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse könnten Einflussfaktoren wie Krankheitsstaus, HLA-

Haplotyp und Therapie sein. So beobachteten Veldmann et al. eine Erhöhung von  $T_H1$  nur bei akutem PV (Veldman et al. 2003). Weitere Studien konnten zeigen, dass im Verlauf einer immunsuppressiven oder immunmodulatorischen Therapie ein allgemeiner Rückgang der Zytokinproduktion von  $IFN-\gamma$  und  $IL-4$  zu detektieren war (Braun et al. 1997; Keskin et al. 2008).  $T_H1$ -Zellen mit ihrer charakteristischen  $IFN-\gamma$ -Sekretion konnten auch bei gesunden Trägern PV-assoziierter HLA-Haplotypen nachgewiesen werden (Eming et al. 2014; Hertl et al. 2006). Dies könnte eine mögliche Ursache für ein vermehrtes Vorliegen von  $CD4^+CD154^+IFN-\gamma^+$  T-Zellen bei vier gesunden Kontrollen sein und sollte in zukünftigen Untersuchungen beachtet werden. Das derzeitige Verständnis der Immunpathogenese des PV legt nahe, dass die von autoreaktiven  $T_H2$ -Zellen produzierten Zytokine essenziell für die Entstehung von Autoantikörpern sind, wohingegen die  $T_H1$ -assoziierten Zytokine keinen entscheidenden Einfluss auf die Immunpathogenese des PV haben (Di Zenzo et al. 2016; Giordano und Sinha 2012). Satyam et al. sahen in der Pathogenese des PV eine Folge eines Ungleichgewichts zwischen Dsg3-reaktiven  $T_H2$ - und  $T_H1$ -Zellen, welches zu einer komplexen und schweren Beeinträchtigung der Immunfunktion beiträgt und für die Aufrechterhaltung der Toleranz gegenüber Dsg3 entscheidend sein kann (Satyam et al. 2009). Diese Beobachtungen konnte in dieser Arbeit nicht festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung stellt das Patientenkollektiv dar, welches keine aktiven PV-Patienten beinhaltete. In den oben genannten Studien konnte nur im aktiven Stadium ein signifikant erniedrigtes  $T_H1/T_H2$ -Verhältnis im Vergleich zum Remissionstadium bzw. zu gesunden Kontrollen gezeigt werden (Giordano und Sinha 2012; Zhu et al. 2012).

Neuste Studien konnten die Beteiligung weiterer Faktoren und T-Zell-Subpopulationen, wie  $T_{FH}$ - und  $T_H17$ -Zellen, welche über das bestehende  $T_H1/T_H2$  Paradigma hinausgehen, aufzeigen. Eine mögliche pathogene Rolle dieser T-Zell-Subpopulationen wurde bereits in Ansätzen beschrieben, ist bisher aber nicht hinreichend geklärt (Asothai et al. 2015; Xuekun et al. 2014; Yuan et al. 2017). Das proinflammatorische Zytokin  $IL-17A$  wird überwiegend von  $T_H17$ -Zellen sezerniert und markiert eine  $T_H17$ -Immunantwort. Inwiefern die für den PV vermutete Dominanz einer  $T_H17$ -Antwort über die Veränderung der intrazellulären Zytokinantwort bei antigenspezifisch aktivierten  $CD4^+$  T-Zellen nachweisbar ist, wurde in der vorliegenden Arbeit analysiert. Ein Anstieg der Expression von  $IL-17$  durch Dsg3-spezifische autoreaktive T-Zellen im Serum im Vergleich zur Kontrollgruppe ist bereits in mehreren Studien gezeigt worden (Hennerici et al. 2016; Timoteo et al. 2017). Auch in Hautläsionen von PV-Patienten konnte eine lokale Zunahme von  $IL-17$ -produzierenden  $T_H17$ -Zellen detektiert

werden (Arakawa et al. 2011; Giordano und Sinha 2012; Xu et al. 2013). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen einen tendenziell höheren Anteil der CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup> T-Zellen in PBMC von PV-Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen. Die eigenen Daten bekräftigen die Ergebnisse von Mortazavi und Kollegen, die ebenfalls einen erhöhten durchschnittlichen Spiegel von IL-17 vor, während und nach Therapie beobachten konnten, dieser aber nicht signifikant war (Mortazavi et al. 2014). In weiterer Fortführung dieser Arbeit durch unsere Forschungsgruppe konnte eine signifikante Erhöhung von IL-17 in CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T-Zellen bei aktiven PV-Patienten im Vergleich zur Kontrollkohorte festgestellt werden (Polakova et al. 2022). Dies stimmt mit den Ergebnissen von Holstein et al. überein, die aufzeigen konnten, dass die Häufigkeit von T<sub>H</sub>17-Zellen im peripheren Blut insbesondere in der akuten Phase und aktiv chronischen Phasen signifikant höher als bei gesunden Kontrollpersonen ist (Holstein et al. 2021). Welche Rolle die Erhöhung des IL-17 in der akuten Phase des PV spielt und ob diese dabei hilft, die Störungen zu initiieren oder als Resultat der lokalen Entzündung produziert wird, ist noch nicht hinreichend bekannt und muss in weiteren Untersuchungen analysiert werden.

Die T<sub>FH</sub> sind ebenfalls eine Untergruppe der CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>-Zellen mit intrinsischen Unterschieden zu den zuvor charakterisierten T<sub>H</sub>1-, T<sub>H</sub>2- und T<sub>H</sub>17-Zellen. Die Hauptfunktion der T<sub>FH</sub>-Zellen mit ihrem pleiotropen Zytokin IL-21 ist die Unterstützung bei der B-Zell-Aktivierung und der Antikörperproduktion während humoraler Immunantworten (Spolski und Leonard 2014). Hinweise auf die Rolle von T<sub>FH</sub>-Zellen bei PV ergibt sich aus mehreren durchgeführten Studien. So zeigt Holstein und Kollegen, dass die Häufigkeit zirkulierender T<sub>FH</sub>-Zellen (definiert als CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup> T-Zellen) und die Plasmakonzentrationen von IL-21 bei Patienten mit PV im Vergleich zur Kontrolle signifikant höher waren (Holstein et al. 2021). Zudem wurden bei der Hälfte der PV-Patienten nach ex vivo-Stimulation Dsg3-spezifische autoreaktive IL-21-sezernierende Zellen festgestellt (Hennerici et al. 2016). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen einen tendenziell höheren Anteil der CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup>IL-21<sup>+</sup> in PBMC von PV-Patienten als bei den Kontrollen. Diese Ergebnisse bekräftigen Untersuchungen unserer Forschungsgruppe, die eine signifikante Erhöhung von IL-21 in CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T-Zellen bei aktiven PV-Patienten aber nicht bei Patienten in Remission im Vergleich zur Kontrolle feststellen konnten (Polakova et al. 2022). Auch Hennerici et al. beobachteten einen höheren Gehalt an IL-21 produzierenden Dsg3-autoreaktiven T<sub>FH</sub>17-Zellen bei akutem PV (Hennerici et al. 2016). Bemerkenswert ist, dass in einer Studie nach einer effektiven Therapie mit zunehmender Besserung des klinischen Zustands die Frequenz der T<sub>FH</sub>-Zellen als auch der IL-21-Serumspiegel abnahm (Li et al. 2013).

Es könnte die Vermutung angestellt werden, dass es wie bei anderen Autoimmunerkrankungen auch beim PV eine Korrelation zwischen dem IL-21-Serumspiegel mit der Krankheitsaktivität und dem Behandlungsstatus gibt. So konnte kürzlich für andere Autoantikörper-vermittelte Erkrankungen, wie dem Sjögren-Syndrom, gezeigt werden, dass eine immunsuppressive Behandlung zu einer Reduktion der T<sub>FH</sub>-Zellen und IL-21 im Blut führte (Jin et al. 2014; Liu et al. 2014). Beobachtungen konnten zeigen, dass IL-21 nicht nur die B-Zell-abhängige Antikörperbildung induzieren (Ettinger et al. 2008), sondern auch die T<sub>H17</sub>-Reifung in naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen fördern kann (Bettelli et al. 2006). Dies stellt somit eine positive Rückkopplungsschleife dar und könnte zur multifaktoriellen Pathogenese des PV beitragen (Tavakolpour 2016). Unsere Forschungsgruppe konnte zudem eine signifikante Erhöhung der Dsg3-spezifische CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T-Zellen sowohl in T<sub>FH</sub> (definiert als CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup> T-Zellen) als auch bei T<sub>H</sub> (CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>-</sup> T-Zellen) beobachten (Polakova et al. 2022). Die gleichzeitige Expression von CD154 in CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit IL-21 und IL-17 unterstreicht somit das Konzept von CD154 als spezifischen Aktivierungsmarker bei PV. Ein kombinierte CD154- und intrazelluläre Zytokinfärbung von PBMC könnte so zur sensitiven Überwachung von Veränderungen in antigenspezifischen T-Zell-Unterklassen wie T<sub>FH</sub> und T<sub>H17</sub> verwendet werden.

Die Diskrepanz zwischen den vorliegenden Daten und den Ergebnissen anderer Forschungsgruppen scheint im Aufbau der Studienprotokolle begründet, da einerseits Querschnittsanalysen mit longitudinalen Verläufen verglichen, andererseits für die Probeentnahme Zeitpunkte mit unterschiedlicher Krankheitsaktivität bzw. unterschiedlichen Therapiestadien gewählt wurden. In diesem Zusammenhang ist die Wahl geeigneter Beobachtungszeiträume bzw. ein engmaschiges Studiendesign sowie eine Vergrößerung der Patientenpopulation essenziell, um immunologische Mechanismen in der Peripherie auf zellulärer Ebene zu detektieren. Ein weiterer wichtiger methodischer Aspekt der ursächlich für die Unterschiede sein könnte, stellt die verschiedenen Methoden zur Zytokinmessung dar. Zum einen werden die verschiedenen Zytokine durch Serumkonzentrationen bestimmt und zum anderen wie in dieser Arbeit durch intrazelluläre Zytokinproduktion nach diversen Stimulations-Schemata gemessen. Zur Unterstützung der Daten könnten zukünftig die Zytokine neben der hier durchgeführten Analyse der Zytokinmessung von CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T-Zellen in PBMC parallel im Serum der Patienten analysiert und miteinander verglichen werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Spitzenexpression von Zytokinen verschiedener Patienten zu unterschiedlichen Zeitpunkten auftreten, was dazu führen kann, dass bei einer festgelegten

Stimulationsdauer für die optimale CD154-Expression die Hauptexpression der Zytokine schon vorüber ist oder erst sein wird (Huang et al. 2003). Da das etablierte Protokoll dieser Arbeit eine lange Inkubationszeit für die optimale CD154-Expression beinhaltet, sollte zukünftig zur Evaluation der Zytokinexpression eine Balance zwischen der empfohlenen kurzen Inkubationszeit von mehreren Stunden für Zytokine und dem Optimum für CD154 gefunden werden. In einem Tiermodell konnte zudem gezeigt werden, dass CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die kürzlich IL-4 in vivo produziert haben, in ihrer Fähigkeit eingeschränkt waren Zytokine als Reaktion auf eine TCR-vermittelte Restimulation ex vivo zu produzieren. Dieser Befund könnte zum Teil die geringe Häufigkeit der Dsg3-spezifischen Zytokinproduktion bei frisch isolierten PBMC erklären, die in dieser Arbeit ex vivo nachgewiesen wurde (Mohrs et al. 2005). Die Heterogenität der Zytokinmuster könnte auch für eine antigenspezifische Immunmodulation bei PV hinweisen, die nicht nach dem vereinfachten Schema der T<sub>H</sub>1-, T<sub>H</sub>2-, T<sub>H</sub>17-, T<sub>FH</sub>-Subpopulationen klassifiziert werden kann.

### **5.2.5 Bedeutung von Dsg3 epitopspezifischen Peptidsequenzen**

Periphere CD4<sup>+</sup> T-Zell-Antworten gegen spezifische Peptide der Dsg3-Ektodomäne wurden bei PV-Patienten von mehreren unabhängigen Forschern (Hertl et al. 1998b; Lin et al. 1997; Wucherpfennig et al. 1995) identifiziert sowie deren Epitopspezifität bestimmt (Eming et al. 2014; Veldman et al. 2003; Veldman et al. 2004). Zudem konnte Eming et al. in einem humanisierten HLA-DRB1\*04:02 transgenen Mausmodell zeigen, dass T-Lymphozyten menschliche Dsg-3-Epitope im Zusammenspiel mit HLA-DRB1\*04:02 erkennen können (Eming et al. 2014). Diese Erkennung war mit einer CD40-CD154 abhängigen T-/B-Zell-Interaktion verbunden, die über die Induktion von pathogenen IgG-Autoantikörpern eine intraepidermale Blasenbildung auslösten. Dies veranlasste die Frage, ob eine Stimulation mit Peptiden, die die T-Zell-Epitope der Dsg3-spezifischen Ektodomäne darstellen, eine Induktion von CD154 in antigenspezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen bewirken kann. Entsprechend der veröffentlichten Sequenzen des Dsg3 wurden vier Peptide, welche Epitope (P1-4) innerhalb der aminoterminalen ECD von Dsg3 (ECD1 und ECD2) darstellen, verwendet. Alle hier verwendeten epitopspezifischen Peptide (P1-4) waren in der Lage antigenspezifisch CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch eine Hochregulation der CD154-Expression zu aktivieren. Beide für den PV typischen und hier untersuchten HLA-Klasse II Haplotypen (HLA DRB1\*0402- und HLA DQB1\*0503) zeigen dabei ähnliche Peptidbindungsmotive. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass besonders das Dsg3-Peptid P2 (190-204) bei PV-Patienten im Vergleich zu den

gesunden Kontrollen am effektivsten die Aktivierung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen über die Hochregulation von CD154 auf ihrer Oberfläche induzieren konnte. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant (p=0,15). Die Frequenz der antigenspezifischen CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> war nach Stimulation mit dem P2 vergleichbar zum Dsg3-Protein. Dies deutet darauf hin, dass P2 eine gesteigerte Fähigkeit besitzt CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu aktivieren und somit ein besonders immunogenes Peptid für autoreaktive T-Zellen sein könnte. Mehrere Studien stellten bereits die Hypothese auf, dass das P2 ein besonders immundominantes T-Zell Epitop des Dsg3 darstellen könnte (Tong et al. 2006; Wucherpfennig et al. 1995). Hinsichtlich dieser speziellen Peptidsequenz konnte in unserer Forschungsgruppe in einem Mausversuch gezeigt werden, dass die mit diesem Peptid immunisierten Mäuse die höchste Pathogenität der daraus resultierenden Antikörper im Vergleich zu anderen Sequenzen aufwiesen (Hudemann et al. 2022). Dies würde ebenfalls für eine gesteigerte Immunogenität dieser Sequenz sprechen. Bezüglich der von Veldmann et al. beschriebenen immundominanten Sequenz DSG (97-111, hier P1), zeigte das P1 in dieser Arbeit keine gesteigerte Fähigkeit CD4<sup>+</sup> T-Zellen über den Signalweg CD40-CD154 zu aktivieren. Die Epitope des P2 und P3 sind innerhalb der extrazellulären Domäne angrenzend und könnten so einen synergistischen Effekt auf die Bindung ausüben und somit zur Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen über den CD40-CD154 Signalweg führen. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass die CD154-Expression bei der Stimulation mit allen Peptiden in einem Peptidpool (P1-4) ihr Maximum erreichen konnte und gegenüber den gesunden Kontrollen der Unterschied signifikant war. Ein weiterer Erklärungsansatz könnte die erhöhte Konzentration aller Peptide zusammen im Peptidpool darstellen. Insgesamt wird ein besseres Ansprechen der T-Zellaktivierung über den Signalweg CD40-CD154 nach Stimulation mit Peptiden gegenüber Proteinen beschrieben (Meier et al. 2008). Daher muss bei der Interpretation der potenziellen Bedeutung der identifizierten immundominanten T-Zell-Epitope von Dsg3, die unterschiedliche Ansprechbarkeit der antigenspezifischen Aktivierung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen auf die Antigene berücksichtigt werden. Die Bedeutung des potenziell besonders immunogenen T-Zell Epitop dieser Arbeit (P2) könnte sonst möglicherweise unter- bzw. im Vergleich zum Vollprotein Dsg3 überschätzt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen zudem eine positive Korrelation der CD154-Expression der Dsg3-spezifischen T-Zellen mit den CD154<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Peptidstimulation mit P1, P2, P3 und P1-4. Dies bekräftigt die Annahme, dass diese Peptide allein oder in Kombination (P1-4) Dsg3-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen in PBMC von PV in ähnlichem Ausmaß wie das Vollprotein Dsg3 aktivieren können. Allerdings konnten die PBMC von vier PV-Patienten, die nach Stimulation mit Dsg3 antigenspezifisch CD154 auf ihren CD4<sup>+</sup> T-Zellen exprimierten,

durch keines der verwendeten Dsg3-epitopspezifischen Peptide ebenso stimuliert werden. Dies könnte mehrere Gründe haben. Zum einen könnte ein bestimmtes T-Zell-Epitop nicht vollständig in einem einzigen Peptid enthalten sein, posttranslationale Modifikationen von Dsg3 waren in den synthetischen Peptiden nicht konserviert (Veldman et al. 2004) oder eine immundominante Peptid-induzierte Anergie von antigenspezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen war der Auslöser (Diepolder et al. 1996). Auch gesunde Probanden reagieren mit einer geringen CD154-Hochregulation innerhalb der CD4<sup>+</sup> T-Zellen auf Peptide, insbesondere auf P1. Diese Beobachtung bestätigt die Vermutung von Veldmann und Kollegen, dass Kreuzreaktivitäten oder Reaktionen auf strukturhomologe Peptide als Ursache anzuführen sind (Veldman et al. 2004). Der genetische Hintergrund könnte ebenfalls eine Ursache des Anstiegs bei gesunden Kontrollen sein. Es gab keine direkte Beziehung zwischen antigenspezifischer Aktivierung der CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T-Zellen auf ein bestimmtes Epitop von Dsg3 und dem klinischen Status der PV-Patienten. Diese Beobachtung ist mit den Ergebnissen von Veldmann et al. vereinbar. Die von mehreren Studien erwähnten unterschiedlichen Bindungsspezifitäten bezüglich der Dsg3-Epitope der beiden Allele DRB1\*0402 und DQB1\*0503 (Eming et al. 2014; Tong et al. 2006; Veldman et al. 2004; Wucherpfennig et al. 1995) konnten hinsichtlich der antigenspezifischen Aktivierung von CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T-Zellen nicht beobachtet werden. Insgesamt unterstützen die Ergebnisse die Hypothese, dass autoreaktive T-Zell-Reaktionen auf Dsg3 in der Pathogenese der PV kritisch sein können. Bereits die T-Zell-Erkennung von einzelnen Epitopen des Dsg3 allein kann für die Initiierung und Aufrechterhaltung der Produktion von Dsg3-spezifischen Autoantikörpern durch B-Zellen entscheidend sein.

### **5.3 Die Rolle von CD154 bei der T-Zell-vermittelten Pathogenese der Birkenpollenallergie**

Die Birkenpollenallergie als IgE-vermittelte allergische Sofortreaktion vom Typ I ist pathophysiologisch von der Aktivierung allergenspezifischer T<sub>H</sub>-Zellen geprägt. Aktivierte T<sub>H</sub>2-Zellen spielen bei der Auslösung und Aufrechterhaltung allergischer Erkrankungen, wie der Birkenpollenallergie, eine Schlüsselrolle (Mosmann und Sad 1996; Romagnani 1994; Wambre et al. 2012). Durch ihre Zytokine tragen sie zur eosinophilen Entzündung bei, spielen eine Schlüsselrolle bei der bronchialen Hyperreaktivität und sind an der Produktion der allergietypischen IgE-Produktion durch B-Zellen beteiligt (Kay 2001; Smith et al. 2013a). Für die Aktivierung von B-Zellen und die Bildung von T-Zell-abhängigen IgE-Antikörpern, sind

nicht nur die Zytokine der T<sub>H</sub>2-Zellen, sondern auch die CD40-CD154-Interaktion relevant (Noelle et al. 1992; Poulsen und Hummelshoj 2007). Dabei scheint die Fähigkeit der B-Zell-abhängigen CD154-Produktion in T-Zellen von Allergikern um ein Vielfaches größer zu sein als bei Gesunden (Hermes et al. 1997). Diese Hypothese konnte bereits von vielen Studien bekräftigt werden (Nakstad et al. 1999; Smith et al. 2013a; Wingett und Nielson 2003). Allerdings ist die pathogenetische Relevanz der CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T-Zellen bei BPA noch nicht hinreichend bekannt und erforscht. Es wurde bereits über die Verwendung der Oberflächenexpression von CD154 zur Identifizierung von Lymphozyten, die spezifisch Allergene erkennen berichtet (Bacher und Scheffold 2013; Bonvalet et al. 2011; Campbell et al. 2010; Chattopadhyay et al. 2005; van Hemelen et al. 2011; Renand et al. 2015; Smith et al. 2013a). So konnte bei BPA nach einer kurzen ex vivo-Stimulation eine höhere Frequenz allergenspezifisch aktivierter CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu Nicht-Allergikern detektiert werden (Smith et al. 2013a). Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb eine mögliche Beteiligung des CD40-CD154 Signalwegs durch Detektion antigenspezifisch aktivierter CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei BPA während der Birkenpollensaison untersucht. Ein Ziel war es, die hierbei beteiligten immunologischen Mechanismen mit Hinblick auf antigenspezifische T-Zellen und deren T-Subpopulationen anhand von Zytokinen zu analysieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen anhand der CD154-Methode ein signifikant gesteigertes Vorkommen von antigenspezifisch aktivierten T-Zellen in PBMC von BPA während der Birkenpollensaison (Abb. 22). Die vorliegenden Daten sind mit den Ergebnissen von Smith et al. insofern vereinbar, dass sowohl in allergischen als auch nicht allergischen Probanden antigenspezifisch aktivierte CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T-Zellen nach ex vivo-Stimulation detektiert werden konnten (Smith et al. 2013a). Allerdings war der Unterschied der Studie im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit nicht signifikant. Dies könnte darin begründet sein, dass die BPA hier während der Birkenpollensaison untersucht wurden. Eine mögliche Erklärung für die vermehrte Aktivierung von BPE-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit CD154-Oberflächenexpression bei BPA-Patienten könnte dessen wichtige Rolle in der Pathogenese der manifesten Birkenpollenallergie sein. Dies steht im Einklang mit einer Studie mit Mäusen zur Blockade von CD154, die zur Verhinderung der Sensibilisierung und zur Unterdrückung der T-Zell-Reaktion führte (Linhart et al. 2007). Die Blockade verhindert zwar eine Sensibilisierung, wenn sie zum Zeitpunkt der Allergenexposition verabreicht wird, führt jedoch nicht zu einer dauerhaften Toleranz bei wiederholtem Kontakt mit dem Allergen (Gattringer et al. 2016). Dies bekräftigt die wichtige Rolle der T-/B-Zell-Interaktion über den CD40-CD154-Signalweg weit über die Sensibilisierungsphase hinaus. Allerdings zeigt eine Untersuchung, dass die alleinige

Unterdrückung der T-Zellen durch Blockierung von CD154 zur Behandlung einer etablierten IgE-Reaktion bei Allergien nicht ausreicht. Zur Regulation etablierter allergischer Immunantworten, ist eine Kombinationen mit weiteren Immunregulationen, wie z.B. Immunsuppressiva, anti-CD4-Antikörper oder die Verschiebung des  $T_H2/T_H1$ -Gleichgewichts nötig (Linhart et al. 2007). Unter einer sublingualen Immuntherapie demonstrierten unterschiedliche Forschungsarbeiten, dass nicht nur die klinische Krankheitsaktivität, sondern auch die Anzahl der  $CD4^+CD154^+$  T-Zellen abnahm (Keil 2006; Nomura et al. 2016). Mehreren Studien zufolge korreliert CD154 mit der spezifischen Immunantwort gegen Allergene (Bonvalet et al. 2011; Campbell et al. 2010). Dies könnte ein möglicher Erklärungsansatz für die erhöhte Anzahl der  $CD4^+CD154^+$  T-Zellen bei BPA während der Birkenpollensaison und damit erhöhter klinischer Krankheitsaktivität sein. In Zukunft könnte der CD154 als einfacher Oberflächen-Biomarker fungieren, der die Krankheitsaktivität anzeigt. Die große Spannweite nach unspezifischer Stimulation bei gesunden Individuen lässt sich mit einer Vielzahl spezifischer Reaktionen gegenüber Allergenen, die von nicht detektierbaren Immunantworten bis hin zur Beteiligung aktiver peripherer Toleranzmechanismen reichen, erklären (Akdis 2006). Die in einer großen Anzahl nicht-allergischer Individuen ausbleibende T-Zellaktivierung der  $CD4^+$  T-Zellen nach BPE-Stimulation ist in den fehlenden allergenspezifischer T-Zellen begründet. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten zudem, dass nach antigenspezifischer Aktivierung der Oberflächenmarker CD154 auf den  $CD4^+$  T-Zellen mehrheitlich exprimiert wird, wobei dieser auf  $CD8^+$  T-Zellen nicht über das Hintergrundrauschen hinweg detektiert werden konnte. In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnten eine Zunahme allergenspezifisch aktivierter  $CD8^+$  T-Zellen bei Erdnussallergikern beobachtet werden (Yu et al. 2019). Dies konnte für die BPA in dieser Untersuchung nicht bestätigt werden. Diese These unterstützt auch das von Schramm et al. beobachtete konstante CD4/CD8-Verhältnis bei Allergikern in der Allergiesaison, dass sich nicht von den Kontrollen unterscheiden lassen konnte (Schramm et al. 2016).

