

DISSERTATION

Das MECP2-IRAK1-Duplikationssyndrom: Systematische
Literaturrecherche und Untersuchung des IRAK1-kontrollierten
NF- κ B-Signalwegs

The MECP2/IRAK1 Duplication Syndrome: Systematic
Literature Review and Investigation of the IRAK1-driven NF- κ B-
Pathway

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Ilona Gottschalk

Erstbetreuung: Prof. Dr. med. Horst von Bernuth

Datum der Promotion: 28.02.2025

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis.....	v
Abbildungsverzeichnis.....	vi
Abkürzungsverzeichnis.....	vii
Zusammenfassung	1
1 Einleitung.....	3
1.1 Das <i>MECP2</i> -Duplikationssyndrom	3
1.1.1 Klinischer Phänotyp.....	3
1.1.2 Immunologischer Phänotyp und bisherige pathophysiologische Erklärungsansätze.....	4
1.2 Signalwege der angeborenen Immunität.....	5
1.2.1 Toll-like-Rezeptoren und Zytokin-Rezeptoren sowie ihre Liganden und Signalwege.....	5
1.2.2 MyD88- und IRAK-abhängiger kanonischer NF- κ B-Signalweg	6
1.2.3 MyD88- und IRAK-unabhängige NF- κ B-Signalwege.....	7
1.2.4 MyD88/IRAK-abhängiger Typ-I-Interferon-Signalweg	8
1.2.5 TRIF-abhängiger Typ-I-Interferon-Signalweg.....	9
1.3 Die Rolle von IRAK1 in Signalwegen der angeborenen Immunität.....	9
1.3.1 Die IRAK-Familie	9
1.3.2 Die Rolle von IRAK1 im NF- κ B-Signalweg	10
1.3.3 Die Rolle von IRAK1 im Typ-I-Interferon-Signalweg.....	11
1.4 Fragestellung.....	11
2 Methodik.....	13
2.1 Systematische Literaturrecherche der bisher publizierten Patientinnen und Patienten mit <i>MECP2</i> -Duplikationssyndrom.....	13
2.2 Patientenkohorte	14
2.2.1 Rekrutierung.....	14

2.2.2	Fragebogendesign.....	15
2.3	Material.....	16
2.3.1	Geräte	16
2.3.2	Verbrauchsmaterialien.....	16
2.3.3	Chemikalien.....	17
2.3.4	Kits	18
2.3.5	Zytokine und TLR-Agonisten	19
2.3.6	Westernblot-Antikörper	19
2.4	Kultivierung von SV40-Fibroblasten	20
2.4.1	SV40-Immortalisierung von primären Fibroblasten.....	20
2.4.2	Zellkultur von SV40-immortalisierten Fibroblasten	20
2.4.3	Überprüfung auf Kontamination mit Mykoplasmen mittels PCR	21
2.5	Ermittlung der Expression von IRAK1 sowie des Abbaus von IRAK1 und I κ B α mittels Westernblot	22
2.5.1	Untersuchung der Expression von IRAK1 und IRAK4.....	22
2.5.2	Untersuchung von IRAK1-Phosphorylierung und -Abbau sowie I κ B α -Abbau 22	
2.5.3	Westernblot: Zellyse, BCA-Assay, Blotting und Detektion.....	23
2.6	Zytokinproduktion in PBMC und Vollblut	27
2.6.1	Probengewinnung und -transport	27
2.6.2	Interleukin-6- und Interleukin-8-Produktion in PBMC.....	27
2.6.3	Interleukin-6- und Interleukin-10-Produktion in Vollblut	29
2.7	Interleukin-6- und Interleukin-8-Produktion in SV40-Fibroblasten	29
2.8	Auswertung und Statistische Analyse.....	30
3.	Ergebnisse	31
3.1	Ergebnisse der systematischen Literaturrecherche.....	31
3.1.1	Beschreibung der systematischen Literaturrecherche.....	31

3.1.2	Anzahl und Geschlechterverhältnis bislang publizierter Patientinnen und Patienten mit <i>MECP2</i> -Duplikationssyndrom	32
3.1.3	Infektiologischer und immunologischer Phänotyp der publizierten Patientinnen und Patienten	43
3.2	Charakterisierung der eigenen Patientenkohorte	44
3.2.1	Genotyp	44
3.2.2	Phänotyp	45
3.2.3	Detaillierte Fallberichte	45
3.2.4	Material	52
3.2.5	Expression von IRAK1 und IRAK4	53
3.3	In vitro Untersuchung des kanonischen NF- κ B-Signalwegs in Patienten mit <i>MECP2</i> -Duplikationssyndrom	54
3.3.1	IRAK1-Phosphorylierung und -Abbau sowie I κ B α -Abbau	54
3.3.2	Produktion von IL-6 und IL-8 in Fibroblasten, PBMC und Vollblut nach Aktivierung mit Interleukin-1 β und TLR-Agonisten	57
4.	Diskussion	61
4.1	Systematische Literaturrecherche	61
4.1.1	Kurze Zusammenfassung und Interpretation der Ergebnisse	61
4.1.2	Einbettung der Ergebnisse in den bisherigen Forschungsstand	62
4.1.3	Stärken und Schwächen	63
4.2	NF- κ B-Signaltransduktion bei <i>MECP2/IRAK1</i> -Duplikation	64
4.2.1	Kurze Zusammenfassung und Interpretation der Ergebnisse	64
4.2.2	Einbettung der Ergebnisse in den bisherigen Forschungsstand	66
4.2.3	Stärken und Schwächen der Studie	67
4.3	Alternative Hypothesen	68
4.3.1	IRAK1 in Atemwegsepithelien und CXCL-10-Induktion	68
4.3.2	Beeinträchtigte IFN- γ -Sekretion	69
4.3.3	Beeinträchtigte Typ-I-IFN-Signatur	69

4.3.4	Genetisch bedingte, IRAK1-unabhängige Suszeptibilität für Infektionen..	70
4.3.5	Erstes Mausmodell mit <i>MECP2-IRAK1</i> -Tandemduplikation	71
5.	Schlussfolgerungen	72
	Literaturverzeichnis	73
	Eidesstattliche Versicherung	86
	Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen.....	87
	Druckexemplar der Publikation.....	88
	Lebenslauf.....	107
	Komplette Publikationsliste.....	108
	Danksagung	109

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Anwendung der STARLITE-Prinzipien auf die Literaturrecherche	13
Tabelle 2: Geräte	16
Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien	16
Tabelle 4: Chemikalien	17
Tabelle 5: Kits	18
Tabelle 6: Zytokine und TLR-Agonisten	19
Tabelle 7: Westernblot-Antikörper	19
Tabelle 8: Herstellung von Lysepuffer	23
Tabelle 9: Herstellung von Trenn- und Sammelgel.....	24
Tabelle 10: Herstellung von Lower buffer und Upper buffer	24
Tabelle 11: Herstellung von SDS-Laufpuffer und Transferpuffer	26
Tabelle 12: Herstellung von TBS(T)-Puffer.....	26
Tabelle 13 Überblick über die bislang veröffentlichten MDS-Patienten	33
Tabelle 14: Überblick über den infektiologischen Phänotyp der bislang veröffentlichten weiblichen MDS-Patientinnen.....	38
Tabelle 15 Überblick über den infektiologischen Phänotyp der bislang veröffentlichten männlichen MDS-Patienten	39
Tabelle 16: Überblick über die Patienten unserer Kohorte	51
Tabelle 17: Densitometrie des in Abb. 5 dargestellten Westernblots.....	53

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: vereinfachte Darstellung der Signalwege der angeborenen Immunität.....	6
Abbildung 2: PRISMA-Schema der systematischen Literaturrecherche	31
Abbildung 3: Größe der Duplikationen bzw. Triplikationen auf Chromosom Xq288 bei unserer Kohorte entsprechend GRCh37 (hg19) in Megabasenpaaren (Mb)	45
Abbildung 4: Ergebnisse einer Mykoplasmen-PCR aus Zellkulturen mit SV40-Fibroblasten von MDS-Patienten und gesunden Kontrollen	52
Abbildung 5: Charakterisierung der SV40-Fibroblasten bezüglich ihrer IRAK1- und IRAK4- Expression mittels Westernblot aus Zelllysaten	53
Abbildung 6: IRAK1-Phosphorylierung und -Abbau sowie I κ B α -Abbau	56
Abbildung 7: IRAK1-Phosphorylierung und I κ B α -Degradierung nach Stimulation mit IL-1 β (10 ng/ml)	57
Abbildung 8: Zytokinproduktion nach Stimulation, gemessen in Zellkulturüberständen von SV40-Fibroblasten, PBMC und Vollblut	60

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumperoxodisulfat
Array-CGH	Array-basierte vergleichende genomische Hybridisierung
ASO	Antisense-Oligonukleotid
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Bovine Serum Albumin
CpG	CpG-Oligonukleotide
CRP	C-reaktives Protein
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	Doppelstrang RNA
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat
EEG	Elektroenzephalogramm
ELISA	Enzymimmunoassay
FBS	Fetal Bovine Serum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GRCh37	Genome Reference Consortium Human Build 37
HNO	Hals-Nasen-Ohren(-Heilkunde)
HRP	horseradish peroxidase
IFN	Interferon(e)
Ig	Immunglobulin
IKK	I κ B-Kinase
IL	Interleukin
IL-1R	IL-1-Rezeptor
IRAK	Interleukin-1 Receptor assoziierte Kinase
IRF	IFN-Regulationsfaktor
I κ B	Inhibitoren des Nuklearfaktors kappa B, Inhibitoren des Nuklearfaktors kappa B
LPS	Lipopolysaccharide
MBP	methylierte DNA-bindende Proteine
MDS	<i>MECP2</i> -Duplikationssyndrom
MECP2	Methyl-CpG-Bindungsprotein 2
MoCD169	Expression von CD169 auf der Zelloberfläche von Monozyten
MRT	Magnetresonanztomographie
MSSA	Methicillin-sensibler <i>Staphylococcus aureus</i>
MyD88	Adapterprotein Myeloid Differentiation Primary Response 88
NF- κ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
p38MAPK	p38-mitogenaktivierte Proteinkinasen
p50/p65	Komponenten von NF- κ B
PAMP	Pathogen-assozierte molekulare Muster
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMA	phorbol 12-myristate 13-acetate
PRISMA	Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses

PRR.....	Pattern Recognition Receptor; Mustererkennungsrezeptoren
RNA.....	Ribonukleinsäure
SDS.....	Sodium Dodecyl Sulfate
ssRNA.....	Einzelstrang RNA
SV40.....	Simian Virus 40
TAB.....	TAK1-bindende Proteine
TAK.....	TGF- β -aktivierte Kinase
TBK.....	TRAF family member-associated NF- κ B activator (TANK)-binding kinase
TBST.....	Tris-buffered saline with Tween 20
TEMED.....	Tetramethylethylenediamine
TICAM1.....	TIR domain containing adaptor molecule 1
TLR.....	Toll-like-Rezeptor
TNF.....	Tumornekrosefaktor
TNFR.....	TNF-Rezeptor
TRAF.....	TNF-Rezeptor-assoziierter Faktor
TRIF.....	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β
XCI.....	X-Chromosom-Inaktivierung

Zusammenfassung

Es gibt zahlreiche Beschreibungen von Patienten mit *MECP2*-Duplikationssyndrom (MDS), die neben einem charakteristischen neurologischen Phänotyp häufig auch an wiederkehrenden und schweren Infektionen mit starker Entzündung, insbesondere der Atemwege, leiden. Die Pathogenese dieser gehäuften Infektionen ist noch nicht geklärt. Beinahe alle Patienten weisen auch eine Duplikation des benachbarten *IRAK1*-Gens auf, welches das IRAK1-Protein kodiert. IRAK1 spielt eine Rolle im proinflammatorischen kanonischen NF- κ B-Signalweg. Wir stellten die Hypothese auf, dass die Duplikation von *IRAK1* zu einer vermehrten NF- κ B-vermittelten Inflammation bei Patienten mit *MECP2/IRAK1*-Duplikation führt.

Wir führten erstmals eine systematische Literaturrecherche durch und verglichen den neurologischen und infektiologischen Phänotyp der bereits beschriebenen Patienten mit *MECP2/IRAK1*-Duplikationssyndrom. Zudem untersuchten wir den Einfluss der Überexpression von IRAK1 auf die kanonische NF- κ B-Signalübertragung, indem die Produktion proinflammatorischer Zytokine gemessen und die IRAK1-Phosphorylierung und -Degradierung sowie der I κ B α -Abbau nach Stimulation mit IL-1 β und TLR-Agonisten in immortalisierten SV40-Fibroblasten, PBMC und Vollblut von 9 Patienten gemessen wurden.

In der Literatur wurden bislang 546 Patienten beschrieben, davon 506 (93%) männliche und 40 (7%) weibliche Patienten. 78% (374/479) litten an wiederkehrenden oder schweren Infektionen, insbesondere der Atemwege, mit einem Unterschied in der Häufigkeit zwischen weiblichen (55%) und männlichen (83%) Patienten. Patienten wiesen eine Verdopplung bis Verdreifachung von IRAK1-Protein in Fibroblasten auf. Patienten und Kontrollen wiesen nach Stimulation mit IL-1 β die gleichen Muster bei IRAK1-Phosphorylierung und -Abbau sowie I κ B α -Abbau auf. Sowohl Patienten als auch gesunde Kontrollen zeigten eine ähnliche IL-6- und IL-8-Produktion nach Stimulation mit IL-1 β und TLR2/6-Agonisten in SV40-Fibroblasten. In PBMC und Vollblut war die Zytokinproduktion nach Stimulation mit IL-1 β und TLR4 und TLR2/6-Agonisten bei Patienten und Kontrollen gleich.

Zusammenfassend konnten wir in unserer Kohorte keine Hinweise auf eine verstärkte Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs bei *MECP2/IRAK1*-duplizierten Patienten finden.

Daher gehen wir davon aus, dass diese Patienten nicht von einer therapeutischen Unterdrückung dieses Signalweges profitieren.

Abstract

There are numerous descriptions of patients with *MECP2* duplication syndrome (MDS) who, in addition to a characteristic neurological phenotype, often suffer from recurrent and severe infections with strong inflammation, particularly of the respiratory tract. The pathogenesis of these clustered infections is not yet clear. Nearly all patients also have a duplication of the adjacent *IRAK1* gene, which encodes the IRAK1 protein. IRAK1 plays a role in the proinflammatory canonical NF- κ B signaling pathway. We hypothesized that duplication of *IRAK1* leads to increased NF- κ B-mediated inflammation in patients with *MECP2/IRAK1* duplication.

We performed a systematic literature review for the first time and compared the neurological and infectious phenotype of previously described patients with *MECP2* duplication syndrome. In addition, we investigated the impact of IRAK1 overexpression on canonical NF- κ B signaling by measuring proinflammatory cytokine production and IRAK1 phosphorylation and degradation and I κ B α degradation after stimulation with IL-1 β and TLR agonists in immortalized SV40 fibroblasts, PBMC, and whole blood from 9 patients.

To date, 546 patients have been described in the literature, of whom 506 (93%) were male and 40 (7%) were female. 78% (374/479) suffered from recurrent or severe infections, especially respiratory, with a difference in frequency between female (55%) and male (83%) patients. Patients exhibited a doubling to tripling of IRAK1 protein in fibroblasts. Patients and controls showed the same patterns of IRAK1 phosphorylation and degradation and I κ B α degradation after stimulation with IL-1 β . Both patients and healthy controls showed similar IL-6 and IL-8 production after stimulation with IL-1 β and TLR2/6 agonists in SV40 fibroblasts. In PBMC and whole blood, cytokine production after stimulation with IL-1 β and TLR4 and TLR2/6 agonists was the same in patients and controls.

In summary, we found no evidence of enhanced activation of the NF- κ B pathway in *MECP2/IRAK1*-duplicated patients in our cohort. Therefore, we assume that these patients do not benefit from therapeutic suppression of this pathway.

1 Einleitung

1.1 Das *MECP2*-Duplikationssyndrom

Das *MECP2*-Duplikationssyndrom (MDS) ist eine seltene X-chromosomal-rezessiv vererbte Erkrankung, die auf einer Duplikation des *Methyl-CpG-Bindungsproteins 2 (MECP2)* -Gens in der Chromosomenregion Xq28 beruht. Es wurde nach der Erstbeschreibung von Lubs et al. 1999 zunächst als Lubs-Syndrom bezeichnet, bis 2005 die Duplikation des *MECP2*-Gens als ursächlich beschrieben wurde [1–3]. Die Größe der Duplikation auf dem Chromosom Xq28 und damit auch die Anzahl der duplizierten Gene ist variabel. In vielen Veröffentlichungen wurde die Duplikation des *MECP2*- und des benachbarten *IRAK1*-Gens als die „minimal critical region“ beschrieben [4–6].

MECP2 kodiert das Methyl-CpG-Bindungsprotein 2 (MECP2), welches zur Familie der methylierten DNA-bindenden Proteine (MBP) gehört und durch Aktivierung und Inhibierung zur Regulation der Transkription führt, unter anderem durch Bindung methylierter CpG-Dinukleotide in DNA-Promotoren [7,8]. *MECP2* wird ubiquitär exprimiert, wobei es im Gehirn, insbesondere in neuronalen Zellen, häufiger vorkommt. Das Ausmaß der Expression korreliert mit der Reifung von Neuronen [9,10]. Eine Mutation oder Deletion des *MECP2* führt zum Rett-Syndrom, während die Duplikation des Gens als Ursache für den neurologischen Phänotyp beim *MECP2*-Duplikationssyndrom angenommen wird [4,11].

IRAK1 kodiert die Interleukin-1 Rezeptor assoziierte Kinase 1 (IRAK1), ein Adapterprotein der angeborenen Immunität („innate immunity“), das an verschiedenen Signalprozessen beteiligt ist, die Immunität und Entzündungen regulieren, und die ich im Folgenden näher beschreibe [12–19].

1.1.1 Klinischer Phänotyp

Der klinische Phänotyp des *MECP2*-Duplikationssyndroms ist charakterisiert durch Intelligenzminderung, ausgeprägte Entwicklungsverzögerungen mit weitgehend ausbleibender Sprachentwicklung und muskuläre Hypotonie insbesondere der Rumpf- und Gesichtsmuskulatur. Freies Gehen wird in der Regel nicht erreicht. Weitere häufige Symptome sind leichte kraniofaziale Dysmorphien, epileptische Anfälle, eine progressive Spastik, Ataxie, sowie das Auftreten rezidivierender, schwerer Infektionen [1,2,20]. Ein

Großteil der Patientinnen und Patienten mit *MECP2*-Duplikationssyndrom verstirbt vor dem 25. Lebensjahr, häufig an respiratorischen Infektionen [1,4,21]. Hauptsächlich betroffenen sind männliche Patienten. Basierend auf den Daten von mehreren genetischen Screening-Studien könnten ungefähr 1-2 % der schweren X-chromosomalen geistigen Behinderungen bei Männern durch das *MECP2*-Duplikationssyndrom erklärt werden [1,4,5,20,22–24]. Bei den meisten weiblichen Patientinnen mit *MECP2*-Duplikation handelt es sich um klinisch nicht betroffene Trägerinnen, die ein vorteilhaft verschobenes Muster der X-Chromosom-Inaktivierung (XCI) aufweisen [1,5,22,25]. Einige Frauen zeigen jedoch einen leichten bis schweren Phänotyp. Es wird vermutet, dass die Symptome bei Frauen einerseits durch die Lage des duplizierten Materials auf einem Autosom oder andererseits durch eine ungünstige X-Chromosom-Inaktivierung verursacht werden könnten [26–40]. Das Ausmaß der Symptome bei Frauen mit einer *MECP2*-Duplikation kann jedoch nicht mit ihrem X-Chromosom-Inaktivierungs-Muster korreliert werden, zumindest nicht, wenn es im peripheren Blut gemessen wird [40].

1.1.2 Immunologischer Phänotyp und bisherige pathophysiologische Erklärungsansätze

Nur wenige Studien charakterisierten den infektiösen und immunologischen Phänotyp der Patientinnen und Patienten. Am häufigsten beschrieben sind eine mangelnde Impfantwort, insbesondere gegen *Streptococcus pneumoniae*, und ein Immunglobulin(Ig)-Mangel, sowie unerklärliche Fieberschübe und auffallend hohe Werte von C-reaktivem Protein (CRP) [41]. Bauer et al. schlugen die Substitution von polyvalentem IgG bei Patientinnen und Patienten mit einem IgG2-Unterklassendefizit und/oder niedrigen Impftitern gegen Pneumokokken vor, die an rezidivierenden Infektionen leiden - gegebenenfalls in Kombination mit prophylaktischen Antibiotika [41,42].

Der zugrundeliegende Pathomechanismus für die ausgeprägte Akute-Phase-Reaktion und die schweren Infektionen bei diesen Patienten und insbesondere die Frage, ob es sich eher um infektiöses oder autoinflammatorisches Fieber handelt, ist nach wie vor unklar [43,44]. Yang et al. schlugen vor, dass die schweren Infektionen bei Patientinnen und Patienten mit *MECP2*-Duplikationssyndrom auf das Fehlen einer TH1-Antwort und eine daraus resultierende geringe Interferon- γ -Aktivität zurückzuführen sind [45]. Andererseits wurde ein gastroösophagealer Reflux mit anschließender Aspiration als

Ursache für häufige Atemwegsinfektionen vermutet [3,46]. Kirk et al. postulierten einen Zusammenhang zwischen der *IRAK1*-Duplikation und der Anfälligkeit für Infektionen [47].

1.2 Signalwege der angeborenen Immunität

1.2.1 Toll-like-Rezeptoren und Zytokin-Rezeptoren sowie ihre Liganden und Signalwege

Die Erkennung von sogenannten Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (PAMP) über Mustererkennungsrezeptoren (Pattern Recognition Receptor, PRR) sind als Teil des angeborenen Immunsystems in der frühen Immunantwort überlebenswichtig, indem sie verschiedene mikrobielle Bestandteile erkennen [48]. Eine Schlüsselrolle spielt eine Unterform der PRR, die Toll-like-Rezeptoren (TLR), von denen beim Menschen bisher zehn verschiedene Arten beschrieben sind. Einige TLR befinden sich in der Zellmembran (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR10) und andere in der Endosom-Membran (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9). TLR2 in Verbindung mit TLR1 oder TLR6 erkennt bakterielle Lipoproteine und Lipopeptide wie z.B. Pam₂CSK₄ (TLR 2/6) und Pam₂CSK₄ (TLR 1/2). Die Agonisten von TLR4 sind Lipopolysaccharide (LPS), die Hauptbestandteile der äußeren Zellwand von gram-negativen Bakterien. TLR5 bindet bakterielles Flagellin. Endosomal lokalisierter TLR3 ist für die Erkennung von Doppelstrang RNA (dsRNA) verantwortlich, ein Zwischenprodukt, das von den meisten RNA- und DNA-Viren während ihrer Replikation gebildet wird. Poly(I:C) ist ein synthetisches Analogon von dsRNA. Die ebenfalls endosomal gelegenen TLR7 und TLR8 erkennen Einzelstrang RNA (ssRNA), wie beispielsweise R848 (Resiquimod). Agonist für den endosomalen TLR9 ist mikrobielle RNA, insbesondere Oligonukleotide aus unmethyliertem CpG [13,48–54].

Zytokin-Rezeptoren sind membranständige Glykoproteine, die Zytokine wie Interleukine (IL), Interferone (IFN) und Tumornekrosefaktoren (TNF) spezifisch binden und dadurch eine intrazelluläre Antwort auslösen. Beispiele hierfür sind IL-1-Rezeptoren (IL-1R), die durch diverse Interleukine wie unter anderem IL-1 β stimuliert werden, und TNF-Rezeptoren (TNFR), von denen der TNFR1 beispielsweise TNF- α erkennt [13,48–54].

In Abhängigkeit des vom Rezeptor rekrutierten Adapterproteins wird zwischen MyD88-abhängigen und TRIF-abhängigen Signalwegen unterschieden [55]. Das Adapterprotein für den IL-1R sowie für alle TLR außer TLR3, ist Myeloid Differentiation Primary Response 88 (MyD88) [56]. Dagegen ist das Adapterprotein des TLR3, und teilweise

auch des TLR4, TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β), auch TICAM1 (TIR domain containing adaptor molecule 1) genannt [56] (Abb. 1). Der MyD88-abhängige Signalweg führt in erster Linie zur Produktion von proentzündlichen Zytokinen (z.B. IL-1, IL-6, IL-8, TNF) und Chemokinen, während die TRIF-Achse hauptsächlich die Expression von Typ-I-IFN (z. B. IFN- α und IFN- β) induziert [57,58].

1.2.2 MyD88- und IRAK-abhängiger kanonischer NF- κ B-Signalweg

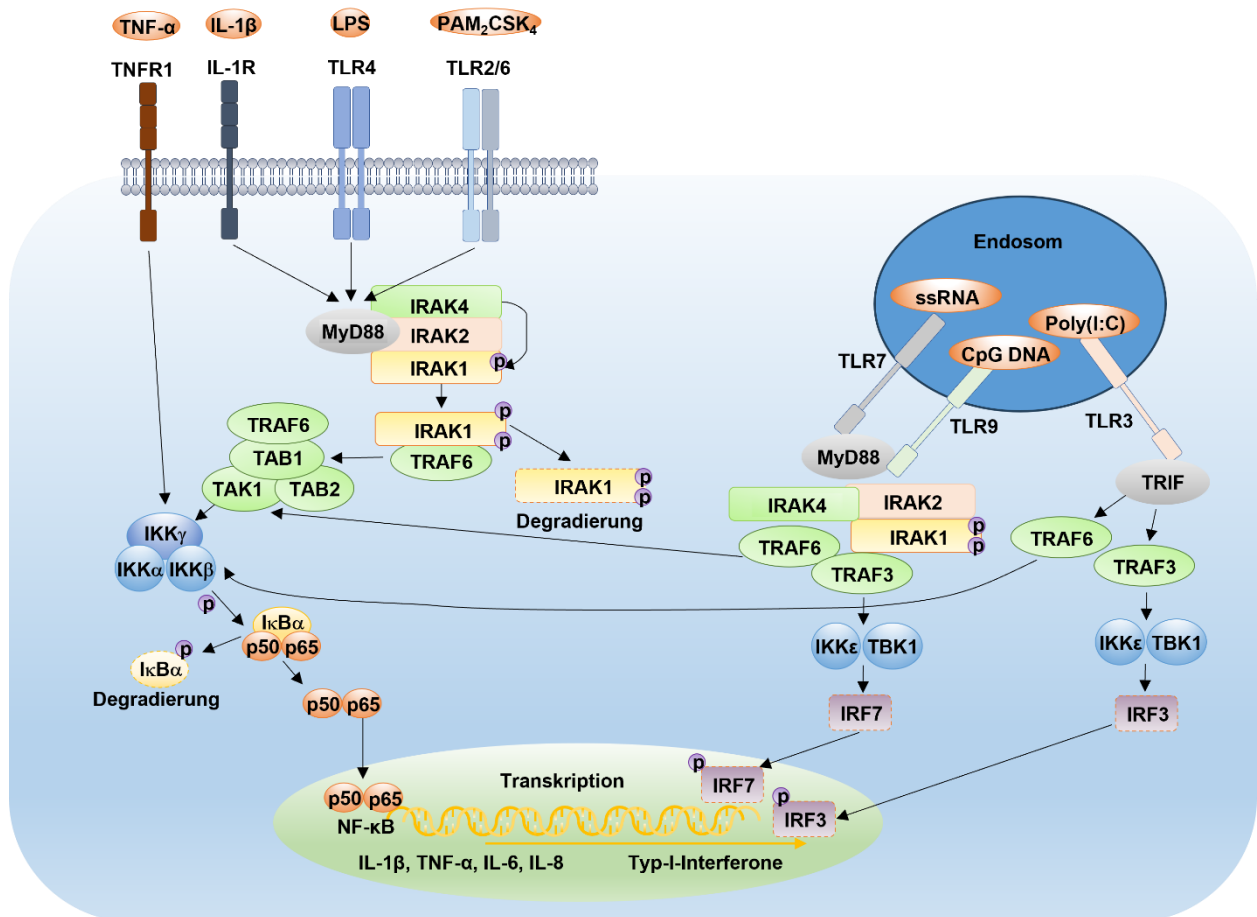


Abbildung 1: vereinfachte Darstellung der Signalwege der angeborenen Immunität. DNA, Desoxyribonukleinsäure; IFN, Interferon; I κ B α , NF- κ B inhibitor α ; IKK, I κ B kinase; IL, Interleukin; IL-1R, interleukin-1 receptor; IRAK, interleukin-1 receptor-associated kinase; IRF, IFN-Regulationsfaktor; LPS, lipopolysaccharide; MyD88, myeloid differentiation primary response 88; p50/p65, Komponenten von NF- κ B (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells); ssRNA, Einzelstrang-Ribonukleinsäure; TAB, TAK1-binding proteins; TAK1, TGF- β -activated kinase 1; TBK, NF- κ B activator (TANK)-binding kinase; TLR, toll-like receptor; TNF, Tumornekrosefaktor; TRAF, TNF receptor-associated factor. Eigene Darstellung mit freundlicher Genehmigung modifiziert nach Heller et al., 2020 und Gottschalk et al., 2023 [59,60]

Der NF- κ B (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells)-Signalweg ist ein wichtiger Signalprozess zur Regulation von Immunität und Entzündungen. Nach Bindung von IL-1R an ihr jeweiliges Zytokin oder von TLR (außer TLR3) an ihren

jeweiligen Liganden rekrutieren diese das Adapterprotein MyD88, das sich über eine homophile Interaktion zwischen ihren Todesdomänen mit IRAK4 verbindet (Abb. 1). Es bildet sich das sogenannte MyDDosome bestehend aus MyD88, IRAK4 und IRAK1/IRAK2. IRAK4 induziert die Phosphorylierung von IRAK1, welches sich dann autophosphoryliert. Die Phosphorylierung an mehreren Stellen ermöglicht es IRAK1, von dem Komplex zu dissoziieren und gleichzeitig mit nachgeschalteten Proteinen wie dem TNF-Rezeptor-assoziierten Faktor 6 (TRAF6) zu interagieren, um die Signalübertragung einzuleiten. IRAK1 und TRAF6 dissoziieren aus dem Komplex und binden TAK1/TAB (TGF- β -aktivierte Kinase/TAK1-bindende Proteine). Durch Ubiquitinierung und Abbau von IRAK1 und TRAF6 wird TAK1 aktiviert. Letzteres steigert die Aktivität des I κ B-Kinase(IKK)-Komplexes, was wiederum zur Phosphorylierung und zum Abbau von Inhibitoren des Nuklearfaktors kappa B (I κ B) führt. Dadurch werden die NF- κ B-Dimere, bestehend aus RelA (p65), c-Rel und p50, aktiviert. Diese wandern in den Zellkern, was zur Gentranskription und zur Induktion von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 und IL-12 führt [12–17,54,61,62] (Abb. 1). Patientinnen und Patienten mit vollständigem Mangel an MyD88 oder IRAK4 leiden klinisch an invasiven bakteriellen Infektionen [62–65].

1.2.3 MyD88- und IRAK-unabhängige NF- κ B-Signalwege

Neben dem oben beschriebenen klassischen Signalweg gibt es weitere, die über NF- κ B-Aktivierung ebenfalls zur Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen führen, jedoch unabhängig von MyD88 und der IRAK-Familie. Sie werden daher in Experimenten zur Untersuchung der Zytokin-Ausschüttung häufig als Kontrollen verwendet.

Ein Beispiel dafür ist die Bindung von TNF- α an den Rezeptor TNFR1. In Immunzellen und Fibroblasten kontrollieren TNFR1-abhängige Signalwege über Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B MyD88- und IRAK-unabhängig die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6, IL-8, und TNF- α , aber auch IL-10 [66] (Abb. 1). Ebenso führt die Stimulation von Zellen mit der Kombination aus PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) und Ionomycin durch MyD88-/IRAK-unabhängige Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B zur Produktion proinflammatorischer Zytokine. „PMA aktiviert die Proteinkinase C, während Ionomycin ein Kalzium-Ionophor ist. Die Stimulation mit diesen Verbindungen umgeht den T-Zell-Membranrezeptor-Komplex und führt zur Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalwege, was zur Aktivierung der T-

Zellen und zur Produktion einer Vielzahl von Zytokinen führt“ (Übersetzung durch die Autorin) [67]. Ein weiteres Beispiel ist die Erkennung von dsRNA durch den TLR3, was zur Aktivierung des TRIF-abhängigen NF- κ B-Signalwegs führt (siehe 1.2.5) (Abb. 1).

1.2.4 MyD88/IRAK-abhängiger Typ-I-Interferon-Signalweg

TLR7 und TLR9 erkennen als PAMP ssRNA bzw. CpG-DNA. Wenn TLR7 und TLR9 einen Liganden binden, aktivieren sie MyD88, das einen Komplex mit TRAF3 und dem IFN-Regulationsfaktor 7 (IRF7) bildet (Abb. 1). Vermutlich bindet IRAK1 direkt an IRF7 und ist in diesem Komplex enthalten. IRAK4 befindet sich möglicherweise stromaufwärts von IRAK1 und ist an der Aktivierung von IRAK1 durch Phosphorylierung beteiligt. Wenn der Komplex in den Zellkern transloziert wird, induziert er die Transkription von IFN-Genen des Typs I (IFN- α / β), welche das virale Wachstum hemmen und die antivirale Reaktion regulieren [13,14,54,68] (Abb. 1). Außerdem kann das nach TLR7- oder TLR9-Ligand-Bindung aktivierte MyD88 auch TRAF6 rekrutieren, was den NF- κ B-Signalweg aktiviert (s. 1.1.2) (Abb. 1).

Interferone sind für eine adäquate Abwehr von Viren unerlässlich. Eine pathologisch verstärkte oder anhaltende Aktivierung des IFN-Signalwegs kann auch ursächlich für Autoimmunerkrankungen sein [68–71]. Bei IRF7-Mangel sind Kinder selektiv anfällig für schwere Infektionen durch Influenza und SARS-CoV2 und zeigen eine beeinträchtigte Typ-I-IFN-Signatur [72,73]. Die Messung von Typ-I-IFN im Blut ist zwar mittels Enzymimmunoassay theoretisch möglich (ELISA), aber aufgrund der geringen Blutkonzentrationen sehr kosten- und zeitaufwändig und daher auch nur unzureichend für die Routinediagnostik validiert. Eine Alternative bietet die quantitative Bestimmung der Expression von Typ-I-Interferon-stimulierten Genen (ISG) wie beispielsweise ISG15 und Siglec-1, die sogenannte IFN-Signatur, mittels rt-PCR oder Gesamt-RNA-Sequenzierung (RNA-Seq) [74,75]. Eine IFN-Signatur kommt bei zahlreichen rheumatischen Erkrankungen vor, unter anderem Systemischem Lupus erythematoses, Dermatomyositis, Systemischer Sklerose und Sjögren-Syndrom [76–79]. Eine preiswerte, robust verfügbare und gut validierte Alternative zur aufwendigen Bestimmung dieser „Interferonsignatur“ im Vollblut stellt die Messung der Expression von CD169 auf der Zelloberfläche von Monozyten aus peripherem Blut mittels Durchflusszytometrie dar [68]. CD169 (Siglec-1), ein Zelloberflächenmarker, wird auf Blutmonozyten im Rahmen einer physiologischen Abwehrreaktion zu einem frühen Zeitpunkt während einer

Virusinfektion höher exprimiert. Die Expression von CD169 auf Monozyten (MoCD169) ist dabei vor allem bei einer Virusinfektion erhöht, nicht jedoch bei Patienten mit einer bakteriellen Infektion, sodass CD169 auf Monozyten auch als ein Marker zur Unterscheidung zwischen bakteriellen und viralen Infektionen dienen könnte [80,81]. Die Expression von MoCD169 ist auch bei Patienten mit Autoimmun- und autoinflammatorischen Erkrankungen erhöht, bei denen IFN- α an der Pathogenese beteiligt ist, und dient beispielsweise bei der Behandlung des Systemischen Lupus erythematoses als ein gut etablierter Aktivitätsmarker [69,82,83].

1.2.5 TRIF-abhängiger Typ-I-Interferon-Signalweg

TLR3 ist der einzige Rezeptor in der TLR-Familie, der in seiner Signalgebung vollständig von TRIF abhängt. Der TLR3-Signalweg verzweigt sich von TRIF aus in zwei Zweige. Ein Zweig führt über TRAF6 zur Aktivierung von NF- κ B, während der zweite Zweig über TRAF3 die Aktivierung von IRF3 bewirkt (Abb. 1). Über TRAF6 kommt es zur Aktivierung der I κ B-Kinasen (IKK), welche wie unter 1.2.2 beschrieben den kanonischen NF- κ B-Signalweg aktivieren, was zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen bzw. Chemokinen führt. Über TRAF3 kommt es zur Aktivierung weiterer Proteine wie IKK ϵ und TRAF family member-associated NF- κ B activator (TANK)-binding kinase 1 (TBK1), was zur Produktion von Typ-I-IFN führt [50,54,84–86] (Abb. 1). Auch über den TLR4 kann der TRIF-IRF3-abhängige Typ-I-Interferon-Signalweg aktiviert werden [54], was in Abb. 1 aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt ist. Die genauen Mechanismen und die Regulierung von TRIF sind Gegenstand aktueller Forschung [85].

1.3 Die Rolle von IRAK1 in Signalwegen der angeborenen Immunität

1.3.1 Die IRAK-Familie

Die IRAK-Familie, eine Gruppe von Kinasen, spielt eine zentrale Rolle bei Entzündungsreaktionen und ist entscheidend für die Eliminierung von Viren, Bakterien und Krebszellen sowie für die Wundheilung [15]. Beim Menschen wurden bisher vier Mitglieder beschrieben: die katalytisch aktiven IRAK1 und IRAK4, sowie IRAK2 und IRAK3 (auch IRAKM genannt) ohne katalytische Aktivität. IRAK1, IRAK2 und IRAK4 spielen eine wichtige Rolle bei der Regulierung sowohl des IL-1-vermittelten als auch des TLR-vermittelten, kanonischen Signalwegs von NF- κ B [12–17] (Abb. 1). Es wird angenommen, dass IRAK4 IRAK1 phosphoryliert, wodurch IRAK1 eine

Autophosphorylierungskaskade in Gang setzen kann. Dies ermöglicht die Lösung von MyD88 und die Einleitung der Signalübertragung. Die (Auto-) Phosphorylierung führt aber nicht nur zu einer Aktivierung, sondern hat auch einen regulatorischen Charakter, indem phosphoryliertes IRAK1 von Ubiquitin-Ligasen erkannt und für den proteasomalen Abbau markiert wird [15,19].

1.3.2 Die Rolle von IRAK1 im NF- κ B-Signalweg

IRAK1 wurde als eine Kinase beschrieben, die *in vitro* maßgeblich an der TLR- und IL-1R-Signalübertragung beteiligt ist. Die IL-1-vermittelte IL-6-Produktion und Aktivierung von NF- κ B waren in murinen IRAK1-defizienten Embryonal-Fibroblasten und Haut-Fibroblasten stark vermindert [87,88]. Makrophagen von IRAK1-defizienten Mäusen wiesen eine geringere Zytokinproduktion nach TLR4- TLR7- und TLR8-Stimulation auf, nicht aber nach TLR2-Stimulation [89]. Swantek et al. konnten zeigen, dass die Zytokinproduktion sowie die NF- κ B-Aktivierung als Reaktion auf den TLR4-Liganden LPS in IRAK1-defizienten murinen Makrophagen beeinträchtigt, aber nicht aufgehoben war [90]. Die TLR7- und TLR9-vermittelte NF- κ B-Aktivierung und Produktion proinflammatorischer Zytokine ist in plasmazytoiden dendritischen Zellen von IRAK1-defizienten Mäusen nicht beeinträchtigt [14,91]. Scheinbar ist IRAK1 bei der Reaktion bestimmter Zelltypen auf bestimmte TLR-Liganden redundant [14].

Der einzige bislang beschriebene menschliche Fall von IRAK1-Defizienz betraf einen männlichen Patienten mit großer Xq28-Deletion, die sowohl *MECP2* als auch *IRAK1* umfasste. Er verstarb im Alter von 7 Monaten aufgrund einer fortschreitende Ateminsuffizienz im Rahmen einer radiologisch bestätigten Pneumonie, vermutlich im Rahmen einer Aspiration. *In vitro* reagierten die SV40-Fibroblasten des Patienten schlecht auf TLR2/6- und TLR4-Agonisten, aber normal auf IL-1 β . Im Gegensatz dazu war die Reaktion in PBMC des Patienten normal auf IL-1 β und alle getesteten TLR-Agonisten (TLR1/2, TLR2/6, TLR4, TLR7 und TLR8). Die TLR- und IL-1R-vermittelte Signalübertragung in menschlichen Fibroblasten scheint bei den IRAK-Proteinen zu divergieren: IRAK1 ist für die Signalübertragung nach TLR ausschlaggebend, während die Signalübertragung nach IL-1R durch IRAK1, IRAK2 oder beide vermittelt werden kann. Auch in Leukozyten scheint der TLR-/IL-1R-Weg durch IRAK1, IRAK2 oder beide vermittelt zu werden [92].

1.3.3 Die Rolle von IRAK1 im Typ-I-Interferon-Signalweg

IRAK1 ist auch ein Schlüsselregulator bei der TLR7- und TLR9-vermittelten Typ-1-IFN-Induktion [14]. *In vitro* reguliert IRAK1 die transkriptionelle Aktivierung von IRF7 durch direkte Bindung und Phosphorylierung. Die TLR7- und TLR9-vermittelte IFN- α -Produktion ist in IRAK1-defizienten Mäusen aufgehoben [14,91]. Zusammenfassend ist IRAK1 für die TLR7- und TLR9-vermittelte NF- κ B-Aktivierung zwar entbehrlich, aber für die Regulation der IFN-Induktion durch die Aktivierung von IRF7 unerlässlich [14,91]. Im TLR3-TRIF-abhängigen IFN-Signalweg spielt IRAK1 nach aktuellem Forschungsstand keine Rolle [50,84,85].

1.4 Fragestellung

Bislang wurden zahlreiche Fallberichte über Patientinnen und Patienten mit *MECP2*-Duplikationssyndrom veröffentlicht. Jedoch existierte keine systematische Übersicht, sodass es unmöglich war, zuverlässige Aussagen zur Prävalenz der Symptome, sowie zu Geschlechterverhältnissen, zu treffen. Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, durch eine systematische Literaturrecherche den aktuellen Wissensstand über alle veröffentlichten Patientinnen und Patienten zusammenzufassen und folgende Fragen zu beantworten:

- Wie viele Patientinnen und Patienten mit *MECP2*-Duplikationssyndrom wurden bislang veröffentlicht? Aus welchen Ländern kommen diese Veröffentlichungen?
- Wie viele von diesen präsentieren sich mit den Hauptsymptomen geistige Entwicklungsverzögerung und/oder infantile Hypotonie?
- Wie viele von diesen leiden an epileptischen Anfällen?
- Bei wie vielen von diesen sind schwerwiegende/ wiederkehrende Infektionen beschrieben? Wie oft betreffen diese die Atemwege? Welche weiteren Infektionen sind häufig? Welche Erreger wurden identifiziert?
- Wie viele dieser Patientinnen und Patienten sind vorzeitig verstorben und an welcher Todesursache?
- Welche immunologische Diagnostik wurde bei den Patientinnen und Patienten durchgeführt und welche Ergebnisse ergab diese?
- Welche Therapien wurden durchgeführt?

Die für das *MECP2*-Duplikationssyndrom als typisch beschriebenen schweren wiederkehrenden Infektionen kombiniert mit der Duplikation des an wichtigen Inflammationssignalwegen beteiligten *IRAK1*-Gens warf die Frage auf, ob eine Überexpression von *IRAK1* ursächlich für den klinischen Phänotyp sein könnte. Ein verstärktes Signal im kanonischen NF- κ B-Signalweg könnte Akute-Phase-Reaktionen nachteilig beeinflussen. Wir vermuteten, dass Patientinnen und Patienten mit einer *MECP2/IRAK1*-Duplikation eine verstärkte proinflammatorische Signaltransduktion über den TLR-/IL-1R-gesteuerten kanonischen NF- κ B-Signalweg aufweisen könnten und formulierten die folgende Hypothese:

Die Duplikation von *IRAK1* führt zu einer vermehrten Aktivierung des kanonischen TLR/IL1R-MYD88-IRAK4-IRAK1-NF- κ B-abhängigen Signalwegs mit konsekutiv erhöhter Bildung proinflammatorischer Zytokine bei Patienten mit *MECP2/IRAK1*-Duplikation.

Zur Untersuchung dieser Hypothese wurden die folgenden Unterhypothesen überprüft:

- a. Patienten mit *MECP2/IRAK1*-Duplikation weisen eine verstärkte Expression von *IRAK1*-Protein im Vergleich zu gesunden Probanden auf.
- b. Patienten mit *MECP2/IRAK1*-Duplikation weisen in Fibroblasten einen schnelleren I κ B α -Abbau nach Stimulation mit IL-1 β im Vergleich zu gesunden Probanden auf.
- c. Die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen nach Stimulation mit TLR2/6- und TLR4-Agonisten ist *in vitro* in Fibroblasten, PBMC und/ oder Vollblut von Patienten mit *MECP2/IRAK1*-Duplikation im Vergleich zu gesunden Probanden verstärkt.

2 Methodik

2.1 Systematische Literaturrecherche der bisher publizierten Patientinnen und Patienten mit *MECP2*-Duplikationssyndrom

Die systematische Literaturrecherche wurde mit dem Ziel der Transparenz und Reproduzierbarkeit angelehnt an die Richtlinien des Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) und nach den STARLITE-Grundsätzen (Standards for Reporting Literature searches) durchgeführt.

Tabelle 1: Anwendung der STARLITE-Prinzipien auf die Literaturrecherche; eigene Darstellung

Element	Erläuterungen
S: Sampling strategy	umfassend
T: Type of studies	vollständig berichtet
A: Approaches	Elektronisch und Zitat-Schneeballprinzip
R: Range of years	vollständig berichtet 2005 (Erstbeschreibung) bis 2021, zusätzlich Artikel vor 2005 durch Zitat-Schneeballprinzip
L: Limits	Sprache (Englisch, Deutsch, Französisch, Spanisch)
I: Inclusion and Exclusion	Einschluss (human, Duplikation oder Triplikation von <i>MECP2</i> - und <i>IRAK1</i> -Gen); Ausschluss (Volltext nicht verfügbar, unvollständige Duplikation der Gene, <i>IRAK1</i> nicht vollständig dupliziert)
T: Terms used	Suchbegriffe „ <i>MECP2</i> duplication“ oder „ <i>IRAK1</i> duplication“
E: Electronic sources	PubMed®

Die Datenbank PubMed® wurde nach den Suchbegriffen „*MECP2* duplication“ oder „*IRAK1* duplication“ durchsucht. Die Identifizierung der relevanten Studien erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurden die Titel und Abstracts aller identifizierten Artikel gesichtet, und Studien, die nicht den Einschlusskriterien entsprachen, ausgeschlossen. Anschließend wurden die verbleibenden Artikel in voller Länge gelesen, um ihre Eignung zu bewerten.

Eingeschlossen wurden nur Artikel, die menschliche Patientinnen und Patienten mit *MECP2*-Duplikationssyndrom beschreiben. In der quantitativen Auswertung wurden nur die Patientinnen und Patienten berücksichtigt, die eine Duplikation oder Triplikation der sogenannten „minimal critical region“ aus *MECP2*- und *IRAK1*-Gen aufwiesen. Patientinnen und Patienten, die keine oder lediglich eine teilweise *IRAK1*-Duplikation

aufweisen, bzw. bei denen keine Angabe zur *IRAK1*-Duplikation getroffen wurde, wurden nicht berücksichtigt. Ausgeschlossen wurden Artikel, bei denen der Volltext nicht abrufbar war oder die ausschließlich in chinesischer Sprache vorlagen.

Die Suche umfasste alle Artikel seit Erstbeschreibung des *MECP2*-Duplikationssyndroms im Jahr 2005 bis März 2021. Wenn in den gesichteten Fallberichten Bezug auf in anderen Artikeln veröffentlichte Patientinnen und Patienten genommen wurde, wurden diese Abstracts ebenfalls eingeschlossen, sodass auch Artikel vor Erstbeschreibung des Syndroms berücksichtigt wurden, sofern aus den genetischen Informationen hervorging, dass die Duplikation bzw. Triplikation mindestens die Gene *MECP2* und *IRAK1* umfasst haben muss.

Beim Sichten der Volltexte wurden Dopplungen von Patientinnen und Patienten sofern nachvollziehbar ausgeschlossen. Wenn die Patientinnen und Patienten bereits in einem Artikel beschrieben wurden, wurden sie in der Auswertung nur einfach gezählt, aber alle verfügbaren Informationen zusammengefügt. Zudem wurden die von den gleichen Autoren veröffentlichten Artikel aktiv auf mögliche Doppelbeschreibungen untersucht.

Für die Auswertung wurden die Daten aus Volltext, Tabellen und Grafiken der Artikel extrahiert und systematisch tabellarisch dokumentiert, um eine spätere Analyse zu ermöglichen. Hierbei wurden unter anderem Informationen wie Anzahl und Alter der Patientinnen und Patienten, sowie Angaben zum klinischen Phänotyp, zur genetischen, immunologischen und mikrobiologischen Diagnostik sowie zur Therapie erfasst.

Die Ergebnisse der systematischen Literaturrecherche wurden in einer tabellarischen Form präsentiert, um eine übersichtliche Darstellung zu ermöglichen. Darüber hinaus wurden weitere Ergebnisse für eine bessere Übersichtlichkeit narrativ zusammengefasst.

2.2 Patientenkohorte

2.2.1 Rekrutierung

Die Rekrutierung erfolgte europaweit über verschiedene Wege:

- Kontaktaufnahme mit Patienten, die an unserer früheren Studie teilgenommen hatten [41]

- Kontaktaufnahme mit Ärztinnen und Ärzten, die an unserer früheren Studie beteiligt waren und ebenfalls Patientinnen und Patienten mit *MECP2*-Duplikationssyndrom behandeln
- Kontaktaufnahme mit Autorinnen und Autoren von wissenschaftlichen Veröffentlichungen, in denen Patientinnen und Patienten mit *MECP2*-Duplikationssyndrom beschrieben wurden
- Kontaktaufnahme mit Selbsthilfe-/Unterstützungsgruppen für Eltern von Kindern mit *MECP2*-Duplikationssyndrom

Auf diesen Wegen konnte ein Kontakt zu mehreren betroffenen und interessierten Familien hergestellt werden. Von jedem gesetzlichen Vertreter eines jeden für die Studie rekrutierten Patienten wurde eine informierte Zustimmung eingeholt. Die Studie wurde in Übereinstimmung mit den ethischen Standards der Helsinki-Erklärung von 1964 und dem institutionellen Forschungsausschuss (Charité-Universitätsmedizin Berlin, Deutschland, EA2/063/12) durchgeführt.