Die Analyse der antigenspezifischen  $CD4^+CD154^+$  T-Zellen nach BPE-Stimulation von 15 BPA reichte zur Erfassung eines relevanten Unterschieds zwischen den beiden Patientenkollektiven (PV, BPA) aus und bestätigt die Erfahrungen anderer Autoren (Smith et al. 2013a). Allerdings wäre für zukünftige Untersuchungen eine höhere Anzahl an Patienten wünschenswert, um auch kleine Unterschiede statistisch erfassen zu können. Das heterogene Probandenkollektiv ermöglichte mögliche Einflussfaktoren wie Geschlecht, Alter und Therapie benennen zu können. Dies könnte die große Spannweite antigenspezifischer Reaktionen

innerhalb des BPA-Patientenkollektivs erklären. Eine Limitation der Auswahl der BPA in dieser Arbeit besteht darin, dass Birkenpollenallergie mit Symptomen einer perennialen Allergie oder mit einer begleitenden Allergie auf andere saisonale Allergene mit überlappender Zeit des Symptomauftretens nicht aus der Studie ausgeschlossen wurden. Ebenso wurden Personen, die innerhalb der letzten 3 Jahre an chronischen oder entzündlichen Erkrankungen litten oder sich einer Immuntherapie unterzogen, nicht ausgeschlossen. In weiteren Untersuchungen sollte jedoch je nach Fragestellung ein homogeneres und größeres Patientenkollektiv gewählt werden, um den Einfluss dieser Faktoren validieren und Störvariablen minimieren zu können.

### **5.3.1 Effekte einer T-Zellaktivierung auf die Effektorfunktion**

Die allergische Sensibilisierung und Manifestation der Birkenpollenallergie wird auf eine dysregulierte Beziehung zwischen allergenspezifischen  $T_H1$ -,  $T_H2$ - und regulatorischen T-Zellen zurückgeführt (Akdis et al. 2004). Durch die Aktivierung der T-Zellen konnten bereits mehreren Studien bei allergischen Erkrankungen aufzeigen, dass neben dem Anstieg von CD154 sich die Zytokinexpression verändert (Renand et al. 2015; Smith et al. 2013a; Nomura et al. 2016). Die durch die Aktivierung vermehrt produzierten Zytokine tragen zur eosinophilen Entzündung bei, spielen eine Schlüsselrolle bei der bronchialen Hyperreaktivität und sind an der Produktion der allergietypischen IgE-Produktion durch B-Zellen beteiligt (Kay 2001; Smith et al. 2013a). Auf Grundlage dieser Kenntnis wurde die Synthese der Zytokine IL-4, IFN- $\gamma$ , IL-17A und IL-21 mithilfe von intrazellulärer Zytokinfärbung (ICS) und anschließender Durchflusszytometrie analysiert. Es konnten  $CD4^+CD154^+$   $T_H1$ - und  $T_H2$ - Subtypen und  $CD4^+CD154^+$  Populationen mit IL-21 und IL-17 Zytokinexpression nach ex vivo-Stimulation mit BPE bei BPA und deren Kontrollen nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurde ebenfalls eine vermehrt Zytokinexpression nach CD154-Hochregulation im Vergleich zu nicht aktivierten  $CD4^+CD154^-$  T-Zellen gesehen.

Aktivierte  $T_H2$ -Zellen spielen bei der Auslösung und Aufrechterhaltung allergischer Erkrankungen, wie der Birkenpollenallergie, eine Schlüsselrolle (Mosmann und Sad 1996; Romagnani 1994; Wambre et al. 2012). Da die Induktion einer  $T_H2$ -Immunantwort bei BPA eine zentrale Funktion zugeschrieben wird, wurde eine Veränderung der Expression nach spezifischer Stimulation anhand des Markerzytokins IL-4 analysiert. Die Analyse der Zytokinexpression auf  $CD4^+CD154^+$  T-Zellen ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede für IL-4 im Vergleich zu BPA gegenüber den Kontrollen. Allerdings war die

Spannbreite bei den BPA größer als bei den Kontrollen. Die Ergebnisse dieser Arbeit stehen somit nicht im Einklang mit der erhöhten IL-4 Sekretion der CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T-Zellen bei BPA in Untersuchungen von Smith et al. (Smith et al. 2013a). In dieser wurde eine enge Korrelation zwischen der T<sub>H</sub>2-Zell-Häufigkeit und der absoluten Konzentration von Bet v 1-spezifischem IgE innerhalb der BPA beobachtet. Die in dieser Arbeit detektierte niedrige IL-4 Zytokinexpression könnte somit auf niedrigen Bet v 1-spezifischen IgE-Werten der BPA beruhen. Die renzi1-spezifischen IgE-Werte wurden bei dieser Arbeit nicht systematisch bei allen BPA zum Zeitpunkt der Blutentnahme erfasst, sodass keine valide Aussage hierzu getroffen werden kann. In diesem Kontext wurde in einer Studie nachgewiesen, dass sich die Anzahl der Bet v1-spezifischen T-Zellen innerhalb saisonaler Allergenexposition von 10<sup>-6</sup> auf 10<sup>-3</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen erhöhen kann (van Overtvelt et al. 2008).

Die wichtige Rolle der CD40-CD154-Interaktion und ihrer Zytokinproduktion in der Pathogenese der Allergie unterstreicht eine weitere Studie, welche durch Hemmung der CD40-Expression mithilfe kleiner interferierender RNA in Ovalbumin-sensibilisierten Mäusen eine verminderte Produktion von T<sub>H</sub>2-Zytokinen beobachten konnte (Suzuki et al. 2009). Ein Grund für die geringe Frequenz an IL-4-produzierenden Zellen im peripheren Blut, könnte eine kontinuierliche Migration von aktivierten T<sub>H</sub>2-Zellen in Gewebe der primären Allergenexposition sein (Gerblich et al. 1991). Weiterhin wurde eine Abnahme der aktivierten T<sub>H</sub>2-Zellen bei zu hoher Allergengabe (10 µl und 15µl BPE) festgestellt. Grund dafür könnte eine zu hohe Allergenkonzentration sein, die zu einem aktivierungsinduzierten Zelltod (AICD) (Arakaki et al. 2014; Kamradt und Mitchison 2001) oder toxischen Effekte führen kann. Es ist denkbar, dass durch einen gewissen Grad an Allergenprästimulation die bereits aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch erneute ex vivo-Antigenstimulation in den Zustand eines AICD übergehen (Snow et al. 2010). Die primäre Antigenpräsentation induziert die klonale Proliferation von T-Zellen, die IL-2-Produktion und den Erwerb von Effektorfunktionen. Eine TCR-Restimulation bei sekundärer Begegnung mit einem Antigen (Antigenrestimulation) kann bei Vorhandensein von IL-2 ein "Restimulations-induzierter Zelltod" (RICD) bewirken, wodurch die T-Zell-Expansion begrenzt wird (Snow et al. 2010). Zudem kann die TCR-Reaktivierung einer aktivierte T-Zelle auch durch den Überfluss an Zytokinen wie IL-2 und IL-4 eine autoregulatorische Form der Apoptose auslösen (Zheng et al. 1998). Dies könnte eine Erklärung für die ähnlichen Zytokinprofile der CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T-Zellen von BPA und den Kontrollen sein und zukünftig durch eine longitudinale Studie inner- und außerhalb der Birkenpollensaison überprüft werden.

Die Ausbildung IgE-vermittelter Allergien ist mit einem immunologischen Gleichgewicht der allergenspezifischen Subpopulationen  $T_H1$  und  $T_H2$  vergesellschaftet (Maggi 1998). Eine zentrale Rolle bei der Unterscheidung zwischen allergischen und gesunden Teilnehmern nimmt das  $T_H2/T_H1$ -Verhältnis ein, welches laut Studien bei Allergikern durch den großen Anteil an aktivierten  $T_H2$ -Zellen und der geringen  $T_H1$ -Reaktion geprägt ist (Akdis et al. 2004; Smith et al. 2013a). Ein verändertes  $T_H2/T_H1$ -Verhältnis aktivierter  $CD4^+$  Zellen konnte durch unabhängige Studien bei BPA bereits nachgewiesen werden (Bacher et al. 2016; Wambre et al. 2012). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen dahingegen kein Unterschied des  $T_H2/T_H1$ -Verhältnis bei antigenspezifisch aktivierten  $CD4^+$  T-Zellen zwischen den BPA und der gesunden Kontrollen. Eine mögliche Erklärung beruht auf der Annahme, dass die Veränderungen im Verhältnis von  $T_H2$ - zu  $T_H1$ -Zellen einerseits auf eine Zunahme von IL-4-produzierenden  $T_H2$ -Zellen zurückzuführen sind (Lagier et al. 1995) andererseits eine Stagnation oder Abnahme der IFN- $\gamma$ -sezernierenden  $T_H1$ -Zellen nach Allergenexposition festgestellt werden kann (Leonard et al. 1997; Renzi et al. 1999). Die Beobachtung bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit insofern, dass kein Unterschied zwischen den  $CD4^+CD154^+$  IFN- $\gamma^+$  T-Zellen bei BPA und Kontrollen gezeigt werden konnte. Die Diskrepanz der Ergebnisse bezüglich des  $T_H2/T_H1$ -Verhältnis scheint in der verminderten IL-4-Produktion der  $CD4^+CD154^+$  T-Zellen begründet zu sein. In diesem Zusammenhang zeigte sich, dass während das Verhältnis bei gesunden Probanden über das ganze Jahr auf einem Level pendelt, ein Anstieg innerhalb der Birkenpollensaison und ein Abfall außerhalb der Saison beobachtet werden kann (Smith et al. 2013a). Ein weiterer wichtiger Aspekt hinsichtlich eines Einflusses auf die Zytokinproduktion scheint die Therapie zu sein. So zeigt eine Studie sechs Monate nach Beginn der AIT bei Pollenallergikern eine Reduktion der  $CD154^+CD4^+$  T-Zellen und eine Verschiebung des Zytokinprofils hin zu einer reduzierten IL-4-Produktion mit Erhöhung der IFN $\gamma$ -produzierenden  $CD4^+$  Zellen (Urrea et al. 2014). Eine Abnahme des allergenspezifischen  $T_H2/T_H1$ -Verhältnisses konnte mit klinischer Verbesserung unter AIT auch bei Möbs et al. beobachtet werden (Möbs et al. 2010). Ein Einfluss auf die Zytokinexpression durch das Einnehmen von immunmodulierenden Medikamenten, wie Steroide und Antihistaminika während der Birkenpollensaison, ist nicht auszuschließen (Schmidt et al. 1994). So müsste beispielsweise zukünftig der Einfluss von Antihistaminika während der Saison mitbeachtet werden, da Histamin eine wichtige Rolle in der Pathogenese des atopischen Asthmas durch differenzielle Regulation der  $T_H$ -Lymphozyten spielt und somit die Sekretion von  $T_H1$ - und  $T_H2$ - Zytokinen steuert (Jutel et al. 2001; Packard und Khan 2003). Jeder dritte Proband der BPA in dieser Arbeit nahm während der Saison einen H1-Rezeptorblocker der zweiten

Generation ein. Studien mit dem Medikament Cetirizin zeigten durch die Einnahme eine Verschiebung des menschlichen  $T_H2/T_H1$ -Verhältnisses hin zu einer  $T_H1$ -Typ-Reaktion, indem es die IFN- $\gamma$ -Produktion erhöhte und die Freisetzung von Zytokinen, wie IL-10, verstärkte. Die IL-4-Freisetzung änderte sich dabei nicht oder nahm infolge der IL-10-vermittelten herunterregulierenden Wirkung signifikant ab (Farrokhi et al. 2010; Testa et al. 2001). Dies könnte ein weiterer Grund der nicht den Erwartungen entsprechenden Ergebnisse darstellen. Jedoch gibt es auch eine neuere Studie, die nur mäßigen Einfluss der Antihistaminikaeinnahme während der Pollensaison bei allergischer Rhinitis (AR) feststellen konnte (Schramm et al. 2016). Zusammenfassend gibt es Hinweise darauf, dass der klinische Krankheitsstatus und die Therapie eine bedeutende Auswirkung auf die  $CD4^+CD154^+$  T-Zellen und ihr Zytokinprofil haben.

Aktuell zeigt sich, dass das  $T_H2/T_H1$ -Modell nicht ausreichend zur Erklärung der komplexen immunologischen Zusammenhänge ist und weitere immunpathologische Vorgänge erforscht werden müssen. Weitere T-Zell-Subpopulationen, die eine Rolle spielen könnten, sind IL-17-produzierende  $T_H17$ -Zellen. Das proinflammatorische Zytokin hat eine wichtige Aufgabe bei allergischen Reaktionen, da es die Freisetzung von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (G-CSF) sowie die Zytokine IL-6 und IL-21 als positive Rückkopplungsschleife induziert (Jordakieva und Jensen-Jarolim 2018; Wang und Liu 2008). Erhöhte Konzentrationen von IL-17 wurden in der Lunge und im Blut von Patienten mit allergischem Asthma festgestellt und mit dem Schweregrad in Verbindung gebracht (Hashimoto et al. 2005; Lindén und Adachi 2002; Oboki et al. 2008). Auf Ebene der  $T_H17$ -Zellen konnte eine gesteigerte Anzahl allergenspezifischer  $CD4^+CD154^+$  IL-17 $^+$  T-Zellen gegenüber den anderen gemessenen Subpopulationen detektiert werden. Der Unterschied gegenüber den Kontrollen war jedoch nicht signifikant. Bei BPA wurden ähnlich den vorliegenden Ergebnissen ein Anstieg von IL-17 detektiert (Ciprandi et al. 2008). Dieser IL-17-Anstieg war nicht nur gegenüber den gesunden Kontrollen signifikant, sondern zeigte eine Korrelation zu hohen spezifischen IgE-Spiegeln im Serum, klinischen Symptomen und der Einnahme von Medikamenten. Eine Erklärung für die abweichenden Daten dieser Arbeit ist zum einen der unterschiedliche Beobachtungszeitraum und die Zusammensetzung der Patientenpopulationen. So konnte Tsvetkova-Vicheva et al. feststellen, dass der Prozentsatz der IL-17A-produzierenden  $CD4^+$  T-Zellen vom Geschlecht des Patienten abhängt (Tsvetkova-Vicheva et al. 2014). Da das männliche Geschlecht in dieser Studie mit einer höheren IL-17-Produktion einhergeht und in dieser Arbeit nur zwei von neun Probanden männlich sind,

könnte dies eine mögliche Ursache darstellen. Da IL-17 im Serum als Biomarker für die Schwere einer Birkenpollenallergie diskutiert wird (Ciprandi et al. 2009; Hofmann et al. 2021) könnte auch eine überwiegend milde Krankheitsaktivität in der Patientenpopulation ursächlich sein. Eine erhöhte IL-17A-Spiegel im Serum wurden ebenfalls bei Patienten mit AR im Vergleich zu den Kontrollen beobachtet (Huang et al. 2014; Tang et al. 2014; Xuekun et al. 2014) und von einer Verringerung der zirkulierenden T<sub>H</sub>17-Zellen nach erfolgreicher AIT berichtet (Gómez et al. 2015). Weitere Studien mit IL-17-defizienten Mäusen oder durch Neutralisierung der IL-17-Aktivität zeigten, dass IL-17-produzierende Zellen und nicht T<sub>H</sub>1-Zellen die Entzündungspathologie vermitteln und zur Modulation der allergenspezifischen T<sub>H</sub>2-Zellaktivierung beitragen könnte (Gu et al. 2017; Nakada et al. 2014; Nakae et al. 2002). In einer neueren Studie wurden bei AR-Patienten während der Pollensaison allerdings keine Veränderungen der Frequenz und Funktionen der T<sub>H</sub>17 T-Zellen (Tsvetkova-Vicheva et al. 2014) oder eine Reduktion der IL-17-Expression gegenüber den Kontrollen beobachtet (Schramm et al. 2016). Ursache für die Divergenz dieser Studien kann die Polysensibilisierung der eingeschlossenen AR-Patienten sein, die gegen ganzjährige Allergene allergisch sind (Xuekun et al. 2014) oder empfindlich auf saisonale und ganzjährige Allergene reagieren (Tsvetkova-Vicheva et al. 2014). Eine Erklärung für die ebenfalls erhöhten antigenspezifisch aktivierte CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup> bei den Kontrollen könnte eine asymptomatisch Birkenpollen- oder eine Polysensibilisierung bei den gesunden Kontrollen sein.

Auch das Zytokin IL-21 scheint in der Immunpathogenese der Allergien relevant zu sein, da das überwiegend durch T<sub>FH</sub>-Zellen produzierte IL-21 die antigenspezifische IgE-Produktion im Serum herunterreguliert, IL-4 vermindert und zu einer Verringerung der allergischen Symptome führen kann (Hiromura et al. 2007; Kishida et al. 2007; Ozaki et al. 2002). Die Fähigkeit von IL-21, die IgE-Produktion herunterzuregulieren impliziert, dass IL-21 den Schweregrad von Allergien vermindern könnte. Tatsächlich führte in einem Mausmodell der AR die Verabreichung von IL-21 während der anfänglichen Antigenprovokation zu einer signifikanten Verringerung der allergischen Symptome. Zusätzlich konnte eine Abnahme des Serum-IgE und der lokalen T<sub>H</sub>2-Zytokine (IL-4, IL-5 und IL-13) beobachtet werden (Hiromura 2007). Eine Studie von Ozaki et al. (Ozaki et al. 2002) hat im Tiermodell gezeigt, dass IL-21R-Knockout-Mäuse nach der Immunisierung ein höheres IgE und ein niedrigeres IgG-Niveau als Wildtypmäuse aufweisen. Da IL-21 bei T-Zell-Reaktionen in den letzten Jahren viel Aufmerksamkeit erhalten und der Verlust von IL-21-Rezeptoren in Tiermodellen zu allergischen Atemwegsentzündungen geführt hat (Tortola et al. 2019), wurde IL-21 in die

Analyse aufgenommen. Die Ergebnisse allergenspezifischer CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup>IL-21<sup>+</sup> T-Zellen ergaben in dieser Arbeit ähnlich den anderen Zytokinen IL-4 und IFN- $\gamma$  keine Frequenzänderungen nach ex vivo-Stimulation. Dass BPA und die Kontrollen ein vergleichbares Zytokinmuster der antigenspezifischen Expression von IL-21 aufweisen, wurde auch von Huang et al. beschrieben. Diese Studie konnte weder einen signifikanten Unterschied des IL-21-Serumspiegels zwischen Patienten mit AR und gesunden Kontrollen beobachten noch eine Assoziation von IL-21 mit spezifischen IgE im Serum sehen (Huang et al. 2011). Aufgrund der begrenzten Patientenzahl und der Tatsache, dass viele Arbeiten bisher nur an Tiermodellen geforscht haben, sind weitere humane Studien mit einer größeren Stichprobengröße erforderlich, um die genaue Rolle von IL-21 bei der Aktivierung antigenspezifischer T-Zellen bei BPA eruieren zu können.

Die Unterschiede zwischen den vorliegenden Daten und den Ergebnissen anderer Forschungsgruppen scheint wie bereits bei PV (vgl. 5.2.4) im Studienprotokolldesign begründet, da zum einen Serumkonzentrationen der verschiedenen Interleukine bestimmt und zum anderen intrazelluläre Zytokinproduktionen nach unterschiedlichen Stimulations-Schemata gemessen wurden. Es konnte gezeigt werden, dass das Maximum der Zytokinexpression individuell zu unterschiedlichen Zeitpunkten auftreten kann (Huang et al. 2003), sodass neben der zeitlichen Kinetik der CD154-Expression zukünftig auch die Zytokinexpression evaluiert werden sollte. Da die immunologische Reaktion sehr spezifisch ist und nur die antigenspezifisch aktivierten CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T-Zellen nach ex vivo-Stimulation mit BPE detektiert werden, ist die Methode deutlich sensitiver bzw. weniger anfällig als eine Messung der Serumkonzentration eines Zytokins. So gibt es klinisch inapparente oder schwer zu erkennende Zustände, die mit einer Veränderung der Zytokinproduktion einhergehen können. Auch finden sich bei Allergikern häufig sogenannte minimale persistierende Entzündungen, die ein chronisches Stadium der allergischen Entzündung der nasalen Schleimhaut darstellen und mit einem pathologischen Zytokinmuster auftreten können (Ricca et al. 2000). Ein wichtiger methodisch zu diskutierender Aspekt sind die klinisch gesunden Kontrollen, die ebenfalls asymptomatisch Birkenpollen-sensibilisiert sein könnten und die Ergebnisse verzerren könnten. So konnte Smith et al. zeigen, dass sich das T<sub>H</sub>2/T<sub>H</sub>1-Verhältnis zwischen BPA und asymptomatisch Birkenpollen-sensibilisierten Probanden nicht unterschied (Smith et al. 2013a). Ein weiterer methodischer Kritikpunkt an der Auswertung sind die relativen Häufigkeitswerte der Zytokinexpression bezogen auf die CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T-Zellen. Hier kann es trotz einer Reduktion der CD154-Expression nach Stimulation zu einem

verhältnismäßigen Anstieg der Zytokinexpression kommen und umgekehrt. Bei solch geringen Häufigkeiten sollte diesbezüglich eine Anreicherung der Zellen stattfinden und die Bezugsgröße auf die Grandparentsgeneration ausgeweitet werden (Annunziato et al. 2021; Mura et al. 2020). Eine Ausweitung auf die Grandparentsgeneration hat in unserer Analyse allerdings ohne vorherige Anreicherung keinen nennenswerten Unterschied erzeugt. Ein weiterer wichtiger Aspekt scheint der Aufbau der Studienprotokolle zu sein (vgl. 5.2.4). In diesem Zusammenhang ist die Wahl eines engmaschigen Studiendesigns mit Erfassung wichtiger Parameter, wie Krankheitsaktivität oder einer AIT in der Vergangenheit, essentiell um immunologische Modifikationen in der Peripherie auf zellulärer Basis zu detektieren.

## 5.4 Fazit und Ausblick

Durch die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse konnten neue Einblicke in die zentrale Rolle der antigenspezifisch aktivierten T-Zellen hinsichtlich zellulärer und humoraler Mechanismen der adaptiven Autoimmunantwort bei PV und BPA gewonnen werden. Diese neuen Erkenntnisse sind ein wichtiger Bestandteil für ein besseres Verständnis der Pathomechanismen und stellen ein attraktives Ziel für die Immunmodulation dar. Diese Arbeit zeigt, dass die antigeninduzierte CD154-Expression hoch sensitiv und spezifisch für humane antigenspezifische T<sub>H</sub>-Zellen sowohl bei PV als auch BPA ist. Darüber hinaus erfordert die Isolierung von antigenspezifischen CD154<sup>+</sup> T<sub>H</sub>-Zellen nur eine Oberflächen- und Intrazellulärfärbung mit Antikörpern, wodurch die schnelle Generierung antigenspezifischer T<sub>H</sub>-Subtypen ermöglicht wird. Dieser Ansatz erlaubt die Beurteilung von T<sub>H</sub>-Zellen für eine kombinierte quantitative und qualitative Analyse der T<sub>H</sub>-Zell-Immunität, trotz niedriger Frequenzen dieser Zellen im Körperkreislauf. Zudem wird das Wissen über die tatsächliche Häufigkeit und das Merkmal der CD4<sup>+</sup> T-Zell-Reaktivität mit der Erstellung zellulärer Aktivierungsprofile ermöglicht. Im Vergleich zu herkömmlichen Verfahren, ist der Nachweis von antigenaktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen mithilfe von CD154 unabhängig von der Zytokinproduktion sowie ohne Bestimmung des MHC-Haplotyps und immundominanter Epitope möglich. Eine wichtige Eigenschaft des Markers ist ein sehr geringes Hintergrundrauschen der nicht stimulierten T-Zellen, sodass eine spezifische Detektion von antigeninduzierter CD154-Expression ermöglicht werden kann. Die Methode stellt eine mögliche schnelle Charakterisierung dar, welche anhand einer ausreichend großen Zahl der Patientenproben in dieser Arbeit wissenschaftlich fundiert werden sollte.