2.2.2 Fragebogendesign

Ein standardisierter Fragebogen zu klinischen Charakteristika wurde von den behandelnden Pädiatern gemeinsam mit den Eltern ausgefüllt. Drei der Patienten waren selbst in unserer Ambulanz vorstellig. Der Fragebogen wurde aus dem in unserer vorherigen Studie verwendeten Fragebogen [41] weiterentwickelt und enthielt Fragen zu

- Allgemeinen Informationen wie Alter und Geschlecht
- Art der betreuenden medizinischen Fachdisziplinen
- Art und Größe der Duplikation
- Art, Häufigkeit und Therapie von Infektionen
- Art, Häufigkeit und Methode der Diagnostik von Pneumonien
- Art und Nachweismethode auslösender Erreger
- Fieberepisoden
- Neurologischen Symptomen wie epileptischen Anfällen, muskulärer Hypotonie und Entwicklungsverzögerung
- Impfungen und deren Erfolg
- Blutspiegeln von Immunglobulin-Klassen und spezifischen Antikörpern und
- Antibiotischer Prophylaxe und IgG-Substitution.

2.3 Material

2.3.1 Geräte

Tabelle 2: Geräte; eigene Darstellung

Name	Katalognummer	Firma
Biofuge Pico Mikroliterzentrifuge	11332	Heraeus
Biometra P25T Standard Power Pack mit Timer	846-040-850	Analytik Jena
Elektrophorese Netzgerät Consort E835	E835	Consort
Elektrophoresekammer		Peqlab
ELISA Mikrotiterplatten-Reader, multimodal, VersaMax™	735-0348	Molecular Devices
Heckel 150 CO2 Inkubator		Heraeus
Immolute 1000		Siemens
Mikroskop mit hochauflösender Kamera (DMIL, DFC340 FX)		Leica
Mikrotiterplatten-Schüttler Titramax	444-1210	Heidolph
Mikrozentrifuge Fresco™ 17, gekühlt	75002402	Thermo Fisher Scientific
Mini-PROTEAN® Electrophoresis Cell	165-8004	BioRad
Sicherheitswerkbank HERAsafe HS15	3125	Heraeus
Thermomixer	5.355.000.011	Eppendorf
Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell	1703940	BioRad
Versadoc Imaging System	1708010	BioRad
Wasserbad 1012	1012	GFL
Zentrifuge 5810R (rad 17,9)	5811000015	Eppendorf

2.3.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien; eigene Darstellung

Name	Katalognummer	Firma
12-Well-Platten Falcon™	353043	Thermo Fisher Scientific
Cell Culture Tubes	83.9923.929	Sarstedt
Eppendorf Reaktionsgefäß, 1,5ml	30125150	Eppendorf
Immuno 96-Well-Platten	475094	Thermo Fisher Scientific
Kryoröhrchen CryoPure	72.380.007	Sarstedt

Name	Katalognummer	Firma
Kryoröhrchen Nunc™	377267	Thermo Fisher Scientific
Mr. Frosty™ Gefrierbehälter	5100-0001	Thermo Fisher Scientific
Nitrocellulose Membran 0,45µm	88018	Thermo Fisher Scientific
Nunc™ Zellkultur-Multischalen	140675	Thermo Fisher Scientific
Serologische Pipette, 5ml	357543	Corning
Serologische Pipette, 10ml	357551	Corning
Serologische Pipette, 5ml	357525	Corning
Transferpipette, 3,5 ml	86.1172.010	Sarstedt
Zellkulturflasche, PS, 250 ml, 75 cm ² , filter-Schraubverschluss, cellstar® TC, steril	GB658175	Greiner Bio-One
Zellkulturkolben, 25 cm ² Nunc™ EasYFlask™	156367	Thermo Fisher Scientific
Zellkulturschale 100x20mm	353003	Thermo Fisher Scientific
Zellschaber	83.3950	Sarstedt
Zentrifugenröhrchen Falcon™, 15ml	352096	Thermo Fisher Scientific
Zentrifugenröhrchen Falcon™, 50ml	352070	Thermo Fisher Scientific
Whatman Blotting Paper, Pure Cellulose	10426994	Whatman

2.3.3 Chemikalien

Tabelle 4: Chemikalien; eigene Darstellung

Name	Katalognummer	Herstellende Firma
30% Acrylamide/Bis	1610156	BioRad
Agarose	840004	Biozym
Ammoniumperoxydisulfat (APS)	101201	Merck
Ampuwa Spüllösung 1000 ml Plastipur	1088811	Fresenius
BioColl® Trennlösung	L6113	Biochrom
Bovine Serum Albumin (BSA)	01400	Biomol
cOmplete™, Mini, EDTA-freier Protease-Inhibitor-Cocktail	11836170001	Roche
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), high glucose, GlutaMAX Supplement	31966021	Thermo Fisher Scientific
DMSO (Dimethylsulfoxid)	D2650	Sigma-Aldrich
Ethanol absolut	BAKR8025	Avantor
Ethidiumbromid-Lösung	E1510	Sigma-Aldrich

Name	Katalognummer	Herstellende Firma
Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA)	8043.2	Roth
Fötales Kälberserum (Fetal Bovine Serum, FBS)	F7524	Sigma-Aldrich
FIREPol® Master Mix	04-11-00125	Solis Biodyne
Glycin	A1067.1000	PanReac AppliChem
Histopaque®-1077 Hybri-Max™	H8889	Sigma-Aldrich
Isopropanol	109634	Merck
Laemmli Puffer	1610737EDU	Bio-Rad
Natriumchlorid (NaCl)	106404	Merck
PBS (phosphate buffered saline) Lösung ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺	D8537	Sigma-Aldrich
PCR Wasser	1HPE.1	Roth
Proteinmarker (Precision Plus Protein Dual Color Standard)	161-0374	Bio-Rad
RPMI 1640 Medium, GlutaMAX™ Supplement	61870010	Thermo Fisher Scientific
SDS for molecular biology	A2263	PanReac AppliChem
Magermilchpulver	70166-500G	Sigma-Aldrich
Methanol	4627.5	Roth
Restore™ PLUS Western Blot Stripping-Puffer	46430	Thermo Fisher Scientific
TEMED (Tetramethylethylenediamine)	1610801	BioRad
Triton™ X-100	93426	Sigma-Aldrich
Trizma®-Base	T1503	Sigma-Aldrich
Trypanblau -Lösung	T8154	Sigma-Aldrich
Tween® 20	9127.1	Roth
β-Mercaptoethanol	4227.2	Roth
Trypsin/EDTA solution 0.25%/0.02% in PBS, without Ca ²⁺ , Mg ²⁺	L2163	Biochrom

2.3.4 Kits

Tabelle 5: Kits; eigene Darstellung

Name	Katalognummer	Firma
PeliPair™ reagent set für humanes IL-6	M9316	Sanquin
PeliPair™ reagent set für humanes IL-8	M9318	Sanquin

Name	Katalognummer	Firma
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	23227	Thermo Fisher Scientific
Pierce™ ECL Western Blotting-Substrat	32106	Thermo Fisher Scientific
Xfect™ Transfection Reagent	631317	Takara Bio

2.3.5 Zytokine und TLR-Agonisten

Tabelle 6: Zytokine und TLR-Agonisten; eigene Darstellung

Name	Katalognummer	Firma
Ionomycin Calcium Salt from Streptomyces	I0634	Sigma-Aldrich
LPS	L9764	Sigma-Aldrich
Pam ₂ CSK ₄	Tlrl-pm2s-1	InvivoGen
Phorbol-12-myristate-13-acetat (PMA)	P8139	Sigma-Aldrich
Poly (I:C) LMW	Tlrl-picw	InvivoGen
rhTNF- α	210-TA	R&D Systems
rhIL-1 β	201-LB	R&D Systems

2.3.6 Westernblot-Antikörper

Tabelle 7: Westernblot-Antikörper; eigene Darstellung

Name	Katalognummer	Firma	Verdünnung
GAPDH (FL-335), polyclonal rabbit IgG	sc-25778	Santa Cruz Biotechnology	1:1 000
Goat Anti Mouse IgG (H+L)	115-035-062	Dianova	1:10 000
Goat Anti Rabbit IgG (H+L)	111-035-045	Dianova	1:10 000
I κ Ba (25/I κ Ba/MAD-3), monoclonal mouse IgG	610690	BD Biosciences	1:1 000
IRAK1 (H-273), polyclonal rabbit IgG	sc-7883	Santa Cruz Biotechnology	1:500
IRAK4, polyclonal rabbit antibody	ADI-KAP-ST206-E	Enzo	1:250
P38MAPK, polyclonal rabbit antibody	#9212S	Cell Signaling	1:1000

2.4 Kultivierung von SV40-Fibroblasten

2.4.1 SV40-Immortalisierung von primären Fibroblasten

Aufgrund der aufwändigen Logistik, die für die betroffenen Familien mit dem Arztbesuch und für uns mit dem internationalen Probenversand verbunden war, entschieden wir uns die aus Hautbiopsien isolierten primären Fibroblasten der Patienten nach Einverständnis mit einem Simian Virus (SV) 40-Vektor zu transfizieren und zu immortalisieren, sodass die Zellen auch für weitere spätere Experimente patientenunabhängig zur Verfügung standen.

Einen Tag vor der Transfektion wurden die primären Fibroblasten in 1 ml DMEM-Wachstumsmedium ausplattiert, so dass die Zellen zum Zeitpunkt der Transfektion zu 50-70% konfluent adhärent gewachsen waren. In einem Mikrozentrifugenröhrchen wurden 5 µg der SV40-Plasmid-DNA mit Xfect-Reaktionspuffer auf ein Endvolumen von 100 µl verdünnt und durch 5 Sekunden Vortexen bei hoher Geschwindigkeit gut vermischt. Anschließend wurden 1,5 µl Xfect Polymer zur verdünnten Plasmid-DNA hinzugegeben und ebenso durch 5 Sekunden Vortexen bei hoher Geschwindigkeit gut vermischt.

Nach Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur und anschließendem Abschleudern wurde die Nanopartikel-Komplexlösung tropfenweise in das Zellkulturmedium zugegeben. Nach Inkubation bei 37°C 5% CO₂ über Nacht wurde der Zellkulturüberstand durch Absaugen entfernt und durch neues Wachstumsmedium ersetzt.

SV40-transfizierte Fibroblasten weisen eine höhere Proliferationsrate und Abweichungen in der Morphologie gegenüber primären Fibroblasten auf [93,94]. Somit lässt sich der Verdrängungsprozess in der Zellkultur lichtmikroskopisch gut untersuchen. Neben der gesteigerten Teilungsrate fallen bei SV40-immortalisierten Fibroblasten insbesondere eine abgerundete Form und eine ausgeprägte Clusterbildung auf. Nach etwa zwei Monaten waren in der Zellkultur nur noch immortalisierte Zellen zu sehen.

2.4.2 Zellkultur von SV40-immortalisierten Fibroblasten

Die Kultivierung der verwendeten Zellen erfolgte in Brutschränken bei 37°C und 5% CO₂ unter wasserdampfgesättigter Atmosphäre. Alle Arbeiten mit den Zellkulturen und Zellkulturmedien fanden unter einer Laminar-Flow-Sicherheitswerkbank statt.

Die Zellkultur der SV40-immortalisierten Fibroblasten erfolgte in Vollmedium (DMEM mit 10% hitzeinaktiviertem FBS). Der Austausch des Zellkulturmediums erfolgte je nach Bedarf (Farbe und Trübung des Mediums, Konfluenz der Zellen) alle 2 bis 5 Tage. Bei 80-100% konfluentem Wachstum oder ausgeprägter Clusterbildung wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde der Zellrasen nach Abnahme des Mediums zunächst mit PBS gespült und dann mittels auf 37°C erwärmtem 2ml Trypsin/EDTA abgelöst. Nach einer Einwirkzeit von wenigen Minuten ließ sich der Zellrasen dann durch leichtes Klopfen und Spülen mit PBS mittels einer Pipette vom Boden der Zellkulturflasche ablösen. Die Suspension wurde anschließend bei 1800rpm (648G) für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Abnehmen des Überstands wurde das Zellpellet im Medium (DMEM 10% FBS) resuspendiert, je nach Bedarf verdünnt und wieder ausplattiert.

Um die Zelllinien für weitere Experimente nutzbar zu machen, wurden die nach oben beschriebenen Vorgehen aus einer T75 Zellkulturflasche abgelösten Zellen in je 4ml FBS 10% DMSO resuspendiert und zu je 1ml tiefgefroren. Dies geschah in Kryoröhrchen, die in einem Isopropanol-Gefrierbehälter zunächst für 24 Stunden bei -20°C und anschließend für 24 Stunden bei -80°C aufbewahrt und letztlich in einem Tank mit Flüssigstickstoff bei -196°C eingelagert wurden.

Zum Auftauen wurde der Inhalt des in Trockeneis transportierten Kryoröhrchens in 37°C warmem Medium gelöst. Nach Zentrifugation (1800rpm (648G), 5 Minuten, Raumtemperatur) wurde der Zellüberstand abgenommen und das Zellpellet zum Waschen nochmals in PBS gelöst. Nach erneuter Zentrifugation (1800rpm (648G), 5 Minuten, Raumtemperatur) wurde das Endmedium zugegeben und die Suspension in eine T25 Zellkulturflasche überführt.

2.4.3 Überprüfung auf Kontamination mit Mykoplasmen mittels PCR

Um nachzuweisen, dass die verwendeten Zellkulturen frei von Mykoplasmen sind und die gemessene Zytokin-Ausschüttung der kommenden Versuche nicht auf einer bereits bestehenden Infektion beruht, wurde aus den Zellkulturüberständen regelmäßig eine Mykoplasmen-PCR durchgeführt. Als Positivkontrolle diente Mykoplasma-bovis-DNA. Die zu testende Zellreihe wurde zuvor für mindestens 3 Tage im üblichen Medium ohne Antibiotikum kultiviert. Der Zellkulturüberstand wurde für 10 Minuten bei 95°C erhitzt und anschließend zentrifugiert. Jeder 20 µl PCR-Ansatz enthielt 4 µl 5x FIREPol® Master Mix, 14µl destilliertes PCR-Wasser, jeweils 0,5µl des Vorwärts- und Rückwärts-Primers

(10mmol/l) sowie 1µl des zu testenden Zellkulturüberstandes. Wir verwendeten die Primer MycoF (GTACACACCGCCCGTCACAC) und MycR1 (CTTCWTCGACTTYCAGACCCAAGGCAT), die in der Gensequenz von Mykoplasmen-Spezies binden. Die PCR erfolgte nach folgendem Temperaturprofil: Initiale Denaturierung bei 95 °C für 3 Minuten; gefolgt von 3 Zyklen mit 95 °C für 30 Sekunden, 61 °C für 45 Sekunden und 72 °C für 90 Sekunden; 3 Zyklen mit 95 °C für 30 Sekunden, 59 °C für 45 Sekunden und 72 °C für 90 Sekunden; 3 Zyklen mit 95 °C für 30 Sekunden, 57 °C für 45 Sekunden und 72 °C für 90 Sekunden; 33 Zyklen mit 95 °C für 30 Sekunden, 55 °C für 45 Sekunden und 72 °C für 90 Sekunden sowie die finale Extension bei 72 °C für 5 Minuten. Die Überprüfung der Produkte der PCR erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese mit Ethidiumbromid-Anfärbung und UV-Transillumination.

2.5 Ermittlung der Expression von IRAK1 sowie des Abbaus von IRAK1 und IκBα mittels Westernblot

2.5.1 Untersuchung der Expression von IRAK1 und IRAK4

Zunächst wurden die kultivierten SV40-immortalisierten Fibroblasten in Vorbereitung auf die folgenden Experimente bezüglich ihrer Expression von IRAK1 und IRAK4 überprüft. Charakterisiert wurden vier Zelllinien von gesunden Kontrollen, vier Patienten mit *MECP2/IRAK1*-Duplikation sowie eine *IRAK1*-defiziente (*IRAK1y/-*) und eine *IRAK4*-defiziente (*IRAK4-/-*) Zelllinie als Negativkontrollen. Pro Zelllinie war eine konfluent mit SV40-immortalisierten Fibroblasten bewachsene T75-Flasche ausreichend. Die Expression von IRAK1 und IRAK4 wurden mittels Westernblot wie in 2.5.3 beschrieben untersucht und anschließend densitometrisch ausgewertet.

2.5.2 Untersuchung von IRAK1-Phosphorylierung und -Abbau sowie IκBα-Abbau

Um die Funktionalität des TLR-/IL-1R-abhängigen NF-κB-Signalwegs zu testen, bietet es sich an, den Abbau von IRAK1 zu untersuchen. Bei Defekten von IRAK4 oder MyD88, also stromaufwärts von IRAK1, kann IRAK1 nicht phosphoryliert und degradiert werden [61,63]. Für die Untersuchung der Phosphorylierung und des Abbaus von IRAK1 sowie des Abbaus von IκBα wurden pro Patient beziehungsweise Positiv- und Negativkontrolle die SV40-immortalisierten Fibroblasten aus zwei 100% konfluent bewachsenen T75-Zellkulturflaschen verwendet. Nach Ablösen des Zellrasens mit Trypsin/EDTA (siehe 2.4.2) wurde die Zellsuspension gleichmäßig zu 5ml in zwölf 10 cm² große

Zellkulturschalen aufgeteilt und für 24-48h im Brutschrank inkubiert. Nach Erreichen von 80-100% Konfluenz wurde mit der Stimulation begonnen. Dazu wurde das DMEM-Medium im ersten Versuch mit dem IL-1R-Agonisten IL-1 β (10ng/ml), dem TNFR-Agonisten TNF- α (20ng/ml) oder dem TLR4-Agonisten LPS (10 μ g/ml) versetzt. TNF- α fungierte als Kontrolle, da der TNF-Signalweg unabhängig von MyD88, IRAK4 und IRAK1 funktioniert (siehe 1.2.3). Je Zelllinie wurde je eine Zellkulturschale mit je einem der Stimulationsmedien für 15, 30, 45, 60 und 90 Minuten bzw. für 20, 60, 120 und 240 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Stimulationsreaktion gestoppt, indem die Schalen auf Eis gestellt wurden.

2.5.3 Westernblot: Zellyse, BCA-Assay, Blotting und Detektion

Nach Verwerfen des Mediums wurde mit 5ml kaltem PBS gespült, was wiederum verworfen wurde. Anschließend wurde der Zellrasen nach Zugabe von 5ml kaltem PBS mithilfe eines Zellschabers abgelöst und zentrifugiert (1800rpm (648G), 5 Minuten, 4°C). Der Überstand wurde mithilfe einer Pipette möglichst vollständig abgenommen und verworfen, das Zellpellet in 50 μ l Lysepuffer gelöst und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach zwanzigminütiger Inkubation auf Eis erfolgte eine weitere Zentrifugation (5000rpm (2600G), 5 Minuten, 4°C).

Tabelle 8: Herstellung von Lysepuffer; eigene Darstellung

Chemikalie	Lysepuffer	Kommentar
Trizma®-Base	50 mM	
NaCl	150 mM	
EDTA	2 mM	
Triton™ X-100	0,5 %	
Destilliertes Wasser	Auf 100 ml auffüllen	
Proteaseinhibitor	1x	Stocklösung nach Herstellerangaben, erst kurz vor Lyse zum Lysepuffer hinzufügen

Der Proteinüberstand wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und anschließend die Proteinkonzentration des Lysats mittels Bicinchoninsäure (BCA)-Assay bestimmt. Hierzu wurden Protein-Standards mit dem BCA-Protein-Assay-Kit entsprechend den Herstellerempfehlungen zu 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125 und 25 μ g/ml in PBS verdünnt. Das Zellysat wurde jeweils 1:5 in PBS verdünnt. In einer 96-Well-Platte wurden je Well 25 μ l des Standards (je Verdünnung doppelt) bzw. 25 μ l der

verdünnten Probe aufgetragen. Nach Zugabe von 200µl Working Reagent je Well mittels Mehrkanal-Pipette wurde die 96-Well-Platte für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Mit einem ELISA-Reader wurde die Absorption bei 562nm bestimmt. Aus den gemessenen Werten der Standards wurde eine Standardkurve erstellt. Auf Grundlage der Formel der Standardkurve wurde dann die Proteinkonzentration in den Proben berechnet.

Tabelle 9: Herstellung von Trenn- und Sammelgel; eigene Darstellung

Schritt	Chemikalie	Trenngel	Sammelgel	Kommentar
1	Destilliertes Wasser	8,25 ml	6.5 ml	
2	Lower buffer (pH 8,8) Upper buffer (pH 6,8)	5 ml -	- 2.5 ml	
3	30% Acrylamide/Bis	6,8 ml	1 ml	
4	10% APS	150 µl	100 µl	
5	TEMED	15 µl	20 µl	Erst unmittelbar vor Verwendung hinzugeben!

Tabelle 10: Herstellung von Lower buffer und Upper buffer; eigene Darstellung

Schritt	Chemikalie	Lower buffer	Upper buffer	Kommentar
1	Destilliertes Wasser	300 ml	300 ml	
2	Trizma®-Base	90,86g (1,5M)	30,3g (0,5M)	Mit Rührfisch einrühren
3	HCl 32%	bis pH 8,8 (ca. 12ml)	bis pH 6,8 (ca. 20ml)	Unter Abzugshaube, pH-metrische Kontrolle
4	SDS 10%	20ml	20ml	
5	Destilliertes Wasser	Auf 500ml auffüllen	Auf 500ml auffüllen	

Schutzkleidung: Kittel, geschlossene Schuhe, Schutzbrille & Mundschutz

Mittels Gelelektrophorese (SDS-PAGE, Sodium Dodecyl Sulfate – PolyAcrylamid Gel Electrophoresis) wurden die Proteine im Zelllysate nach ihrer Größe aufgetrennt. Trenn- und Sammelgel wurden entsprechend der in Tabelle 9 dargestellten Reihenfolge und Menge hergestellt. Nachdem das Trenngel zwischen die Glasplatten der Gelkammer gegossen wurde, wurde es vorsichtig mit 1ml Isopropanol überschichtet und unter einer Abzugshaube polymerisieren gelassen. Nach etwa 30 Minuten war das Trenngel ausgehärtet, sodass das Isopropanol abgegossen werden und das Trenngel mit dem

Sammelgel überschichtet werden konnte. Nach Einsetzen der Kämme wurde auch das Sammelgel polymerisieren gelassen.

Anschließend wurden zur Herstellung des Probenpuffers 950µl Laemmli Puffer unter einer Abzugshaube mit 50µl β -Mercaptoethanol versetzt. Die Zelllysate wurden in einem neuen Eppendorf-Gefäß entsprechend der Ergebnisse des BCA-Assays mit Lyse-Puffer auf eine Endkonzentration von 50µg Protein pro 20µl verdünnt, nachfolgend mit 5µl des Probenpuffers versetzt und dann für 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis gelegt. Die Gelkammern wurden mit den Gelen bestückt und mit SDS-Laufpuffer aufgefüllt. Nach Herausziehen der Kämme wurde in die jeweils erste Geltasche mithilfe einer spitzen Pipette 5µl Proteinmarker pipettiert. In die weiteren Geltaschen wurden je 25µl einer Probe eingefüllt. Für 20 Minuten wurden 70 V Spannung angelegt, sodass sich die Proben am Boden des Sammelgels sammelten. Anschließend wurden 100V Spannung angelegt, bis die Bromphenolbande fast am unteren Rand des Gels angelangt war. Nach Äquilibrieren der Gele sowie der Nitrocellulose-Membranen für 20 Minuten in Transferpuffer wurde auch das Whatmanpaper in Transferpuffer eingeweicht. In einer Semi-Dry-Blot-Kammer wurden die Komponenten dann wie folgt gestapelt (von unten nach oben): 2 Whatmanpaper, 1 Nitrocellulose-Membran, 1 Gel, 2 Whatmanpaper. Durch vorsichtiges Überrollen mit einem 50ml Falcon wurden etwaige Luftblasen entfernt. Anschließend wurde für 60 Minuten bei 25V und 400mA geblottet. Man sah anhand der Markerbande, dass die Proteine vom Gel auf die Nitrocellulose-Membran übertragen wurden. Die Membranen wurden anschließend mit 10ml 5% Milch-TBST (Tris-buffered saline with Tween 20) für mindestens 1 Stunde schwenkend bei 4°C geblockt. Die Membranen wurden dann mit einem primären Antikörper inkubiert: für I κ B α 1:1000, für IRAK1 1:500, für IRAK4 1:250 und für GAPDH 1:1000 in 10ml 5% Milch-TBST. Nach Inkubation bei 4°C schwenkend über Nacht wurden die Membranen am Folgetag dreimal für 5 Minuten mit TBST-Puffer gewaschen. Dann wurden die Membranen mit dem sekundären Antikörper für 1 Stunde dunkel bei 4°C schwenkend inkubiert. In Abhängigkeit des primären Antikörpers war der sekundäre Antikörper entweder vom anti-rabbit- oder anti-mouse-Typ. Es erfolgten weitere vier Waschschrte mit TBST-Puffer für je 5 Minuten schwenkend bei Raumtemperatur.

Tabelle 11: Herstellung von SDS-Laufpuffer und Transferpuffer; eigene Darstellung

Schritt	Chemikalie	10X SDS-Laufpuffer	10X Transferpuffer
1	Destilliertes Wasser	500 ml	300ml
2	Trizma®-Base	30,3 g	1,5 g
3	Glycin	144 g	7,2 g
4	SDS	10 g	-
	Methanol	-	100ml
5	Destilliertes Wasser	Auf 1 l auffüllen	Auf 500 ml auffüllen

Tabelle 12: Herstellung von TBS(T)-Puffer; eigene Darstellung

Schritt	Chemikalie	10X TBS(T)-Puffer	Kommentar
1	Destilliertes Wasser	300 ml	
2	Trizma®-Base	12,11 g	
3	NaCl	43,83 g	
4	HCl	pH auf 7,5 einstellen	Unter Abzugshaube, pH-metrische Kontrolle
5	Destilliertes Wasser	Auf 500 ml auffüllen	
(6)	Tween® 20	2,5 ml	Für TBS-Puffer ohne Tween® 20

Zur Detektion wurden das Pierce™ ECL Western Blotting-Substrat Kit und das ChemiDoc Imaging System von Bio-Rad verwendet. Die Membranen wurden kurz vor der Entwicklung mit 1,5ml der 1:1 gemischten Blotting-Substrate benetzt, für 1 Minute dunkel inkubiert und dann luftblasenfrei im Detektionsgerät aufgelegt. Die Analyse erfolgte mit der ImageLab Software. Die Proteinbanden zeigten sich bei etwa folgenden Größen: IκBα 38kDa, IRAK1 85 kDa, IRAK4 50 kDa, GAPDH 25 kDa und p38MAPK 40 kDa. GAPDH und p38MAPK dienten als Kontrollen einer gleichmäßigen Probenkonzentration in allen Geltaschen.

Die Membranen wurden dann in mehreren Waschschritten gestrippt, um für weitere Proteindetektionen zur Verfügung zu stehen: 5 Minuten in TBST-Puffer, 5 Minuten schwenkend in TBS-Puffer, 10 Minuten schwenkend in Stripping-Puffer, 5 Minuten schwenkend in TBS-Puffer, 5 Minuten schwenkend in TBST-Puffer. Anschließend

wurden die Membranen wieder mit 10ml 5% Milch-TBST für mindestens 1 Stunde schwenkend bei 4°C geblockt und waren somit wieder für die Inkubation mit einem anderen primären Antikörper bereit.

2.6 Zytokinproduktion in PBMC und Vollblut

2.6.1 Probengewinnung und -transport

Die Abnahme von peripherem Venenblut geschah parallel zu Routine-Blutabnahmen. Das von den Patienten beziehungsweise gesunden Kontrollen entnommene Heparin-Vollblut wurde schnellstmöglich in der Regel innerhalb von 24 h, jedoch bei langen Transportwegen nach maximal 48 Stunden, weiterverarbeitet. Der Transport erfolgte bei Raumtemperatur, immer gemeinsam mit einer Reisekontrolle (gesunder Proband). Falls die Probe nicht am gleichen Tag analysiert werden konnte, wurde zusätzlich im Vergleich zu einer Tageskontrolle (gesunder Proband) gemessen.

2.6.2 Interleukin-6- und Interleukin-8-Produktion in PBMC

Isolation von Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) aus Vollblut

Zunächst wurden in einem Zellkulturröhrchen 3ml Trennmedium vorgelegt. Das Heparin-Blut wurde 1:1 mit PBS-Puffer verdünnt. Diese Suspension wurde mit einer Pipette vorsichtig über das Trennmedium geschichtet, sodass eine klare Schichttrennung ohne Durchwirbelung der Gradienten erreicht wurde. Das Röhrchen wurden anschließend ohne Abbremsen zentrifugiert (2000rpm (800G), 20 Minuten plus Zeit zum Auslaufen lassen, Raumtemperatur). Anschließend wurde mit einer Pipette vorsichtig die helle Schicht in der Mitte, welche die PBMC enthält, abgenommen und in ein separates 15ml Zentrifugenröhrchen überführt. Dieses wurde mit PBS aufgefüllt und im Anschluss zentrifugiert (2200rpm (970G), 5 Minuten mit Bremse, Raumtemperatur). Nach Verwerfen des Überstands wurde das verbleibende Zellpellet nochmals in 15ml PBS aufgenommen und zentrifugiert (1500rpm (450G), 5 Minuten mit Bremse, Raumtemperatur). Nach Verwerfen des Überstands wurde das verbleibende Zellpellet in 1ml Zellkulturmedium (RPMI mit 10% FBS) aufgenommen. In einer Neubauerkammer wurde nach Verdünnung und Versetzen mit Trypanblau die Zellzahl bestimmt.

Stimulation

Die zuvor beschriebene PBMC-Zellsuspension in RPMI 10% FBS ruhte für mindestens 2 Stunden im Brutschrank (37°C, 5% CO₂), bevor sie auf eine Zielzellzahlkonzentration von $0,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml verdünnt wurde. Anschließend wurden auch die Stimulantien in RPMI 10% FBS verdünnt: IL-1 β 1 ng/ml, TNF- α 20 ng/ml, PMA/Ionomycin 1×10^{-7} M/ 1×10^{-5} M, LPS 1 ng/ml und PAM₂CSK₄ 1 μ g/ml. In einer 12-Well-Platte wurden je Well 0,5ml Zellsuspension und je 0,5ml Stimulanz eingesetzt. Nach Inkubation im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) für 48 Stunden wurden die Zellkulturüberstände abgenommen, zentrifugiert (2200rpm (970G), Raumtemperatur) und direkt weiterverarbeitet oder alternativ bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C eingefroren.

ELISA

Der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) wurde entsprechend der Anweisungen des Kits durchgeführt. Die Immuno 96-Well-Platte wurde zunächst mit Anti-IL-6- bzw. Anti-IL-8-Coating-Antikörper über Nacht inkubiert, dann mit 5 % BSA/PBS für 2 Stunden bei Raumtemperatur geblockt und im Anschluss dreimal mit Waschpuffer (1:10) gewaschen. Die Standard-Verdünnungsreihe wurde hergestellt, indem ausgehend von einer maximalen Konzentration von 2000pg/ml wiederholt halbiert mit 1 % BSA/PBS verdünnt wurde bis zu einer minimalen Konzentration von 1,953ng/ml. Die Proben wurden nach Bedarf ebenfalls mit 1 % BSA/PBS verdünnt.

Je Well wurden 50 μ l der Standardverdünnung oder der Probenverdünnung oder 1 % BSA/PBS (letzteres als Leerwert zur Bestimmung der Hintergrundabsorption) eingesetzt. Die 96-Well-Platte wurde für 1 Stunde schüttelnd (300/min) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach viermaligem Waschen wurden 100 μ l Anti-IL-6-Detektions-Antikörper (1:100 in 1% BSA/PBS) je Well aufgetragen und die Platte für weitere zwei Stunden schüttelnd (300/min) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem viermaligem Waschen wurden 100 μ l HRP(horseradish peroxidase) -konjugiertes Streptavidin (1:8000 in QFT-Puffer) je Well aufgetragen und die Platte für weitere zwei Stunden schüttelnd (300/min) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem viermaligem Waschen wurden mittels einer Mehrkanal-Pipette zügig 100 μ l Substratlösung je Well aufgetragen und die Platte für ca. 10 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden mittels der Mehrkanal-Pipette zügig 100 μ l Stopplösung je Well aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit dem VersaMax für IL-6 bei Wellenlängen von 450 nm und 540nm und für IL-

8 bei Wellenlängen von 450 nm und 620nm. Die Analyse wurde mit der Software SoftMax Pro 6.2 durchgeführt.

2.6.3 Interleukin-6- und Interleukin-10-Produktion in Vollblut

Stimulation

Das heparinisierte Vollblut wurde 1:2 mit Zellkulturmedium (RPMI-1640) verdünnt. Die Stimulantien wurden ebenfalls in Zellkulturmedium (RPMI-1640) verdünnt und in den folgenden Endkonzentrationen eingesetzt: IL-1 β 20 ng/ml, TNF- α 20 ng/ml, PMA/Ionomycin 1×10^{-7} M/ 1×10^{-5} M, LPS 1 ng/ml und PAM₂CSK₄ 100 ng/ml. In einer 48-Well-Platte wurden 50 μ l der jeweiligen Stimulanz zu 450 μ l jeder Zellsuspension hinzugegeben. Nach Inkubation im Brutschrank für 48 Stunden (37°C, 5% CO₂) wurden die Zellkulturüberstände ohne vorherige Zentrifugation abgenommen. Da je nach Stimulanz unterschiedliche Zytokin-Konzentrationen zu erwarten sind, wurden die Überstände für die IL-6-Messung unterschiedlich verdünnt: unstimuliert 1:5, IL-1 β 1:20, PMA/Ionomycin 1:30, LPS 1:100 und PAM₂CSK₄ 1:10.

ELISA

Die Überstände wurden am IMMULITE® 1000 (Siemens) mittels spezifischer Chemilumineszenz-Immunoassays für IL-6 beziehungsweise IL-10 gemessen oder bis zur Messung am nächsten Tag bei -20°C eingefroren. Die IL-6-Produktion wurde nach Stimulation mit PAM₂CSK₄, LPS und IL-1 β gemessen, die IL-10 Produktion nach Stimulation mit TNF- α . Zusätzlich wurde die PMA-stimulierte Probe als Positivkontrolle (Signalweg MyD88-/IRAK-unabhängig, s. 1.2.3) gemessen. Die gemessenen Zytokin-Konzentrationen wurden entsprechend des verwendeten Verdünnungsfaktors korrekturgerechnet. Die Werte der Patienten wurden auf Plausibilität mit der Tages-/Reisekontrolle verglichen und anschließend mit den Vergleichswerten einer im Labor erhobenen Kohorte aus gesunden Probanden in Relation gesetzt (n = 179) [59].

2.7 Interleukin-6- und Interleukin-8-Produktion in SV40-Fibroblasten

Stimulation

Die Kultivierung der SV40-Fibroblasten erfolgte wie in 2.4.2 beschrieben. Die analog zu 2.4.1 mit Trypsin/EDTA von der Zellkulturflasche abgelösten SV40-Fibroblasten wurden in DMEM gelöst. Dann wurde die Zellzahl in dieser Zellsuspension mithilfe einer

Neubauerkammer nach Versetzen mit Trypanblau mikroskopisch bestimmt. Durch Verdünnung in Medium (DMEM 10% FBS) wurde auf eine Zielzellzahlkonzentration von $0,5 \cdot 10^5$ Zellen/ml verdünnt. In einer 12-Well-Platte wurden je Well 1ml Zellsuspension eingesetzt. Nach Inkubation für 24 Stunden im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) wurde das Medium verworfen. Die Stimulantien wurden wie folgt in DMEM 10% FBS verdünnt: IL-1 β 1 ng/ml, TNF- α 20 ng/ml, PMA/Ionomycin 1×10^{-7} M/ 1×10^{-5} M, LPS 10 μ g/ml, PAM₂CSK₄ 10 μ g/ml und Poly(I:C) 25 μ g /ml. In der 12-Well-Platte wurden je Well 1ml Medium mit der jeweiligen Stimulanz eingesetzt, sodass jede Zelllinie je einmal mit jeder Stimulanz und einmal mit Stimulanz-freiem Medium benetzt wurde. Nach Inkubation im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) für 24 Stunden wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und entweder direkt weiterverarbeitet oder alternativ bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C eingefroren.

ELISA

Die Zytokin-Konzentrationen von IL-6 und IL-8 in den Zellkulturüberständen der SV40-Fibroblasten wurden mittels ELISA analog zu den unter 2.6.1 beschriebenen Schritten bestimmt. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt.

2.8 Auswertung und Statistische Analyse

Die Abbildungen wurden mit PowerPoint (Microsoft Office) und GraphPad Prism 9 (GraphPad Software Inc.) erstellt. Die statistischen Analysen wurden mit SPSS V28.0.1.0 (IBM) durchgeführt. Die Datensätze wurden auf Normalverteilung getestet, und statistische Vergleiche wurden mit einem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Für den Vergleich von mehreren Gruppen wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet. P-Werte von weniger als 0,05 nach Anpassung durch die Bonferroni-Methode wurden als signifikant angesehen. *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0.0001.

3. Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der systematischen Literaturrecherche

3.1.1 Beschreibung der systematischen Literaturrecherche

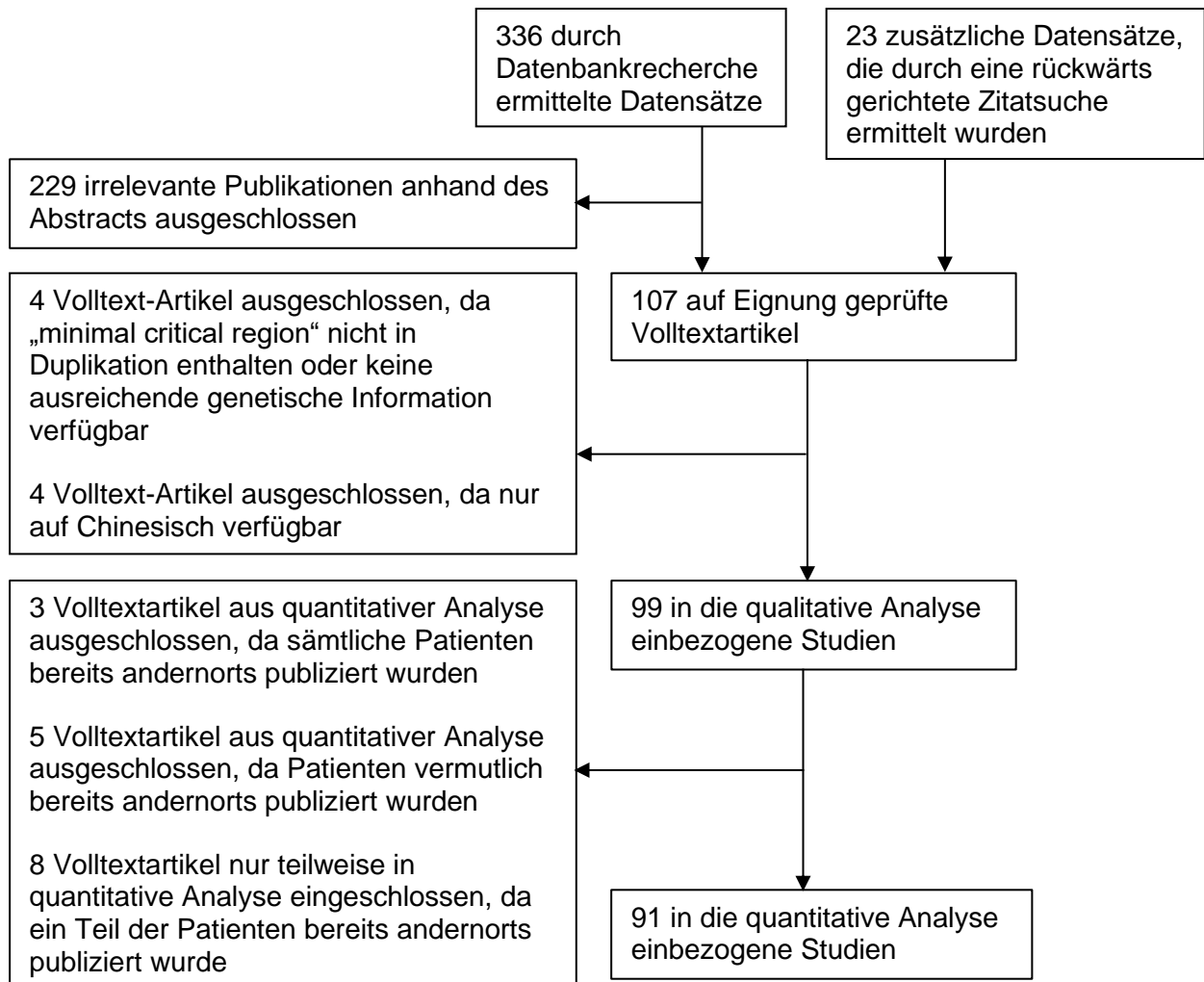


Abbildung 2: PRISMA-Schema der systematischen Literaturrecherche; eigene Darstellung

Bei der Durchsicht der Literatur fanden wir insgesamt 107 zwischen 1987 und März 2021 veröffentlichte Artikel, in denen Patientinnen und Patienten mit *MECP2*-Duplikationssyndrom beschrieben wurden (Abb. 2). Vier Artikel wurden aus der Auswertung ausgeschlossen, da bei allen darin beschriebenen Patientinnen und Patienten die „minimal critical region“ aus *MECP2* und *IRAK1* nicht oder nur unvollständig dupliziert/ tripliziert war oder keine ausreichenden genetischen Informationen vorlagen [30,95–97]. Interessanterweise beschreiben 14 Artikel bereits insgesamt 28 Patienten und 2 Patientinnen mit Xq28-Duplikation im entsprechendem Bereich und typischem

klinischen Phänotyp, bevor das *MECP2*-Duplikationssyndrom offiziell beschrieben wurde [60] (Tabelle 13).

4 Artikel wurden nicht in die Auswertung miteinbezogen, da der Volltext lediglich auf Chinesisch verfügbar war [98–101]. In drei Veröffentlichungen waren alle Patientinnen und Patienten bereits andernorts beschrieben worden, weshalb sie ebenfalls nicht in die Auswertung miteinbezogen wurden [102–104]. In mehreren Publikationen lag bei einem Teil der beschriebenen Patientinnen und Patienten eine *MECP2*-Duplikation ohne oder mit nur unvollständiger *IRAK1*-Duplikation vor [34,39,40,105–107], weshalb diese Patientinnen und Patienten ebenfalls nicht in die statistische Auswertung aufgenommen wurden. Eine der von Bijlsma et al. beschriebenen Patientinnen weist keine Duplikation von *IRAK1* auf und wurde in unserer Publikation versehentlich mit in die Auswertung einbezogen, nun aber korrekterweise aus der quantitativen Auswertung ausgeschlossen [34,60]. Interessanterweise war bei dieser Patientin ohne *IRAK1*-Duplikation ein gehäuftes Auftreten von schweren Infektionen beschrieben [34].

3.1.2 Anzahl und Geschlechterverhältnis bislang publizierter Patientinnen und Patienten mit *MECP2*-Duplikationssyndrom

Bislang wurden mindestens 546 Fälle von *MECP2*-Duplikationssyndrom mit bestätigtem Genotyp veröffentlicht, wovon 506 (93%) männliche Patienten und 40 (7%) symptomatische weibliche Patientinnen waren (Tabellen 13-15) [60]. Wir haben nur die Patienten in die Auswertung miteinbezogen, die mutmaßlich bislang noch nicht beschrieben worden sind. Zusätzlich wurde die Duplikation bei 39 verwandten Patientinnen und Patienten vermutet (Tabelle 13) [60]. Die Publikationen stammen vorwiegend aus USA (23), Japan (10), China (9), Italien (8), Frankreich (7), Spanien (6), Deutschland (6), Belgien (5), Australien (3) und dem vereinigten Königreich (3). Summiert kommen die Berichte vorwiegend aus Europa (44), Nordamerika (25; hier USA, Kanada und Mexiko) und Ostasien (23, hier Japan, China, Taiwan, Hong Kong und Südkorea), die übrigen asiatischen Länder einschließlich Russland (5), Australien (3), Südamerika (2) und Afrika (1) sind deutlich seltener vertreten (Tabelle 13).

Tabelle 13 Überblick über die bislang veröffentlichten MDS-Patienten. ND: nicht erhoben; modifiziert nach Gottschalk et al., 2023 [60]

Referenz	Land	Patienten		davon		weitere		Mentale Retardierung/ Entwicklungs- verzögerung	Kindliche muskuläre Hypotonie	Epileptische Anfälle	Wiederholte o. schwere Infektionen		davon respiratorische Infektionen	
		männlich	weiblich	mutmaßliche Patienten	1/1	2/2	3/3				4/4	5/5	1/1	2/2
Mohandas 1987	USA	1	1				1/1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Bertini 1992	Italien	2	2	5			2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
Lahn 1994	USA	3	3				3/3	3/3	3/3	3/3	ND	ND	ND	ND
Vasquez 1995	Mexiko	2	2	1			2/2	2/2	2/2	ND	2/2	2/2	2/2	2/2
Pai 1997	USA	5	5	1			5/5	ND	4/5	4/5	4/4	4/4	4/4	4/4
Goodman 1998	USA	4	4	1			4/4	4/4	1/4	1/4	2/4	2/4	2/2	2/2
Lubs 1999	USA	5	5				5/5	5/5	2/5	2/5	5/5	5/5	5/5	5/5
Lammer 2001	USA	1	1	3			1/1	1/1	ND	ND	1/1	1/1	1/1	1/1
Akiyama 2001	Japan	1	1				1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
Bialer 2003	USA	1	1		1		1/1	1/1	ND	ND	1/1	1/1	1/1	1/1
Novelli 2004	Italien	1	1				1/1	1/1	ND	ND	1/1	1/1	1/1	1/1
Kokalj-Vokac 2004	Slowenien	1	1				1/1	1/1	0/1	0/1	1/1	1/1	1/1	1/1
Lachlan 2004	Vereinigtes Königreich	2	1	1			2/2	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2	1/1	1/1
Teek 2004	Estland	1	1				1/1	ND	ND	ND	1/1	1/1	1/1	1/1
Meins 2005	Deutschland	1	1				1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
Sanlaville 2005 ^a	Frankreich	2	1	1			2/2	2/2	0/2	0/2	2/2	2/2	2/2	2/2
Van Esch 2005	Belgien	13	13				12/12	11/11	4/9	4/9	5/9	5/9	5/5	5/5
Friez 2006 ^a	USA	13	13				13/13	12/13	9/13	9/13	13/13	13/13	12/12	12/12
Rosenberg 2006	Brasilien	1	1	2			1/1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
del Gaudio 2006	USA	7	7				7/7	7/7	1/7	1/7	4/7	4/7	4/4	4/4
Froyen 2007 ^b	Belgien													
Madrigal 2007	Spanien	1	1	2			1/1	1/1	ND	ND	1/1	1/1	1/1	1/1
Bauters 2008 ^a	Frankreich	4	4				ND	ND	ND	ND	1/1	1/1	1/1	1/1

Referenz	Land	Patienten		davon		weitere mutmaßliche Patienten	Mentale Retardierung/ Entwicklungs- verzögerung	Kindliche muskuläre Hypotonie	Epileptische Anfälle	Wiederholte o. schwere Infektionen	davon respi- ratorische Infektionen
		männlich	weiblich	männlich	weiblich						
Smyk 2008	Polen	3	3	2	3/3	2	3/3	3/3	1/3	3/3	2/2
Lugtenberg 2009	Niederlande	13	13	1	13/13	1	13/13	13/13	7/13	3/13	3/3
Clayton-Smith 2009	Vereinigtes Königreich	15	15		14/15		14/15	12/15	8/15	14/15	14/14
Prescott 2009	Norwegen	2	2		2/2		2/2	ND	1/2	2/2	2/2
Ramocki 2009 ^a	USA	8	8	5	8/8	5	8/8	8/8	4/8	6/8	6/6
Velinov 2009	USA	1	1		1/1		1/1	1/1	0/1	0/1	ND
Echenne 2009	Frankreich	5	5		5/5		5/5	5/5	4/5	0/5	ND
Kirk 2009	Australien	3	3		3/3		3/3	1/1	2/2	2/2	2/2
Bartsch 2010	Deutschland	4	4		4/4		4/4	4/4	2/4	4/4	2/2
Honda 2010 ^c	Japan										
Belligni 2010	Italien	1	1		1/1		1/1	1/1	ND	1/1	1/1
Reardon 2010	Irland	8	7	1	8/8		8/8	2/2	4/8	7/8	7/7
Auber 2010	Deutschland	1	1		1/1		1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
Campos 2010	Brasilien	3	3		3/3		3/3	1/1	2/2	ND	ND
Fernandez 2010	Spanien	1	1	1	1/1	1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
Kroes 2011	Niederlande	1	1		1/1		1/1	1/1	ND	1/1	1/1
Neill 2011	USA	1	1		1/1		1/1	ND	ND	ND	ND
Mayo 2011	Spanien	1	1	1	1/1		1/1	0/1	1/1	0/0	0/0
Budisteanu 2011	Rumänien	1	1		1/1		1/1	1/1	0/1	1/1	1/1
Grashoff 2011	Deutschland	2	2	2	2/2		2/2	ND	0/2	1/2	1/1
Breman 2011	USA	6	6		6/6		6/6	6/6	0/6	5/6	ND
Jezela-Stanek 2011	Polen	1	1		1/1		1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
Carvalho 2011 ^a	USA	7	7		7/7		7/7	7/7	2/7	6/6	6/6
Honda 2012	Japan	12	12		12/12		12/12	10/12	9/12	10/12	10/10
Honda 2012	Japan	2	2	1	2/2	1	2/2	2/2	2/2	2/2	1/1