Die Ergebnisse liefern erste grundlegende Erkenntnisse über eine zentrale Rolle der allergen- und autoantigen-spezifisch aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zell-Antworten, welche in der Krankheitskontrolle, Aufrechterhaltung oder Auslösung von pathogenen Zuständen der zellulären Immunantwort bei PV und Birkenpollenallergie relevant sein könnten. Es konnten nach antigenspezifischer Stimulation eine signifikant höhere Anzahl von CD154<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei PV-Patienten und BPA gegenüber den Kontrollen detektiert werden. Das Auftreten von Dsg3-reaktiven CD154<sup>+</sup> war dabei nicht auf spezielle T<sub>H</sub>-Subtypen bei Patienten mit PV bzw. Birkenpollenallergie beschränkt. Bei PV-Patienten wurden Dsg3-spezifische CD154<sup>+</sup> T<sub>H</sub>-Lymphozyten in verschiedenen Krankheitsstadien der Erkrankung vermehrt induziert, während CD154<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen hinsichtlich ihrer Zytokinexpression nach antigener Stimulation weitgehend unbeeinflusst blieben. Durch den in dieser Arbeit erfolgte erstmalige Nachweis von Dsg3-epitopspezifisch aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen, nach ex vivo-Stimulation mit spezifischen Peptiden der Dsg3-Ektodomäne, konnte die funktionelle Bedeutung von immunreaktiver Epitope unterstrichen werden. Es wurde festgestellt, dass das Dsg3 Peptid P2 (190-204) bei PV-Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen die CD4<sup>+</sup> T-Zellen am wirksamsten induziert. Die Induktion ist vergleichbar mit der des vollständigen Dsg3-Proteins. Einen Unterschied der HLA DRB1\*0402- und HLA DQB1\*0503-bindenden Dsg3-T-Zell Epitope konnte nicht festgestellt werden. In Anbetracht der Tatsache, dass die T-Zell-Aktivierung entscheidend von der Erkennung von Epitopen der Dsg3-Ektodomäne abhängt, könnten T-Zell-Epitope von Dsg3 (insbesondere P2) ausreichen, um eine robuste CD4<sup>+</sup> T-Zellantwort zu generieren. Nach antigenspezifischer Aktivierung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit Hochregulation von CD154, können über den Signalweg CD40-CD154 B-Zellantwort gegen humanes Dsg3 induziert werden und so letztendlich zur Produktion pathogener Dsg3-IgG-Antikörper führen. Diese Ergebnisse deuten stark darauf hin, dass antigenspezifisch aktivierte CD4<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> T-Zellen bei der Pathogenese eine entscheidende Rolle spielen. Die in dieser Arbeit erzielten neuen Erkenntnisse konnten einige der sich aus den Beobachtungen ergebenden Fragen mit der durchgeführten Querschnittsanalyse nicht abschließend beantworten. Gerade die unterschiedliche CD154-Expression blieb an einigen Stellen bei fehlender Kenntnis von Einflussfaktoren noch unverstanden. Die Induktion von CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T-Zellen basiert sowohl bei Patienten mit PV als auch Birkenpollenallergie wahrscheinlich auf einem multifaktoriellen Zusammenspiel vieler endogener und exogener Einflussfaktoren mit unterschiedlichen Wichtungen (vgl. Kap. 4.3.3). Es konnte in dieser Arbeit bei PV-Patienten zwar eine erhöhte CD154-Expression auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der partiellen Remission gegenüber Stadien mit geringerer Krankheitsaktivität gesehen werden, allerdings fehlten Patienten im aktiven Status

zum Vergleich. Eine weiterführende longitudinale Untersuchung bei PV-Patienten mit aktiver Erkrankung und der Übergang hin zur klinischen Remission bzw. von der klinischen Remission hin zum Rezidiv könnte wichtige Erkenntnisse liefern. Zum besseren Verständnis von potenziellen Einflussfaktoren, wie Krankheitsaktivität, immunsuppressiver Therapiestufe und genetischer Prädispositionen, sollten diese in weiterfolgenden Untersuchungen die PV-Patienten in einer größeren Kohorte erfasst und stratifiziert werden. Bei den BPA empfiehlt es sich ebenfalls in zukünftigen Untersuchungen longitudinale und individuelle Analysen innerhalb und außerhalb der Birkenpollensaison durchzuführen. Zudem sollten mögliche Einflussfaktoren und diverse Allergien erfasst werden.

Die Beobachtung über einen längeren Zeitraum bietet die Möglichkeit, die Frequenz und Funktion der antigenspezifischen T-Zellen mithilfe der hier angewandten Untersuchungsmethode besser nachzuvollziehen. Gerade der diskutierte Einfluss einzelner antigenspezifisch aktivierter  $T_H$ -Subtypen und ihrer Zytokine in den jeweiligen Krankheitsstadien könnte hierdurch aufgeklärt werden. Hierzu sollte ein besonderes Augenmerk auf die zeitliche Kinetik der Zytokine nach antigenspezifischer Aktivierung gelegt werden. Zusammenfassend sind weitere Studien und Versuchsreihen notwendig, um die Mechanismen, die zur Dysfunktionalität führen, genauer und besser charakterisieren zu können. Die hier angewendete Methode zeigt eine gut realisierbare Möglichkeit zur Detektion von dysfunktionalen Zellen auf, um wichtigen Fragestellungen zur Pathogenese von Allergien und Autoimmunerkrankungen nachzugehen. Mithilfe des neuen Ansatzes könnten sich Therapieoptionen eröffnen, die darauf abzielen die Funktionalität der  $CD4^+$  T-Zellen wiederherzustellen. Darüber hinaus legen die Ergebnisse dieser Arbeit einen Grundstein für weitere Untersuchung bezüglich der Natur und Funktion antigenspezifischer  $CD154^+$  T-Zell-Antworten. Dies könnte ein wichtiger Schritt für zukünftige prädiktive Mittel zur Beurteilung des Schweregrades, zur Überwachung der Krankheitsaktivität und zur Überprüfung eines möglichen Ansprechens auf Immuntherapien darstellen.

## 6 Zusammenfassung

Antigenspezifisch aktivierte T-Helfer ( $T_H$ )-Zellen sind zentrale Regulatoren adaptiver Immunantworten. Sie vermitteln die schützende Immunität gegen spezifische Pathogene, können aber auch Immunpathologien wie Autoimmunität oder Allergie verursachen. Auf der Oberflächenmembran von  $CD4^+$   $T_H$ -Zellen wird im Rahmen der Aktivierung der Zelle das Transmembranglykoprotein CD154 (CD40L) exprimiert. Die Interaktion von CD154 mit CD40 auf B-Zellen stellt eine Schlüsselrolle der T-Zell-induzierten B-Zell-Aktivierung dar und ist daher für die optimale Entwicklung und Modulation der adaptiven Immunantwort notwendig.

Pemphigus vulgaris (PV) ist eine antikörpervermittelte Autoimmunerkrankung, bei der es zur Bildung von Blasen und Erosionen an der Haut und den Schleimhäuten kommt. Autoantikörper gegen Desmoglein (Dsg)-1 und 3 sind maßgeblich für die Entstehung des PV verantwortlich, indem sie einen Adhäsionsverlust der epidermalen Keratinozyten (Akantholyse) induzieren. Autoreaktive  $CD4^+$  T-Zellen nehmen bei der Immunantwort gegen Dsg3 eine pathogenetisch kritische Rolle ein, da sie im Zusammenspiel mit PV-assoziierten humanen Leukozytenantigenen (HLA)-Klasse-II-Allelen Dsg3-spezifische Epitope erkennen. Auf diese Weise wird die Aktivierung und Differenzierung von autoreaktiven B-Zellen und damit die Induktion einer pathologischen Autoantikörperproduktion T-Zellen abhängig kontrolliert. Das wesentliche Merkmal einer Überempfindlichkeitsreaktion ist die Produktion allergenspezifischer IgE-Antikörper. Für die Aktivierung von B-Zellen und die Bildung allergenspezifischer IgE-Antikörper, sind neben der CD154-CD40-Interaktion besonders allergieassoziierte  $T_H2$ -Helferzellen während der allergischen Sensibilisierung von Bedeutung. Nach sekundärem Allergenkontakt kann es dann zu einer Quervernetzung der auf der Oberfläche von Granulozyten und Mastzellen befindlichen IgE-Antikörper mit konsekutiver Zellaktivierung und Freisetzung von Entzündungsmediatoren kommen. Diese führen schließlich zur IgE-vermittelten Typ I-Reaktion, die sich durch klassische Symptome einer Allergie äußert.

Die genauen zellulären und humoralen Mechanismen der an der Antikörperantwort des PV und hier am Beispiel der Birkenpollenallergie beteiligten Immunzellen sind derzeit noch nicht vollständig verstanden. Zudem sind antigenspezifische T-Zellen aufgrund ihrer niedrigen Frequenz schwer nachweisbar und daher schlecht zu charakterisieren. Während beim PV bisher noch keine Untersuchung der antigenspezifisch aktivierten  $CD4^+$  T-Zellen über die Detektion der CD154-Expression erfolgte, konnte bei Birkenpollenallergikern (BPA) bereits erste

Unterschiede in der Frequenz der CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T-Zellen beobachtet werden. Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand daher darin, CD154 zur Charakterisierung von antigenspezifischen T-Zellen zu etablieren, um schließlich antigenspezifisch aktivierte CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T-Zellen im peripheren Blut von Patienten mit PV und Birkenpollenallergie nachzuweisen und mit gesunden Kontrollen zu vergleichen. Dafür wurde im Rahmen einer Querschnittsstudie die de novo CD154-Expression auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit PV- und Birkenpollenspezifischen Antigenen bei 16 PV-Patienten bzw. 15 BPA durchflusszytometrisch analysiert und 14 gesunden Kontrollen gegenübergestellt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass anhand der hier angewandten Methode antigenspezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen mithilfe ihres Aktivierungsmarkers CD154 identifiziert werden können. Diese zeitökonomische und sensitive Methode ermöglichte eine detaillierte Charakterisierung der T-Zellen, die sich allgemein in einer signifikant erhöhten Expression von CD154<sup>+</sup> auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen von PV-Patienten und BPA im Vergleich zu gesunden Kontrollen äußerte. Das Auftreten von reaktiven CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T-Zellen war dabei nicht auf spezielle T<sub>H</sub>-Zell-Subtypen beschränkt. Bei PV-Patienten zeigte sich sowohl ein Ansprechen auf das Vollprotein Dsg3 als auch auf diverse epitopspezifische Peptide, von denen besonders P2 immunmodulierend erscheint. Ein Unterschied zwischen HLA DRB1\*0402- und HLA DQB1\*0503-bindenden Dsg3-T-Zell Epitopen konnte nicht festgestellt werden. Eine Stratifizierung hinsichtlich des klinischen Status demonstrierte, dass überwiegend Patienten mit aktiven Krankheitsstadien wie partieller Remission eine erhöhte CD154-Expression auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen aufwiesen. Die im Rahmen dieser Arbeit neu erworbenen Kenntnisse über die signifikant erhöhte CD154-Expression auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen bekräftigen eine zentrale Rolle der autoantigen- bzw. allergenspezifischen CD4<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> T-Zellen. Diese können über den CD40-CD154-Signalweg B-Zell-Antworten induzieren und so letztendlich zur Produktion pathogener Antikörper in der Pathogenese des PV und BPA führen. Auf Grundlage dieser Beobachtungen können T-Zell-gerichtete Therapien als vielversprechende Behandlungsoption betrachtet werden, da bei beiden Erkrankungen Patienten von einer Herunterregulierung autoaggressiver bzw. allergenspezifischer T-Zellen profitieren würden. Die hier beschriebene CD154-Methode kann somit einen Beitrag zum besseren Verständnis der Pathomechanismen bei PV und BPA leisten und schließlich auch für die Entwicklung der personalisierten Medizin von Bedeutung sein. So könnten beispielsweise zielgerichtete Therapieformen zur Behandlung der PV-Patienten und BPA entwickelt bzw. ein mögliches Therapieansprechen überprüft werden.

## 7 Summary

Antigen-specific activated T helper ( $T_H$ ) cells are central regulators of adaptive immune responses. They mediate protective immunity against specific pathogens but can also cause immune pathologies such as autoimmunity or allergy. On the surface membrane of  $CD4^+$   $T_H$  cells, the transmembrane glycoprotein CD154 (CD40L) is expressed as part of the activation of the cell. The interaction of CD154 with CD40 on B cells represents a key role of T-cell-induced B cell activation and is therefore necessary for the optimal development and modulation of the adaptive immune response.

Pemphigus vulgaris (PV) is an antibody-mediated autoimmune disease that results in the formation of blisters and erosions on the skin and mucous membranes. Autoantibodies against desmoglein (Dsg)-1 and 3 are largely responsible for the development of PV by inducing a loss of adhesion of epidermal keratinocytes (acantholysis). Autoreactive  $CD4^+$  T-cells take a pathogenetically critical role in the immune response against Dsg3 by recognising Dsg3-specific epitopes in interaction with PV-associated human leukocyte antigen (HLA) class II alleles. In this way, the activation and differentiation of autoreactive B-cells and thus the induction of pathological autoantibody production is controlled T-cells dependent.

The essential feature of a hypersensitivity reaction is the production of allergen-specific IgE antibodies. For the activation of B cells and the production of allergen-specific IgE antibodies, in addition to the CD154-CD40 interaction, allergy-associated  $T_H2$  helper cells are particularly important during allergic sensitisation. After secondary allergen contact, cross-linking of IgE antibodies on the surface of granulocytes and mast cells can then occur with consecutive cell activation and release of inflammatory mediators. These finally lead to the IgE-mediated type I reaction, which manifests itself through classic symptoms of an allergy.

The exact cellular and humoral mechanisms of the immune cells involved in the PV antibody response and here in the example of birch pollen allergy are currently not fully understood. In addition, antigen-specific T-cells are difficult to detect due to their low frequency and are therefore difficult to characterise. While antigen-specific activated  $CD4^+$  T-cells have not yet been investigated in PV by detecting CD154 expression, initial differences in the frequency of  $CD4^+CD154^+$  T-cells have already been observed in birch pollen allergy (BPA) patients. The aim of the present study was therefore to establish CD154 for the characterisation of antigen-specific T-cells to finally detect antigen-specific activated  $CD4^+CD154^+$  T-cells in the

peripheral blood of patients with PV and birch pollen allergy and to compare them with healthy controls. For this purpose, de novo CD154 expression on CD4<sup>+</sup> T-cells after stimulation with PV- and birch pollen-specific antigens was analysed by flow cytometry in 16 PV patients and 15 BPA, respectively, and compared to 14 healthy controls.

The results of the present work show that the method used here can identify antigen-specific CD4<sup>+</sup> T-cells using their activation marker CD154. This time-efficient and sensitive method allowed a detailed characterisation of the T-cells, which was generally manifested by a significantly increased expression of CD154<sup>+</sup> on CD4<sup>+</sup> T-cells from PV patients and BPA compared to healthy controls. The occurrence of reactive CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T-cells was not limited to specific T<sub>H</sub> cell subtypes. PV patients showed a response to the full protein Dsg3 as well as to various epitope-specific peptides, of which P2 appears to be immunomodulatory. A difference between HLA DRB1\*0402- and HLA DQB1\*0503-bound Dsg3 T-cell epitopes could not be detected. Stratification with respect to clinical status demonstrated that predominantly patients with active disease stages such as partial remission had increased CD154 expression on CD4<sup>+</sup> T-cells. The newly acquired knowledge about the significantly increased CD154 expression on CD4<sup>+</sup> T-cells in the context of this work confirms a central role of the autoantigen- or allergen-specific CD4<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> T-cells. These can induce B-cell responses via the CD40-CD154 pathway, ultimately leading to the production of pathogenic antibodies in the pathogenesis of PV and BPA. Based on these observations, T-cell-targeted therapies may be considered a promising treatment option, as in both diseases patients would benefit from down-regulation of autoaggressive or allergen-specific T-cells. The CD154 method described here can thus contribute to a better understanding of the pathomechanisms in PV and BPA and ultimately also be important for the development of personalised medicine. For example, targeted therapies for the treatment of PV patients and BPA could be developed or a possible therapy response could be verified.

## 8 Literaturverzeichnis

- Abbas, A. K./Murphy, K. M./Sher, A. (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383 (6603), 787–793.
- Akdis, Mübeccel (2006). Healthy immune response to allergens: T regulatory cells and more. *Current Opinion in Immunology* 18 (6), 738–744.
- Akdis, Mübeccel/Verhagen, Johan/Taylor, Alison/Karamloo, Fariba/Karagiannidis, Christian/Cramer, Reto/Thunberg, Sarah/Deniz, Günnur/Valenta, Rudolf/Fiebig, Helmut/Kegel, Christian/Disch, Rainer/Schmidt-Weber, Carsten B./Blaser, Kurt/Akdis, Cezmi A. (2004). Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. *The Journal of experimental medicine* 199 (11), 1567–1575.
- Alam, S. M./Travers, P. J./Wung, J. L./Nasholds, W./Redpath, S./Jameson, S. C./Gascoigne, N. R. (1996). T-cell-receptor affinity and thymocyte positive selection. *Nature* 381 (6583), 616–620.
- Allen, R. C./Armitage, R. J./Conley, M. E./Rosenblatt, H./Jenkins, N. A./Copeland, N. G./Bedell, M. A./Edelhoff, S./Disteche, C. M./Simoneaux, D. K. (1993). CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyper-IgM syndrome. *Science (New York, N.Y.)* 259 (5097), 990–993.
- Altman, John D./Moss, Paul A. H./Goulder, Philip J. R./Barouch, Dan H./McHeyzer-Williams, Michael G./Bell, John I./McMichael, Andrew J./Davis, Mark M. (2011). Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science*. 1996. 274: 94-96. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 187 (1), 7–9.
- Altmeyer, Peter/Bacharach-Buhles, Martina/Buhles, N. (2002). *Springer-Enzyklopädie Dermatologie, Allergologie, Umweltmedizin*. Mit 566 Tabellen ; [mit CD-ROM. Berlin, Springer.
- Amagai, M./Hashimoto, T./Shimizu, N./Nishikawa, T. (1994). Absorption of pathogenic autoantibodies by the extracellular domain of pemphigus vulgaris antigen (Dsg3) produced by baculovirus. *The Journal of clinical investigation* 94 (1), 59–67.

- Amagai, M./Komai, A./Hashimoto, T./Shirakata, Y./Hashimoto, K./Yamada, T./Kitajima, Y./Ohya, K./Iwanami, H./Nishikawa, T. (1999). Usefulness of enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant desmogleins 1 and 3 for serodiagnosis of pemphigus. *The British journal of dermatology* 140 (2), 351–357.
- Amagai, Masayuki/Klaus-Kovtun, Vera/Stanley, John R. (1991). Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. *Cell* 67 (5), 869–877.
- Amagai, Masayuki/Stanley, John R. (2012). Desmoglein as a target in skin disease and beyond. *The Journal of investigative dermatology* 132 (3 Pt 2), 776–784.
- Amber, Kyle T./Staropoli, Patrick/Shiman, Michael I./Elgart, George W./Hertl, Michael (2013). Autoreactive T cells in the immune pathogenesis of pemphigus vulgaris. *Experimental dermatology* 22 (11), 699–704.
- Anhalt, G. J./Labib, R. S./Voorhees, J. J./Beals, T. F./Diaz, L. A. (1982). Induction of pemphigus in neonatal mice by passive transfer of IgG from patients with the disease. *The New England journal of medicine* 306 (20), 1189–1196.
- Anhoj, C./Backer, V./Nolte, H. (2001). Diagnostic evaluation of grass- and birch-allergic patients with oral allergy syndrome. *Allergy* 56 (6), 548–552.
- Annunziato, Francesco/Cosmi, Lorenzo/Santarlaschi, Veronica/Maggi, Laura/Liotta, Francesco/Mazzinghi, Benedetta/Parente, Eliana/Fili, Lucia/Ferri, Simona/Frosali, Francesca/Giudici, Francesco/Romagnani, Paola/Parronchi, Paola/Tonelli, Francesco/Maggi, Enrico/Romagnani, Sergio (2007). Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *The Journal of experimental medicine* 204 (8), 1849–1861.
- Annunziato, Francesco/Maggi, Laura/Mazzoni, Alessio (2021). *T-Helper Cells*. New York, NY, Springer US.
- Aoki-Ota, Miyo/Kinoshita, Mari/Ota, Takayuki/Tsunoda, Kazuyuki/Iwasaki, Toshiro/Tanaka, Sigeru/Koyasu, Shigeo/Nishikawa, Takeji/Amagai, Masayuki (2006). Tolerance induction by the blockade of CD40/CD154 interaction in pemphigus vulgaris mouse model. *The Journal of investigative dermatology* 126 (1), 105–113.

- Arakaki, Rieko/Yamada, Akiko/Kudo, Yasusei/Hayashi, Yoshio/Ishimaru, Naozumi (2014). Mechanism of activation-induced cell death of T cells and regulation of FasL expression. *Critical reviews in immunology* 34 (4), 301–314.
- Arakawa, Masataka/Dainichi, Teruki/Ishii, Norito/Hamada, Takahiro/Karashima, Tadashi/Nakama, Takekuni/Yasumoto, Shinichiro/Tsuruta, Daisuke/Hashimoto, Takashi (2011). Lesional Th17 cells and regulatory T cells in bullous pemphigoid. *Experimental dermatology* 20 (12), 1022–1024.
- Arakawa, Masataka/Dainichi, Teruki/Yasumoto, Shinichiro/Hashimoto, Takashi (2009). Lesional Th17 cells in pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. *Journal of dermatological science* 53 (3), 228–231.
- Armitage, R. J./Fanslow, W. C./Strockbine, L./Sato, T. A./Clifford, K. N./Macduff, B. M./Anderson, D. M./Gimpel, S. D./Davis-Smith, T./Maliszewski, C. R. (1992). Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. *Nature* 357 (6373), 80–82.
- Aruffo, Alejandro/Farrington, Mary/Hollenbaugh, Diane/Li, Xu/Milatovich, Athena/Nonoyama, Shigeaki/Bajorath, Jürgen/Grosmaire, Laura S./Stenkamp, Ronald/Neubauer, Michael/Roberts, Robert L./Noelle, Randolph J./Ledbetter, Jeffrey A./Francke, Uta/Ochs, Hans D. (1993). The CD40 ligand, gp39, is defective in activated T cells from patients with X-linked hyper-IgM syndrome. *Cell* 72 (2), 291–300.
- Asothai, R./Anand, Vivek/Das, Dayasagar/Antil, Parul Singh/Khandpur, Sujay/Sharma, V. K./Sharma, Alpana (2015). Distinctive Treg associated CCR4-CCL22 expression profile with altered frequency of Th17/Treg cell in the immunopathogenesis of Pemphigus Vulgaris. *Immunobiology* 220 (10), 1129–1135.
- Bacher, Petra/Heinrich, Frederik/Stervbo, Ulrik/Nienen, Mikalai/Vahldieck, Marco/Iwert, Christina/Vogt, Katrin/Kollet, Jutta/Babel, Nina/Sawitzki, Birgit/Schwarz, Carsten/Bereswill, Stefan/Heimesaat, Markus M./Heine, Guido/Gadermaier, Gabriele/Asam, Claudia/Assenmacher, Mario/Kniemeyer, Olaf/Brakhage, Axel A./Ferreira, Fátima/Wallner, Michael/Worm, Margitta/Scheffold, Alexander (2016). Regulatory T Cell Specificity Directs Tolerance versus Allergy against Aeroantigens in Humans. *Cell* 167 (4), 1067-1078.e16.

- Bacher, Petra/Scheffold, Alexander (2013). Flow-cytometric analysis of rare antigen-specific T cells. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* 83 (8), 692–701.
- Bacher, Petra/Schink, Christian/Teutschbein, Janka/Kniemeyer, Olaf/Assenmacher, Mario/Brakhage, Axel A./Scheffold, Alexander (2013). Antigen-reactive T cell enrichment for direct, high-resolution analysis of the human naive and memory Th cell repertoire. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 190 (8), 3967–3976.
- Banchereau, J./Briere, F./Caux, C./Davoust, J./Lebecque, S./Liu, Y. J./Pulendran, B./Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annual review of immunology* 18, 767–811.
- Banchereau, J./Dubois, B./Fayette, J./Burdin, N./Brière, F./Miossec, P./Rissoan, M. C./van Kooten, C./Caux, C. (1995). Functional CD40 antigen on B cells, dendritic cells and fibroblasts. *Advances in experimental medicine and biology* 378, 79–83.
- Barthelemy, H./Frappaz, A./Cambazard, F./Mauduit, G./Rouchouse, B./Kanitakis, J./Souteyrand, P./Claudy, A. L./Thivolet, J. (1988). Treatment of nine cases of pemphigus vulgaris with cyclosporine. *Journal of the American Academy of Dermatology* 18 (6), 1262–1266.
- Behrendt, H./Becker, W. M./Fritzsche, C./Sliwa-Tomczok, W./Tomczok, J./Friedrichs, K. H./Ring, J. (1997). Air pollution and allergy: experimental studies on modulation of allergen release from pollen by air pollutants. *International archives of allergy and immunology* 113 (1-3), 69–74.
- Belloni-Fortina, Anna/Faggion, Diana/Pigozzi, Barbara/Peserico, Andrea/Bordignon, Matteo/Baldo, Vincenzo/Alaibac, Mauro (2009). Detection of autoantibodies against recombinant desmoglein 1 and 3 molecules in patients with pemphigus vulgaris: correlation with disease extent at the time of diagnosis and during follow-up. *Clinical & developmental immunology* 2009, 187864.
- Berner, B./Wolf, G./Hummel, K. M./Müller, G. A./Reuss-Borst, M. A. (2000). Increased expression of CD40 ligand (CD154) on CD4+ T cells as a marker of disease activity in rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 59 (3), 190–195.

- Bettelli, Estelle/Carrier, Yijun/Gao, Wenda/Korn, Thomas/Strom, Terry B./Oukka, Mohamed/Weiner, Howard L./Kuchroo, Vijay K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441 (7090), 235–238.
- Biedermann, T./Winther, L./Till, S. J./Panzner, P./Knulst, A./Valovirta, E. (2019). Birch pollen allergy in Europe. *Allergy* 74 (7), 1237–1248.
- Bilgic Temel, Asli/Murrell, Dedee F. (2019). Pharmacological advances in pemphigus. *Current opinion in pharmacology* 46, 44–49.
- Bischof, F./Melms, A. (1998). Glucocorticoids inhibit CD40 ligand expression of peripheral CD4+ lymphocytes. *Cellular immunology* 187 (1), 38–44.
- Boelen, Lies/O'Neill, Patrick K./Quigley, Kathryn J./Reynolds, Catherine J./Maillere, Bernard/Robinson, John H./Lertmemongkolchai, Ganjana/Altmann, Daniel M./Boyton, Rosemary J./Asquith, Becca (2016). BIITE: A Tool to Determine HLA Class II Epitopes from T Cell ELISpot Data. *PLoS computational biology* 12 (3), e1004796.
- Bonvalet, M./Wambre, E./Moussu, H./Horiot, S./Kwok, W. W./Louise, A./Ebo, D./Hoarau, C./van Overtvelt, L./Baron-Bodo, V./Moingeon, P. (2011). Comparison between major histocompatibility complex class II tetramer staining and surface expression of activation markers for the detection of allergen-specific CD4+ T cells. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 41 (6), 821–829.
- Botti, Elisabetta/Spallone, Giulia/Caruso, Roberta/Monteleone, Giovanni/Chimenti, Sergio/Costanzo, Antonio (2012). Psoriasis, from pathogenesis to therapeutic strategies: IL-21 as a novel potential therapeutic target. *Current pharmaceutical biotechnology* 13 (10), 1861–1867.
- Boumpas, Dimitrios T./Furie, Richard/Manzi, Susan/Illei, Gabor G./Wallace, Daniel J./Balow, James E./Vaishnaw, Akshay (2003). A short course of BG9588 (anti-CD40 ligand antibody) improves serologic activity and decreases hematuria in patients with proliferative lupus glomerulonephritis. *Arthritis and rheumatism* 48 (3), 719–727.

- Braun, Christine M./Huang, Shau-Ku/Bashian, Gregory G./Kagey-Sobotka, Anne/Lichtenstein, Lawrence M./Essayan, David M. (1997). Corticosteroid modulation of human, antigen-specific Th1 and Th2 responses. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 100 (3), 400–407.
- Bretscher, P. A. (1999). A two-step, two-signal model for the primary activation of precursor helper T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (1), 185–190.
- Buhlmann, J. E./Noelle, R. J. (1996). Therapeutic potential for blockade of the CD40 ligand, gp39. *Journal of clinical immunology* 16 (2), 83–89.
- Bystryn, Jean-Claude/Rudolph, Jennifer L. (2005). Pemphigus. *The Lancet* 366 (9479), 61–73.
- Calkins, Catharine C./Setzer, Shannon V./Jennings, Jean Marie/Summers, Susan/Tsunoda, Kazuyuki/Amagai, Masayuki/Kowalczyk, Andrew P. (2006). Desmoglein endocytosis and desmosome disassembly are coordinated responses to pemphigus autoantibodies. *The Journal of biological chemistry* 281 (11), 7623–7634.
- Campbell, J. D./Buchmann, P./Kesting, S./Cunningham, C. R./Coffman, R. L./Hessel, E. M. (2010). Allergen-specific T cell responses to immunotherapy monitored by CD154 and intracellular cytokine expression. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 40 (7), 1025–1035.
- Capelle, Christophe M./Cire, Séverine/Ammerlaan, Wim/Konstantinou, Maria/Balling, Rudi/Betsou, Fay/Cosma, Antonio/Ollert, Markus/Hefeng, Feng Q. (2021). Standard PBMC cryopreservation selectively decreases detection of nine clinically-relevant T-cell markers.
- Caproni, Marzia/Antiga, Emiliano/Torchia, Daniele/Volpi, Walter/del Bianco, Elena/Cappetti, Alessio/Feliciani, Claudio/Fabbri, Paolo (2007a). The CD40/CD40 ligand system is involved in the pathogenesis of pemphigus. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* 124 (1), 22–25.

- Caproni, Marzia/Torchia, Daniele/Antiga, Emiliano/Giomi, Barbara/Mercuri, Michele/Volpi, Walter/Fabbri, Paolo (2007b). The CD40/CD40 ligand system in the skin of patients with subacute cutaneous lupus erythematosus. *The Journal of rheumatology* 34 (12), 2412–2416.
- Casamayor-Palleja, M./Khan, M./MacLennan, I. C. (1995). A subset of CD4<sup>+</sup> memory T cells contains preformed CD40 ligand that is rapidly but transiently expressed on their surface after activation through the T cell receptor complex. *The Journal of experimental medicine* 181 (4), 1293–1301.
- Chamberlain, Chris/Colman, Peter J./Ranger, Ann M./Burkly, Linda C./Johnston, Geoffrey I./Otoul, Christian/Stach, Christian/Zamacona, Miren/Dörner, Thomas/Urowitz, Murray/Hiepe, Falk (2017). Repeated administration of dapirolizumab pegol in a randomised phase I study is well tolerated and accompanied by improvements in several composite measures of systemic lupus erythematosus disease activity and changes in whole blood transcriptomic profiles. *Annals of the rheumatic diseases* 76 (11), 1837–1844.
- Chaplin, David D. (2010). Overview of the immune response. *The Journal of allergy and clinical immunology* 125 (2 Suppl 2), S3-23.
- Chattopadhyay, Pratip K./Yu, Joanne/Roederer, Mario (2005). A live-cell assay to detect antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells with diverse cytokine profiles. *Nature medicine* 11 (10), 1113–1117.
- Chattopadhyay, Pratip K./Yu, Joanne/Roederer, Mario (2006). Live-cell assay to detect antigen-specific CD4<sup>+</sup> T-cell responses by CD154 expression. *Nature protocols* 1 (1), 1–6.
- Chen, Lieping/Flies, Dallas B. (2013). Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nature reviews. Immunology* 13 (4), 227–242.
- Chen, Yuhong/Yu, Mei/Zheng, Yongwei/Fu, Guoping/Xin, Gang/Zhu, Wen/Luo, Lan/Burns, Robert/Li, Quan-Zhen/Dent, Alexander L./Zhu, Nan/Cui, Weiguo/Malherbe, Laurent/Wen, Renren/Wang, Demin (2019). CXCR5<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> follicular helper CD8 T cells control B cell tolerance. *Nature communications* 10 (1), 4415.

- Cheng, Genhong/Schoenberger, Stephen P. (2002). CD40 signaling and autoimmunity. *Current directions in autoimmunity* 5, 51–61.
- Chernyavsky, Alex/Amber, Kyle T./Agnoletti, Arianna F./Wang, Candice/Grando, Sergei A. (2019). Synergy among non-desmoglein antibodies contributes to the immunopathology of desmoglein antibody-negative pemphigus vulgaris. *The Journal of biological chemistry* 294 (12), 4520–4528.
- Ciprandi, G./Amici, M. de/Murdaca, G./Fenoglio, D./Ricciardolo, F./Marseglia, G./Tosca, M. (2009). Serum interleukin-17 levels are related to clinical severity in allergic rhinitis. *Allergy* 64 (9), 1375–1378.
- Ciprandi, Giorgio/Fenoglio, Daniela/Amici, Mara de/Quaglini, Silvana/Negrini, Simone/Filaci, Gilberto (2008). Serum IL-17 levels in patients with allergic rhinitis. *The Journal of allergy and clinical immunology* 122 (3), 650-1.e2.
- Clark, Usa B./Foy, Teresa M./Noelle, Randolph J. (1996). CD40 and Its Ligand. In: *Advances in Immunology* Volume 63. Elsevier, 43–78.
- Cohen, George B./Kaur, Amitinder/Johnson, R. Paul (2005). Isolation of viable antigen-specific CD4 T cells by CD40L surface trapping. *Journal of immunological methods* 302 (1-2), 103–115.
- Colliou, Natacha/Picard, Damien/Caillot, Frédérique/Calbo, Sébastien/Le Corre, Stéphanie/Lim, Annick/Lemercier, Brigitte/Le Mauff, Brigitte/Maho-Vaillant, Maud/Jacquot, Serge/Bedane, Christophe/Bernard, Philippe/Caux, Frédéric/Prost, Catherine/Delaporte, Emmanuel/Doutre, Marie-Sylvie/Dreno, Brigitte/Franck, Nathalie/Ingen-Housz-Oro, Saskia/Chosidow, Olivier/Pauwels, Christine/Picard, Catherine/Roujeau, Jean-Claude/Sigal, Michèle/Tancrede-Bohin, Emmanuelle/Templier, Isabelle/Eming, Rüdiger/Hertl, Michael/D'Incan, Michel/Joly, Pascal/Musette, Philippe (2013). Long-term remissions of severe pemphigus after rituximab therapy are associated with prolonged failure of desmoglein B cell response. *Science translational medicine* 5 (175), 175ra30.

Cooper, Nichola/Arnold, Donald M. (2010). The effect of rituximab on humoral and cell mediated immunity and infection in the treatment of autoimmune diseases. *British journal of haematology* 149 (1), 3–13.

Cossarizza, Andrea/Chang, Hyun-Dong/Radbruch, Andreas/Acs, Andreas/Adam, Dieter/Adam-Klages, Sabine/Agace, William W./Aghaeepour, Nima/Akdis, Mübeccel/Allez, Matthieu/Almeida, Larissa Nogueira/Alvisi, Giorgia/Anderson, Graham/Andrä, Immanuel/Annunziato, Francesco/Anselmo, Achille/Bacher, Petra/Baldari, Cosima T./Bari, Sudipto/Barnaba, Vincenzo/Barros-Martins, Joana/Battistini, Luca/Bauer, Wolfgang/Baumgart, Sabine/Baumgarth, Nicole/Baumjohann, Dirk/Baying, Bianka/Bebawy, Mary/Becher, Burkhard/Beisker, Wolfgang/Benes, Vladimir/Beyaert, Rudi/Blanco, Alfonso/Boardman, Dominic A./Bogdan, Christian/Borger, Jessica G./Borsellino, Giovanna/Boulais, Philip E./Bradford, Jolene A./Brenner, Dirk/Brinkman, Ryan R./Brooks, Anna E. S./Busch, Dirk H./Büscher, Martin/Bushnell, Timothy P./Calzetti, Federica/Cameron, Garth/Cammarata, Ilenia/Cao, Xuetao/Cardell, Susanna L./Casola, Stefano/Cassatella, Marco A./Cavani, Andrea/Celada, Antonio/Chatenoud, Lucienne/Chattopadhyay, Pratip K./Chow, Sue/Christakou, Eleni/Čičin-Šain, Luka/Clerici, Mario/Colombo, Federico S./Cook, Laura/Cooke, Anne/Cooper, Andrea M./Corbett, Alexandra J./Cosma, Antonio/Cosmi, Lorenzo/Coulie, Pierre G./Cumano, Ana/Cvetkovic, Ljiljana/van Dang, Duc/Dang-Heine, Chantip/Davey, Martin S./Davies, Derek/Biasi, Sara de/Del Zotto, Genny/Cruz, Gelo Victoriano Dela/Delacher, Michael/Della Bella, Silvia/Dellabona, Paolo/Deniz, Günnur/Dessing, Mark/Di Santo, James P./Diefenbach, Andreas/Dieli, Francesco/Dolf, Andreas/Dörner, Thomas/Dress, Regine J./Dudziak, Diana/Dustin, Michael/Dutertre, Charles-Antoine/Ebner, Friederike/Eckle, Sidonia B. G./Edinger, Matthias/Eede, Pascale/Ehrhardt, Götz R.A./Eich, Marcus/Engel, Pablo/Engelhardt, Britta/Erdei, Anna/Esser, Charlotte/Everts, Bart/Evrard, Maximilien/Falk, Christine S./Fehniger, Todd A./Felipo-Benavent, Mar/Ferry, Helen/Feuerer, Markus/Filby, Andrew/Filkor, Kata/Fillatreau, Simon/Follo, Marie/Förster, Irmgard/Foster, John/Foulds, Gemma A./Frehse, Britta/Frenette, Paul S./Frischbutter, Stefan/Fritzsche, Wolfgang/Galbraith, David W./Gangaev, Anastasia/Garbi, Natalio/Gaudilliere, Brice/Gazzinelli, Ricardo T./Geginat, Jens/Gerner, Wilhelm/Gherardin, Nicholas A./Ghoreschi, Kamran/Gibellini, Lara/Ginhoux, Florent/Goda, Keisuke/Godfrey, Dale I./Goettlinger, Christoph/González-Navajas, Jose M./Goodyear, Carl S./Gori,

Andrea/Grogan, Jane L./Grummitt, Daryl/Grützkau, Andreas/Haftmann, Claudia/Hahn, Jonas/Hammad, Hamida/Hämmerling, Günter/Hansmann, Leo/Hansson, Goran/Harpur, Christopher M./Hartmann, Susanne/Hauser, Andrea/Hauser, Anja E./Haviland, David L./Hedley, David/Hernández, Daniela C./Herrera, Guadalupe/Herrmann, Martin/Hess, Christoph/Höfer, Thomas/Hoffmann, Petra/Hogquist, Kristin/Holland, Tristan/Höllt, Thomas/Holmdahl, Rikard/Hombrink, Pleun/Houston, Jessica P./Hoyer, Bimba F./Huang, Bo/Huang, Fang-Ping/Huber, Johanna E./Huehn, Jochen/Hundemer, Michael/Hunter, Christopher A./Hwang, William Y. K./Iannone, Anna/Ingelfinger, Florian/Iverson, Sabine M./Jäck, Hans-Martin/Jani, Peter K./Jávega, Beatriz/Jonjic, Stipan/Kaiser, Toralf/Kalina, Tomas/Kamradt, Thomas/Kaufmann, Stefan H. E./Keller, Baerbel/Ketelaars, Steven L. C./Khalilnezhad, Ahad/Khan, Srijit/Kisielow, Jan/Klenerman, Paul/Knopf, Jasmin/Koay, Hui-Fern/Kobow, Katja/Kolls, Jay K./Kong, Wan Ting/Kopf, Manfred/Korn, Thomas/Kriegsmann, Katharina/Kristyanto, Hendy/Kroneis, Thomas/Krueger, Andreas/Kühne, Jenny/Kukat, Christian/Kunkel, Désirée/Kunze-Schumacher, Heike/Kurosaki, Tomohiro/Kurts, Christian/Kvistborg, Pia/Kwok, Immanuel/Landry, Jonathan/Lantz, Olivier/Lanuti, Paola/LaRosa, Francesca/Lehuen, Agnès/LeibundGut-Landmann, Salomé/Leipold, Michael D./Leung, Leslie Y.T./Levings, Megan K./Lino, Andreia C./Liotta, Francesco/Litwin, Virginia/Liu, Yanling/Ljunggren, Hans-Gustaf/Lohoff, Michael/Lombardi, Giovanna/Lopez, Lilly/López-Botet, Miguel/Lovett-Racke, Amy E./Lubberts, Erik/Luche, Herve/Ludewig, Burkhard/Lugli, Enrico/Lunemann, Sebastian/Maecker, Holden T./Maggi, Laura/Maguire, Orla/Mair, Florian/Mair, Kerstin H./Mantovani, Alberto/Manz, Rudolf A./Marshall, Aaron J./Martínez-Romero, Alicia/Martrus, Glòria/Marventano, Ivana/Maslinski, Wlodzimierz/Matarese, Giuseppe/Mattioli, Anna Vittoria/Maueröder, Christian/Mazzoni, Alessio/McCluskey, James/McGrath, Mairi/McGuire, Helen M./McInnes, Iain B./Mei, Henrik E./Melchers, Fritz/Melzer, Susanne/Mielenz, Dirk/Miller, Stephen D./Mills, Kingston H.G./Minderman, Hans/Mjösberg, Jenny/Moore, Jonni/Moran, Barry/Moretta, Lorenzo/Mosmann, Tim R./Müller, Susann/Multhoff, Gabriele/Muñoz, Luis Enrique/Münz, Christian/Nakayama, Toshinori/Nasi, Milena/Neumann, Katrin/Ng, Lai Guan/Niedobitek, Antonia/Nourshargh, Sussan/Núñez, Gabriel/O'Connor, José-Enrique/Ochel, Aaron/Oja, Anna/Ordonez, Diana/Orfao, Alberto/Orlowski-Oliver, Eva/Ouyang, Wenjun/Oxenius, Annette/Palankar, Raghavendra/Panse, Isabel/Pattanapanyasat, Kovit/Paulsen, Malte/Pavlinic, Dinko/Penter, Livius/Peterson,

Pärt/Peth, Christian/Petriz, Jordi/Piancone, Federica/Pickl, Winfried F./Piconese, Silvia/Pinti, Marcello/Pockley, A. Graham/Podolska, Malgorzata Justyna/Poon, Zhiyong/Pracht, Katharina/Prinz, Immo/Pucillo, Carlo E. M./Quataert, Sally A./Quatrini, Linda/Quinn, Kylie M./Radbruch, Helena/Radstake, Tim R. D. J./Rahmig, Susann/Rahn, Hans-Peter/Rajwa, Bartek/Ravichandran, Gevitha/Raz, Yotam/Rebhahn, Jonathan A./Recktenwald, Diether/Reimer, Dorothea/e Sousa, Caetano Reis/Remmerswaal, Ester B.M./Richter, Lisa/Rico, Laura G./Riddell, Andy/Rieger, Aja M./Robinson, J. Paul/Romagnani, Chiara/Rubartelli, Anna/Ruland, Jürgen/Saalmüller, Armin/Saeyns, Yvan/Saito, Takashi/Sakaguchi, Shimon/de-Oyanguren, Francisco Sala/Samstag, Yvonne/Sanderson, Sharon/Sandrock, Inga/Santoni, Angela/Sanz, Ramon Bellmàs/Saresella, Marina/Sautes-Fridman, Catherine/Sawitzki, Birgit/Schadt, Linda/Scheffold, Alexander/Scherer, Hans U./Schiemann, Matthias/Schildberg, Frank A./Schimisky, Esther/Schlitzer, Andreas/Schlosser, Josephine/Schmid, Stephan/Schmitt, Steffen/Schober, Kilian/Schraivogel, Daniel/Schuh, Wolfgang/Schüler, Thomas/Schulte, Reiner/Schulz, Axel Ronald/Schulz, Sebastian R./Scottá, Cristiano/Scott-Algara, Daniel/Sester, David P./Shankey, T. Vincent/Silva-Santos, Bruno/Simon, Anna Katharina/Sitnik, Katarzyna M./Sozzani, Silvano/Speiser, Daniel E./Spidlen, Josef/Stahlberg, Anders/Stall, Alan M./Stanley, Natalie/Stark, Regina/Stehle, Christina/Steinmetz, Tobit/Stockinger, Hannes/Takahama, Yousuke/Takeda, Kiyoshi/Tan, Leonard/Tárnok, Attila/Tiegs, Gisa/Toldi, Gergely/Tornack, Julia/Traggiai, Elisabetta/Trebak, Mohamed/Tree, Timothy I.M./Trotter, Joe/Trowsdale, John/Tsoumakidou, Maria/Ulrich, Henning/Urbanczyk, Sophia/van de Veen, Willem/van den Broek, Maries/van der Pol, Edwin/van Gassen, Sofie/van Isterdael, Gert/van Lier, René A.W./Veldhoen, Marc/Vento-Asturias, Salvador/Vieira, Paulo/Voehringer, David/Volk, Hans-Dieter/Borstel, Anouk von/Volkmann, Konrad von/Waisman, Ari/Walker, Rachael V./Wallace, Paul K./Wang, Sa A./Wang, Xin M./Ward, Michael D./Ward-Hartstonge, Kirsten A./Warnatz, Klaus/Warnes, Gary/Warth, Sarah/Waskow, Claudia/Watson, James V./Watzl, Carsten/Wegener, Leonie/Weisenburger, Thomas/Wiedemann, Annika/Wienands, Jürgen/Wilharm, Anneke/Wilkinson, Robert John/Willimsky, Gerald/Wing, James B./Winkelmann, Rieke/Winkler, Thomas H./Wirz, Oliver F./Wong, Alicia/Wurst, Peter/Yang, Jennie H. M./Yang, Juhao/Yazdanbakhsh, Maria/Yu, Liping/Yue, Alice/Zhang, Hanlin/Zhao, Yi/Ziegler, Susanne Maria/Zielinski, Christina/Zimmermann, Jakob/Zychlinsky, Arturo (2019). Guidelines for the use of

- flow cytometry and cell sorting in immunological studies (second edition). *European journal of immunology* 49 (10), 1457–1973.
- Costantini, A./Mancini, S./Giuliodoro, S./Butini, L./Regnery, C. M./Silvestri, G./Montroni, M. (2003). Effects of cryopreservation on lymphocyte immunophenotype and function. *Journal of immunological methods* 278 (1-2), 145–155.
- Crotty, Shane (2014). T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity* 41 (4), 529–542.
- D'Amato, G./Cecchi, L./Bonini, S./Nunes, C./Annesi-Maesano, I./Behrendt, H./Liccardi, G./Popov, T./van Cauwenberge, P. (2007). Allergenic pollen and pollen allergy in Europe. *Allergy* 62 (9), 976–990.
- Daneshpazhooh, M./Chams-Davatchi, C./Khamesipour, A./Mansoori, P./Taheri, A./Firooz, A./Mortazavi, H./Esmaili, N./Dowlati, Y. (2007). Desmoglein 1 and 3 enzyme-linked immunosorbent assay in Iranian patients with pemphigus vulgaris: correlation with phenotype, severity, and disease activity. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV* 21 (10), 1319–1324.
- Das, Dayasagar/Akhtar, Shamima/Kurra, Santosh/Gupta, Somesh/Sharma, Alpana (2019). Emerging role of immune cell network in autoimmune skin disorders: An update on pemphigus, vitiligo and psoriasis. *Cytokine & growth factor reviews* 45, 35–44.
- Del Prete, G./Maggi, E./Parronchi, P./Chrétien, I./Tiri, A./Macchia, D./Ricci, M./Banchereau, J./Vries, J. de/Romagnani, S. (1988). IL-4 is an essential factor for the IgE synthesis induced in vitro by human T cell clones and their supernatants. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 140 (12), 4193–4198.
- Desai-Mehta, A./Lu, L./Ramsey-Goldman, R./Datta, S. K. (1996). Hyperexpression of CD40 ligand by B and T cells in human lupus and its role in pathogenic autoantibody production. *The Journal of clinical investigation* 97 (9), 2063–2073.
- Di Blasi, Daniela/Claessen, Iris/Turksma, Annelies W./van Beek, Josine/Brinke, Anja ten (2020). Guidelines for analysis of low-frequency antigen-specific T cell results: Dye-

based proliferation assay vs 3H-thymidine incorporation. *Journal of immunological methods* 487, 112907.

Di Zenzo, Giovanni/Amber, Kyle T./Sayar, Beyza S./Müller, Eliane J./Borradori, Luca (2016). Immune response in pemphigus and beyond: progresses and emerging concepts. *Seminars in immunopathology* 38 (1), 57–74.

Didona, Dario/Maglie, Roberto/Eming, Rüdiger/Hertl, Michael (2019). Pemphigus: Current and Future Therapeutic Strategies. *Frontiers in immunology* 10, 1418.

Diepolder, H. M./Jung, M. C./Wierenga, E./Hoffmann, R. M./Zachoval, R./Gerlach, T. J./Scholz, S./Heavner, G./Riethmüller, G./Pape, G. R. (1996). Anergic TH1 clones specific for hepatitis B virus (HBV) core peptides are inhibitory to other HBV core-specific CD4+ T cells in vitro. *Journal of virology* 70 (11), 7540–7548.

Dolton, Garry/Zervoudi, Efthalia/Rius, Cristina/Wall, Aaron/Thomas, Hannah L./Fuller, Anna/Yeo, Lorraine/Legut, Mateusz/Wheeler, Sophie/Attaf, Meriem/Chudakov, Dmitriy M./Choy, Ernest/Peakman, Mark/Sewell, Andrew K. (2018). Optimized Peptide-MHC Multimer Protocols for Detection and Isolation of Autoimmune T-Cells. *Frontiers in immunology* 9, 1378.