Referenz	Land	Patienten		davon männlich	davon weiblich	weitere mutmaßliche Patienten	Mentale Retardierung/Entwicklungsverzögerung	Kindliche muskuläre Hypotonie	Epileptische Anfälle	Wiederholte o. schwere Infektionen	davon respiratorische Infektionen
		15	15								
Van Esch 2012	Belgien	15	15				13/13	14/14	8/14	9/13	ND
Bijlsma 2012 ^a	USA	3	3					2/3	0/4	2/3	1/2
De Palma 2012	Italien	1	1				1/1	ND	1/1	1/1	1/1
Vignoli 2012	Italien	8	8				8/8	5/5	6/8	6/6	6/6
Sanmann 2012	USA	6	6	4			6/6	3/3	2/2	5/5	5/5
Xu 2012	China	2	2				2/2	2/2	0/2	0/2	ND
Utine 2012	Türkei	1	1				1/1	1/1	0/1	1/1	1/1
Tang 2012	Vereinigtes Königreich	2	2				3/3	3/3	2/2	3/3	3/3
Lund 2013	Norwegen	1	1				1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
Peters 2013 ^c	USA										
Peters 2013 ^c	USA										
Shimada 2013	Japan	4	3	1			4/4	3/3	3/4	4/4	3/3
Shimada 2013	Japan	3	2	1			3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Yamamoto 2014 ^a	Japan	4	4				4/4	2/2	3/4	1/1	ND
Caumes 2014	Frankreich	8	8				8/8	8/8	8/8	3/8	ND
Scott Schwoerer 2014	USA	2	2				2/2	2/2	2/2	1/2	1/1
Fukushi 2014	Japan	5	5				5/5	4/4	5/5	5/5	4/4
Fieremans 2014	Belgien	2	2				2/2	ND	0/1	ND	ND
Nascimento 2014	Kanada	1	1				1/1	ND	1/1	ND	ND
Yi 2014 ^d	China										
Wang 2014 ^d	China										
Novara 2014	Italien	3	3	2			3/3	3/3	ND	0/3	0/0
Lin 2014	Taiwan	1	1				1/1	1/1	1/1	1/1	1/1

Referenz	Land	Patienten	davon männlich	davon weiblich	weitere mutmaßliche Patienten	Mentale Retardierung/Entwicklungsverzögerung	Kindliche muskuläre Hypotonie	Epileptische Anfälle	Wiederholte o. schwere Infektionen	davon respiratorische Infektionen
Peters 2019	USA	48	43	5		31/48	42/48	21/48	27/48	27/27
Hirabayashi 2019	Japan	1	1			1/1	1/1	1/1	1/1	ND
Pascual-Alonso 2020 ^a	Spanien	19	18	1		19/19	17/19	10/19	14/18	14/14
Choi 2020	Hong Kong	1	1			1/1	1/1	0/1	1/1	1/1
Tekendo-Ngongang 2020	Kamerun	1	1		1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
van Baelen 2020	Belgien	3	3			2/2	2/2	ND	3/3	3/3
Liu 2020 ^d	China									
Gutierrez-Sanchez 2020	Spanien	2	2			2/2	1/1	ND	2/2	1/1
Takeguchi 2021	Japan	24	24			18/18	18/21	16/24	18/23	14/18
Gesamt		546	506	40	39	459/487	412/454	257/459	374/479	316/324
			93%	7%		94%	91%	56%	78%	98%

a Teil der Kohorte wurde andernorts bereits beschrieben und die betroffenen Patienten daher nicht in Berechnungen einbezogen

b gesamte Kohorte wurde andernorts bereits beschrieben und daher nicht in Berechnungen einbezogen

c eventuell schon andernorts publizierte Patienten, daher nicht in Berechnungen einbezogen

d Artikel nur auf Chinesisch verfügbar, daher aus Auswertung ausgeschlossen

Tabelle 14: Überblick über den infektiologischen Phänotyp der bislang veröffentlichten weiblichen MDS-Patientinnen. ND, nicht erhoben

Referenz	Patientinnen	Mentale Retardierung o. Entwicklungsverzögerung	Kindliche muskuläre Hypotonie	Epileptische Anfälle	Wiederholte oder schwere Infektionen	davon respiratorische Infektionen	Schluckstörung	Gastroösophagealer Reflux	Vorzeitiger Tod (<25. Lebensjahr) [Anzahl (Alter); Ursache ^e]
Bialer 2003	1	1/1	1/1	ND	1/1	1/1	ND	ND	1 (24m); Pneumonie
Lachlan 2004	1	1/1	1/1	0/1	0/1	ND	ND	ND	
Sanlaville 2005	1	1/1	1/1	0/1	1/1	1/1	ND	ND	
Reardon 2010	1	1/1	ND	0/1	0/1	ND	ND	ND	
Auber 2010	1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	ND	ND	
Mayo 2011	1	1/1	0/1	1/1	0/0	0/0	ND	ND	
Grashoff 2011	2	2/2	ND	0/2	1/2	1/1	ND	ND	
Bijlsma 2012 ^a	3	2/3	2/3	0/3	2/3	1/2	ND	ND	
Shimada 2013	1	1/1	ND	0/1	1/1	1/1	0/1	ND	
Shimada 2013	1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	ND	ND	
Scott Schwoerer 2014	2	2/2	2/2	2/2	1/2	1/1	ND	ND	
Fieremans 2014	2	2/2	ND	0/1	ND	ND	ND	1/1	
Novara 2014	3	3/3	3/3	ND	0/3	0/0	ND	ND	
Yi 2016	1	1/1	1/1	1/1	1/1	ND	ND	ND	1; Infektion
San Antonio-Arce 2016	2	2/2	1/2	1/2	1/1	2/2	ND	ND	1 (20y); Respiratorische Infektion
Lim 2017	7	6/7	4/7	3/6	3/7	3/3	ND	3/7	
El Chehadeh 2017	4	4/4	3/4	2/4	3/4	0/2	ND	ND	
Li 2017 ^b									1; Pneumonie/ Myokarditis
Giudice-Naim 2019 ^c	4								
Peters 2019 ^d	5								2
Pascual-Alonso 2020	1	1/1	0/1	1/1	0/1	ND	ND	0/1	
Gesamt	40	33/35	19/26	13/26	17/31	13/16		4/9	44%
		94%	73%	50%	55%	81%		44%	

a bei einer Patientin ist /RAK1 nicht Teil der Duplikation

b keine genetischen Informationen vorliegend, daher nicht in Berechnungen einbezogen

c eventuell schon andernorts publizierte Patientinnen, daher nicht in Berechnungen einbezogen

d keine nach Geschlecht differenzierten Informationen vorliegend, daher nicht in Berechnungen einbezogen

e y, Jahre; m, Monate

Referenz	Patienten	Mentale Retardierung o. Entwicklungsverzögerung	Kindliche muskuläre Hypotonie	Epileptische Anfälle	Wiederholte oder schwere Infektionen	davon respiratorische Infektionen	Schluckstörung	Gastro-ösophagealer Reflux	Vorzeitiger Tod (<25. Lebensjahr) [Anzahl (Alter); Ursache]ª
Smyk 2008	3	3/3	3/3	1/3	3/3	2/2	ND	2/3	1 (11y); Infektion und Status epilepticus
Lugtenberg 2009	13	13/13	13/13	7/13	3/13	3/3	3/13	1/1	1 (10y)
Clayton-Smith 2009	15	14/15	12/15	8/15	14/15	14/14	ND	6/6	8 (10m, 18m, 2.5y, 3y, 9y, 20y, 20y); 7x Pneumonie, 1x Infektion
Prescott 2009	2	2/2	ND	1/2	2/2	2/2	ND	ND	
Ramocki 2009	8	8/8	8/8	4/8	6/8	6/6	ND	2/8	
Velinov 2009	1	1/1	1/1	0/1	0/1	ND	ND	ND	
Echenne 2009	5	5/5	5/5	4/5	0/5	ND	ND	ND	
Kirk 2009	3	3/3	1/1	2/2	2/2	2/2	ND	ND	1 (11y)
Bartsch 2010	4	4/4	4/4	2/4	4/4	2/2	0/4	ND	
Belligni 2010	1	1/1	1/1	ND	1/1	1/1	ND	ND	
Reardon 2010	7	7/7	2/2	4/7	7/7	7/7	1/1	ND	2 (9y, 13y) 1x Pneumonie
Campos 2010	3	3/3	1/1	2/2	ND	ND	ND	ND	
Fernandez 2010	1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	ND	ND	
Kroes 2011	1	1/1	1/1	ND	1/1	1/1	ND	ND	
Neill 2011	1	1/1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
Budisteanu 2011	1	1/1	1/1	0/1	1/1	1/1	ND	ND	
Breman 2011	6	6/6	6/6	0/6	5/6	ND	ND	3/6	
Jezela-Stanek 2011	1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	ND	ND	
Carvalho 2011	7	7/7	7/7	2/7	6/6	6/6	ND	6/7	3 (3y, 4m, 3w)
Honda 2012	12	12/12	10/12	9/12	10/12	10/12	7/12	4/12	1 (10y)
Honda 2012	2	2/2	2/2	2/2	2/2	1/1	1/2	1/2	
Van Esch 2012	15	13/13	14/14	8/14	9/13	ND	ND	ND	7
De Palma 2012	1	1/1	ND	1/1	1/1	1/1	ND	ND	

Referenz	Patienten	Mentale Retardierung o. Entwicklungsverzögerung	Kindliche muskuläre Hypotonie	Epileptische Anfälle	Wiederholte oder schwere Infektionen	davon respiratorische Infektionen	Schluckstörung	Gastro-ösophagealer Reflux	Vorzeitiger Tod (<25. Lebensjahr) [Anzahl (Alter); Ursache] ^e
Vignoli 2012	8	8/8	5/5	6/8	6/6	6/6	2/2	ND	
Sanmann 2012	6	6/6	3/3	2/2	5/5	5/5	4/6	1/1	
Xu 2012	2	2/2	2/2	0/2	0/2	ND	ND	ND	
Utine 2012	1	1/1	1/1	0/1	1/1	1/1	ND	ND	
Tang 2012	2	3/3	3/3	2/2	3/3	3/3	ND	ND	3 (15m, 15y, 16y) 3x Resp. Infektion
Lund 2013	1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	ND	ND	
Peters 2013 ^c									
Peters 2013 ^c									
Shimada 2013	3	3/3	3/3	3/3	3/3	2/2	3/3	1/3	1 (21y) Aspirationspneumonie
Shimada 2013	2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	ND	
Yamamoto 2014	4	4/4	2/2	3/4	1/1	ND	ND	ND	
Caumes 2014	8	8/8	8/8	8/8	3/8	ND	ND	ND	
Fukushi 2014	5	5/5	4/4	5/5	5/5	4/4	ND	ND	5 (22y, 6y, 21y, 24y, 8y); 1x Bronchitis, 1x resp. Insuffizienz; 1x Aspirationspneumonie, 1x Pilzinfektion
Nascimento 2014	1	1/1	ND	1/1	ND	ND	1/1	ND	
Lin 2014	1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	ND	
Chow 2015	3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	1/1	1/1	1 (16y)
Bauer 2015	12	ND	ND	ND	10/10	9/10	ND	ND	1 (15y); Pneumonie
Zhang 2015	1	1/1	1/1	0/1	1/1	1/1	ND	ND	
Voinova 2015	4	4/4	4/4	2/4	4/4	ND	ND	ND	
Yi 2016	15	15/15	15/15	5/15	15/15	ND	ND	ND	4; 2x Infektion, 2x Status epilepticus
EI Chehadeh 2016 ^c									
Ha 2016	1	1/1	1/1	0/1	ND	ND	ND	ND	
Tug 2016	1	1/1	1/1	0/1	1/1	ND	ND	ND	

Referenz	Patienten	Mentale Retardierung o. Entwicklungsverzögerung	Kindliche muskuläre Hypotonie	Epileptische Anfälle	Wiederholte oder schwere Infektionen	davon respiratorische Infektionen	Schluckstörung	Gastro-ösophagealer Reflux	Vorzeitiger Tod (<25. Lebensjahr) [Anzahl (Alter); Ursache]e
Trobaugh-Lostratio 2016	1	1/1	ND	1/1	1/1	1/1	ND	1/1	
Lim 2017	49	39/48	31/48	21/49	38/49	38/38		26/49	
Moirangthem 2017	2	2/2	1/1	0/2	1/2	1/1	ND	ND	1 (9m); Resp. Infektion
Tsuji-Hosokawa 2017	1	1/1	ND	0/1	1/1	1/1	ND	ND	1 (7y); Resp. Infektion
Yon 2017	2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	ND	ND	
Tang 2017	3	2/2	3/3	2/3	3/3	ND	ND	ND	
Li 2017	5	5/5	5/5	4/5	4/5	4/5	ND	ND	2; ZNS-Infektion
Deshwar 2018	1	1/1	1/1	ND	1/1	1/1	1/1	ND	
Mignet 2018	86	59/59	57/58	35/59	49/55	49/55	ND	34/51	9/59 bzw. 23/86; 8x Resp. Infektion, 1x Status epilepticus, 1x PAH
Giudice-Nairn 2019 ^c									2 (25y, 11m); 1x Sepsis, 1x PAH
Peters 2019 ^d	43								2
Hirabayashi 2019	1	1/1	1/1	1/1	1/1	ND	ND	ND	
Pascual-Alonso 2020	18	18/18	17/18	9/18	14/17	14/14	ND	13/18	4
Choi 2020	1	1/1	1/1	0/1	1/1	1/1	1/1	1/1	
Tekendo-Ngongang 2020	1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	ND	ND	1 (8y), Epileptischer Anfall
van Baelen 2020	3	2/2	2/2	ND	3/3	3/3	1/1	1/1	
Gutierrez-Sanchez 2020	2	2/2	1/1	ND	2/2	1/1	ND	ND	
Takeguchi 2021	24	18/18	18/21	16/24	18/23	14/21	9/21	3/22	
Gesamt	506	399/409	349/377	223/392	328/397	273/290		124/211	
		98%	93%	57%	83%	94%		59%	

c eventuell schon andernorts publizierte Patienten, daher nicht in Berechnungen einbezogen

d keine nach Geschlecht differenzierten Informationen vorliegend, daher nicht in Berechnungen einbezogen

e y, Jahre; m, Monate; w, Wochen; resp., respiratorische; ZNS, Zentralnervensystem; PAH, pulmonalerielle Hypertonie

3.1.3 Infektiologischer und immunologischer Phänotyp der publizierten Patientinnen und Patienten

78 Prozent der Patientinnen und Patienten (374/479) leiden an wiederkehrenden oder schweren Infektionen [60] (Tabelle 13). Dabei zeigt sich ein Geschlechterunterschied. Während 83 Prozent (328/397) der berichteten männlichen Patienten an wiederkehrenden oder schweren Infektionen litten, war dies nur bei 55 % (17/31) der weiblichen Patientinnen der Fall (Tabellen 14-15). Die am häufigsten angegebene Art von Infektionen waren Atemwegsinfektionen mit 98 % (316/324). Zudem wurde über Harnwegsinfektionen [21,28,35,41,108–110], Meningitiden [5,35,41], Sepsen [41,108,111,112] und HNO-Infektionen (insbesondere Otitis media) [20,21,27,35,41,44,110,113–115] berichtet. Bei 12 Patientinnen und Patienten wurde angegeben, dass diese mindestens eine Aspirationspneumonie erlitten hatten [3,22,35,46,106,110,116–120]. 56 % (149/268) der Patientinnen und Patienten wiesen einen gastroösophagealen Reflux auf. Im Geschlechtervergleich waren 59 % (124/211) der männlichen und 44 % (4/9) der weiblichen Patientinnen betroffen (Tabellen 14-15). Peters et. al berichteten über das Auftreten von Reflux, aber differenzierten nicht zwischen den Geschlechtern [121]. Leider wurde in der Mehrheit der Studien nicht über das Vorkommen von Aspiration und Reflux berichtet.

Ein frühzeitiger Tod (definiert als vor dem 25. Lebensjahr) wurde bei 67 Patientinnen und Patienten beschrieben, wovon 58 (87 %) der Todesfälle im Zusammenhang mit einer schweren Infektion standen [60] (Tabellen 14-15). Der Großteil der Patientinnen und Patienten wurde zu Lebzeiten in jungem Alter beschrieben, sodass die veröffentlichten Daten keinen Rückschluss auf den Todeszeitpunkt und damit auch nicht auf einen verfrühten Tod zulassen.

Obwohl bei dem Großteil der Patientinnen und Patienten über "wiederkehrende schwere Infektionen" berichtet wurde, liegen nur für 19 Patientinnen und Patienten Informationen über die identifizierten Erreger vor [60]. Unter den 55 isolierten Erregern waren 45 Bakterien (vor allem *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *E. coli* und *S. aureus*), 6 Viren und 4 *Candida* (siehe Tabelle S1 in [60]). Zudem bleibt unklar, ob es sich bei den identifizierten um die krankheitsverursachenden Erreger handelt. Eine bronchoalveoläre Lavage (BAL) wurde nur bei 7 Patienten durchgeführt [41,42]. Laborchemisch zeigt sich bei einem Teil der Patienten eine insuffiziente Immunreaktion nach Impfungen, insbesondere gegen *Streptococcus pneumoniae*, die bei 15/26 Patienten beschrieben wurde [60]. Einige

Patienten weisen zudem einen selektiven Mangel an Immunglobulin (Ig) A (11/47) und/oder IgG2 (7/24) auf [60]. Darüber hinaus traten bei mehreren Patienten während nicht-invasiver Infektionen unerklärliche Fieberschübe und auffallend hohe C-reaktive Protein (CRP)-Werte auf [60].

Von Bauer et al. wurde im Jahr 2015 die Substitution von polyvalentem IgG bei Patienten mit einem IgG2-Unterklassendefizit und/oder niedrigen Nachimpftitern gegen Pneumokokken, die an rezidivierenden Infektionen leiden, vorgeschlagen - eventuell in Kombination mit prophylaktischen Antibiotika [41,42]. In den seitdem veröffentlichten 26 Studien wurden nur in drei die Immunglobulin-Spiegel untersucht und in keiner wurde die Reaktion auf Impfungen erwähnt [110,120,122]. Bei 4 der 285 Patientinnen und Patienten wurde eine Antibiotikaprohylaxe erwähnt [42,113,120].

3.2 Charakterisierung der eigenen Patientenkohorte

Die für diese Studie rekrutierte Kohorte besteht aus 9 männlichen Patienten aus Deutschland, Belgien, Frankreich und Polen. Fünf der Patienten wurden bereits zuvor beschrieben [41,42,123]. Eine Duplikation von mindestens *MECP2* und *IRAK1* war bei allen neun Patienten bereits vor der Studie mittels Array-basierter vergleichender genomischer Hybridisierung (Array-CGH) bestätigt worden.

Aufgrund von Barrieren durch die komplexe Logistik, die mit dem internationalen Transport von Biologischen Stoffen der Kategorie B (UN3373) verbunden ist, konnten wir fünf interessierte und infrage kommende Patienten nicht in unsere Studie einschließen.

3.2.1 Genotyp

Eine Xq28-Duplikation, die zumindest *MECP2* und *IRAK1* einschließt, wurde bei allen 9 Patienten durch Array-CGH (Array-basierte vergleichende genomische Hybridisierung Genomische Hybridisierung) vor dieser Studie bestätigt. Bei den Patienten 5 und 8 ist ein Teil des Xq28 tripliziert, aber nur bei P8 umfasst die triplizierte Region auch *MECP2* und *IRAK1*. Die Duplikationen bzw. Triplikationen variieren stark in ihrer Größe und sind in Abb. 3 gegenübergestellt. Die Bereiche wurden mithilfe des NCBI Genome Remapping Service auf das System Genome Reference Consortium Human Build 37 (GRCh37, hg 19) standardisiert, um die Duplikationsgrößen von allen Patienten vergleichen zu können, auch wenn die Angaben im genetischen Befund bei P1, P2, P4 und P6 ursprünglich im

Format NCBI36 (hg18) gemacht wurden. Die genauen Grenzen und die einbezogenen Gene sind tabellarisch in unserer Publikation dargestellt (siehe Tabelle S3 in [60]). Die Mütter von 4 Patienten waren asymptotische Trägerinnen der Duplikation (P1, P2, P5, P8). Bei 3 Patienten handelte es sich um eine de novo Mutation (P6, P7, P9). Bei zwei der Patienten liegt diese Information nicht vor.

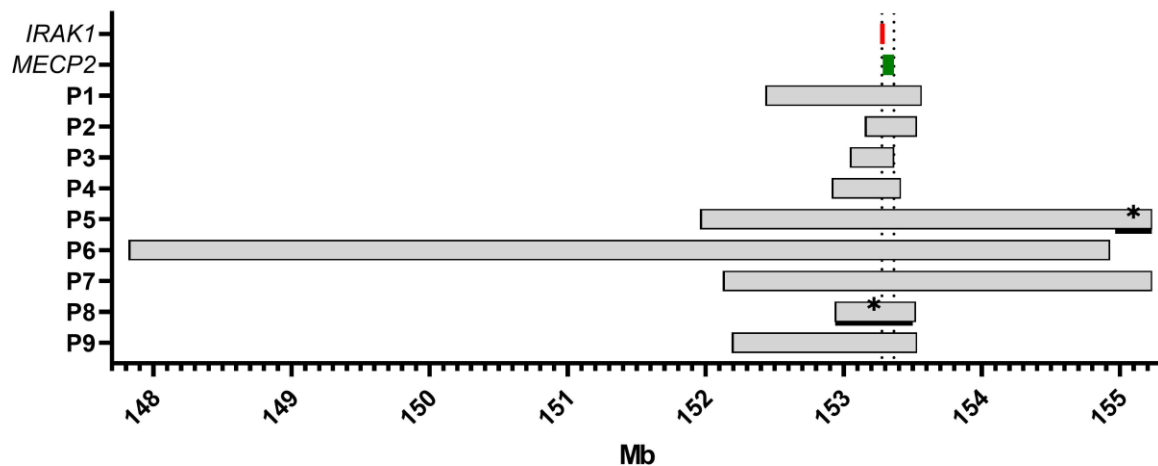


Abbildung 3: Größe der Duplikationen bzw. Triplikationen auf Chromosom Xq288 bei unserer Kohorte entsprechend GRCh37 (hg19) in Megabasenpaaren (Mb). Die gestrichelten Linien zeigen die minimale *IRAK1* und *MECP2* umfassende Duplikationsregion; Mb, Megabasenpaare, *, triplizierte Abschnitte; aus Gottschalk et al., 2023 [60]

3.2.2 Phänotyp

Grundlegende klinische Daten unserer Kohorte sind in Tabelle 16 zusammengefasst. Alle Patienten unserer Kohorte litten an schweren bzw. wiederkehrenden Infektionen, insbesondere des Respirationstraktes, was wiederholte Hospitalisationen mit teils invasiver Beatmung und antibiotischen Therapien bedurfte. Detaillierte Fallberichte aller Patienten sind im Nachfolgenden beschrieben.

3.2.3 Detaillierte Fallberichte

„Patient 1 wurde zuvor als P14 in Bauer et al. veröffentlicht [41]. Der Junge wurde im Alter von 11 Jahren diagnostiziert und zeigte im Array-CGH eine de novo Duplikation von 500 kb auf Xq28. Er litt an infantiler Hypotonie und sprach nur 4 Wörter. Im Alter von 3,5 Jahren war er in der Lage, selbständig zu gehen, verlor diese Fähigkeit jedoch im Alter von 10 Jahren, so dass er auf einen Rollstuhl angewiesen war. Seit seinem 10. Lebensjahr litt er an einer therapieresistenten Epilepsie. Außerdem berichtete seine

Mutter von Fütterungsschwierigkeiten, die sich durch die Epilepsie verschlimmerten; aber nicht von gastroösophagealem Reflux. Im Laufe seines Lebens hatte er 18 schwere Infektionen, die eine intravenöse Antibiotikabehandlung erforderten, darunter 14 Episoden von Bronchopneumonie. Während seiner Infektionen hatte er Fieber bis zu 39,5°C. Im Alter von 16 Jahren verstarb er an Ateminsuffizienz im Rahmen einer totalen Atelektase und einer Infektion mit Pseudomonas. Seit seinem 12. Lebensjahr erhielt er eine Antibiotikaphylaxe. Er wurde zweimal im Jahr von einem Facharzt für Neuropädiatrie nachuntersucht.“ (Übersetzung durch die Autorin) [60].

„Patient 2 wurde bereits zuvor beschrieben (P15 in [41], P1 in [123]). Er wurde nach einer ereignislosen Schwangerschaft als erstes Kind gesunder, nicht blutsverwandter Eltern geboren. Die Familienanamnese war negativ. Bei der Geburt war er sehr hypoton und er hatte Probleme bei der Nahrungsaufnahme. Seine Entwicklung war stark verzögert; im Alter von 2 Jahren konnte er sitzen und im Alter von 3,5 Jahren mit Unterstützung gehen. Er hat kein aktives Sprechen entwickelt und zeigt repetitives Verhalten und Händeklatschen, wenn er aufgeregt ist. Seit den ersten Lebensmonaten litt er unter wiederkehrenden Infektionen, die eine fast ununterbrochene Antibiotikatherapie und häufige Krankenhausaufenthalte erforderlich machten. Im Alter von 6 Jahren wurde er wegen einer schweren Lungenentzündung 1 Woche lang beatmet. Danach konnte er nicht mehr gehen und seine Epilepsie wurde refraktär. Er wurde mehrfach wegen einer Lungenentzündung und Atemnot ins Krankenhaus eingeliefert, wobei sich sein Allgemeinzustand verschlechterte. Er entwickelte eine schwere Spastik mit Kontrakturen in den oberen und unteren Gliedmaßen. Die MRT des Gehirns zeigte eine globale zerebrale Atrophie und atrophische Hippocampi. Er starb im Alter von 15 Jahren an Atemversagen. Ein Array-CGH im Alter von 2 Jahren zeigte eine sehr kleine Duplikation von 380 kb auf Xq28. Seine Mutter ist Trägerin der Duplikation.“ (Übersetzung durch die Autorin) [60].