Durie, F. H./Fava, R. A./Foy, T. M./Aruffo, A./Ledbetter, J. A./Noelle, R. J. (1993). Prevention of collagen-induced arthritis with an antibody to gp39, the ligand for CD40. *Science (New York, N.Y.)* 261 (5126), 1328–1330.

Eming, R. (2015). Pemphigus. Modellerkrankung für zielgerichtete Therapien. *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete* 66 (8), 574–582.

Eming, Rüdiger/Hennerici, Tina/Bäcklund, Johan/Feliciani, Claudio/Visconti, Kevin C./Willenborg, Sebastian/Wohde, Jessica/Holmdahl, Rikard/Sønderstrup, Grete/Hertl, Michael (2014). Pathogenic IgG antibodies against desmoglein 3 in pemphigus vulgaris are regulated by HLA-DRB1\*04:02-restricted T cells. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 193 (9), 4391–4399.

- Eming, Rüdiger/Nagel, Angela/Wolff-Franke, Sonja/Podstawa, Eva/Debus, Dirk/Hertl, Michael (2008). Rituximab exerts a dual effect in pemphigus vulgaris. *The Journal of investigative dermatology* 128 (12), 2850–2858.
- Eriksson, N. E./Holmen, A. (1996). Skin prick tests with standardized extracts of inhalant allergens in 7099 adult patients with asthma or rhinitis: cross-sensitizations and relationships to age, sex, month of birth and year of testing. *Journal of investigational allergology & clinical immunology* 6 (1), 36–46.
- Espié, Pascal/He, YanLing/Koo, Phillip/Sickert, Denise/Dupuy, Cyrielle/Chokoté, Edwige/Schuler, Roland/Mergentaler, Heidi/Ristov, Jacinda/Milojevic, Julie/Verles, Aurelie/Groenewegen, Andrea/Auger, Anita/Avrameas, Alexandre/Rotte, Michael/Colin, Laurence/Tomek, Charles S./Hernandez-Illas, Martha/Rush, James S./Gergely, Peter (2020). First-in-human clinical trial to assess pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety, and tolerability of iscalimab, an anti-CD40 monoclonal antibody. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 20 (2), 463–473.
- Ettinger, R./Kuchen, S./Lipsky, P. E. (2008). Interleukin 21 as a target of intervention in autoimmune disease. *Annals of the rheumatic diseases* 67 Suppl 3, iii83-6.
- Farrokhi, Shokrollah/Mousavi, Tahereh/Arshi, Saba/Javahertarash, Naser/Varasteh, Abdolreza/Falak, Reza/Rezaei, Nima/Salekmoghadam, Alireza (2010). Effect of treatment with intranasal corticosteroid and oral antihistamine on cytokine profiles of peripheral blood mononuclear cells of patients with allergic rhinitis sensitive to *chenopodium album*. *Iranian journal of allergy, asthma, and immunology* 9 (4), 225–230.
- Fathman, C. Garrison/Lineberry, Neil B. (2007). Molecular mechanisms of CD4+ T-cell anergy. *Nature reviews. Immunology* 7 (8), 599–609.
- Fiocchi, Alessandro/Pecora, Valentina/Petersson, Carl Johan/Dahdah, Lamia/Borres, Magnus P./Amengual, Maria J./Huss-Marp, Johannes/Mazzina, Oscar/Di Girolamo, Francesco (2015). Sensitization pattern to inhalant and food allergens in symptomatic children at first evaluation. *Italian journal of pediatrics* 41, 96.

- Ford, Tom/Wenden, Claire/Mbekeani, Alison/Dally, Len/Cox, Josephine H./Morin, Merribeth/Winstone, Nicola/Hill, Adrian V. S./Gilmour, Jill/Ewer, Katie J. (2017). Cryopreservation-related loss of antigen-specific IFN $\gamma$  producing CD4<sup>+</sup> T-cells can skew immunogenicity data in vaccine trials: Lessons from a malaria vaccine trial substudy. *Vaccine* 35 (15), 1898–1906.
- Franchimont, D. (2004). Overview of the actions of glucocorticoids on the immune response: a good model to characterize new pathways of immunosuppression for new treatment strategies. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1024, 124–137.
- Frenguelli, G./Spieksma, F. TH. M./Bricchi, E./Romano, B./Mincigrucci, G./Nikkels, A. H./Dankaart, W./Ferranti, F. (1991). The influence of air temperature on the starting dates of the pollen season of alnus and populus. *Grana* 30 (1), 196–200.
- Frentsch, Marco/Arbach, Olga/Kirchhoff, Dennis/Moewes, Beate/Worm, Margitta/Rothe, Martin/Scheffold, Alexander/Thiel, Andreas (2005). Direct access to CD4<sup>+</sup> T cells specific for defined antigens according to CD154 expression. *Nature medicine* 11 (10), 1118–1124.
- Frentsch, Marco/Stark, Regina/Matzmohr, Nadine/Meier, Sarah/Durlanik, Sibel/Schulz, Axel R./Stervbo, Ulrik/Jürchott, Karsten/Gebhardt, Friedemann/Heine, Guido/Reuter, Morgan A./Betts, Michael R./Busch, Dirk/Thiel, Andreas (2013). CD40L expression permits CD8<sup>+</sup> T cells to execute immunologic helper functions. *Blood* 122 (3), 405–412.
- Fukasawa, Chikako/Kawaguchi, Yasushi/Harigai, Masayoshi/Sugiura, Tomoko/Takagi, Kae/Kawamoto, Manabu/Hara, Masako/Kamatani, Naoyuki (2003). Increased CD40 expression in skin fibroblasts from patients with systemic sclerosis (SSc): role of CD40-CD154 in the phenotype of SSc fibroblasts. *European journal of immunology* 33 (10), 2792–2800.
- Fuleihan, R./Ramesh, N./Horner, A./Ahern, D./Belshaw, P. J./Alberg, D. G./Stamenkovic, I./Harmon, W./Geha, R. S. (1994). Cyclosporin A inhibits CD40 ligand expression in T lymphocytes. *The Journal of clinical investigation* 93 (3), 1315–1320.

- Futei, Y./Amagai, M./Sekiguchi, M./Nishifuji, K./Fujii, Y./Nishikawa, T. (2000). Use of domain-swapped molecules for conformational epitope mapping of desmoglein 3 in pemphigus vulgaris. *The Journal of investigative dermatology* 115 (5), 829–834.
- Garside, P./Ingulli, E./Merica, R. R./Johnson, J. G./Noelle, R. J./Jenkins, M. K. (1998). Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node. *Science (New York, N.Y.)* 281 (5373), 96–99.
- Gattringer, M./Baranyi, U./Pilat, N./Hock, K./Klaus, C./Ramsey, H. E./Wrba, F./Valenta, R./Wekerle, T. (2016). Anti-OX40L alone or in combination with anti-CD40L and CTLA4Ig does not inhibit the humoral and cellular response to a major grass pollen allergen. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 46 (2), 354–364.
- Geha, Raif S./Jabara, Haifa H./Brodeur, Scott R. (2003). The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination. *Nature reviews. Immunology* 3 (9), 721–732.
- Gell, P.G.H./Coombs, R.A.A (1963). The classification of allergic reactions underlying disease. *Clinical Aspects of Immunology* (Coombs, R.R.A and Gell, P.G.H., eds) Blackwell Science.
- Gerblich, A. A./Salik, H./Schuyler, M. R. (1991). Dynamic T-cell changes in peripheral blood and bronchoalveolar lavage after antigen bronchoprovocation in asthmatics. *The American review of respiratory disease* 143 (3), 533–537.
- Germain, Ronald N. (2002). T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nature reviews. Immunology* 2 (5), 309–322.
- Gerritse, K./Laman, J. D./Noelle, R. J./Aruffo, A./Ledbetter, J. A./Boersma, W. J./Claassen, E. (1996). CD40-CD40 ligand interactions in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (6), 2499–2504.
- Giordano, Cerrene N./Sinha, Animesh A. (2012). Cytokine networks in Pemphigus vulgaris: An integrated viewpoint. *Autoimmunity* 45 (6), 427–439.

- Girvin, Ann M./Dal Canto, Mauro C./Miller, Stephen D. (2002). CD40/CD40L interaction is essential for the induction of EAE in the absence of CD28-mediated co-stimulation. *Journal of autoimmunity* 18 (2), 83–94.
- Giurdanella, Federica/Fania, Luca/Gnarra, Maria/Toto, Paola/Di Rollo, Daniela/Sauder, Daniel N./Feliciani, Claudio (2013). A possible role for CD8+ T lymphocytes in the cell-mediated pathogenesis of pemphigus vulgaris. *Mediators of inflammation* 2013, 764290.
- Gómez, E./Fernández, T. D./Doña, I./Rondon, C./Campo, P./Gomez, F./Salas, M./Gonzalez, M./Perkins, J. R./Palomares, F./Blanca, M./Torres, M. J./Mayorga, C. (2015). Initial immunological changes as predictors for house dust mite immunotherapy response. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 45 (10), 1542–1553.
- Gorak-Stolinska, Patricia/Kemeny, David M./Noble, Alistair (2002). Activation-induced cell death in human T cells is a suicidal process regulated by cell density but superantigen induces T cell fratricide. *Cellular immunology* 219 (2), 98–107.
- Grau-López, L./Raïch, D./Ramo-Tello, C./Naranjo-Gómez, M./Dávalos, A./Pujol-Borrell, R./Borràs, F. E./Martínez-Cáceres, E. (2011). Specific T-cell proliferation to myelin peptides in relapsing-remitting multiple sclerosis. *European journal of neurology* 18 (8), 1101–1104.
- Grewal, I. S./Flavell, R. A. (1996a). The role of CD40 ligand in costimulation and T-cell activation. *Immunological reviews* 153, 85–106.
- Grewal, I. S./Flavell, R. A. (1998). CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annual review of immunology* 16, 111–135.
- Grewal, Iqbal S./Flavell, Richard A. (1996b). A central role of CD40 ligand in the regulation of CD4+ T-cell responses. *Immunology Today* 17 (9), 410–414.
- Griggs, N. D./Agersborg, S. S./Noelle, R. J./Ledbetter, J. A./Linsley, P. S./Tung, K. S. (1996). The relative contribution of the CD28 and gp39 costimulatory pathways in the clonal

- expansion and pathogenic acquisition of self-reactive T cells. *The Journal of experimental medicine* 183 (3), 801–810.
- Grishkan, Inna V./Ntranos, Achilles/Calabresi, Peter A./Gocke, Anne R. (2013). Helper T cells down-regulate CD4 expression upon chronic stimulation giving rise to double-negative T cells. *Cellular immunology* 284 (0), 68–74.
- Grousseau, J./Ffrench, M./Concha, M./Schmitt, D./Péguet-Navarro, J. (2000). CD40 ligation alters the cell cycle of differentiating keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology* 114 (3), 581–586.
- Gu, Zhao Wei/Wang, Yun Xiu/Cao, Zhi Wei (2017). Neutralization of interleukin-17 suppresses allergic rhinitis symptoms by downregulating Th2 and Th17 responses and upregulating the Treg response. *Oncotarget* 8 (14), 22361–22369.
- Hackett, Charles J./Sharma, Opendra K. (2002). Frontiers in peptide-MHC class II multimer technology. *Nature immunology* 3 (10), 887–889.
- Harman, K. E./Seed, P. T./Gratian, M. J./Bhagal, B. S./Challacombe, S. J./Black, M. M. (2001). The severity of cutaneous and oral pemphigus is related to desmoglein 1 and 3 antibody levels. *The British journal of dermatology* 144 (4), 775–780.
- Hashimoto, Tomomi/Akiyama, Kazuo/Kobayashi, Noriaki/Mori, Akio (2005). Comparison of IL-17 production by helper T cells among atopic and nonatopic asthmatics and control subjects. *International archives of allergy and immunology* 137 Suppl 1, 51–54.
- Hennerici, Tina/Pollmann, Robert/Schmidt, Thomas/Seipelt, Maria/Tackenberg, Björn/Möbs, Christian/Ghoreschi, Kamran/Hertl, Michael/Eming, Rüdiger (2016). Increased Frequency of T Follicular Helper Cells and Elevated Interleukin-27 Plasma Levels in Patients with Pemphigus. *PLoS ONE* 11 (2).
- Hermes, B./Worm, M./Nowak, F./Kroczyk, R. A./Stein, H./Henz, B. M. (1997). Upregulation of CD40 and CD40 ligand expression in IgE-associated cutaneous diseases. *Acta dermato-venereologica* 77 (6), 441–445.
- Hernandez, Maria Genevive H./Shen, Lianjun/Rock, Kenneth L. (2008). CD40 on APCs is needed for optimal programming, maintenance, and recall of CD8<sup>+</sup> T cell memory even

- in the absence of CD4+ T cell help. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 180 (7), 4382–4390.
- Hertl, M. (2000). Humoral and cellular autoimmunity in autoimmune bullous skin disorders. *International archives of allergy and immunology* 122 (2), 91–100.
- Hertl, M./Amagai, M./Sundaram, H./Stanley, J./Ishii, K./Katz, S. I. (1998a). Recognition of desmoglein 3 by autoreactive T cells in pemphigus vulgaris patients and normals. *The Journal of investigative dermatology* 110 (1), 62–66.
- 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, M. F. (2015). 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). *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV* 29 (3), 405–414.
- Hertl, M./Karr, R. W./Amagai, M./Katz, S. I. (1998b). Heterogeneous MHC II restriction pattern of autoreactive desmoglein 3 specific T cell responses in pemphigus vulgaris patients and normals. *The Journal of investigative dermatology* 110 (4), 388–392.
- Hertl, M./Schuler, G. (2002a). Bullöse Autoimmundermatosen. Teil 1: Klassifikation. *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete* 53 (3), 207-19; quiz 220-1.
- Hertl, M./Schuler, G. (2002b). Bullöse Autoimmundermatosen. Teil 3: Diagnostik und Therapie. *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete* 53 (5), 352-65; quiz 366-7.
- Hertl, Michael/Eming, Rüdiger/Veldman, Christian (2006). T cell control in autoimmune bullous skin disorders. *The Journal of clinical investigation* 116 (5), 1159–1166.
- Hertl, Michael/Veldman, Christian (2003). T-cellular autoimmunity against desmogleins in pemphigus, an autoantibody-mediated bullous disorder of the skin. *Autoimmunity reviews* 2 (5), 278–283.

- Heupel, Wolfgang-Moritz/Zillikens, Detlef/Drenckhahn, Detlev/Waschke, Jens (2008). Pemphigus vulgaris IgG directly inhibit desmoglein 3-mediated transinteraction. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 181 (3), 1825–1834.
- Hirromura, Yayoi/Kishida, Tsunao/Nakano, Hiroshi/Hama, Takemitsu/Imanishi, Jiro/Hisa, Yasuo/Mazda, Osam (2007). IL-21 administration into the nostril alleviates murine allergic rhinitis. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 179 (10), 7157–7165.
- Hodge, G./Hodge, S./Han, P. (2000). Increased levels of apoptosis of leukocyte subsets in cultured PBMCs compared to whole blood as shown by Annexin V binding: relevance to cytokine production. *Cytokine* 12 (12), 1763–1768.
- Hofmann, Maja A./Fluhr, Joachim W./Ruwwé-Glösenkamp, Christoph/Stevanovic, Katarina/Bergmann, Karl-Christian/Zuberbier, Torsten (2021). Role of IL-17 in atopy-A systematic review. *Clinical and translational allergy* 11 (6), e12047.
- Holstein, Julia/Solimani, Farzan/Baum, Carolin/Meier, Katharina/Pollmann, Robert/Didona, Dario/Tekath, Tobias/Dugas, Martin/Casadei, Nicolas/Hudemann, Christoph/Polakova, Alexandra/Matthes, Jakob/Schäfer, Iris/Yazdi, Amir S./Eming, Rüdiger/Hertl, Michael/Pfützner, Wolfgang/Ghoreschi, Kamran/Möbs, Christian (2021). Immunophenotyping in pemphigus reveals a TH17/TFH17 cell-dominated immune response promoting desmoglein1/3-specific autoantibody production. *The Journal of allergy and clinical immunology* 147 (6), 2358–2369.
- Huang, Jing-Long/Chen, Li-Chen/Yeh, Kno-Wei/Lin, Syh-Jae/Hsieh, Kue-Hsiung/Kuo, Ming-Ling (2003). TH1 and TH2 cytokine production among asthmatic children after immunotherapy. *The Journal of asthma : official journal of the Association for the Care of Asthma* 40 (3), 273–279.
- Huang, Shuli/Mao, Jing/Zhou, Lin/Xiong, Xia/Deng, Yongqiong (2019). The imbalance of gut microbiota and its correlation with plasma inflammatory cytokines in pemphigus vulgaris patients. *Scandinavian journal of immunology* 90 (3), e12799.
- Huang, Xuekun/Chen, Yulian/Zhang, Fucheng/Yang, Qintai/Zhang, Gehua (2014). Peripheral Th17/Treg cell-mediated immunity imbalance in allergic rhinitis patients. *Brazilian journal of otorhinolaryngology* 80 (2), 152–155.

- Huang, Xuekun/Yang, Qintai/Chen, Yulian/Li, Peng/Zhang, Gehua/Li, Yuan (2011). Expressions of IL-17, IL-21 and IL-23 in the Serum of Allergic Rhinitis Patients. *Journal of Medical Biochemistry* 30 (4), 323–327.
- Hudemann, Christoph/Maglie, Roberto/Llamazares-Prada, Maria/Beckert, Benedikt/Didona, Dario/Tikkanen, Ritva/Schmitt, Thomas/Hashimoto, Takashi/Waschke, Jens/Hertl, Michael/Eming, Rüdiger (2022). Human Desmocollin 3–Specific IgG Antibodies Are Pathogenic in a Humanized HLA Class II Transgenic Mouse Model of Pemphigus. *The Journal of investigative dermatology* 142 (3 Pt B), 915-923.e3.
- Ioannides, D./Chrysomallis, F./Bystryn, J. C. (2000). Ineffectiveness of cyclosporine as an adjuvant to corticosteroids in the treatment of pemphigus. *Archives of dermatology* 136 (7), 868–872.
- Ishii, K./Amagai, M./Hall, R. P./Hashimoto, T./Takayanagi, A./Gamou, S./Shimizu, N./Nishikawa, T. (1997). Characterization of autoantibodies in pemphigus using antigen-specific enzyme-linked immunosorbent assays with baculovirus-expressed recombinant desmogleins. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 159 (4), 2010–2017.
- Jabara, H. H./Brodeur, S. R./Geha, R. S. (2001). Glucocorticoids upregulate CD40 ligand expression and induce CD40L-dependent immunoglobulin isotype switching. *The Journal of clinical investigation* 107 (3), 371–378.
- Janeway, Charles A./Medzhitov, Ruslan (2002). Innate immune recognition. *Annual review of immunology* 20, 197–216.
- Jantunen, Juha/Saarinen, Kimmo/Rantio-Lehtimäki, Auli (2012). Allergy symptoms in relation to alder and birch pollen concentrations in Finland. *Aerobiologia* 28 (2), 169–176.
- Jarolim, E./Rumpold, H./Endler, A. T./Ebner, H./Breitenbach, M./Scheiner, O./Kraft, D. (1989). IgE and IgG antibodies of patients with allergy to birch pollen as tools to define the allergen profile of *Betula verrucosa*. *Allergy* 44 (6), 385–395.

- Jensen, J./Krakauer, M./Sellebjerg, F. (2001). Increased T cell expression of CD154 (CD40-ligand) in multiple sclerosis. *European journal of neurology* 8 (4), 321–328.
- Jeurink, Prescilla V./Vissers, Yvonne M./Rappard, Bianca/Savelkoul, Huub F. J. (2008). T cell responses in fresh and cryopreserved peripheral blood mononuclear cells: kinetics of cell viability, cellular subsets, proliferation, and cytokine production. *Cryobiology* 57 (2), 91–103.
- Jin, Bo/Sun, Tao/Yu, Xiao-Hong/Yang, Ying-Xiang/Yeo, Anthony E. T. (2012). The effects of TLR activation on T-cell development and differentiation. *Clinical & developmental immunology* 2012, 836485.
- Jin, Li/Yu, Daliang/Li, Xiaomei/Yu, Ning/Li, Xiangpei/Wang, Yuanmin/Wang, Yiping (2014). CD4+CXCR5+ follicular helper T cells in salivary gland promote B cells maturation in patients with primary Sjogren's syndrome. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 7 (5), 1988–1996.
- Joly, Pascal/Maho-Vaillant, Maud/Prost-Squarcioni, Catherine/Hebert, Vivien/Houivet, Estelle/Calbo, Sébastien/Caillot, Frédérique/Golinski, Marie Laure/Labeille, Bruno/Picard-Dahan, Catherine/Paul, Carle/Richard, Marie-Aleth/Bouaziz, Jean David/Duvert-Lehembre, Sophie/Bernard, Philippe/Caux, Frederic/Alexandre, Marina/Ingen-Housz-Oro, Saskia/Vabres, Pierre/Delaporte, Emmanuel/Quereux, Gaele/Dupuy, Alain/Debarbieux, Sebastien/Avenel-Audran, Martine/D'Incan, Michel/Bedane, Christophe/Bénéton, Nathalie/Jullien, Denis/Dupin, Nicolas/Misery, Laurent/Machet, Laurent/Beylot-Barry, Marie/Dereure, Olivier/Sassolas, Bruno/Vermeulin, Thomas/Benichou, Jacques/Musette, Philippe (2017). 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. *The Lancet* 389 (10083), 2031–2040.
- Jordakieva, Galateja/Jensen-Jarolim, Erika (2018). The impact of allergen exposure and specific immunotherapy on circulating blood cells in allergic rhinitis. *The World Allergy Organization journal* 11 (1), 19.

- Jung, Thomas/Schauer, Uwe/Heusser, Christoph/Neumann, Christine/Rieger, Christian (1993). Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *Journal of immunological methods* 159 (1-2), 197–207.
- Jutel, M./Watanabe, T./Klunker, S./Akdis, M./Thomet, O. A./Malolepszy, J./Zak-Nejmark, T./Koga, R./Kobayashi, T./Blaser, K./Akdis, C. A. (2001). Histamine regulates T-cell and antibody responses by differential expression of H1 and H2 receptors. *Nature* 413 (6854), 420–425.
- Kalyuzhny, Alexander E. (2005). Chemistry and biology of the ELISPOT assay. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 302, 15–31.
- Kamradt, T./Mitchison, N. A. (2001). Tolerance and autoimmunity. *The New England journal of medicine* 344 (9), 655–664.
- Karnell, Jodi L./Albulescu, Marius/Drabic, Stacey/Wang, Liangwei/Moate, Rachel/Baca, Manuel/Oganessian, Vaheh/Gunsior, Michele/Thisted, Thomas/Yan, Li/Li, Jing/Xiong, Ximing/Eck, Steven C./Los Reyes, Melissa de/Yusuf, Isharat/Streicher, Katie/Müller-Ladner, Ulf/Howe, David/Ettinger, Rachel/Herbst, Ronald/Drappa, Jörn (2019a). A CD40L-targeting protein reduces autoantibodies and improves disease activity in patients with autoimmunity. *Science translational medicine* 11 (489).
- Karnell, Jodi L./Rieder, Sadiye Amcaoglu/Ettinger, Rachel/Kolbeck, Roland (2019b). Targeting the CD40-CD40L pathway in autoimmune diseases: Humoral immunity and beyond. *Advanced drug delivery reviews* 141, 92–103.
- Kasperkiewicz, Michael/Eming, Rüdiger/Behzad, Melika/Hunzelmann, Nicolas/Meurer, Michael/Schulze-Koops, Hendrik/Wussow, Peter von/Hertl, Michael/Zillikens, Detlef/Freivogel, Klaus/Dörner, Thomas/Schmidt, Enno (2012). Efficacy and safety of rituximab in pemphigus: experience of the German Registry of Autoimmune Diseases. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG* 10 (10), 727–732.
- Kato, K./Santana-Sahagún, E./Rassenti, L. Z./Weisman, M. H./Tamura, N./Kobayashi, S./Hashimoto, H./Kipps, T. J. (1999). The soluble CD40 ligand sCD154 in systemic lupus erythematosus. *The Journal of clinical investigation* 104 (7), 947–955.