„Bei Patient 3 handelt es sich um einen 25-jährigen Patienten, der mindestens viermal pro Jahr in unserer Abteilung nachuntersucht wird und zuvor klinisch und molekularbiologisch charakterisiert wurde (P1 in [41,42]). Die vergleichende Array-Genom-Hybridisierung (Array-CGH) bestätigte eine Duplikation von 1,1 Mb auf Xq28. Er stellte sich zunächst mit einer globalen Entwicklungsverzögerung, Muskelhypotonie und spastischer Tetraparese vor. Er leidet unter Epilepsie und wiederkehrenden schweren

Infektionen. Von seinen insgesamt 64 Episoden von Lungenentzündung hatte er 47 bis zu seinem vierzehnten Lebensjahr. Nach Beginn einer Immunglobulin-Substitution (im Alter von 12 Jahren) sowie unterstützender Maßnahmen und einer Antibiotikaphylaxe (im Alter von 14 Jahren) ging die Häufigkeit der Infektionen zurück, so dass es in den folgenden 8 Jahren nur noch zu 3 Pneumonie-Episoden kam. Trotz dieser Behandlung verzeichneten wir in den letzten 2 Jahren einen Anstieg der Krankenhauseinweisungen aufgrund von Infektionen, darunter 12 Episoden von Lungenentzündung und 2 Episoden von Sepsis. In den letzten Jahren entwickelte der Junge eine chronische Aspiration und zeigt in seinen letzten CT-Aufnahmen eine Bronchiektasie. In der bronchoalveolären Lavage werden nun opportunistische Erreger wie ein multiresistenter *Citrobacter freundii* sowie *Candida glabrata* und *Trichosporon asahii* nachgewiesen. Er wird derzeit prophylaktisch mit Cotrimoxazol, Penicillin und Fluconazol behandelt. Bei allen infektiösen Episoden zeigte unser Patient Fieber über 39°C und hohe CRP-Werte, typischerweise über 100 mg/dl, bereits in den ersten drei Tagen der Infektion. Der Junge weist einen normalen Gesamt-Immunglobulintiter auf, aber einen Mangel an IgG2, IgG4, IgA und IgM. Ein Polysaccharid-spezifischer Antikörpermangel blieb trotz wiederholter Impfungen bestehen.“ (Übersetzung durch die Autorin) [60]. Zudem litt P3 an Reflux und entwickelte in den letzten Jahren eine chronische Aspiration.

„Patient 4 wurde zuvor als P13 in Bauer et al. beschrieben und trägt eine sehr große Duplikation von 320 kb auf Xq28 [41]. Leider konnten wir keine aktuellen Informationen über diesen Jungen erhalten.“ (Übersetzung durch die Autorin) [60].

„Patient 5 ist ein 21-jähriger Mann, bei dem vor kurzem das *MECP2*-Duplikationssyndrom diagnostiziert wurde und der bisher noch nicht veröffentlicht wurde. Er ist nicht-eineiiger Zwilling und zeigte infantile Hypotonie und Fütterungsprobleme. Seine Entwicklung war stark verzögert, und im Alter von 6 Jahren konnte er weder sprechen noch laufen. Er kann immer noch nur mithilfe von Hilfsmitteln gehen. Im Alter von 14 Jahren entwickelte er eine Absence-Epilepsie. Seit seiner Geburt litt er unter wiederkehrenden und schweren Infektionen (mehr als 32 Episoden von Lungenentzündung, 1 Sepsis und mindestens 1 Harnwegsinfektion), die regelmäßig einen Krankenhausaufenthalt zur intravenösen Antibiotikabehandlung erforderlich machten. In einer bronchoalveolären Lavage wurden *S. aureus*, *H. influenzae* B und *Moxarella catarrhalis* als verursachende Erreger nachgewiesen. Die Infektionen sind in der Regel mit hohem Fieber verbunden. Außerdem

hat er 4 bis 5 unerklärliche Fieberschübe pro Jahr. Die Immunglobuline A und M liegen im Normbereich, während Immunglobulin G über dem Normbereich liegt und eine isolierte Erhöhung von IgG3 aufweist. Der Junge erhält Azithromycin als Antibiotikaprophylaxe und wird einmal im Jahr von einem multidisziplinären Team nachuntersucht. Er trägt eine komplexe Chromosomenaberration mit einer terminalen Deletion der *PAR1*-Region auf Xp22.33 sowie einer Duplikation von 3,3 Mb auf Xq28. Seine Mutter ist eine asymptotische Trägerin und er hatte einen Bruder, der in jungen Jahren mit einem sehr ähnlichen Phänotyp verstarb.“ (Übersetzung durch die Autorin) [60].

„Patient 6 ist ein 10-jähriger Junge, der zuvor nicht beschrieben wurde. Er ist das dritte Kind gesunder Eltern, das nach einer ereignislosen Schwangerschaft und einer negativen Familienanamnese geboren wurde. Nach der Geburt wurden intermittierende myoklonische Anfälle sowie erhebliche Ernährungsprobleme festgestellt. Seine Entwicklung war stark verzögert mit schwerer Hypotonie. Er lernte nie laufen und konnte nicht sprechen. Im Alter von 2 bis 5 Jahren litt er an 5 schweren Infektionen, die eine intravenöse Antibiotikabehandlung erforderten, davon mindestens 3 Bronchopneumonien. Bisher sind seine wiederkehrenden Infektionen ambulant behandelbar. Er hat keine Vorgeschichte von Sepsis, Meningitis oder eitriger Otitis. Während seiner Infektionsschübe hatte er hohes Fieber bis zu 40,5°C. Außerdem berichten seine Eltern über 4 bis 5 unerklärliche Fieberschübe pro Jahr. IgG, IgA und IgM lagen im normalen Bereich. Die Analyse der IgG-Subklassen ergab ein erhöhtes IgG2. Eine bronchoalveoläre Lavage wurde nie durchgeführt. Im Alter von 9 Jahren traten tonische Anfälle auf, die auf eine Mehrfach-Antiepileptika-Therapie nicht ansprachen. Die MRT des Gehirns zeigte eine Hypoplasie des Corpus callosum und eine Atrophie des Frontallappens. Der Junge wird einmal im Jahr von einem Genetiker sowie in unregelmäßigen Abständen von einem Neurologen und einem Pneumologen untersucht. Er erhält weder eine Antibiotikaprophylaxe noch eine IgG-Substitution. Die Array-CGH zeigte eine sehr große de novo terminale Duplikation von 7 Mb auf Xq28.“ (Übersetzung durch die Autorin) [60].

„Patient 7 ist ein 5 Jahre alter Junge, der bisher nicht veröffentlicht wurde. Die Array-CGH zeigte eine große de novo Duplikation von 3 Mb auf Xq28. Er leidet an muskulärer Hypotonie und braucht Unterstützung beim Gehen. Seine Sprache ist auf wenige Wörter

beschränkt. Kurz nach der Geburt wurden Fütterungsprobleme festgestellt. Die Diagnose eines gastroösophagealen Refluxes führte zu einer medikamentösen Behandlung, die im Alter von 3 Jahren begann. Es wurde keine Epilepsie festgestellt, aber er zeigte ein abnormales EEG. Außerdem wurden ein Hypophysenhormon-Mangel, ein Vorhofseptumdefekt, eine Kraniosynostose und zerebrale Zysten diagnostiziert. In seinen ersten drei Lebensjahren litt er an 5 bis 6 Infektionen der unteren Atemwege, darunter mindestens 4 Episoden von Lungenentzündung, und 2 Harnwegsinfektionen im Alter von 3 Monaten und 15 Monaten. Insgesamt wurde bei ihm 6-mal eine Lungenentzündung diagnostiziert, wobei die erste im Alter von 6 Monaten auftrat. Bei einer der Infektionen handelte es sich um eine MSSA-Pneumonie mit Sepsis. Eine bronchoalveoläre Lavage wurde nie durchgeführt, aber im Blut wurden *Staphylococcus aureus* und alpha-hämolytische Streptokokken nachgewiesen. Seine Eltern berichteten über unerklärliche Fieberschübe (~40°C), die bis zu fünfmal pro Jahr auftraten. Die IgG, IgA und IgM und IgG-Subklassen lagen im Normalbereich. Der Junge wird zweimal jährlich von einem multidisziplinären Team (allgemeine Pädiatrie, Neurologie, Pulmonologie, Endokrinologie) nachuntersucht. Er erhält keine prophylaktische Behandlung.“ (Übersetzung durch die Autorin) [60].

„Patient 8 ist ein unveröffentlichter 10-jähriger Junge aus Deutschland. Die Array-CGH zeigte eine Kombination aus Duplikation und Triplikation von 590 kb auf Xq28. Seine Mutter ist eine asymptotische Trägerin. Bei der Geburt wurde eine muskuläre Hypotonie festgestellt. Er ist sprachlich beeinträchtigt (10-15 Wörter), hat aber eine gute soziale Interaktion. Im Alter von 1 Jahr wurde ein obstruktives Schlafapnoe-Syndrom (OSAS) diagnostiziert, das eine Atemtherapie und Intubation erforderte, was zu einem schwierigen Entwöhnungsprozess führte. Im Alter von 2 Jahren konnte er laufen. Bislang wurde keine Epilepsie festgestellt. Eine röntgenologisch nachgewiesene Bronchopneumonie im Alter von 11 Monaten erforderte einen Krankenhausaufenthalt, aber keine Antibiotikabehandlung. Seitdem sind vor allem in den Wintermonaten immer wiederkehrende Infektionen der oberen und seltener der unteren Atemwege zu beobachten, die selten eine antibiotische Behandlung erfordern. Bei einer Bronchitis wurde das Respiratory-Syncytial-Virus (RSV) nachgewiesen. Er weist gute Antikörpertiter gegen Pneumokokken auf, und IgG, A und M liegen im Normalbereich. Der Junge wird von einem multidisziplinären Team (sozialpädiatrisches Zentrum, HNO, Orthopädie,

Augenheilkunde) zweimal im Jahr nachuntersucht. Er erhält keine prophylaktische Behandlung.“ (Übersetzung durch die Autorin) [60].

„Patient 9 ist ein 10-jähriger Junge aus Deutschland mit einer de novo Duplikation von 1,3 Mb auf Xq28, der bereits veröffentlicht wurde (P28 in [41]). Er ist in seiner Entwicklung stark verzögert. Seit seinem 9. Lebensjahr entwickelte er rezidivierende Infektionen, die sich auf insgesamt 7 Episoden von Lungenentzündung, 1 eitrige Mittelohrentzündung und 5 Harnwegsinfektionen summierten. Bei 3 der 7 Lungenentzündungen handelte es sich um röntgenologisch nachgewiesene Bronchopneumonien, die mit Antibiotika behandelt werden mussten, und bei einer um eine Influenza-B-Pneumonie. Während dieser Infektionsepisoden wurden wiederholt hohe CRP-Werte über 200 mg/l festgestellt, wobei der Höchstwert bei 321 mg/l lag. Andererseits zeigte der Junge 2–3-mal pro Jahr unerklärliche Fieberschübe bis zu maximal 41 °C ohne CRP-Erhöhung. Wegen mangelnder Antikörperbildung gegen Pneumokokken wurden mehrere Auffrischungsimpfungen verabreicht. Eine regelmäßige Nachuntersuchung wird nicht durchgeführt.“ (Übersetzung durch die Autorin) [60].

Tabelle 16: Überblick über die Patienten unserer Kohorte. HWI, Harnwegsinfektion; SV40, SV-40 immortalisierte Fibroblasten, PBMC, peripheral blood mononuclear cells; ND, nicht erhoben; x, Symptom vorhanden, /, Symptom nicht vorhanden; modifiziert nach Gottschalk et al., 2023 [60]

Alter bei letzter Visite	Herkunftsland	Mentale Retardierung o. Entwicklungsverzögerung	Kindliche muskuläre Hypotonie	Epileptische Anfälle	Wiederholte oder schwere Infektionen	Anzahl an			Material	
						Pneumonie	Sepsis	HWI		Purulente Otitis
P1 ^a 15 †	Deutschland	x	x	x	x	14	0	7	2	SV40
P2 ^a 15 †	Belgien	x	x	x	x	50	1	ND	3	SV40
P3 ^a 25	Deutschland	x	x	x	x	64	>5	>1	>3	SV40, PBMC, Vollblut
P4 ^a 8	Frankreich	x	x	ND	x	2	0	ND	>4	SV40
P5 21	Belgien	x	x	x	x	32	1	1	ND	PBMC, Vollblut
P6 10	Belgien	x	x	x	x	3	0	0	ND	PBMC, Vollblut
P7 5	Polen	x	x	/	x	5	1	2	ND	PBMC, Vollblut
P8 10	Deutschland	x	x	/	x	>1	0	ND	ND	PBMC, Vollblut
P9 ^a 10	Deutschland	x	x	ND	x	7	ND	5	1	PBMC, Vollblut
Gesamt		9/9	9/9	5/7	9/9					

^a bereits andernorts publiziert

† verstorben

3.2.4 Material

SV40-immortalisierte Fibroblasten

Wir konnten SV40-immortalisierte Fibroblasten von insgesamt 5 Patienten (P1-4 sowie P7) gewinnen. Davon waren 2 SV40-Zelllinien (P3 und P4) bereits von Dr. Bauer im Rahmen der Vorgängerstudie immortalisiert und nach Einverständnis der Patientenvertreter im Stickstofftank bei -196°C für weitere Versuche eingelagert worden [124]. Die Fibroblasten von P1, P2 und P7 wurden nach dem unter 2.4.1 beschriebenen Vorgehen transfiziert. Die Fibroblasten von P7 erhalten wir erst spät, sodass wir diese zwar transfizierten und kryokonservierten, aber für die hier dargestellten Versuche aus Zeitgründen nicht mehr berücksichtigten. Die SV40-transfizierten Fibroblasten-Zelllinien von der *IRAK1*-defizienten Zelllinie und von der *IRAK4*-defizienten Zelllinie wurden dankenswerterweise von Dr. Anne Puel und Prof. Jean Laurent Casanova zur Verfügung gestellt. Die SV40-Zellkulturen wurden regelmäßig auf Mykoplasmen getestet, um eine Kontamination auszuschließen. Beispielhaft ist hier das Ergebnis einer solchen Mykoplasmen-PCR dargestellt (Abb. 4). Nur die Positivkontrolle weist die bei Vorliegen von Mykoplasmen-DANN typische bei einer Größe von rund 500 Basenpaaren liegende Bande auf. Alle verwendeten Zelllinien blieben stets frei von Mykoplasmen.

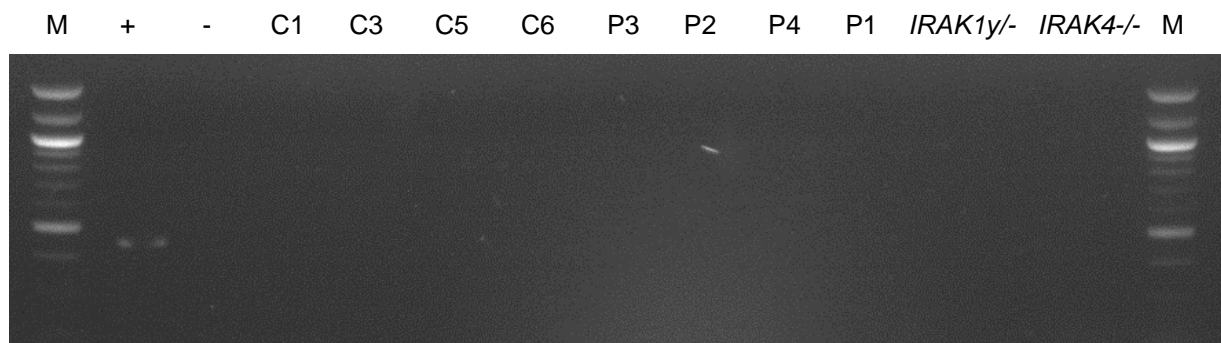


Abbildung 4: Ergebnisse einer Mykoplasmen-PCR aus Zellkulturen mit SV40-Fibroblasten von MDS-Patienten und gesunden Kontrollen; M: Marker, +: Positivkontrolle, -: Negativkontrolle; eigene Darstellung

Vollblut und PBMC

Die Abnahme von peripherem Venenblut geschah bei P3 und P5-P9 parallel zu Routine-Blutabnahmen. Von P1, P2 und P4 lag uns kein Vollblut vor, da P1 und P2 verstorben sind und wir P4 nicht mehr erreichen konnten. Die Isolierung der PBMC geschah bei den gleichen Patienten aus dem gleichzeitig abgenommenen Blut.

3.2.5 Expression von IRAK1 und IRAK4

Um die verwendeten SV40-Zelllinien zu charakterisieren, untersuchten wir deren Expression von IRAK1 und IRAK4 mittels Westernblot. In allen Kontrollzelllinien (C1-4) war sowohl IRAK1- als auch IRAK4-Protein vorhanden. Die Zelllinien der Patienten mit *MECP2*-Duplikationssyndrom zeigten ebenfalls sowohl IRAK1- als auch IRAK4-Expression. Allerdings fiel visuell auf, dass im Vergleich zu den Kontrollen mehr IRAK1 vorhanden war (Abb. 5).

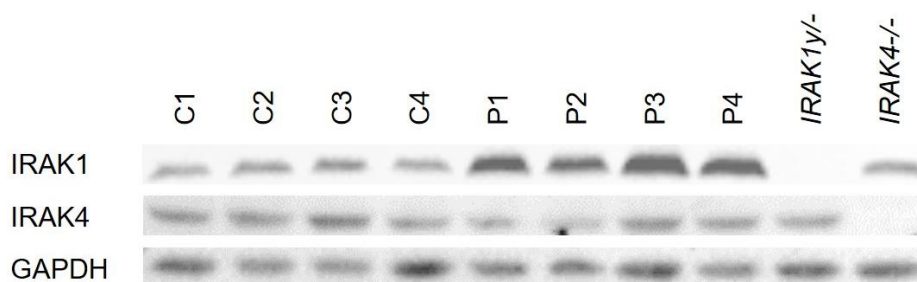


Abbildung 5: Charakterisierung der SV40-Fibroblasten bezüglich ihrer IRAK1- und IRAK4-Expression mittels Westernblot aus Zelllysaten. Die Bilder wurden zugeschnitten und angepasst; aus Gottschalk et al., 2023 [60]

Tabelle 17: Densitometrie des in Abb. 5 dargestellten Westernblots. Normalisierung des IRAK1-Signals auf jeweiliges GAPDH-Signal und Durchschnittswert der Kontrollzelllinien; eigene Darstellung

	IRAK1 Signal	GAPDH Signal	Normalisierung
C1	2,11633217	1,02428109	0,72859562
C2	2,67125346	0,74862623	1,25826447
C3	2,85007812	0,71557675	1,4045022
C4	2,16626607	1,25508986	0,60863771
P1	6,77292039	0,78270357	3,05140977
P2	5,7471175	0,75058706	2,70004424
P3	9,21719675	1,21040189	2,68528968
P4	7,63183865	0,7861034	3,42350828
<i>IRAK1y</i> ^{-/-}	0	1,07314373	0
<i>IRAK4</i> ^{-/-}	2,99419612	1,08995311	0,96871116

Wir untersuchten die IRAK1- und GAPDH-Banden densitometrisch und stellten fest, dass in den Zelllysaten von P1-4 mindestens doppelt bis mehr als dreimal so viel IRAK1 wie in den Zellen der gesunden Kontrollen (C1-C4) vorhanden war (Tabelle 17). Naturgemäß fehlte die IRAK1-Expression in der *IRAK1*-defizienten Zelllinie und die IRAK4-Expression

in der *IRAK4*-defizienten Zelllinie. GAPDH diene als Kontrolle einer gleichmäßigen Probenverteilung.

3.3 In vitro Untersuchung des kanonischen NF- κ B-Signalwegs in Patienten mit *MECP2*-Duplikationssyndrom

3.3.1 IRAK1-Phosphorylierung und -Abbau sowie I κ B α -Abbau

Um die Phosphorylierung und den Abbau von IRAK1 sowie den Abbau von I κ B α zu analysieren, stimulierten wir SV40-immortalisierte Fibroblasten von P1, P2, P3 und P4 und einer gesunden Kontrolle (C) sowie einer *IRAK1*-defizienten und einer *IRAK4*-defizienten Kontrolle in einem ersten Versuch parallel für 0, 15, 30, 45, 60 bzw. 90 Minuten mit dem IL1R-Agonisten IL-1 β und dem TNFR-Agonisten TNF- α . Mittels Westernblot (siehe 2.5.3) wurde die zum jeweiligen Zeitpunkt vorhandene Menge an IRAK1-, I κ B α - bzw. GAPDH-Protein detektiert. Phosphoryliertes – also im Abbau befindliches - IRAK1 ist an höher liegenden Banden zu erkennen, da das IRAK1-Protein durch die Phosphatgruppen eine höhere Molekülmasse erlangt und deshalb im Blot langsamer, also weniger weit, läuft. Durch mehrfache Phosphorylierung kann das IRAK1 einen Schmierstreifen oberhalb der Bande des nicht-phosphorylierten IRAK1 bilden.

Sowohl bei der gesunden Kontrolle als auch bei den Patienten P1-4 zeigt sich nach Stimulation mit IL-1 β eine IRAK1-Phosphorylierung durch höherliegende Banden sowie ein Abbau des IRAK1 im Sinne von im Zeitverlauf schwächer werdenden Banden (Abb. 6a). Bei der Kontrolle ist die Bande des nicht-phosphorylierten IRAK1 nach 60 Minuten nahezu vollständig verschwunden, während bei den Patienten auch noch 90 Minuten nicht-phosphoryliertes IRAK1 vorhanden ist. Nach Stimulation mit TNF- α zeigt sich, wie zu erwarten, keine Phosphorylierung und kein Abbau von IRAK1. Selbstverständlich zeigt sich bei der *IRAK1*-defizienten Zelllinie keinerlei IRAK1-Bande und entsprechend auch keine Phosphorylierung. Bei der *IRAK4*-defizienten Zelllinie gibt es zwar eine IRAK1-Bande, aber es finden weder Phosphorylierung noch Abbau von IRAK1 statt (Abb. 6a). In allen unstimulierten Zelllinien wird I κ B α exprimiert. 15 Minuten nach Stimulation mit IL-1 β ist sowohl bei der gesunden Kontrolle als auch bei allen Patienten kein I κ B α -Protein mehr vorhanden. Allerdings ist dieses etwa 30 bis 45 Minuten nach Stimulation wieder nachweisbar. Nach Stimulation mit TNF- α zeigt sich das gleiche Bild. In der *IRAK1*-defizienten Zelllinie ist die I κ B α -Degradierung nach Stimulation mit IL-1 β verspätet und

eingeschränkt, während sie nach TNF- α - Stimulation normal ist (Abb. 6a). In der *IRAK4*-defizienten Zelllinie wurde I κ B α zwar nach Stimulation mit TNF- α vollständig abgebaut und wiederhergestellt, nicht aber nach Stimulation mit IL-1 β (Abb. 6a).

Da das IRAK1 bei den Patienten auch noch 90 Minuten noch nicht vollständig phosphoryliert und abgebaut war, wiederholten wir den Versuch mit einer längeren Kinetik von 0, 20, 60, 120 und 240 Minuten. Weiterhin ergänzten wir im zweiten Versuch eine Stimulation mit dem TLR4-Agonisten LPS (Abb. 6b). Bei P1 und P3 scheint auch nach 240 Minuten noch nicht phosphoryliertes IRAK1 vorhanden zu sein. Bei P2 und P4 wirkt das Bild insgesamt verschwommen. Es sind keine klaren Banden des phosphorylierten bzw. nicht-phosphorylierten IRAK1 zu erkennen, die IRAK1-Bande ist insgesamt schwächer im Vergleich zu P1 und P3 sowie im Vergleich zu Abb. 6a, was eine methodische Schwäche in diesem Versuch vermuten lässt. Bei der Kontrolle erscheint oberhalb der IRAK1-Bande – im Bereich, in dem die Bande des nicht-phosphorylierten IRAK1 zu erwarten wäre – eine Bande. Da diese auch in den unstimulierten bzw. mit TNF- α stimulierten Lell-Lysaten vorhanden ist, ist von einem Hintergrundsignal im Sinne einer Verunreinigung auszugehen. Nach Stimulation mit LPS bzw. TNF- α lässt sich in keiner der Zelllinien eine IRAK1-Phosphorylierung bzw. -Abbau nachweisen. Bezüglich der Negativkontrollen *IRAK1y*^{-/-} und *IRAK4*^{-/-} ergab sich das gleiche Bild wie im ersten Versuch (Abb. 6a+b).

In beiden Versuchen zeigt sich bei allen Zelllinien eine gleichmäßige GAPDH-Bande im Sinne einer gleichmäßigen Proteinverteilung in allen Geltaschen einer Membran, jedoch zeigten sich im zweiten Versuch deutliche Unterschiede in der Densität der GAPDH-Banden zwischen den einzelnen Membranen (Abb. 6a+b).