- Kawabe, Tsutomu/Naka, Tetsuji/Yoshida, Kanji/Tanaka, Takashi/Fujiwara, Hiroshi/Suematsu, Sachiko/Yoshida, Nobuaki/Kishimoto, Tadamitsu/Kikutani, Hitoshi (1994). The immune responses in CD40-deficient mice: Impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity* 1 (3), 167–178.
- Kawai, Tatsuo/Andrews, David/Colvin, Robert B./Sachs, David H./Cosimi, A. Benedict (2000). Thromboembolic complications after treatment with monoclonal antibody against CD40 ligand. *Nature medicine* 6 (2), 114.
- Kay, A. B. (2001). Allergy and allergic diseases. Second of two parts. *The New England journal of medicine* 344 (2), 109–113.
- Keil, A. (2006). Vergleich der Interleukin- und CD154-Expression in T-Zell-Kulturen von gesunden und allergischen Kindern vor und nach spezifischer Immuntherapie.
- Kelsall, B. L./Stüber, E./Neurath, M./Strober, W. (1996). Interleukin-12 production by dendritic cells. The role of CD40-CD40L interactions in Th1 T-cell responses. *Annals of the New York Academy of Sciences* 795, 116–126.
- Keskin, Derin B./Stern, Joel N. H./Fridkis-Hareli, Masha/Razzaque Ahmed, A. (2008). Cytokine profiles in pemphigus vulgaris patients treated with intravenous immunoglobulins as compared to conventional immunosuppressive therapy. *Cytokine* 41 (3), 315–321.
- Kirchhoff, Dennis/Frentsch, Marco/Leclerk, Patrick/Bumann, Dirk/Rausch, Sebastian/Hartmann, Susanne/Thiel, Andreas/Scheffold, Alexander (2007). Identification and isolation of murine antigen-reactive T cells according to CD154 expression. *European journal of immunology* 37 (9), 2370–2377.
- Kishida, Tsunao/Hiromura, Yayoi/Shin-Ya, Masaharu/Asada, Hidetsugu/Kuriyama, Hiroko/Sugai, Manabu/Shimizu, Akira/Yokota, Yoshifumi/Hama, Takemitsu/Imanishi, Jiro/Hisa, Yasuo/Mazda, Osam (2007). IL-21 induces inhibitor of differentiation 2 and leads to complete abrogation of anaphylaxis in mice. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 179 (12), 8554–8561.

- Klausner, R. D./Donaldson, J. G./Lippincott-Schwartz, J. (1992). Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *The Journal of cell biology* 116 (5), 1071–1080.
- Kloverpris, Henrik/Fomsgaard, Anders/Handley, Amanda/Ackland, Jim/Sullivan, Mark/Goulder, Philip (2010). Dimethyl sulfoxide (DMSO) exposure to human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) abolish T cell responses only in high concentrations and following coincubation for more than two hours. *Journal of immunological methods* 356 (1-2), 70–78.
- Kneisel, Andrea/Hertl, Michael (2011). Autoimmune bullous skin diseases. Part 1: Clinical manifestations. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG* 9 (10), 844-56; quiz 857.
- Koch, P. J./Mahoney, M. G./Ishikawa, H./Pulkkinen, L./Uitto, J./Shultz, L./Murphy, G. F./Whitaker-Menezes, D./Stanley, J. R. (1997). Targeted disruption of the pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3) gene in mice causes loss of keratinocyte cell adhesion with a phenotype similar to pemphigus vulgaris. *The Journal of cell biology* 137 (5), 1091–1102.
- Komura, Kazuhiro/Fujimoto, Manabu/Matsushita, Takashi/Yanaba, Koichi/Kodera, Masanari/Kawasuji, Ayako/Hasegawa, Minoru/Takehara, Kazuhiko/Sato, Shinichi (2007). Increased serum soluble CD40 levels in patients with systemic sclerosis. *The Journal of rheumatology* 34 (2), 353–358.
- Korthäuer, U./Graf, D./Mages, H. W./Brière, F./Padayachee, M./Malcolm, S./Ugazio, A. G./Notarangelo, L. D./Levinsky, R. J./Kroczeck, R. A. (1993). Defective expression of T-cell CD40 ligand causes X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Nature* 361 (6412), 539–541.
- Koulu, L./Kusumi, A./Steinberg, M. S./Klaus-Kovtun, V./Stanley, J. R. (1984). Human autoantibodies against a desmosomal core protein in pemphigus foliaceus. *The Journal of experimental medicine* 160 (5), 1509–1518.

- Kowalski, Eric H./Kneibner, Diana/Kridin, Khalaf/Amber, Kyle T. (2019). Serum and blister fluid levels of cytokines and chemokines in pemphigus and bullous pemphigoid. *Autoimmunity reviews* 18 (5), 526–534.
- Kreher, Christian R./Dittrich, Markus T./Guertkov, Robert/Boehm, Bernhard O./Tary-Lehmann, Magdalena (2003). CD4+ and CD8+ cells in cryopreserved human PBMC maintain full functionality in cytokine ELISPOT assays. *Journal of immunological methods* 278 (1-2), 79–93.
- Kridin, Khalaf (2018). Pemphigus group: overview, epidemiology, mortality, and comorbidities. *Immunologic research* 66 (2), 255–270.
- Kvarnström, M./Jenmalm, M. C./Ekerfelt, C. (2004). Effect of cryopreservation on expression of Th1 and Th2 cytokines in blood mononuclear cells from patients with different cytokine profiles, analysed with three common assays: an overall decrease of interleukin-4. *Cryobiology* 49 (2), 157–168.
- Kwok, William W./Roti, Michelle/DeLong, Jonathan H./Tan, Venus/Wambre, Erik/James, Eddie A./Robinson, David (2010). Direct ex vivo analysis of allergen-specific CD4+ T cells. *The Journal of allergy and clinical immunology* 125 (6), 1407-1409.e1.
- Kwon, E. J./Yamagami, J./Nishikawa, T./Amagai, M. (2008). Anti-desmoglein IgG autoantibodies in patients with pemphigus in remission. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV* 22 (9), 1070–1075.
- Lagier, Béatrice/Pons, Nathalie/Rivier, Agnès/Chanal, Isabelle/Chanez, Pascal/Bousquet, Jean/Pène, Jérôme (1995). Seasonal variations of interleukin-4 and interferon- $\gamma$  release by peripheral blood mononuclear cells from atopic subjects stimulated by polyclonal activators. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 96 (6), 932–940.
- Laman, Jon D./Claassen, Eric/Noelle, Randolph J. (2017). Functions of CD40 and Its Ligand, gp39 (CD40L). *Critical reviews in immunology* 37 (2-6), 371–420.
- Larché, Mark/Akdis, Cezmi A./Valenta, Rudolf (2006). Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nature reviews. Immunology* 6 (10), 761–771.

- Lederman, S./Yellin, M. J./Krichevsky, A./Belko, J./Lee, J. J./Chess, L. (1992). Identification of a novel surface protein on activated CD4<sup>+</sup> T cells that induces contact-dependent B cell differentiation (help). *The Journal of experimental medicine* 175 (4), 1091–1101.
- Lee, Byung O./Haynes, Laura/Eaton, Sheri M./Swain, Susan L./Randall, Troy D. (2002). The biological outcome of CD40 signaling is dependent on the duration of CD40 ligand expression: reciprocal regulation by interleukin (IL)-4 and IL-12. *The Journal of experimental medicine* 196 (5), 693–704.
- Lee, Sang Hee/Hong, Won Jin/Kim, Soo-Chan (2017). Analysis of Serum Cytokine Profile in Pemphigus. *Annals of dermatology* 29 (4), 438–445.
- Leehan, Kerry M./Koelsch, Kristi A. (2015). T Cell ELISPOT: For the Identification of Specific Cytokine-Secreting T Cells. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 1312, 427–434.
- Lemieux, Jennifer/Jobin, Christine/Simard, Carl/Néron, Sonia (2016). A global look into human T cell subsets before and after cryopreservation using multiparametric flow cytometry and two-dimensional visualization analysis. *Journal of immunological methods* 434, 73–82.
- Lenz, P./Amagai, M./Volc-Platzer, B./Stingl, G./Kimbauer, R. (1999). Desmoglein 3-ELISA: a pemphigus vulgaris-specific diagnostic tool. *Archives of dermatology* 135 (2), 143–148.
- Leonard, C./Tormey, V./Burke, C./Poulter, L. W. (1997). Allergen-induced cytokine production in atopic disease and its relationship to disease severity. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 17 (3), 368–375.
- Leshem, Y. A./David, M./Hodak, E./Waitman, D. A./Vardy, D./Israeli, M./Eskin-Schwartz, M./Bergman, R./Mimouni, D. (2014). A prospective study on clinical response and cell-mediated immunity of pemphigus patients treated with rituximab. *Archives of dermatological research* 306 (1), 67–74.

- Li, Qiuju/Liu, Zhenfeng/Dang, Erle/Jin, Liang/He, Zheng/Yang, Luting/Shi, Xiaowei/Wang, Gang (2013). Follicular Helper T Cells (Tfh) and IL-21 Involvement in the Pathogenesis of Bullous Pemphigoid. *PLoS ONE* 8 (7).
- Lim, Megan S./Straus, Stephen E./Dale, Janet K./Fleisher, Thomas A./Stetler-Stevenson, Maryalice/Strober, Warren/Sneller, Michael C./Puck, Jennifer M./Lenardo, Michael J./Elenitoba-Johnson, Kojo S.J./Lin, Albert Y./Raffeld, Mark/Jaffe, Elaine S. (1998). Pathological Findings in Human Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome. *The American Journal of Pathology* 153 (5), 1541–1550.
- Lin, M. S./Swartz, S. J./Lopez, A./Ding, X./Fernandez-Vina, M. A./Stastny, P./Fairley, J. A./Diaz, L. A. (1997). Development and characterization of desmoglein-3 specific T cells from patients with pemphigus vulgaris. *The Journal of clinical investigation* 99 (1), 31–40.
- Lindén, A./Adachi, M. (2002). Neutrophilic airway inflammation and IL-17. *Allergy* 57 (9), 769–775.
- Linhart, Birgit/Bigenzahn, Sinda/Hartl, Arnulf/Lupinek, Christian/Thalhamer, Josef/Valenta, Rudolf/Wekerle, Thomas (2007). Costimulation blockade inhibits allergic sensitization but does not affect established allergy in a murine model of grass pollen allergy. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 178 (6), 3924–3931.
- Liu, Haiyan/Rhodes, Michele/Wiest, David L./Vignali, Dario A.A (2000). On the Dynamics of TCR:CD3 Complex Cell Surface Expression and Downmodulation. *Immunity* 13 (5), 665–675.
- Liu, Yong/Zhao, Pingwei/Qu, Zhihui/Ayana, Desalegn Admassu/Jiang, Yanfang (2014). Frequency of CD4+CXCR5+ TFH cells in patients with hepatitis b virus-associated membranous nephropathy. *International Immunopharmacology* 22 (1), 98–106.
- Luckheeram, Rishi Vishal/Zhou, Rui/Verma, Asha Devi/Xia, Bing (2012). CD4<sup>+</sup>T cells: differentiation and functions. *Clinical & developmental immunology* 2012, 925135.
- Lüthje, Katja/Kallies, Axel/Shimohakamada, Yoko/Belz, Gabrielle T./Light, Amanda/Tarlinton, David M./Nutt, Stephen L. (2012). The development and fate of

- follicular helper T cells defined by an IL-21 reporter mouse. *Nature immunology* 13 (5), 491–498.
- Luttmann, Werner/Bratke, Kai/Küpper, Michael/Myrtek, Daniel (2014). *Der Experimentator: Immunologie*. 4. Aufl. Berlin/Heidelberg, Springer Spektrum.
- Ma, Cindy S./Deenick, Elissa K./Batten, Marcel/Tangye, Stuart G. (2012). The origins, function, and regulation of T follicular helper cells. *The Journal of experimental medicine* 209 (7), 1241–1253.
- Macfarlane, Alison J./Kon, Onn M./Smith, Susan J./Zeibecoglou, Kyriaki/Khan, L.Nasreen/Barata, Luis T./McEuen, Alan R./Buckley, Mark G./Walls, Andrew F./Meng, Qiu/Humbert, Marc/Barnes, Neil C./Robinson, Douglas S./Ying, Sun/Kay, A.Barry (2000). Basophils, eosinophils, and mast cells in atopic and nonatopic asthma and in late-phase allergic reactions in the lung and skin. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 105 (1), 99–107.
- Mackey, M. F./Barth, R. J./Noelle, R. J. (1998). The role of CD40/CD154 interactions in the priming, differentiation, and effector function of helper and cytotoxic T cells. *Journal of leukocyte biology* 63 (4), 418–428.
- Maggi, E. (1998). The TH1/TH2 paradigm in allergy. *Immunotechnology : an international journal of immunological engineering* 3 (4), 233–244.
- Mahoney, M. G./Wang, Z./Rothenberger, K./Koch, P. J./Amagai, M./Stanley, J. R. (1999). Explanations for the clinical and microscopic localization of lesions in pemphigus foliaceus and vulgaris. *The Journal of clinical investigation* 103 (4), 461–468.
- Mao, Xuming/Payne, Aimee S. (2008). Seeking approval: Present and future therapies for pemphigus vulgaris. *Current opinion in investigational drugs (London, England : 2000)* 9 (5), 497–504.
- Masjedi, Mohsen/Esmail, Nafiseh/Saffaei, Ali/Abtahi-Naeini, Bahareh/Pourazizi, Mohsen/Haghjooy Javanmard, Shaghayegh/Asilian, Ali (2017). Cytokine Indexes in Pemphigus Vulgaris: Perception of Its Immunopathogenesis and Hopes for Non-Steroidal Treatment. *Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR* 16 (3), 1223–1229.

- McDyer, John F./Li, Zhuqing/John, Susan/Yu, Xiang/Wu, Chang-You/Ragheb, Jack A. (2002). IL-2 receptor blockade inhibits late, but not early, IFN-gamma and CD40 ligand expression in human T cells: disruption of both IL-12-dependent and -independent pathways of IFN-gamma production. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 169 (5), 2736–2746.
- McLaughlin, Bridget E./Baumgarth, Nicole/Bigos, Martin/Roederer, Mario/Rosa, Stephen C. de/Altman, John D./Nixon, Douglas F./Ottinger, Janet/Oxford, Carol/Evans, Thomas G./Asmuth, David M. (2008). Nine-color flow cytometry for accurate measurement of T cell subsets and cytokine responses. Part I: Panel design by an empiric approach. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* 73 (5), 400–410.
- Meier, Sarah/Stark, Regina/Frentsch, Marco/Thiel, Andreas (2008). The influence of different stimulation conditions on the assessment of antigen-induced CD154 expression on CD4+ T cells. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* 73 (11), 1035–1042.
- Möbs, Christian/Slotoch, Caroline/Löffler, Harald/Jakob, Thilo/Hertl, Michael/Pfützner, Wolfgang (2010). Birch pollen immunotherapy leads to differential induction of regulatory T cells and delayed helper T cell immune deviation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 184 (4), 2194–2203.
- Mohan, C./Shi, Y./Laman, J. D./Datta, S. K. (1995). Interaction between CD40 and its ligand gp39 in the development of murine lupus nephritis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 154 (3), 1470–1480.
- Mohrs, Katja/Wakil, Adil E./Killeen, Nigel/Locksley, Richard M./Mohrs, Markus (2005). A two-step process for cytokine production revealed by IL-4 dual-reporter mice. *Immunity* 23 (4), 419–429.
- Moll, R./Moll, I. (1998). Epidermal adhesion molecules and basement membrane components as target structures of autoimmunity. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 432 (6), 487–504.

- Moon, Jung Lee/Kim, Sung Youl/Shin, Seoung Woo/Park, Jeen-Woo (2012). Regulation of brefeldin A-induced ER stress and apoptosis by mitochondrial NADP<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase. *Biochemical and biophysical research communications* 417 (2), 760–764.
- Moreland, Larry W. (Hg.) (2004). *Rheumatology and Immunology Therapy*. Berlin/Heidelberg, Springer-Verlag.
- Mortazavi, Hossein/Esmaili, Nafiseh/Khezri, Somayeh/Khamesipour, Ali/Vasheghani Farahani, Iman/Daneshpazhooh, Maryam/Rezaei, Nima (2014). The effect of conventional immunosuppressive therapy on cytokine serum levels in pemphigus vulgaris patients. *Iranian journal of allergy, asthma, and immunology* 13 (3), 174–183.
- Mosmann, T. R./Cherwinski, H./Bond, M. W./Giedlin, M. A./Coffman, R. L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 136 (7), 2348–2357.
- Mosmann, Tim R./Sad, Subash (1996). The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunology Today* 17 (3), 138–146.
- Motel-Klingebiel, Andreas/Klaus, Daniela/Simonson, Julia (2019). Befragungen von älteren und alten Menschen. In: Nina Baur/Jörg Blasius (Hg.). *Handbuch Methoden der empirischen Sozialforschung*. Wiesbaden, Springer Fachmedien Wiesbaden, 935–942.
- Movérare, Robert/Westritschnig, Kerstin/Svensson, Margareta/Hayek, Brigitte/Bende, Mats/Pauli, Gabrielle/Sorva, Ritva/Haahtela, Tari/Valenta, Rudolf/Elfman, Lena (2002). Different IgE reactivity profiles in birch pollen-sensitive patients from six European populations revealed by recombinant allergens: an imprint of local sensitization. *International archives of allergy and immunology* 128 (4), 325–335.
- Mura, Marie/Chaudhury, Sidhartha/Farooq, Fouzia/Duncan, Elizabeth H./Beck, Kevin/Bergmann-Leitner, Elke S. (2020). Optimized flow cytometric protocol for the detection of functional subsets of low frequency antigen-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. *MethodsX* 7, 101005.

Murrell, Dedee F./Dick, Sarah/Ahmed, A. R./Amagai, Masayuki/Barnadas, Maria A./Borradori, Luca/Bystryn, Jean-Claude/Cianchini, Giuseppe/Diaz, Luis/Fivenson, David/Hall, Russell/Harman, Karen E./Hashimoto, Takashi/Hertl, Michael/Hunzelmann, Nico/Iranzo, Pilar/Joly, Pascal/Jonkman, Marcel F./Kitajima, Yasuo/Korman, Neil J./Martin, Linda K./Mimouni, Daniel/Pandya, Amit G./Payne, Aimee S./Rubenstein, David/Shimizu, Hiroshi/Sinha, Animesh A./Sirois, David/Zillikens, Detlef/Werth, Victoria P. (2008). Consensus statement on definitions of disease, end points, and therapeutic response for pemphigus. *Journal of the American Academy of Dermatology* 58 (6), 1043–1046.

Murrell, Dedee F./Peña, Sandra/Joly, Pascal/Marinovic, Branka/Hashimoto, Takashi/Diaz, Luis A./Sinha, Animesh A./Payne, Aimee S./Daneshpazhooh, Maryam/Eming, Rüdiger/Jonkman, Marcel F./Mimouni, Daniel/Borradori, Luca/Kim, Soo-Chan/Yamagami, Jun/Lehman, Julia S./Saleh, Marwah Adly/Culton, Donna A./Czernik, Annette/Zone, John J./Fivenson, David/Ujiie, Hideyuki/Wozniak, Katarzyna/Akman-Karakaş, Ayşe/Bernard, Philippe/Korman, Neil J./Caux, Frédéric/Drenovska, Kossara/Prost-Squarcioni, Catherine/Vassileva, Snejina/Feldman, Ron J./Cardones, Adela Rambli/Bauer, Johann/Ioannides, Dimitrios/Jedlickova, Hana/Palisson, Francis/Patsatsi, Aikaterini/Uzun, Soner/Yayli, Savas/Zillikens, Detlef/Amagai, Masayuki/Hertl, Michael/Schmidt, Enno/Aoki, Valeria/Grando, Sergei A./Shimizu, Hiroshi/Baum, Sharon/Cianchini, Guiseppe/Feliciani, Claudio/Iranzo, Pilar/Mascaró, Jose M./Kowalewski, Cezary/Hall, Russell/Groves, Richard/Harman, Karen E./Marinkovich, M. Peter/Maverakis, Emanuel/Werth, Victoria P. (2020). Diagnosis and management of pemphigus: Recommendations of an international panel of experts. *Journal of the American Academy of Dermatology* 82 (3), 575-585.e1.

Nagafuchi, H./Shimoyama, Y./Kashiwakura, J./Takeno, M./Sakane, T./Suzuki, N. (2003). Preferential expression of B7.2 (CD86), but not B7.1 (CD80), on B cells induced by CD40/CD40L interaction is essential for anti-DNA autoantibody production in patients with systemic lupus erythematosus. *Clinical and experimental rheumatology* 21 (1), 71–77.

Nagel, Angela/Lang, Angelika/Engel, Dorothee/Podstawa, Eva/Hunzelmann, Nicolas/Pita, Ornella de/Borradori, Luca/Uter, Wolfgang/Hertl, Michael (2010). Clinical activity of

- pemphigus vulgaris relates to IgE autoantibodies against desmoglein 3. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* 134 (3), 320–330.
- Nakada, Emily M./Shan, Jichuan/Kinyanjui, Margaret W./Fixman, Elizabeth D. (2014). Adjuvant-dependent regulation of interleukin-17 expressing  $\gamma\delta$  T cells and inhibition of Th2 responses in allergic airways disease. *Respiratory research* 15, 90.
- Nakae, Susumu/Komiyama, Yutaka/Nambu, Aya/Sudo, Katsuko/Iwase, Michiko/Homma, Ikuo/Sekikawa, Kenji/Asano, Masahide/Iwakura, Yoichiro (2002). Antigen-Specific T Cell Sensitization Is Impaired in IL-17-Deficient Mice, Causing Suppression of Allergic Cellular and Humoral Responses. *Immunity* 17 (3), 375–387.
- Nakstad, B./Kähler, H./Lyberg, T. (1999). Allergen-stimulated expression of CD154 (CD40 ligand) on CD3+ lymphocytes in atopic, but not in nonatopic individuals. Modulation by bacterial lipopolysaccharide. *Allergy* 54 (7), 722–729.
- Neefjes, Jacques/Jongsma, Marlieke L. M./Paul, Petra/Bakke, Oddmund (2011). Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nature reviews. Immunology* 11 (12), 823–836.
- Nguyen, V. T./Ndoye, A./Shultz, L. D./Pittelkow, M. R./Grando, S. A. (2000). Antibodies against keratinocyte antigens other than desmogleins 1 and 3 can induce pemphigus vulgaris-like lesions. *The Journal of clinical investigation* 106 (12), 1467–1479.
- Nishifuji, K./Amagai, M./Kuwana, M./Iwasaki, T./Nishikawa, T. (2000). Detection of antigen-specific B cells in patients with pemphigus vulgaris by enzyme-linked immunospot assay: requirement of T cell collaboration for autoantibody production. *The Journal of investigative dermatology* 114 (1), 88–94.
- Noelle, R. J./Roy, M./Shepherd, D. M./Stamenkovic, I./Ledbetter, J. A./Aruffo, A. (1992). A 39-kDa protein on activated helper T cells binds CD40 and transduces the signal for cognate activation of B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (14), 6550–6554.
- Nomura, Takayasu/Suzuki, Motohiko/Yokota, Makoto/Nakamura, Yoshihisa/Ozeki, Kazuyoshi/Ito, Yasuhiko/Tsuge, Ikuya/Saitoh, Shinji (2016). Effect of Japanese cedar-

- specific sublingual immunotherapy on allergen-specific TH2 cell counts in blood. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology* 117 (1), 72-78.e4.
- Nousari, Hossein C./Anhalt, Grant J. (1999). Pemphigus and bullous pemphigoid. *The Lancet* 354 (9179), 667–672.
- Oboki, Keisuke/Ohno, Tatsukuni/Saito, Hirohisa/Nakae, Susumu (2008). Th17 and allergy. *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology* 57 (2), 121–134.
- O'Neil-Andersen, Nancy J./Lawrence, David A. (2002). Differential modulation of surface and intracellular protein expression by T cells after stimulation in the presence of monensin or brefeldin A. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 9 (2), 243–250.
- Or, Reuven/Renz, Harald/Terada, Naohiro/Gelfand, Erwin W. (1992). IL-4 and IL-2 promote human T-cell proliferation through symmetrical but independent pathways. *Clinical Immunology and Immunopathology* 64 (3), 210–217.
- Ozaki, Katsutoshi/Spolski, Rosanne/Feng, Carl G./Qi, Chen-Feng/Cheng, Jun/Sher, Alan/Morse, Herbert C./Liu, Chengyu/Schwartzberg, Pamela L./Leonard, Warren J. (2002). A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production. *Science (New York, N.Y.)* 298 (5598), 1630–1634.
- Packard, Kathleen A./Khan, Manzoor M. (2003). Effects of histamine on Th1/Th2 cytokine balance. *International Immunopharmacology* 3 (7), 909–920.
- Pan, Meng/Zhu, Haiqin/Xu, Renchao (2015). Immune cellular regulation on autoantibody production in pemphigus. *The Journal of dermatology* 42 (1), 11–17.
- Payne, Aimee S./Hanakawa, Yasushi/Amagai, Masayuki/Stanley, John R. (2004). Desmosomes and disease: pemphigus and bullous impetigo. *Current opinion in cell biology* 16 (5), 536–543.
- Peter, Hans-Hartmut/Albert, Michael (2012). *Klinische Immunologie. Mit dem Plus im Web ; Zugangscode im Buch*. 3. Aufl. München, Elsevier Urban & Fischer.