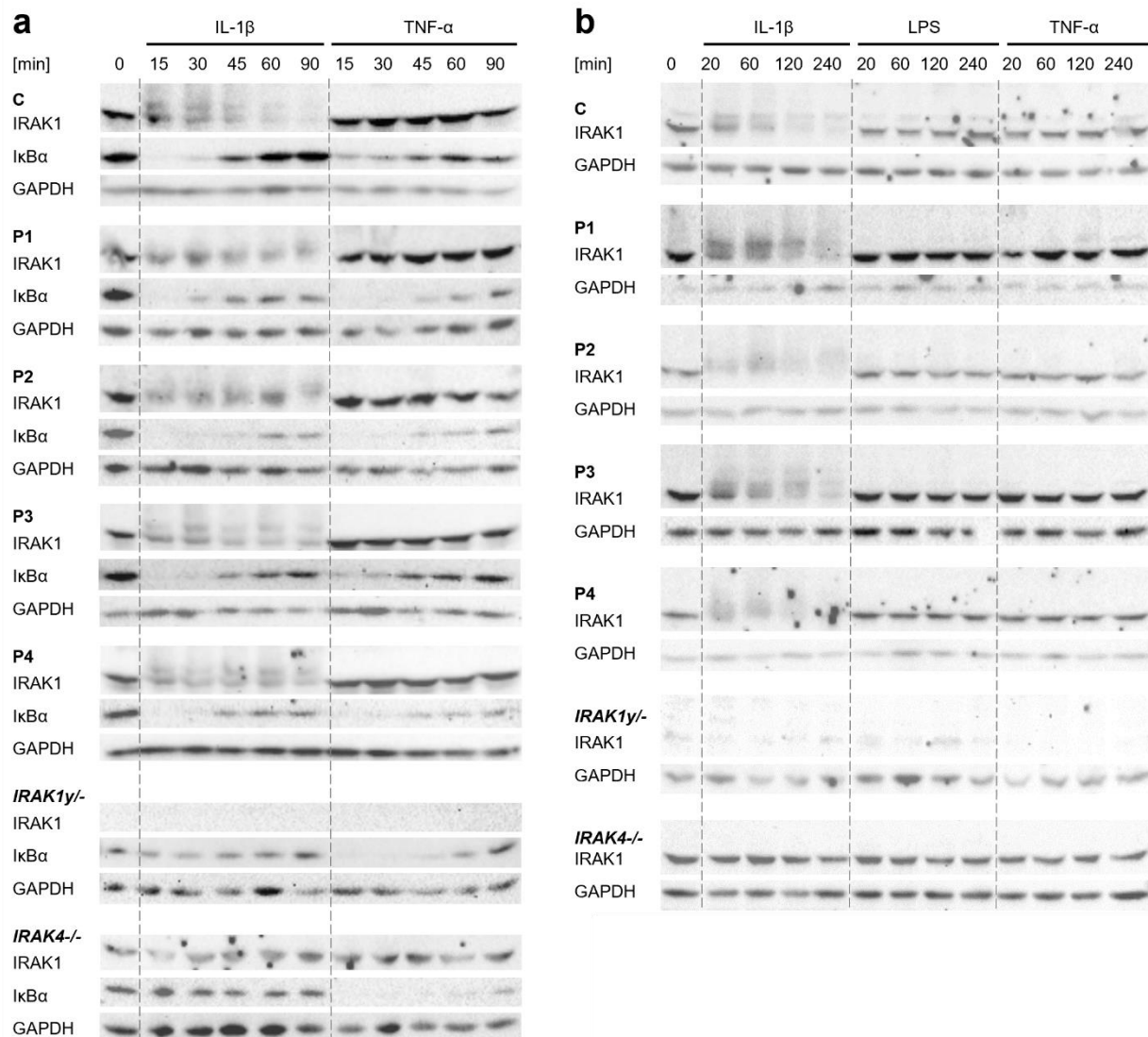


Abbildung 6: IRAK1-Phosphorylierung und -Abbau sowie I κ B α -Abbau. **a** IRAK1-Phosphorylierung und I κ B α -Degradierung nach Stimulation mit IL-1 β (10 ng/ml) und TNF- α (20 ng/ml). **b** IRAK1-Phosphorylierung nach Stimulation mit IL-1 β (10 ng/ml), LPS (10 μ g/ml) und TNF- α (20 ng/ml). IRAK1, IL-1 receptor-associated kinase1; I κ B α , NF- κ B inhibitor α ; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase; IL-1 β , interleukin-1 β ; LPS, lipopolysaccharide; TNF- α , tumor necrosis factor α ; aus Gottschalk et al., 2023 [60]

Die IRAK1-Banden von P2 erschienen in Abb. 6b unscharf bzw. blass. Wir untersuchten in einem weiteren Versuch daher den Abbau von IRAK1 sowie den Abbau von I κ B α nach Stimulation mit IL-1 β für 0, 15, 30, 45 bzw. 90 Minuten bei P2 im Vergleich zu einer gesunden Kontrolle. Bei P2 ist im Vergleich zu C quantitativ mehr IRAK1-Protein vorhanden, was sich sowohl im unstimulierten Zustand sowie durch die stärkeren Banden von phosphoryliertem und nicht-phosphoryliertem IRAK1 zeigt. Nach 90 Minuten ist bei P2 noch immer nicht-phosphoryliertes IRAK1 vorhanden. Sowohl C als auch P2 zeigen als Reaktion auf die Stimulation mit IL-1 β einen vollständigen Abbau des I κ B α nach 15

Minuten sowie eine Regeneration nach 45 Minuten. p38MAPK diene als Kontrolle einer gleichmäßigen Probenverteilung (Abb. 7).

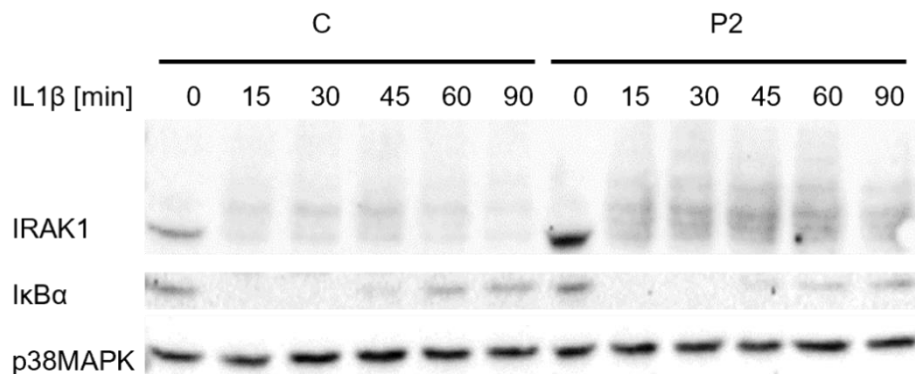


Abbildung 7: IRAK1-Phosphorylierung und IκBα-Degradierung nach Stimulation mit IL-1β (10 ng/ml). IRAK1, IL-1 receptor-associated kinase1; IκBα, NF-κB inhibitor α; p38MAPK, p38-mitogenaktivierte Proteinkinase; IL-1β, interleukin-1β; eigene Darstellung

3.3.2 Produktion von IL-6 und IL-8 in Fibroblasten, PBMC und Vollblut nach Aktivierung mit Interleukin-1β und TLR-Agonisten

Die IL-6- und IL-8-Produktion wurde in den Zellkulturüberständen von SV40-immortalisierten Fibroblasten und PBMC sowie in Vollblut nach Stimulation mit IL-1β bzw. den TLR-Agonisten LPS (TLR4), PAM2CSK4 (TLR2/6) und Poly(I:C) (TLR3) gemessen. Die Stimulationen mit TNF-α und PMA/Ionomycin dienten als MyD88/IRAK-unabhängige Intra-Assay-Kontrollen.

In SV40-Fibroblasten untersuchten wir die Zytokin-Ausschüttung bei P1, P2, P3 und P4 sowie von 4 gesunden Kontrollen und je einer IRAK1-defizienten und einer IRAK4-defizienten Kontrolle. Die Produktion von IL-6 und IL-8 nach Stimulation mit IL-1β oder dem TLR2/6-Agonisten PAM2CSK4 war in SV40-Fibroblasten sowohl von gesunden Kontrollen als auch von *MECP2/IRAK1*-duplizierten Patienten erhöht, aber wir konnten keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen feststellen. Absolut war die IL-6 Produktion nach Stimulation mit IL-1β in den Kontrollen etwas höher als in den Patienten, jedoch war der Unterschied statistisch nicht signifikant und es zeigte sich das gleiche Verhältnis bereits im unstimulierten Ausgangswert (Abb. 8a+b). Interessanterweise und im Gegensatz zu unserer Hypothese deuten die Daten darauf hin, dass in immortalisierten Fibroblasten von *MECP2/IRAK1*-duplizierten Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen nach Stimulation mit LPS keine verstärkte IL-6-Ausschüttung gibt. In IRAK4-defizienten Fibroblasten gab es keine Zytokinproduktion nach Stimulation mit IL-1β, dem TLR4-Agonisten LPS und dem TLR2/6-Agonisten PAM2CSK4 (Abb. 8a+b).

In IRAK1-defizienten Fibroblasten fanden wir keine Reaktion auf den TLR4-Agonisten LPS und den TLR2/6-Agonisten PAM2CSK4, aber eine fast ungestörte Reaktion auf IL-1 β (Abb. 8a+b). Alle Fibroblasten zeigten eine erhöhte Zytokinproduktion bei Aktivierung der MyD88/IRAK-unabhängigen Signalwege über den TLR3-Agonisten Poly(I:C), TNF- α und PMA/Ionomycin (Abb. 8a+b).

Weder in PBMC noch in Vollblut ergab sich zwischen Patienten und Kontrollen ein signifikanter Unterschied der IL-6- bzw. IL-8-Produktion nach Stimulation mit IL-1 β oder den TLR-Agonisten LPS und PAM2CSK4 (Abb. 8c-f). Bei P8, bei dem *IRAK1* tripliziert ist, war die IL-6- bzw. IL-8-Produktion nicht größer als bei den anderen Patienten oder gesunden Kontrollen. Es zeigten sich zwischen Patienten und Kontrollen keine Unterschiede in der Zytokinproduktion bei Aktivierung durch TNF- α oder PMA/Ionomycin (Abb. 8c-f).

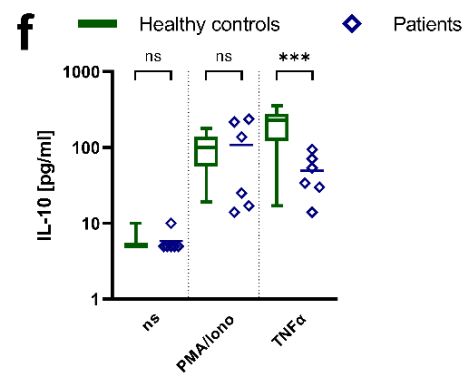
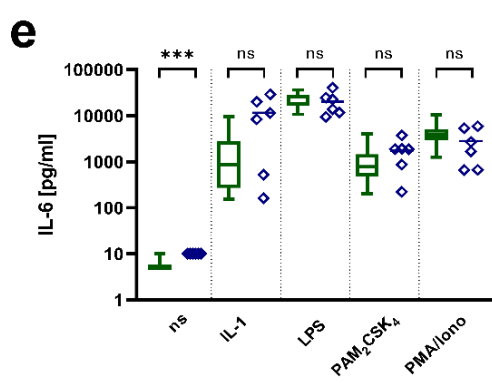
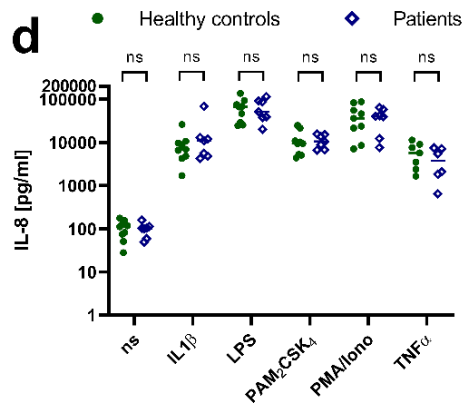
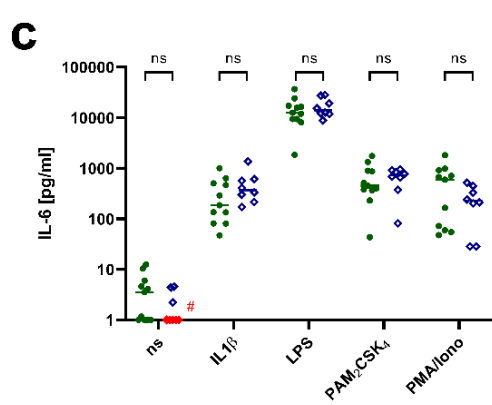
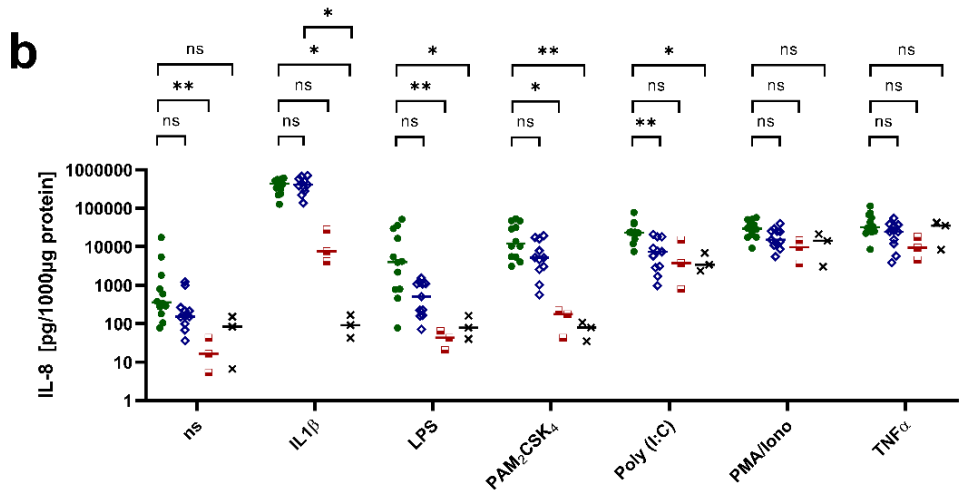
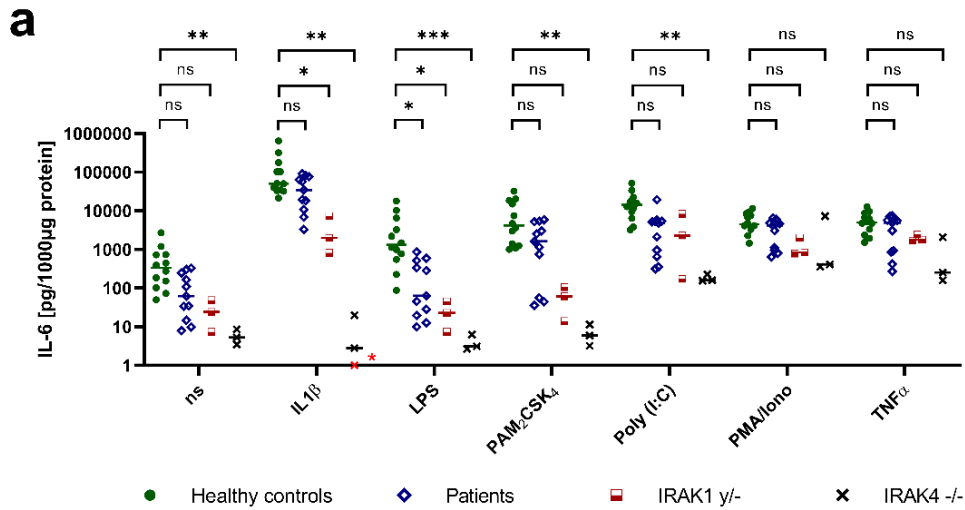


Abbildung 8: Zytokinproduktion nach Stimulation, gemessen in Zellkulturüberständen von SV40-Fibroblasten, PBMC und Vollblut. a und b Zytokinproduktion in SV40-immortalisierten Fibroblasten von Patienten (n=4) nach Stimulation mit IL-1 β (1ng/ml), TLR-Agonisten (LPS für TLR4 (10 μ g/ml), PAM2CSK4 für TLR2/6 (10 μ g/ml), Poly(I:C) für TLR3 (25 μ g/ml)), PMA/Iono (1x10⁻⁷ M/1x10⁻⁵ M) und TNF- α (20ng/ml). SV40-immortalisierte Fibroblasten gesunder Kontrollen (n=4), eines IRAK1-defizienten-Patienten und eines IRAK4-defizienten-Patienten wurden als Intra-Assay-Kontrollen verwendet. Das Experiment wurde dreimal durchgeführt. a IL-6-Produktion. b IL-8-Produktion. c und d Zytokinproduktion in PBMC von Patienten nach Stimulation mit IL-1 β (1ng/ml), TLR-Agonisten (LPS für TLR4 (1ng/ml), PAM2CSK4 für TLR2/6 (1 μ g/ml)), PMA/Iono (1x10⁻⁷ M/1x10⁻⁵ M) und TNF- α (20ng/ml). PBMC von gesunden Kontrollen wurden als Intra-Assay-Kontrollen verwendet. c IL-6-Produktion (n=8 bei Patienten und n=11 bei gesunden Kontrollen). d IL-8-Produktion (n=7 bei Patienten und n=9 bei gesunden Kontrollen). # Nullwerte. e und f Zytokinproduktion im Vollblut der Patienten (n=6) nach Stimulation mit IL-1 β (20ng/ml), TLR-Agonisten (LPS für TLR4 (1ng/ml), PAM2CSK4 für TLR2/6 (100ng/ml)), PMA/Iono (1x10⁻⁷ M/1x10⁻⁵ M) und TNF- α (20ng/ml). Die Analysen wurden im Vergleich zu einer in unserem Labor untersuchten Kohorte gesunder Kontrollen durchgeführt (n = 179, Whisker 5-95 Perzentil). e IL-6-Produktion. f IL-10-Produktion. Diese Abbildung wurde mit Prism 9 (GraphPad) erstellt. Die Balken zeigen die Medianwerte an. * P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001, **** P< 0,0001, ns, nicht signifikant. Wenn kein statistisch signifikanter Unterschied bestand (Patienten vs. IRAK1y/-; Patienten vs. IRAK4-/- und IRAK1y/- vs. IRAK4-/-) wurden die p-Werte nicht dargestellt. Healthy controls, gesunde Kontrollen; IL-1 β , Interleukin-1 β ; IRAK1, IL-1-Rezeptor-assoziierte Kinase 1; LPS, Lipopolysaccharid; PAM2, PAM2CSK4; PMA/Iono, Phorbolmyristataacetat/Ionomycin; patients, Patienten; TLR, Toll-like-Rezeptor; TNF- α , Tumornekrose-Faktor α ; aus Gottschalk et al., 2023 [60]

4. Diskussion

4.1 Systematische Literaturrecherche

4.1.1 Kurze Zusammenfassung und Interpretation der Ergebnisse

Basierend auf genetischen Screening-Studien könnten ungefähr 1-2 % der schweren X-chromosomalen geistigen Behinderung bei Männern durch das *MECP2*-Duplikationssyndrom erklärt werden [1,4,5,20,22–24]. Es gibt zahlreiche klinische Beschreibungen von einzelnen Fällen und kleineren Kohorten. Die von uns durchgeführte Studie ist die erste systematische Übersicht über alle bislang publizierten Patientinnen und Patienten mit *MECP2*-Duplikationssyndrom. Von den 545 Fällen, in denen genetisch eine Duplikation von sowohl *MECP2* als auch *IRAK1* bestätigt ist, sind 506 (93%) männliche Patienten und 40 (7%) symptomatische weibliche Patientinnen [60]. Die geografisch ungleichmäßige Verteilung der Publikationen (44 europäische, 25 nordamerikanische, 23 ostasiatische, 5 übrige asiatische Länder einschließlich Russland, 3 australische, 2 südamerikanische und 1 afrikanische) legt nahe, dass das *MECP2*-Duplikationssyndrom in einigen globalen Regionen unterdiagnostiziert sein könnte und die Zahl der Patientinnen und Patienten daher deutlich unterschätzt sein könnte [60]. Zudem fallen weibliche Patientinnen mitunter klinisch nicht auf, wenn sie einen milden Phänotyp aufweisen oder asymptomatische Trägerinnen sind [40].

Ein Großteil aller beschriebenen Patientinnen und Patienten (94%, 459/487) ist mental retardiert bzw. entwicklungsverzögert ohne wesentlichen Unterschied zwischen Patientinnen (94%, 33/35) und Patienten (98%, 399/409). Bei 91% (412/454) der Patientinnen und Patienten wurde eine muskuläre Hypotonie beschrieben, wobei dies bei den männlichen (93%, 349/377) häufiger als bei den weiblichen (73%, 19/26) der Patientinnen der Fall war. Die Häufigkeit des Vorkommens von epileptischen Anfällen ist bei den weiblichen (50%, 13/26) nur wenig geringer als bei den männlichen Patienten (57%, 223/392). 78% (374/479) der Patientinnen und Patienten leiden an rezidivierenden schweren Infektionen, insbesondere Pneumonien (bei 98% vorhanden), aber auch Mittelohrinfektionen, Harnwegsinfektionen und Sepsen [60]. Auffallend ist ein Geschlechterunterschied in der Häufigkeit des Auftretens von Infektionen. Im Vergleich zu 83% (328/397) der männlichen Patienten wurde dies nur bei 55 % (10/31) der weiblichen Patientinnen beschrieben [60]. Mehrfach wurden bei Patientinnen und

Patienten sowohl hohes Fieber während Infektionen als auch unerklärliche Fieberschübe in infektfreien Intervallen beschrieben.

Unsere Literaturrecherche zeigt, dass trotz der hohen Prävalenz von schwerwiegenden Infektionen nur wenige Studien den infektiösen und immunologischen Phänotyp der Patientinnen und Patienten genauer untersuchten. Nur selten wurden auslösende Erreger identifiziert. Die nachgewiesenen Erreger waren am häufigsten kapselbildende Bakterien wie *Streptococcus pneumoniae* und *Haemophilus influenzae*). Eine weiterführende Diagnostik wie bronchoalveoläre Lavage, Bestimmung der Immunglobulin-Spiegel oder Untersuchung der Impfreaktion wurde nur vereinzelt durchgeführt [60].

In unserer Literaturrecherche war die Gesamtprävalenz von gastroösophagealem Reflux 56% (149/268), mit einem kleinen Unterschied zwischen Patientinnen (44%, 4/9) und Patienten (59%, 124/211).

4.1.2 Einbettung der Ergebnisse in den bisherigen Forschungsstand

Unsere Ergebnisse sind weitgehend kongruent mit den ersten veröffentlichten Daten aus der kürzlich eingerichteten „The *MECP2* Duplication Database“ (MDBase), die auf einem ausführlichen Patientenfragebogen beruht. Diese 2020 gegründete Datenbank sammelte innerhalb von 2 Jahren die klinischen Daten von 154 Patientinnen und Patienten mit *MECP2*-Duplikationssyndrom aus 26 Ländern [125]. Es zeigte sich ebenfalls ein deutlicher Geschlechterunterschied in der Häufigkeit von Infektionen: Pneumonien bei 73% (89/122) der männlichen im Vergleich zu 44% (8/18) der weiblichen Patientinnen und Bronchitiden bei 51% (60/118) der männlichen im Vergleich zu 21% (4/19) der weiblichen Patientinnen [126]. Die Infektionen schränken die Lebensqualität der Betroffenen durch die häufigen Krankenhauseinweisungen mit wiederholten intensivstationären Aufenthalten und der Notwendigkeit invasiver Beatmung deutlich ein und stellen die häufigste Todesursache dar [60,126]. Mehr als die Hälfte der Patientinnen und Patienten aus der MDBase haben in den 12 Monaten vor der Befragung Antibiotika aufgrund einer respiratorischen Infektion erhalten [126]. Im Jahr 2015 schlugen Bauer et al. die Substitution von polyvalentem IgG bei Patienten mit einem IgG2-Unterklassendefizit und/oder niedrigen Nachimpftitern gegen Pneumokokken vor, die an rezidivierenden Infektionen leiden - eventuell in Kombination mit prophylaktischen Antibiotika [41,42]. In den in unsere Literaturrecherche eingeschlossenen 26 Studien, die

seit 2016 veröffentlicht wurden, wurde lediglich bei vier Patientinnen und Patienten eine Antibiotikaprophylaxe erwähnt [42,113,120]. Interessanterweise zeigen die Daten von Ta et al. aus der MDBase ein anderes Bild: mehr als ein Viertel der befragten Patientinnen und Patienten hatten in den vergangenen 12 Monaten eine prophylaktische antibiotische Therapie erhalten, am häufigsten Azithromycin, Amoxicillin und Trimethoprim [126].

Als möglicher Pathomechanismus wurde von einigen Autoren ein gastroösophagealer Reflux mit anschließender Aspiration vermutet [3,22,46,110,119,120,127]. Reflux und Aspiration könnten durch die charakteristische Muskelhypotonie mit konsekutiven Schluckstörungen und einem unvollständigen Magenschluss begünstigt sein [60]. In unserer Literaturrecherche war die Prävalenz des Refluxes mit 56% (149/268) jedoch geringer als die der wiederkehrenden schwerwiegenden Infektionen (78%, 374/479) [60]. Jedoch wurde bei einem Großteil der beschriebenen Patientinnen und Patienten keine Angabe zum Vorkommen von Schluckstörungen und gastroösophagealem Reflux gemacht. Zudem ist zu bedenken, dass ein Reflux insbesondere bei Kindern mit mentaler Retardierung und gestörter Sprachentwicklung klinisch unbemerkt bleiben kann. Nach den Daten von Ta et al. ist der Reflux mit 81% (107/132) häufiger als das Vorkommen von Pneumonien mit 70% (97/140) [126]. Interessanterweise zeigt sich bei dem Symptom Reflux gleichfalls ein Geschlechterunterschied: betroffen waren 84% (97/115) der Männer im Vergleich zu 59% (10/17) der Frauen [126]. Zudem wurde bei der Mehrheit der Patientinnen und Patienten mindestens eine Aspiration (57%, 72/127) nachgewiesen und ein ineffektives Abhusten von Atemwegssekreten (53%, 78/146) beobachtet [126]. Diese Daten legen nahe, dass tatsächlich ein relevanter Anteil der beim *MECP2*-Duplikationssyndrom beobachteten respiratorischen Infektionen mit Reflux und nachfolgender Aspiration in Zusammenhang stehen könnten. Sie erklären aber nicht die bei unserer Kohorte sowie anderen Patientinnen und Patienten mehrfach beschriebenen unerklärlichen Fieberschübe und auffallend hohen CRP-Werte auf [6,41,47,60,117,124,128]. Ta et al. beschrieben eine gestörte Temperaturregulation bei über der Hälfte ihrer Kohorte (83/146 [57%]) [126].