- Peternel, Renata/Srnc, Lidija/Culig, Josip/Zaninović, Ksenija/Mitić, Božena/Vukusić, Ivan (2004). Atmospheric pollen season in Zagreb (Croatia) and its relationship with temperature and precipitation. *International journal of biometeorology* 48 (4), 186–191.
- Peters, Anna L./Stunz, Laura L./Bishop, Gail A. (2009). CD40 and autoimmunity: the dark side of a great activator. *Seminars in immunology* 21 (5), 293–300.
- Petersen, C.Munck/Christensen, E.Ilsø/Andresen, B.Storstein/Møller, B. K. (1992). Internalization, lysosomal degradation and new synthesis of surface membrane CD4 in phorbol ester-activated T-lymphocytes and U-937 cells. *Experimental cell research* 201 (1), 160–173.
- Polakova, Alexandra/Kauter, Leonie/Ismagambetova, Adina/Didona, Dario/Solimani, Farzan/Ghoreschi, Kamran/Hertl, Michael/Möbs, Christian/Hudemann, Christoph (2022). Detection of rare autoreactive T cell subsets in patients with pemphigus vulgaris. *Frontiers in immunology* 13, 979277.
- Pollmann, Robert/Schmidt, Thomas/Eming, Rüdiger/Hertl, Michael (2018). Pemphigus: a Comprehensive Review on Pathogenesis, Clinical Presentation and Novel Therapeutic Approaches. *Clinical reviews in allergy & immunology* 54 (1), 1–25.
- Porro, Adriana Maria/Seque, Camila Arai/Ferreira, Maria Carolina Corsi/Enokihara, Milvia Maria Simões E. Silva (2019). Pemphigus vulgaris. *Anais brasileiros de dermatologia* 94 (3), 264–278.
- Poulsen, Lars K./Hummelshoj, Lone (2007). Triggers of IgE class switching and allergy development. *Annals of medicine* 39 (6), 440–456.
- Punnonen, J./Aversa, G./Cocks, B. G./McKenzie, A. N./Menon, S./Zurawski, G./Waal Malefyt, R. de/Vries, J. E. de (1993). Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (8), 3730–3734.
- Rafei, David/Müller, Ralf/Ishii, Norito/Llamazares, Maria/Hashimoto, Takashi/Hertl, Michael/Eming, Rüdiger (2011). IgG autoantibodies against desmocollin 3 in

pemphigus sera induce loss of keratinocyte adhesion. *The American Journal of Pathology* 178 (2), 718–723.

Rathmell, Jeffrey C./Townsend, Sarah E./Xu, Jiachao C./Flavell, Richard A./Goodnow, Christopher C. (1996). Expansion or Elimination of B Cells In Vivo: Dual Roles for CD40- and Fas (CD95)-Ligands Modulated by the B Cell Antigen Receptor. *Cell* 87 (2), 319–329.

Reid, Colleen E./Gamble, Janet L. (2009). Aeroallergens, allergic disease, and climate change: impacts and adaptation. *EcoHealth* 6 (3), 458–470.

Reimann, K. A./Chernoff, M./Wilkening, C. L./Nickerson, C. E./Landay, A. L. (2000). Preservation of lymphocyte immunophenotype and proliferative responses in cryopreserved peripheral blood mononuclear cells from human immunodeficiency virus type 1-infected donors: implications for multicenter clinical trials. *The ACTG Immunology Advanced Technology Laboratories. Clinical and diagnostic laboratory immunology* 7 (3), 352–359.

Renand, Amedee/Archila, Luis D./McGinty, John/Wambre, Erik/Robinson, David/Hales, Belinda J./Thomas, Wayne R./Kwok, William W. (2015). Chronic cat allergen exposure induces a TH2 cell-dependent IgG4 response related to low sensitization. *The Journal of allergy and clinical immunology* 136 (6), 1627-1635.e13.

Renzi, P. M./Turgeon, J. P./Marcotte, J. E./Drblik, S. P./Bérubé, D./Gagnon, M. F./Spier, S. (1999). Reduced interferon-gamma production in infants with bronchiolitis and asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine* 159 (5 Pt 1), 1417–1422.

Ricca, Vittorio/Landi, Massimo/Ferrero, Paola/Bairo, Alessandra/Tazzar, Carla/Canonica, G.Walter/Ciprandi, Giorgio (2000). Minimal persistent inflammation is also present in patients with seasonal allergic rhinitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 105 (1), 54–57.

Riechers, R./Grötzinger, J./Hertl, M. (1999). HLA class II restriction of autoreactive T cell responses in pemphigus vulgaris: review of the literature and potential applications for the development of a specific immunotherapy. *Autoimmunity* 30 (3), 183–196.

- Rieux-Laucat, F./Le Deist, F./Hivroz, C./Roberts, I. A./Debatin, K. M./Fischer, A./Villartay, J. P. de (1995). Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science (New York, N.Y.)* 268 (5215), 1347–1349.
- Ring, Johannes (2007). *Angewandte Allergologie*. 3. Aufl. München, Urban & Vogel.
- Rizzo, C./Fotino, M./Zhang, Y./Chow, S./Spizuoco, A./Sinha, A. A. (2005). Direct characterization of human T cells in pemphigus vulgaris reveals elevated autoantigen-specific Th2 activity in association with active disease. *Clinical and experimental dermatology* 30 (5), 535–540.
- Rodriguez, J./Crespo, J. F./Lopez-Rubio, A./La Cruz-Bertolo, J. de/Ferrando-Vivas, P./Vives, R./Daroca, P. (2000). Clinical cross-reactivity among foods of the Rosaceae family. *The Journal of allergy and clinical immunology* 106 (1 Pt 1), 183–189.
- Romagnani, S. (1994). Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annual review of immunology* 12, 227–257.
- Romagnani, S. (2006). Regulation of the T cell response. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 36 (11), 1357–1366.
- Rostaing, Lionel/Tkaczuk, Jean/Durand, Martine/Peres, Christine/Durand, Dominique/Prval, Claude de/Ohayon, Elie/Abbal, Michel (1999). Kinetics of intracytoplasmic Th1 and Th2 cytokine production assessed by flow cytometry following in vitro activation of peripheral blood mononuclear cells. *Cytometry* 35 (4), 318–328.
- Roumm, A. D./Whiteside, T. L./Medsger, T. A./Rodnan, G. P. (1984). Lymphocytes in the skin of patients with progressive systemic sclerosis. Quantification, subtyping, and clinical correlations. *Arthritis and rheumatism* 27 (6), 645–653.
- Roy, M./Aruffo, A./Ledbetter, J./Linsley, P./Kehry, M./Noelle, R. (1995). Studies on the interdependence of gp39 and B7 expression and function during antigen-specific immune responses. *European journal of immunology* 25 (2), 596–603.
- Roy, M./Waldschmidt, T./Aruffo, A./Ledbetter, J. A./Noelle, R. J. (1993). The regulation of the expression of gp39, the CD40 ligand, on normal and cloned CD4+ T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 151 (5), 2497–2510.

- Sad, S./Krishnan, L./Bleackley, R. C./Kägi, D./Hengartner, H./Mosmann, T. R. (1997). Cytotoxicity and weak CD40 ligand expression of CD8<sup>+</sup> type 2 cytotoxic T cells restricts their potential B cell helper activity. *European journal of immunology* 27 (4), 914–922.
- Sárdy, M./Kasperkiewicz, M. (2014). Bullöse Autoimmunkrankheiten bei Kindern. *Monatsschrift Kinderheilkunde* 162 (3), 259–268.
- Satyam, Abhigyan/Khandpur, Sujay/Sharma, V. K./Sharma, Alpana (2009). Involvement of T(H)1/T(H)2 cytokines in the pathogenesis of autoimmune skin disease-Pemphigus vulgaris. *Immunological investigations* 38 (6), 498–509.
- Schäppi, George F./Suphioglu, Cenk/Taylor, Philip E./Knox, R.Bruce (1997). Concentrations of the major birch tree allergen Bet v 1 in pollen and respirable fine particles in the atmosphere. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 100 (5), 656–661.
- Schmidt, Enno/Dährnich, Cornelia/Rosemann, Anke/Probst, Christian/Komorowski, Lars/Saschenbrecker, Sandra/Schlumberger, Wolfgang/Stöcker, Winfried/Hashimoto, Takashi/Bröcker, Eva-Bettina/Recke, Andreas/Rose, Christian/Zillikens, Detlef (2010). Novel ELISA systems for antibodies to desmoglein 1 and 3: correlation of disease activity with serum autoantibody levels in individual pemphigus patients. *Experimental dermatology* 19 (5), 458–463.
- Schmidt, Jürgen/Fleißner, Sandra/Heimann-Weitschat, Irene/Lindstaedt, Roland/Pomberg, Bettina/Werner, Ulrich/Szelenyi, Istvan (1994). Effect of corticosteroids, cyclosporin A, and methotrexate on cytokine release from monocytes and T-cell subsets. *Immunopharmacology* 27 (3), 173–179.
- Schönbeck, U./Libby, P. (2001). The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 58 (1), 4–43.
- Schramm, Agata/Jasiewicz-Honkisz, Barbara/Osmenda, Grzegorz/Wilk, Grzegorz/Siedlinski, Mateusz/Sagan, Agnieszka/Matusik, Pawel T./Maciag, Joanna/Sliwa, Tomasz/Czesnikiewicz-Guzik, Marta/Mikolajczyk, Tomasz P. (2016). Th17 responses are not altered by natural exposure to seasonal allergens in pollen-sensitive patients.

Allergy, asthma, and clinical immunology : official journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology 12, 55.

- Sekiguchi, M./Futei, Y./Fujii, Y./Iwasaki, T./Nishikawa, T./Amagai, M. (2001). Dominant autoimmune epitopes recognized by pemphigus antibodies map to the N-terminal adhesive region of desmogleins. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 167 (9), 5439–5448.
- Shao, R. G./Shimizu, T./Pommier, Y. (1996). Brefeldin A is a potent inducer of apoptosis in human cancer cells independently of p53. *Experimental cell research* 227 (2), 190–196.
- Shlomchik, M. J./Craft, J. E./Mamula, M. J. (2001). From T to B and back again: positive feedback in systemic autoimmune disease. *Nature reviews. Immunology* 1 (2), 147–153.
- Sleasman, J. W./Leon, B. H./Aleixo, L. F./Rojas, M./Goodenow, M. M. (1997). Immunomagnetic selection of purified monocyte and lymphocyte populations from peripheral blood mononuclear cells following cryopreservation. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 4 (6), 653–658.
- Smith, Karen A./Gray, Nicola J./Cheek, Elizabeth/Saleh, Femi/Lavender, Jo/Frew, Anthony J./Kern, Florian/Tarzi, Michael D. (2013a). Characterisation of CD154+ T cells following ex vivo birch allergen stimulation defines a close relationship between T cell subsets in healthy volunteers. *BMC immunology* 14, 14.
- Smith, Karen A./Gray, Nicola J./Saleh, Femi/Cheek, Elizabeth/Frew, Anthony J./Kern, Florian/Tarzi, Michael D. (2013b). Characterisation of CD154+ T cells following ex vivo allergen stimulation illustrates distinct T cell responses to seasonal and perennial allergens in allergic and non-allergic individuals. *BMC immunology* 14, 49.
- Snow, Andrew L./Pandiyan, Pushpa/Zheng, Lixin/Krummey, Scott M./Lenardo, Michael J. (2010). The power and the promise of restimulation-induced cell death in human immune diseases. *Immunological reviews* 236, 68–82.
- Splawski, J. B./Lipsky, P. E. (1994). CD40-mediated regulation of human B-cell responses. *Research in Immunology* 145 (3), 226–234.

- Spolski, Rosanne/Leonard, Warren J. (2014). Interleukin-21: a double-edged sword with therapeutic potential. *Nature reviews. Drug discovery* 13 (5), 379–395.
- Suhlmann, Janet E./Foy, Teresa M./Aruffo, Alejandro/Crassi, Karen M./Ledbetter, Jeffrey A./Green, William R./Xu, Jianchao C./Shultz, Leonard D./Roopeylan, Derry/Flavell, Richard A./Fast, Loren/Noelle, Randolph J./Durie, Fiona H. (1995). In the absence of a CD40 signal, B cells are tolerogenic. *Immunity* 2 (6), 645–653.
- Suzuki, M./Zheng, X./Zhang, X./Ichim, T. E./Sun, H./Kubo, N./Beduhn, M./Shunnar, A./Garcia, B./Min, W-P (2009). Inhibition of allergic responses by CD40 gene silencing. *Allergy* 64 (3), 387–397.
- Svecova, Danka/Parnicka, Zuzana/Pastyrikova, Lucia/Urbancek, Slavomir/Luha, Jan/Buc, Milan (2015). HLA DRB1\* and DQB1\* alleles are associated with disease severity in patients with pemphigus vulgaris. *International journal of dermatology* 54 (2), 168–173.
- Takahashi, Hayato/Amagai, Masayuki/Nishikawa, Takeji/Fujii, Yoshiko/Kawakami, Yutaka/Kuwana, Masataka (2008). Novel system evaluating in vivo pathogenicity of desmoglein 3-reactive T cell clones using murine pemphigus vulgaris. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 181 (2), 1526–1535.
- Takahashi, Hayato/Amagai, Masayuki/Tanikawa, Akiko/Suzuki, Shigeaki/Ikeda, Yasuo/Nishikawa, Takeji/Kawakami, Yutaka/Kuwana, Masataka (2007). T helper type 2-biased natural killer cell phenotype in patients with pemphigus vulgaris. *The Journal of investigative dermatology* 127 (2), 324–330.
- Takahashi, Hayato/Kuwana, Masataka/Amagai, Masayuki (2009). A single helper T cell clone is sufficient to commit polyclonal naive B cells to produce pathogenic IgG in experimental pemphigus vulgaris. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 182 (3), 1740–1745.
- Tang, Jun/Xiao, Ping/Luo, Xi/Bai, Jing/Xia, Wentong/Chen, Weixiong/Li, Jian/Yu, Qingqing/Shi, Sisi/Xu, Yuxia/Mou, Zhonglin/Wang, Yuejian/Li, Huabin (2014). Increased IL-22 level in allergic rhinitis significantly correlates with clinical severity. *American journal of rhinology & allergy* 28 (6), 197–201.

- Tangye, Stuart G./Ma, Cindy S./Brink, Robert/Deenick, Elissa K. (2013). The good, the bad and the ugly - TFH cells in human health and disease. *Nature reviews. Immunology* 13 (6), 412–426.
- Tario, Joseph D./Chen, George L./Hahn, Theresa E./Pan, Dalin/Furlage, Rosemary L./Zhang, Yali/Brix, Liselotte/Halgreen, Charlotte/Jacobsen, Kivin/McCarthy, Philip L./Wallace, Paul K. (2015). Dextramer reagents are effective tools for quantifying CMV antigen-specific T cells from peripheral blood samples. *Cytometry. Part B, Clinical cytometry* 88 (1), 6–20.
- Tavakolpour, Soheil (2016). Interleukin 21 as a new possible player in pemphigus: Is it a suitable target? *International Immunopharmacology* 34, 139–145.
- Tavakolpour, Soheil/Mahmoudi, HamidReza/Mirzazadeh, Azin/Balighi, Kamran/Darabi-Monadi, Sahar/Hatami, SeyedehBehnaz/GhasemiAdl, Mojtaba/Daneshpazhooh, Maryam (2020). Pathogenic and protective roles of cytokines in pemphigus: A systematic review. *Cytokine* 129, 155026.
- Tesch, Sebastian/Abdirama, Dimas/Grießbach, Anna-Sophie/Brand, Hannah Antonia/Goerlich, Nina/Humrich, Jens Y./Bacher, Petra/Hiepe, Falk/Riemekasten, Gabriela/Enghard, Philipp (2020). Identification and characterization of antigen-specific CD4+ T cells targeting renally expressed antigens in human lupus nephritis with two independent methods. *Scientific reports* 10 (1), 21312.
- Testa, B./Mesoletta, C./Mosti, M. R./Mesoletta, M./Testa, D./Motta, G. (2001). Changes in serum interferon-gamma, interleukin-4, and interleukin-12 cytokine levels in anti-histamine type 2-treated allergic rhinitis patients. *The Laryngoscope* 111 (2), 236–239.
- Timoteo, Rodolfo Pessato/da Silva, Marcos Vinicius/Miguel, Camila Botelho/Silva, Djalma Alexandre Alves/Catarino, Jonatas Da Silva/Rodrigues Junior, Virmondos/Sales-Campos, Helioswilton/Freire Oliveira, Carlo Jose (2017). Th1/Th17-Related Cytokines and Chemokines and Their Implications in the Pathogenesis of Pemphigus Vulgaris. *Mediators of inflammation* 2017, 7151285.

- Tompa, Andrea/Nilsson-Bowers, Anette/Faresjö, Maria (2018). Subsets of CD4+, CD8+, and CD25hi Lymphocytes Are in General Not Influenced by Isolation and Long-Term Cryopreservation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 201 (6), 1799–1809.
- Tong, Joo Chuan/Bramson, Jeff/Kanduc, Darja/Chow, Selwyn/Sinha, Animesh A./Ranganathan, Shoba (2006). Modeling the bound conformation of Pemphigus vulgaris-associated peptides to MHC Class II DR and DQ alleles. *Immunome research* 2, 1.
- Tortola, Luigi/Pawelski, Helga/Sonar, Sanchaita Sriwal/Ampenberger, Franziska/Kurrer, Michael/Kopf, Manfred (2019). IL-21 promotes allergic airway inflammation by driving apoptosis of FoxP3+ regulatory T cells. *The Journal of allergy and clinical immunology* 143 (6), 2178-2189.e5.
- Trombetta, E. Sergio/Mellman, Ira (2005). Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annual review of immunology* 23, 975–1028.
- Tsvetkova-Vicheva, Vanya M./Gecheva, Svetla P./Komsa-Penkova, Regina/Velkova, Angelika S./Lukanov, Tcvetan H. (2014). IL-17 producing T cells correlate with polysensitization but not with bronchial hyperresponsiveness in patients with allergic rhinitis. *Clinical and translational allergy* 4 (1), 3.
- Ueno, Hideki (2016). T follicular helper cells in human autoimmunity. *Current Opinion in Immunology* 43, 24–31.
- Urta, J. M./Carrasco, P./Feo-Brito, F./La Roca, F. de/Guerra, F./Cabrera, C. M. (2014). Immunotherapy reduces CD40L expression and modifies cytokine production in the CD4 cells of pollen allergy patients. *Journal of investigational allergology & clinical immunology* 24 (2), 98–105.
- Vaitaitis, Gisela M./Yussman, Martin G./Waid, Dan M./Wagner, David H. (2017). Th40 cells (CD4+CD40+ Tcells) drive a more severe form of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis than conventional CD4 T cells. *PLoS ONE* 12 (2), e0172037.
- van Ewijk, W. (1991). T-cell differentiation is influenced by thymic microenvironments. *Annual review of immunology* 9, 591–615.

- van Hemelen, D./Oude Elberink, J. N. G./Bohle, B./Heimweg, J./Nawijn, M. C./van Oosterhout, A. J. M. (2011). Flow cytometric analysis of cytokine expression in short-term allergen-stimulated T cells mirrors the phenotype of proliferating T cells in long-term cultures. *Journal of immunological methods* 371 (1-2), 114–121.
- van Kooten, C./Banchereau, J. (2000). CD40-CD40 ligand. *Journal of leukocyte biology* 67 (1), 2–17.
- van Kooten, Cees/Banchereau, Jacques (1996). CD40-CD40 Ligand: A Multifunctional Receptor-Ligand Pair. In: Elsevier, 1–77.
- van Overtvelt, Laurence/Wambre, Erik/Maillère, Bernard/Hofe, Eric von/Louise, Anne/Balazuc, Anne Marie/Bohle, Barbara/Ebo, Didier/Leboulair, Christophe/Garcia, Gilles/Moingeon, Philippe (2008). Assessment of Bet v 1-specific CD4<sup>+</sup> T cell responses in allergic and nonallergic individuals using MHC class II peptide tetramers. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 180 (7), 4514–4522.
- Vazquez-Lombardi, Rodrigo/Phan, Tri Giang/Zimmermann, Carsten/Lowe, David/Jermutus, Lutz/Christ, Daniel (2015). Challenges and opportunities for non-antibody scaffold drugs. *Drug discovery today* 20 (10), 1271–1283.
- Veldman, Christian M./Gebhard, Kerstin L./Uter, Wolfgang/Wassmuth, Ralf/Grötzinger, Joachim/Schultz, Erwin/Hertl, Michael (2004). T cell recognition of desmoglein 3 peptides in patients with pemphigus vulgaris and healthy individuals. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 172 (6), 3883–3892.
- Veldman, Christian/Eming, Rüdiger/Wolff-Franke, Sonja/Sonderstrup, Grete/Kwok, William W./Hertl, Michael (2007). Detection of low avidity desmoglein 3-reactive T cells in pemphigus vulgaris using HLA-DR beta 1\*0402 tetramers. *Clinical immunology* (Orlando, Fla.) 122 (3), 330–337.
- Veldman, Christian/Stauber, Angelika/Wassmuth, Ralf/Uter, Wolfgang/Schuler, Gerold/Hertl, Michael (2003). 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. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 170 (1), 635–642.

- Venugopal, Supriya S./Murrell, Dédée F. (2011). Diagnosis and clinical features of pemphigus vulgaris. *Dermatologic clinics* 29 (3), 373-80, vii.
- Vollmar, Angelika/Zündorf, Ilse/Dingermann, Theodor (2012). *Immunologie. Grundlagen und Wirkstoffe*. 2. Aufl. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart.
- Wambre, Erik/DeLong, Jonathan H./James, Eddie A./LaFond, Rebecca E./Robinson, David/Kwok, William W. (2012). Differentiation stage determines pathologic and protective allergen-specific CD4+ T-cell outcomes during specific immunotherapy. *The Journal of allergy and clinical immunology* 129 (2), 544-51, 551.e1-7.
- Wang, Yui-Hsi/Liu, Yong-Jun (2008). The IL-17 cytokine family and their role in allergic inflammation. *Current Opinion in Immunology* 20 (6), 697–702.
- Watanabe, R./Ishiura, N./Nakashima, H./Yazawa, N./Kuwano, Y./Tada, Y./Okochi, H./Fujimoto, M./Tamaki, K. (2007). Increased serum levels of circulating CD40 ligand in patients with bullous pemphigoid: preliminary results. *Dermatology (Basel, Switzerland)* 215 (3), 180–186.
- Weinberg, A./Zhang, L./Brown, D./Erice, A./Polsky, B./Hirsch, M. S./Owens, S./Lamb, K. (2000). Viability and functional activity of cryopreserved mononuclear cells. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 7 (4), 714–716.
- Wingett, Denise/Nielson, Christopher P. (2003). Divergence in NK cell and cyclic AMP regulation of T cell CD40L expression in asthmatic subjects. *Journal of leukocyte biology* 74 (4), 531–541.
- Wucherpfennig, K. W./Yu, B./Bhol, K./Monos, D. S./Argyris, E./Karr, R. W./Ahmed, A. R./Strominger, J. L. (1995). 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (25), 11935–11939.

- Xu, Jianchao/Foy, Teresa M./Laman, Jon D./Elliott, Eileen A./Dunn, Jonathan J./Waldschmidt, Thomas J./Elsemore, Jennifer/Noelle, Randolph J./Flavell, Richard A. (1994). Mice deficient for the CD40 ligand. *Immunity* 1 (5), 423–431.
- Xu, Ren-Chao/Zhu, Hai-Qin/Li, Wei-Ping/Zhao, Xiao-Qing/Yuan, Hui-Jie/Zheng, Jie/Pan, Meng (2013). The imbalance of Th17 and regulatory T cells in pemphigus patients. *European journal of dermatology : EJD* 23 (6), 795–802.
- Xuekun, Huang/Qintai, Yang/Yulian, Chen/Gehua, Zhang (2014). Correlation of gammadelta-T-cells, Th17 cells and IL-17 in peripheral blood of patients with allergic rhinitis. *Asian Pacific journal of allergy and immunology* 32 (3), 235–239.
- Xydia, Maria/Ge, Yingzi/Quitsch, Ulrike/Beckhove, Philipp (2011). CD40L co-stimulation from CD8+ to CD4+ effector memory T cells supports CD4+ expansion. *Immunology and cell biology* 89 (6), 670–680.
- Yang, Xue-Qin/Chen, Yu-Ting/Li, Li-Mei/Gao, Chao-Xian/Liu, Zheng-Yu/Hui, Chang-Ye/Zhang, Wen (2018). Effects of Different Stimulators on Proliferation of Peripheral Blood Lymphocyte Subsets. *Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi* 26 (6), 1765–1771.
- Yellin, M. J./Sippel, K./Inghirami, G./Covey, L. R./Lee, J. J./Sinning, J./Clark, E. A./Chess, L./Lederman, S. (1994). CD40 molecules induce down-modulation and endocytosis of T cell surface T cell-B cell activating molecule/CD40-L. Potential role in regulating helper effector function. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 152 (2), 598–608.
- Ying, S./Meng, Q./Barata, L. T./Robinson, D. S./Durham, S. R./Kay, A. B. (1997). Associations between IL-13 and IL-4 (mRNA and protein), vascular cell adhesion molecule-1 expression, and the infiltration of eosinophils, macrophages, and T cells in allergen-induced late-phase cutaneous reactions in atopic subjects. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 158 (10), 5050–5057.
- Yokoyama, Tomoaki/Amagai, Masayuki (2010). Immune dysregulation of pemphigus in humans and mice. *The Journal of dermatology* 37 (3), 205–213.

- Yokoyama, Wayne M./Thompson, Maria L./Ehrhardt, Rolf O. (2012). Cryopreservation and thawing of cells. *Current protocols in immunology Appendix 3*, 3G.
- Yu, Wong/Zhou, Xiaoying/Dunham, Diane/Lyu, Shu Chen/Manohar, Monali/Zhang, Wenming/Zhao, Fan/Davis, Mark M./Nadeau, Kari (2019). Allergen-specific CD8+ T cells in peanut-allergic individuals. *The Journal of allergy and clinical immunology* 143 (5), 1948–1952.
- Yuan, Feng-Lai/Hu, Wei/Lu, Wei-Guo/Li, Xia/Li, Jian-Ping/Xu, Rui-Sheng/Li, Cheng-Wan/Chen, Fei-Hu/Jin, Cheng (2011). Targeting interleukin-21 in rheumatoid arthritis. *Molecular biology reports* 38 (3), 1717–1721.
- Yuan, Huijie/Zhou, Shengru/Liu, Zhicui/Cong, Weiting/Fei, Xiaochun/Zeng, Weihong/Zhu, Haiqin/Xu, Renchao/Wang, Ying/Zheng, Jie/Pan, Meng (2017). Pivotal Role of Lesional and Perilesional T/B Lymphocytes in Pemphigus Pathogenesis. *The Journal of investigative dermatology* 137 (11), 2362–2370.
- Zheng, L./Trageser, C. L./Willerford, D. M./Lenardo, M. J. (1998). T cell growth cytokines cause the superinduction of molecules mediating antigen-induced T lymphocyte death. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 160 (2), 763–769.
- Zhu, Haiqin/Chen, Yayuan/Zhou, Yun/Wang, Ying/Zheng, Jie/Pan, Meng (2012). Cognate Th2-B cell interaction is essential for the autoantibody production in pemphigus vulgaris. *Journal of clinical immunology* 32 (1), 114–123.
- Zhu, Jinfang/Yamane, Hidehiro/Paul, William E. (2010). Differentiation of effector CD4 T cell populations (\*). *Annual review of immunology* 28, 445–489.

## 9 Anhang

### 9.1 Tabellenanhang

**Tab. S 1: Gesamtübersicht aller Teilnehmer dieser Arbeit** Bet v1: Majorallergen der Birken (*Betula verrucosa*), BPA: Birkenpollenallergiker, Dsg: Desmoglein, HLA: Humanes Leukozyten-Antigen, IgE: Immunglobulin E, K: Kontrolle, m: männlich, PV: Pemphigus vulgaris-Patienten, w: weiblich

	K (PV)	PV	K (BPA)	BPA
Anzahl der Teilnehmer	14	16	7	15
Alter <sup>a</sup>	30 (22-47)	58 (41-81)	31 (22-47)	41 (20-67)
Geschlecht (m:w)	9:5	4:12	4:3	3:12
Dsg1[Re/ml] (Min/Max/Median) <sup>b</sup>		0/193/4,5		
Dsg3[Re/ml] (Min/Max/Median)		4/607/121,5		
HLA-DRβ1*0402 <sup>c</sup>		5		
HLA-DRβ1*0402/ DQβ1*0503		3		
HLA-DQβ1*0503		6		
Bet v1- spezifisches IgE [kUA/l] (n=7) <sup>d</sup> (Min/Max/Mittelwert)				5,13/75/22,2
Positiver Pricktest in % (n= 13)				100

<sup>a</sup> Mittelwert (Spannweite).

<sup>b</sup> durch ELISA (EUROIMMUN) mit rekombinantem Dsg1/Dsg3 [relative Einheiten/ml] bestimmt. Grenzwert beträgt 20 RE/ml

<sup>c</sup> PV- spezifische HLA-Klasse II Haplotypen: HLA-DRβ1\*0402, HLA-DQβ1\*0503

<sup>d</sup> spezifisches Immunglobulin E gegen rekombinantes Bet v1 (Majorallergen der Birken: *Betula verrucosa*) in kUA/L (kilo Units of Allergen per liter) im Serum

**Tab. S 2: Klinik, Therapie, Autoantikörper und der Humane Leukozyten-Antigen-Typ der Pemphigus vulgaris-Patienten** A: Alter, Aza: Azathioprin, Dsg: Desmoglein, G: Geschlecht, HLA-Typ: Humanes Leukozyten-Antigen-Allel, KR: Komplette Remission mit/ohne Therapie, m: männlich, MMF: Mycophenolat-Mofetil, PR: Partielle Remission mit/ohne Therapie, Pred: Prednisolon, PV: Pemphigus vulgaris, R: Rezidiv, w: weiblich

Patient	G.	A.	Status <sup>a</sup>	Therapie <sup>b</sup>	Ritux- imab <sup>c</sup>	Dsg1/ Dsg3 [RE/ml] <sup>d</sup>	Klinischer Phänotyp	HLA-Typ <sup>e</sup>
PV01	m	67	PR	-		6/161	Oral	HR DRβ1* 0402
<b>PV03<sup>f</sup></b>	m	41	KR	Moderat (150 mg Aza)		4/141		-
<b>PV04</b>	m	45	PR	Moderat (100 mg Aza)		0/564	Oral, Genital	DRβ1* 0402, DQβ1* 0503
PV05	m	52	KR	Moderat (7,5 mg Pred, 200 mg Aza)	5	0/4		DRβ1* 0402
<b>PV06</b>	m	60	PR	Minimal (5 mg Pred)		3/10	Oral	DQβ1* 0503
<b>PV07</b>	w	45	1. PR 2. R	1.Minimal (7,5 mg Pred) 2. Moderat (7,5 mg Pred, MMF)		1. 978/15 2. 193/6	1. Kopf, 2. Arme, Stamm,	DQβ1* 0503
PV08	w	45	PR	Moderat (150 mg Aza, 7mg Pred)	25	3/607	Oral	DRβ1* 0402, DQβ1* 0503
<b>PV09</b>	w	55	PR	Moderat (5 mg Pred, MMF)	7	56/161	Oral, Kopf	DQβ1* 0503
<b>PV10</b>	w	61	KR	-		12/291		DQβ1* 0503
<b>PV11</b>	m	81	KR	-		5/199		Nicht PV- spezifisch
PV12	m	67	KR	-		9/132		DRβ1* 0402, DQβ1* 0503

Patient	G.	A.	Status <sup>a</sup>	Therapie <sup>b</sup>	Ritux- imab <sup>c</sup>	Dsg1/ Dsg3 [RE/ml] <sup>d</sup>	Klinischer Phänotyp	HLA-Typ <sup>e</sup>
PV13	w	65	PR	-	2	0/111	Oral	DRβ1* 0402
PV14	w	61	PR	Moderat (100 mg Aza)		0/16		DRβ1* 0402
PV15	w	64	KR	Moderat (30 mg Pred)	12	15/20		DRβ1* 0402
PV16	w	60	PR	Moderat (100 mg Aza, 20mg Pred)		19/51	Stamm	DQβ1* 0503
PV17	w	54	R	Hoch (Rituximab, 1000 mg Aza, 1000 mg Pred)	0	2/20	Kopf, Oral, Genital	DQβ1* 0503

<sup>a</sup> wie bei Murrell et al., 2008 definiert

<sup>b</sup> tägliche Dosis zum Zeitpunkt der Blutabnahme

<sup>c</sup> Monate nach letzter B-Zell-Depletion mit Rituximab (anti-CD20-Antikörper)

<sup>d</sup> durch ELISA (EUROIMMUN) mit rekombinantem Dsg1/Dsg3 [relative Einheiten/ml] bestimmt. Grenzwert beträgt 20 RE/ml

<sup>e</sup> PV-spezifische HLA-Klasse II Haplotypen: HLA-DRβ1\*0402, HLA-DQβ1\*0503

<sup>f</sup> frische PBMC (**fett**)

**Tab. S 3: Übersicht der gesunden Kontrollgruppen BPA:**

Birkenpollenallergiker, K: Kontrolle, m: männlich,  
PV: Pemphigus vulgaris, w: weiblich

Kontrollgruppe	Geschlecht	Alter
K01 (PV)	w	25
K02 (PV)	m	24
K03 (PV)	m	41
K04 (PV)	m	30
K05 (PV)	m	24
K06 (PV)	m	41
K07 (PV)	w	23
K08 (PV+BPA)	m	33
K09 (PV+BPA)	w	22
K11 (PV+BPA)	w	28
K12 (PV+BPA)	m	26
K13 (PV+BPA)	m	47
K14 (PV+BPA)	w	34
K15 (PV+BPA)	m	27

**Tab. S 4: Klinische bzw. serologische Parameter und Therapie der Birkenpollenallergikern**

Bet v1 (Majorallergen der Birken: *Betula verrucosa*), BPA: Birkenpollenallergiker, IgE: Immunglobulin E

Patient	Geschlecht	Alter	Prick-Test	Bet spezifisches [kUA/L] <sup>b</sup>	v1-IgE	Medikamente <sup>c</sup>
<b>BPA01</b> <sup>a</sup>	w	27	positiv	24,0		
<b>BPA02</b>	w	35	n.d. <sup>d</sup>	13,6		Loratadin
<b>BPA03</b>	w	20	positiv	22,3		Loratadin
<b>BPA04</b>	w	55	positiv			Loratadin
<b>BPA05</b>	m	40	positiv			
<b>BPA06</b>	w	24	positiv	5,13		Cetirizin
BPA07	w	21	n.d.	75		
BPA08	w	44	positiv			
BPA09	w	28	positiv			
BPA10	m	54	positiv			
BPA11	w	62	positiv	14,1		Azelastin + Fluticason
BPA12	w	67	positiv			
<b>BPA13</b>	w	60	positiv			Momethason-17-fuorat
<b>BPA14</b>	m	59	positiv			
<b>BPA15</b>	W	22	positiv	12,5		

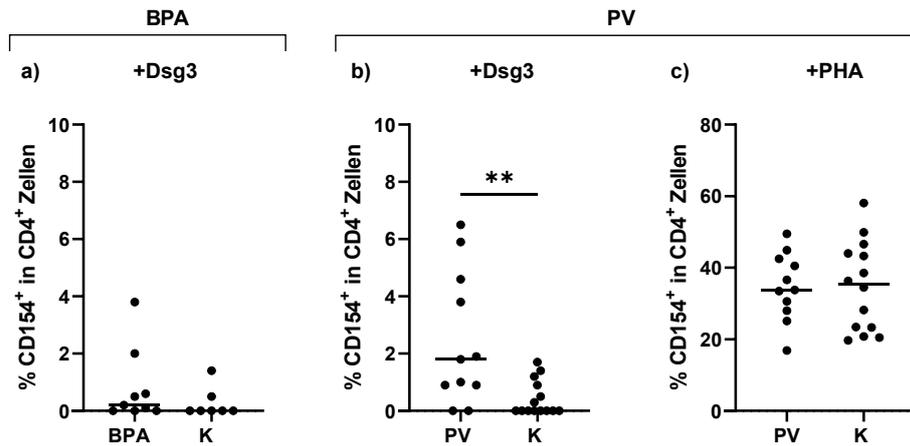
frische PBMC (**fett**)

<sup>b</sup> spezifisches Immunglobulin E gegen rekombinantes Bet v1 (Majorallergen der Birken: *Betula verrucosa*) in kUA/L (kilo Units of Allergen per liter) im Serum

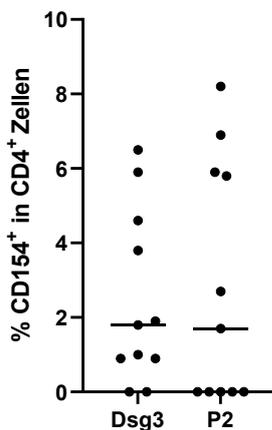
<sup>c</sup> tägliche Medikation zum Zeitpunkt der Blutabnahme

<sup>d</sup> nicht ermittelt (*not detected*)

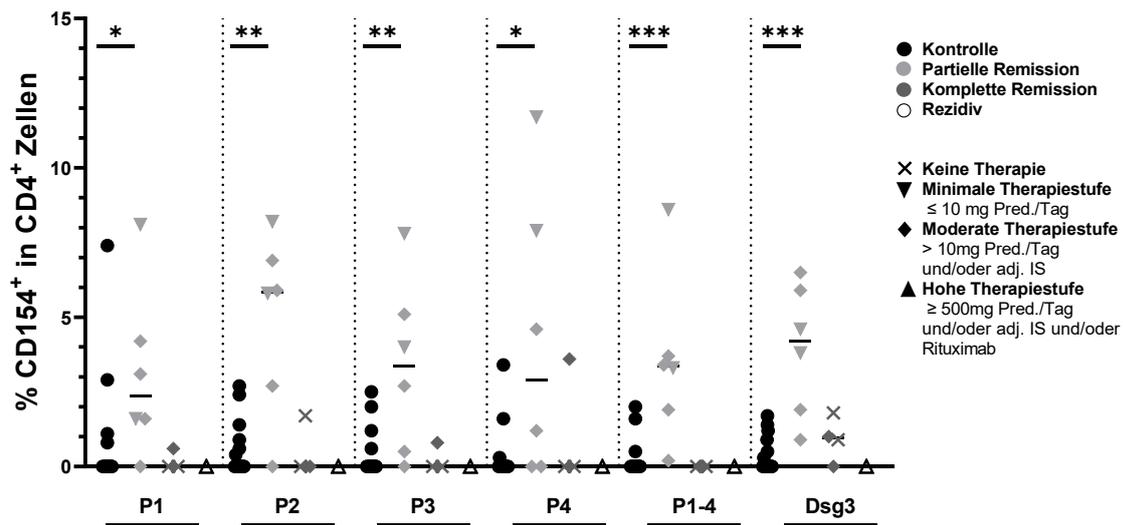
## 9.2 Abbildungen



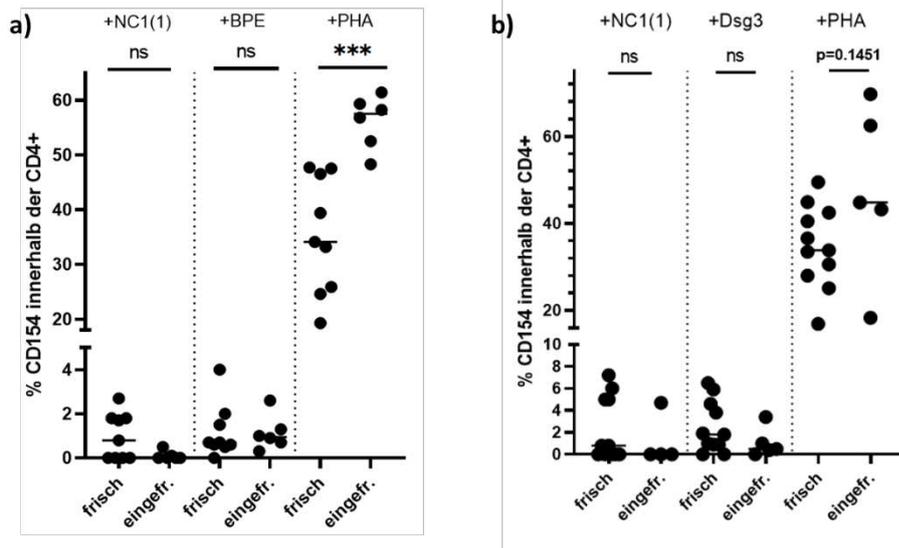
**Abb. S 1: Antigen-spezifisch induzierte CD154-Expression bei Pemphigus vulgaris (PV)-Patienten, gesunden Kontrollen (K) und Birkenpollenallergiker (BPA) infolge der ex vivo-Stimulation.** Frisch aufbereitete mononukleäre Zellen des peripheren Blutes von PV-Patienten (n=11) und den Kontrollen (n=14) wurden ex vivo mit (b) humanem Desmoglein (Dsg)-3 und (c) polyklonal mit Phytohämagglutinin (PHA) stimuliert. Als Negativkontrolle für die antigen-spezifische Stimulation mit Dsg3 bei PV diente K und (a) BPA. Zur Berechnung der prozentualen Veränderung der CD154-Expression innerhalb der CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden die Werte der unstimulierten von den stimulierten Proben subtrahiert. Es wurde der nicht-parametrische, zweiseitige Mann-Whitney-U-Test angewendet. \*\*p<0,01.



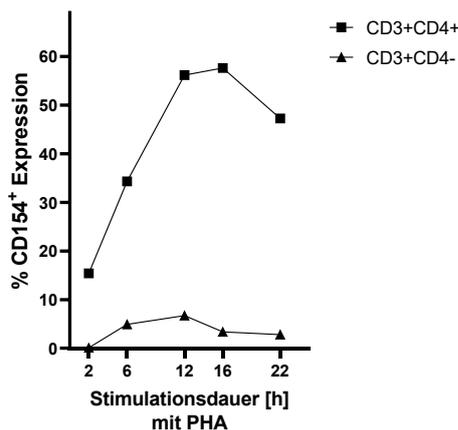
**Abb. S 2: Vergleichende Analyse der CD4<sup>+</sup> T-Zellen hinsichtlich ihrer Fähigkeit CD154 nach Stimulation von Desmoglein (Dsg)-3 und Peptid (P)-2 zu exprimieren.** Frisch aufbereitete mononukleäre Zellen des peripheren Blutes von Pemphigus vulgaris (PV)-Patienten (CD4<sup>+</sup> n=11; CD8<sup>+</sup> n=9) wurden ex vivo spezifisch mit Dsg3 und P2 stimuliert. Zur Berechnung der prozentualen Veränderung der CD154-Expression innerhalb der CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden die Werte der unstimulierten von den stimulierten Proben subtrahiert.



**Abb. S 3: Individuelle CD154-Expression stratifiziert nach dem klinischen Status und der systemischen Therapiestufe.** Darstellung des individuellen CD154-Expressionsniveaus der CD4<sup>+</sup> T-Zellen innerhalb der frisch aufbereiteten mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) von PV-Patienten (n=11) nach ex vivo-Stimulation mit Desmoglein (Dsg)-3 und epitopspezifischen Dsg3-Peptiden (P1, P2, P3, P4, Peptidpool P1-4). Vergleich der CD154-Expression zwischen den Untergruppen partielle Remission (n=6), komplette Remission (n=4) sowie der gesunden Kontrollen (n=14). Die Stratifizierung hinsichtlich der systemischen Therapie (keine, minimale und moderate Therapie) wurde farblich hervorgehoben. Es wurde der nicht parametrische, zweiseitige Mann-Whitney-U-Test angewendet. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001. adj. IS, adjuvante Immunsuppressiva



**Abb. S 4: Einfluss der Kryokonservierung bei Pemphigus vulgaris (PV)-Patienten und Birkenpollenallergikern (BPA) auf CD154-Expression nach diverser Stimulation.** Eingefrorene (eingefr.) und frisch aufbereitete PBMC von (a) BPA (frisch: n=9, eingefr.: n=6) und (b) PV (frisch: n=11, eingefr.: n=5) wurden ex vivo spezifisch mit Desmoglein (Dsg)-3 bzw. mit Birkenpollenextrakt (BPE) stimuliert. Zudem erfolgte eine polyklonale Stimulation mit Phytohämagglutinin (PHA) und dem Kollagen VII (NC1(1)). Unterschiede anhand des nicht parametrischen, zweiseitigen Mann-Whitney-U-Test ermittelt. ns= nicht signifikant. \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.



**Abb. S 5: Kinetische Analyse der CD154-Expression der T-Zellen nach unspezifischer ex vivo-Stimulation bei drei gesunden Kontrollen (K).** Frisch aufbereitete mononukleäre Zellen des peripheren Blutes von wurden ex vivo unspezifisch mit Phytohämagglutinin (PHA) stimuliert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde nach der Stimulation die Antikörperfärbung angeschlossen (2,6,12,18,22 Stunden (h) nach Stimulationsbeginn). Zur Detektion der T-Lymphozyten wurde ein CD3-Antikörper benutzt. Hier dargestellt ist die Analyse der anschließenden Durchflusszytometrie.

### 9.3 Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei:

Prof. Dr. M. Hertl für die Themenvergabe und damit für die Möglichkeit zur Promotion in einem sehr interessanten Gebiet.

Prof. Dr. R. Eming für die Planung und Vorbereitung dieser Arbeit, fachlichen Verbesserungsvorschläge und Diskussionanregungen, die freundliche motivierende Unterstützung und für das entgegengebrachte Vertrauen.

Dr. C. Hudemann für die gute Betreuung, die Einführung und Beaufsichtigung des wissenschaftlichen Arbeitens im Labor, die Unterstützung beim Verfassen dieser Arbeit und für die Hilfsbereitschaft bei Fragen oder Problemen.

Dr. C. Möbs für die unkomplizierte Zusammenarbeit, die zahlreichen fachlichen Diskussionen, die wissenschaftlichen Ratschläge, die aufschlussreiche statistische Beratung und die generelle Hilfe, die maßgeblich zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen hat.

Ärztlichen und technischen Mitarbeitern der Hautklinik Für die Rekrutierung der Patienten, die Durchführung der -blutentnahmen und Erhebung der klinischen Parameter im Rahmen dieser Arbeit.

Alexandra Polakova für die fachlichen Ratschläge, die generelle Hilfe, sowie die Zusammenarbeit bezüglich der Publikation.

Ein außerordentlicher Dank geht an die Patienten der Hautklinik Marburg und die freiwilligen gesunden Kontrollen, die durch ihre Teilnahme an dieser Studie und ihrer Kooperation erst die Entstehung dieser Arbeit ermöglicht haben. Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe bedanken.

Abschließend danke ich meiner Familie und Freunden. Ohne ihre Unterstützung, das Vertrauen, die Motivation und ihre Geduld wäre diese Arbeit wohl nicht zustande gekommen. Mein ganz besonderer Dank gilt dabei meinen Eltern, denen ich diese Arbeit widme.

Zuletzt möchte ich einen großen Dank meinem Freund Timo aussprechen. Ohne seine Geduld, die Unterstützung, sein Verständnis und seine Liebe wäre diese Arbeit wahrscheinlich nicht vollendet worden.

## 9.4 Verzeichnis der akademischen Lehrer-/innen

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren, Professoren, Doktoren und Dozenten in Marburg:

Adamkiewicz, Barth, Bartsch, Bauer, Baum, Bäumlein, Becker, A.Becker, K.Becker, S.Best, Bette, Bien, Bliemel, Bonaterra, Bösner, Brehm, Bücking, Carl, Cetin, Czubayko, Daut, Decher, Del Rey, Dettmeyer, Dietz, Dinges, Donner-Banzhoff, Duda, Eberhart, Eggers, El-Zayat, Engenhardt-Cabillic, Eschbach, Eubel, Fendrich, Feuser, Figiel, Frink, Fritz, Fuchs-Winkelmann, Geks, Geraedts, Görg, Gress, Grgic, Grimm, Grundmann, Haas, Halaszovich, Hertl, Hildebrandt, Hoch, Hofmann, Hoyer, Irsusi, Jerrentrup, Josephs, Kalder, Kann, Kanngießner, Karatolios, Kill, Kinscherf, Kircher, Kirschbaum, Kluge, Kolb-Niemann, Kortus-Götze, Kostev, Köhler, König, Kruse, Kühnert, Lechler, Leonhardt, Lill, Lohoff, Mahnken, Maier, Meißner, Menzler, Meyer, Meyer-Wittkopf, Milani, Mittag, Moll, Morin, Mueller, Mutters, Nenadic, Neubauer, Neumüller, Nikolaizik, Nimsky, Nockher, Oberkircher, Oberwinkler, Oertel, Oliver, Opitz, Pagenstecher, Pankuweit, Parahuleva, Patrascan, Peterlein, Pfestroff, Pfützner, Plant, Preisig-Müller, Reese, Renz, Richter, Rinne, Riße, Roelcke, Roeßler, Rost, Ruchholtz, Sahmland, Schäfer, Schieffer, Schierl, Schneider, Schoner, Schratt, Schu, Schütz, Schulze, Schütt, Schüttler, Schwalbe, Seifart, Seitz, Sekundo, Sevinc, Sommer, Stahl, Steinfeldt, Steiniger, Strik, Stuck, Tackenberg, Teymoortash, Thieme, Thum, Timmermann, Timmesfeld, Vannucchi, Vogelmeier, Vogt, Vorwerk, Wagner, Walter, Weber, Weihe, Westermann, Wiesmann, Wilhelm, Wißniowski, Wolff, Worzfeld, Wrocklage, Wulf, Zavorotny, Ziring, Zwiorek