4.1.3 Stärken und Schwächen

Zahlreiche Artikel, die neue Kohorten von Patientinnen und Patienten mit *MECP2*-Duplikationssyndrom beschrieben, verglichen deren Phänotyp mit einigen zuvor publizierten Kohorten. Unsere Studie bietet nun erstmals eine systematische Übersicht

über alle bislang publizierten Patientinnen und Patienten mit *MECP2*-Duplikationssyndrom. Eine Besonderheit ist, dass wir durch Rückwärtsverfolgung von Zitaten auch Patientinnen und Patienten einschließen konnten, über die vor Erstbeschreibung des Syndroms berichtet wurde. Dopplungen von beschriebenen Patientinnen und Patienten wurden, sofern nachvollziehbar, aus der Analyse ausgeschlossen. Eine Schwäche der Studie ist, dass für eine bessere Vergleichbarkeit trotz der Varianz der Nomenklatur in den Artikeln die Symptome „Mentale Retardierung“ und „Entwicklungsverzögerung“ sowie „Wiederkehrende Infektionen“ und „schwere Infektionen“ jeweils zu einer Kategorie zusammengefasst wurden. Zudem wurde lediglich darauf geachtet, dass die „minimal critical region“ in der Duplikation/ Triplikation enthalten ist. Es fand keine Berücksichtigung der individuell sehr verschiedenen duplizierten Areale außer *MECP2/IRAK1* statt.

4.2 NF-κB-Signaltransduktion bei *MECP2/IRAK1*-Duplikation

4.2.1 Kurze Zusammenfassung und Interpretation der Ergebnisse

Trotz zunehmender Forschung zum *MECP2/IRAK1*-Duplikationssyndrom ist der pathophysiologische Mechanismus der gehäuften Infektionen noch unbekannt. Wir stellten die Hypothese auf, dass die schwerwiegenden Infektionen bei Patientinnen und Patienten mit *MECP2*-Duplikationssyndrom möglicherweise mit einer überstarken Akute-Phase-Reaktion zusammenhängen, die auf einer Überexpression von IRAK1 und einer konsekutiv verstärkten Aktivierung des kanonischen NF-κB-Signalweges beruhen könnten.

Unsere Patienten wiesen in SV40-Zelllysaten eine zwei- bis dreifach höhere Menge an IRAK1 im Vergleich zu den gesunden Probanden auf. Interessanterweise ist die Menge an IRAK1-Protein verdreifacht, obwohl das *IRAK1*-Gen bei P1-4 nur dupliziert und nicht tripliziert ist. Da das Mehr an IRAK1 ebenfalls phosphoryliert und abgebaut wird, lässt sich schlussfolgern, dass es an der Signaltransduktion teilnimmt. Trotzdem lässt sich kein wesentlicher Unterschied zu den Zellen der gesunden Kontrollen im Hinblick auf den IκBα-Abbau und die Zytokinproduktion feststellen.

Sowohl bei der gesunden Kontrolle als auch bei den Patienten zeigte sich nach Stimulation mit IL-1β eine Phosphorylierung und ein Abbau des IRAK1, jedoch mit Unterschieden in der Kinetik. Bei der gesunden Kontrolle war das IRAK1 nach etwa 45

bis 60 Minuten nahezu vollständig phosphoryliert und abgebaut, während bei den Patienten nach 90 Minuten bzw. zumindest bei P1 und P3 auch nach 240 Minuten noch nicht-phosphoryliertes IRAK1 vorhanden war. Diese Unterschiede lassen sich womöglich mit den unterschiedlichen Mengen an IRAK1-Protein erklären. Dahingehend zeigt sich kein Unterschied der Kinetik des I κ B α -Abbaus zwischen Patienten und Kontrolle.

Entgegen unserer Hypothese war die Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8 nach Stimulation mit IL-1 β und den TLR-Agonisten in SV40-Fibroblasten, Vollblut und PBMC von den Patienten nicht vervielfacht, sondern vergleichbar mit der bei den gesunden Kontrollen. Da die Reaktion auf IL-1 β und TLR-Agonisten nicht nur in PBMC, sondern auch im Vollblut normal zu sein scheint, lässt sich vermuten, dass die kanonische NF- κ B-Signalgebung in neutrophilen Granulozyten von Patienten mit *MECP2/IRAK1*-Duplikation weder erhöht noch beeinträchtigt ist.

Interessant sind unsere Ergebnisse in SV40-Fibroblasten nach Stimulation mit dem TLR4-Agonisten LPS. Im Westernblot lässt sich nach LPS-Stimulation in keiner der SV40-Zelllinien eine IRAK1-Phosphorylierung bzw. -Abbau nachweisen. Im ELISA fällt auf, dass die IL-6 und IL-8-Produktion nach Stimulation mit LPS in den SV40-Fibroblasten von Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen leicht vermindert ist, während sich in PBMC und Vollblut kein Unterschied zeigt.

Zusammenfassend wiesen die Patienten mit *MECP2/IRAK1*-Duplikation eine verstärkte Expression von IRAK1-Protein in SV40-Fibroblasten im Vergleich zu gesunden Probanden auf. Allerdings zeigt sich kein Unterschied in der Kinetik des I κ B α -Abbaus und in der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen bei Patienten mit *MECP2/IRAK1*-Duplikation nach Simulation von IRAK1-NF- κ B-vermittelten Signalwegen im Vergleich zu gesunden Probanden. Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass die Duplikation von *IRAK1* entgegen unserer Hypothese nicht zu einer vermehrten NF- κ B-vermittelten Inflammation in SV40-Fibroblasten, PBMCs oder Vollblut führt.

Offen bleibt, ob der hier untersuchte IRAK1-NF- κ B-vermittelte Signalweg möglicherweise in anderen Geweben, wie beispielsweise respiratorischem Epithel, durch die *IRAK1*-Duplikation verstärkt und somit ursächlich für die schweren pulmonalen Verläufe sein könnte. Ebenso bleibt offen, ob die *IRAK1*-Duplikation zu einer verstärkten IRF7-vermittelten Bildung von Typ I Interferonen führt.

4.2.2 Einbettung der Ergebnisse in den bisherigen Forschungsstand

Unsere Ergebnisse stehen zum Großteil in Einklang mit anderen bislang in der Literatur veröffentlichten Ergebnissen. Nach Stimulation mit TNF- α zeigte sich keine Phosphorylierung und kein Abbau von IRAK1. Dies entspricht dem aktuellen Kenntnisstand, dass die TNF- α -induzierte NF- κ B-Signalgebung unabhängig von einer IRAK1-Phosphorylierung erfolgt [129]. Nach Stimulation mit IL-1 β wird das IRAK4-Protein für die Phosphorylierung von IRAK1 und für die weitergehende Signalweiterleitung benötigt [64,130]. In Einklang damit konnte in unseren Versuchen bei IRAK4-Defizienz keine Phosphorylierung und kein Abbau von IRAK1 erfolgen, und nach Stimulation mit IL-1 β auch kein I κ B α -Abbau stattfinden. In der *IRAK1*-defizienten Zelllinie ist die I κ B α -Degradierung nach Stimulation mit IL-1 β verspätet und eingeschränkt. Die Ergebnisse bei unseren gesunden Kontrollen sowie unseren *IRAK1*- und *IRAK4*-defizienten Kontrollen stimmen mit den Ergebnissen von Della Mina et al. überein [92]. Diese wiesen in den Fibroblasten eines *IRAK1*-defizienten Patienten *in vitro* eine verminderte Zytokinproduktion nach Stimulation mit TLR2/6- und TLR4-Agonisten, aber eine unbeeinträchtigte Reaktion auf IL-1 β , nach. Die peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) des Patienten reagierten normal auf IL-1 β sowie auf TLR2/6- und TLR4-Agonisten [92]. Die Reaktionen auf den TLR3-Agonisten Poly(I:C) wurden nicht beeinflusst, da dieser über einen TRIF-abhängigen Signalweg vermittelt wird [92]. Della Mina et al. schlussfolgerten daher, dass IRAK1 in Fibroblasten den TLR, nicht aber den IL-1R nachgeschaltet ist, während es in Leukozyten sowohl den TLR als auch den IL-1R nachgeschaltet eine redundante Rolle spielt [92].

Die über Poly(I:C), PMA/ Ionomycin und TNF- α vermittelten Signalwege sind unabhängig von MyD88, IRAK4 und IRAK1 (siehe 1.2.3). Entsprechend zeigte sich wie zu erwarten nach Stimulation mit diesen Liganden in unseren *IRAK1*-duplizierten, *IRAK1*-defizienten und *IRAK4*-defizienten SV40-Fibroblasten sowie in unseren *IRAK1*-duplizierten PBMC eine vergleichbare Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie bei den gesunden Kontrollen.

In unseren Versuchen zeigte sich nach LPS-Stimulation (10 μ g/ml) in den SV40-Fibroblasten-Zelllinien einerseits eine ausbleibende IRAK1-Phosphorylierung und andererseits eine verminderte IL-6- und IL-8-Produktion. Im Gegensatz dazu fand in der Studie von Lockett et al. in Fibroblasten von Mäuseembryos nach Stimulation mit LPS

(0,1µg/ml) eine IRAK1-Phosphorylierung statt, die jedoch langsamer als nach Stimulation mit IL-1β war (60 vs. 10 Minuten). IRAK1-defiziente Mäusemakrophagen wiesen eine beeinträchtigte, aber nicht ausbleibende, Zytokinproduktion sowie NF-κB-Aktivierung nach Stimulation mit LPS (1ng/ml) auf und waren zudem widerstandsfähiger gegenüber hohen toxischen LPS-Dosen [90]. Diese Differenz könnte einerseits daran liegen, dass es einen Unterschied in der Signalgebung zwischen murinen und humanen Fibroblasten gibt, oder andererseits daran, dass die von uns gewählten LPS-Dosen möglicherweise toxisch waren (s. 4.2.3).

4.2.3 Stärken und Schwächen der Studie

Die NF-κB-Signalübertragung in immortalisierten Fibroblasten, PBMC und Vollblut scheint nicht verstärkt zu sein. In anderen Geweben wie Lungenepithelien könnte dies jedoch anders sein (siehe 4.3.1). Zudem umfasst unsere Studie lediglich eine kleine Zahl von Patienten mit zudem unterschiedlich großen Duplikationen.

Eine weitere Limitation ist, dass wir bei den Westernblots aufgrund des großen technischen Aufwands durch die Versuchsgröße teilweise nur eine Kontrolle verwendet haben. Zudem ergaben sich teilweise Hintergrundsignale durch Verunreinigung und Probleme mit einem Antikörper, was zu schwächeren Banden führte, weshalb wir keine Densitometrie durchführten. Für zukünftige Versuche erscheint es sinnvoll, eine Densitometrie durchzuführen und die Kinetik der IRAK1-Phosphorylierung in Relation zur jeweiligen Menge an IRAK1 zu setzen.

Wir verwendeten in unseren Versuchen höhere LPS-Konzentrationen bei der Stimulation von SV40-Fibroblasten (10µg/ml) als bei der Stimulation von PBMC bzw. Vollblut (1ng/ml), da Fibroblasten bekanntermaßen weniger TLR4-Rezeptoren haben. In unseren Versuchen zeigte sich nach LPS-Stimulation (10µg/ml) in den SV40-Fibroblasten-Zelllinien eine ausbleibende IRAK1-Phosphorylierung und Zytokinproduktion. Wir orientierten uns bei der von uns gewählten Konzentration an Della Mina et al., die für die Stimulation von SV40-Fibroblasten ebenfalls 10µg/ml LPS verwendeten [92]. Lockett et al. verwendeten für die Stimulation von SV40-Fibroblasten 0,1µg/ml, eine um den Faktor 100 geringere LPS-Konzentration als wir [129]. Es ist nicht auszuschließen, dass die von uns gewählte LPS-Dosis toxisch war. Dies könnte für die ausbleibende IRAK1-Phosphorylierung und andererseits eine verminderte IL-6- und IL-8-Produktion in unseren Versuchen mit SV40-Fibroblasten ursächlich sein.

Wir verwendeten inkonsistente Konzentrationen von IL-1 β bei der Stimulation für die Messung der Zytokinproduktion (1ng/ml bei SV40-Fibroblasten und PBMC; 20ng/ml bei Vollblut) und bei der Stimulation für die Westernblot-Analyse der IRAK1-Phosphorylierung und des I κ B α -Abbaus (10ng/ml). Die von vielen anderen Autoren verwendete IL-1 β -Konzentration beträgt 10ng/ml. Da wir bei unseren Patienten eine höhere Konzentration von IL-6 und IL-8 nach der Stimulation vermuteten, entschieden wir uns, die Menge an IL-1 β für die Stimulation zu reduzieren. Wir stellten die Hypothese auf, dass eine geringere IL-1 β -Menge bereits eine starke Zytokinproduktion in Fibroblasten von Patienten mit einer *IRAK1*-Duplikation auslösen könnte, während bei Kontrollen eine geringere IL-1 β -Menge eine schwächere Reaktion hervorrufen könnte. Offensichtlich reichte diese geringere Menge an IL-1 β aus, um eine gesteigerte Zytokinproduktion in unseren Kontrollen (gesunde Kontrollen und *IRAK1y/-*) auszulösen, ähnlich wie bei den Ergebnissen von Della Mina et al [92].

4.3 Alternative Hypothesen

4.3.1 IRAK1 in Atemwegsepithelien und CXCL-10-Induktion

Während die NF- κ B-Signalübertragung in Fibroblasten und Blut nicht beeinträchtigt zu sein scheint, könnte dies in anderen Geweben wie Lungenepithelien anders sein. IRAK1 ist für die IL-8 Produktion in Epithelzellen der menschlichen Atemwege essentiell [131]. Außerdem ist IRAK1 notwendig für die Induktion von CXCL-10 in Atemwegsepithelzellen und Makrophagen [132]. Sowohl eine übermäßige Produktion von IL-8 als auch von CXCL-10 könnte zu einer Lungenentzündung beitragen, die zum klinischen Phänotyp der Patientinnen und Patienten führt. Cronk et al. beschrieben in Mäusen mit *MECP2*-Überexprimierung eine exzessive Entzündungsreaktion. Sie fanden in BAL-Flüssigkeiten dieser Mäuse signifikante Mengen an CXCL5, wohingegen Wildtyp-Mäuse nur wenig bis gar kein CXCL5 aufwiesen. Dies könnte auf eine Beteiligung von Epithelzellen der Atemwege an der Entzündung hindeuten [133].

Von einem wissenschaftlichen Standpunkt aus wäre es daher interessant, Epithelzellen der Atemwege von Patientinnen und Patienten mit *MECP2/IRAK1*-Duplikation zu untersuchen. Es erscheint jedoch fast unmöglich, ausreichende Mengen an primärem Lungengewebe von Kindern mit einer so seltenen Krankheit zu gewinnen, geschweige denn genügend Lungenepithelien zu kultivieren. Auch eine strategische Untersuchung

von Sekreten aus BAL ist aufgrund der Invasivität der Diagnostik in der Klinik nur schwer durchsetzbar. Eine alternative Strategie zur Untersuchung der Rolle von IRAK1 in Lungeneithelien könnte darin bestehen, aus primären Fibroblasten der Patienten menschliche induzierte pluripotente Stammzellen (hiPSCs) zu Epithelzellen der Lunge zu differenzieren [134].

4.3.2 Beeinträchtigte IFN- γ -Sekretion

Yang et al. schlugen vor, dass schwere Infektionen bei Patienten mit *MECP2*-Duplikationssyndrom auf eine fehlende TH1-Reaktion und eine daraus resultierende geringe IFN- γ -Aktivität zurückzuführen sein könnten [45]. Eine allgemein beeinträchtigte IFN- γ -Sekretion konnte jedoch von Bauer et al. nicht reproduziert werden [41]. Darüber hinaus ist ein vollständiger IFN- γ -Mangel gekennzeichnet durch eine selektive Prädisposition für Infektionen durch Mykobakterien, Salmonellen oder *Candida*-Spezies [135,136]. Dies korreliert nicht mit dem klinischen Phänotyp von Patientinnen und Patienten mit *MECP2*-Duplikationssyndrom, die typischerweise eine eitrige Bronchitis aufweisen, die durch Bakterien bedingt ist, die in der Lage sind, eine Kapsel zu bilden, wie z. B. *Streptococcus pneumoniae* oder *Haemophilus influenzae* [41]. Unter den bisher publizierten Patientinnen und Patienten mit *MECP2*-Duplikationssyndrom wurde in unserer systematischen Literaturrecherche nur ein Bericht über eine Infektion mit Mykobakterien gefunden [41].

4.3.3 Beeinträchtigte Typ-I-IFN-Signatur

Neben seiner Rolle für den kanonischen NF- κ B-Signalweg steuert IRAK1 die Induktion von Interferonen über den IRF7 (siehe 1.2.4 und 1.3.3) [12,14,17]. Bei IRF7-Mangel sind Menschen selektiv anfällig für schwere Infektionen durch Influenza und SARS-CoV2 und zeigen eine beeinträchtigte Typ-I-IFN-Signatur [72,73]. *In vitro* reguliert IRAK1 die transkriptionelle Aktivierung von IRF7 durch direkte Bindung und Phosphorylierung (siehe 1.3.3).

Die TLR7- und TLR9-vermittelte IFN- α -Produktion ist in *IRAK1*-defizienten Mäusen aufgehoben, während die Produktion entzündlicher Zytokine nicht beeinträchtigt ist [14]. Dies wirft die Frage auf, ob die Duplikation des *IRAK1*-Gens und damit die Überexpression von IRAK1 eine verstärkte Aktivierung des TLR7- und TLR9-vermittelten

Interferon- α -Induktionsweges bewirkt, was zu einer erhöhten Freisetzung von Interferonen und folglich zu einer hyperinflammatorischen Immunantwort führt.

4.3.4 Genetisch bedingte, IRAK1-unabhängige Suszeptibilität für Infektionen

Es wurde beschrieben, dass MECP2-überexprimierende Mäuse besonders anfällig für schwere Influenza-A-Infektionen sind. Während der Infektion zeigen sie eine Neutrophilie, eine erhöhte Zytokinproduktion, überhöhte Kortikosteroid-Spiegel, eine gestörte adaptive Immunität und eine vaskuläre Pathologie. Dies wirft die Frage auf, ob der der Entzündung zugrunde liegende Pathomechanismus bei Menschen mit MECP2-Duplikationssyndrom eher durch die Überexpression von MECP2 als durch die Überexpression von IRAK1 verursacht wird [133]. In einem humanisierten MDS-Mausmodell konnte gezeigt werden, dass eine intrazerebroventrikuläre Antisense-Oligonukleotid (ASO)-Therapie die MECP2-Expression im Gehirn verringert und Verhaltensdefizite reduziert sowie reduzierte IFN- γ -mRNA-Spiegel im Blut korrigiert [137]. Wenn Entzündungen bei MECP2-Duplikationssyndrom eher durch die Duplikation von MECP2 selbst, als durch Duplikation von IRAK1 verursacht werden, könnte ASO gegen MECP2 eine praktikable Behandlungsoption für diese Patientinnen und Patienten sein [60]. Weitere Studien sind notwendig, um die Auswirkungen einer solchen in Kompartimenten wie Blut und Lunge angewandten ASO-Therapie zu untersuchen.

Die Duplikationen sind bei verschiedenen Patientinnen und Patienten sehr unterschiedlich in Bezug auf Größe und Region und nicht alle Patientinnen und Patienten sind von schweren Infektionen betroffen. Beispielsweise beschrieben Akahoshi et al. einen Patienten, der an gehäuften respiratorischen Infektionen und Otitiden litt, aber dessen Duplikation distal von MECP2/IRAK1 lag und die diese beiden Gene nicht einschloss [138]. Auch Bijlsma et al. berichteten über eine Patientin, bei der IRAK1 nicht im duplizierten Fragment enthalten war, die jedoch ein Muster wiederkehrender Infektionen aufwies, wie es bei Patientinnen und Patienten mit MECP2-Duplikationssyndrom typischerweise zu beobachten ist. Da keines der anderen duplizierten Gene in der Region mit rezidivierenden Infektionen in Verbindung gebracht werden konnte, führten die Autoren das Symptom auf die Duplikation des MECP2-Gens zurück [34]. Es ist denkbar, dass die Empfänglichkeit für schwere Infektionen eine genetische Komponente hat, die allerdings unabhängig von IRAK1 und MECP2 ist. Aus den bislang publizierten Fallberichten lässt sich diese Möglichkeit retrospektiv kaum

beurteilen, da die Variabilität der duplizierten Region zwischen den Patienten sehr groß ist und oft keine Informationen zum infektiologischen Phänotyp vorliegen. Mit den neuen Möglichkeiten, die sich aus der Erstellung eines weltweiten Registers wie der „The *MECP2* Duplication Database“ (MDBase), sowie der Entwicklung von CRISPR/Cas9-basierten Modellen ergeben, sollte in Zukunft der Frage nachgegangen werden, ob womöglich ein anderes bislang nicht beachtetes Gen für den Pathomechanismus der Infektionen bei Patientinnen und Patienten mit *MECP2*-Duplikationssyndrom relevant ist.

4.3.5 Erstes Mausmodell mit *MECP2-IRAK1*-Tandemduplikation

Für die Hypothese einer grundlegenden Rolle von IRAK1 im Pathomechanismus von Infektionen bei Patientinnen und Patienten mit *MECP2*-Duplikationssyndrom sprechen die aktuellen Ergebnisse von Maino et al. In einem mithilfe von CRISPR/Cas9 generierten Mausmodell mit *IRAK1-MECP2*-Tandemduplikation zeigen sich Besonderheiten in der Immunantwort, die zuvor in Mausmodellen mit lediglich *MECP2*-Duplikation nicht nachweisbar waren. Mäuse mit *IRAK1-MECP2*-Duplikation wiesen eine Erhöhung der proinflammatorischen und Th1-assoziierten Zytokine und Chemokine auf. Die Ergebnisse von Maino et al. weisen darauf hin, dass die abnormale Immunantwort auf Infektionen zumindest in Mäusen durch die IRAK1-Überexpression bedingt sein könnte (Preprint) [139]. Die Entwicklung dieses Mausmodells bietet neue Möglichkeiten, Pathomechanismen und therapeutische Strategien auch in anderen Geweben als in Fibroblasten und im peripheren Blut zu untersuchen. Die Arbeitsgruppe um Maino et al. arbeitet aktuell außerdem im Mausmodell an der Therapie von durch Duplikationen bedingten Erkrankungen via Korrektur mittels CRISPR/Cas9 [140].

5. Schlussfolgerungen

Schwere und wiederkehrende Infektionen sind ein typisches Symptom von Patientinnen und Patienten mit *MECP2*-Duplikationssyndrom. Da Infektionen nach wie vor deren Lebensqualität einschränken und die häufigste Todesursache sind, scheint es einen ungedeckten klinischen Bedarf an pneumologischer und mikrobiologischer Diagnostik sowie an gezielter antiinfektöser Behandlung zu geben.

Wir konnten in unserer Kohorte in SV40-Fibroblasten und in peripherem Blut keine Hinweise auf eine verstärkte Aktivierung des kanonischen NF- κ B-Signalwegs bei *MECP2/IRAK1*-duplizierten Patienten finden. Daher gehen wir derzeit davon aus, dass diese Patienten nicht von einer therapeutischen Unterdrückung dieses Signalweges profitieren.

In zukünftigen Studien sollte einerseits der IRAK1-NF- κ B-vermittelte Signalweg in anderen Geweben, wie beispielsweise respiratorischem Epithel, und andererseits der IRAK1-IRF7-vermittelte Interferon-Signalweg als mögliche Pathomechanismen für die schweren pulmonalen Infektionen geprüft werden. Außerdem könnte, wie bei vielen Patienten mit muskulärer Hypotonie, auch ein chronischer, teils unbemerkter, gastroösophagealer Reflux eine Rolle spielen.

Literaturverzeichnis

- [1] Van Esch H, Bauters M, Ignatius J, Jansen M, Raynaud M, Hollanders K, Lugtenberg D, Bienvenu T, Jensen LR, Gecz J, Moraine C, Marynen P, Fryns J-P, Froyen G. Duplication of the MECP2 region is a frequent cause of severe mental retardation and progressive neurological symptoms in males. *Am J Hum Genet* 2005;77:442–53. <https://doi.org/10.1086/444549>.
- [2] Meins M, Lehmann J, Gerresheim F, Herchenbach J, Hagedorn M, Hameister K, Epplen JT. Submicroscopic duplication in Xq28 causes increased expression of the MECP2 gene in a boy with severe mental retardation and features of Rett syndrome. *J Med Genet* 2005;42:e12. <https://doi.org/10.1136/jmg.2004.023804>.
- [3] Lubs H, Abidi F, Bier J-AB, Abuelo D, Ouzts L, Voeller K, Fennell E, Stevenson RE, Schwartz CE, Arena F. XLMR syndrome characterized by multiple respiratory infections, hypertelorism, severe CNS deterioration and early death localizes to distal Xq28. *American Journal of Medical Genetics* 1999;85:243–8. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-8628\(19990730\)85:3<243::AID-AJMG11>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-8628(19990730)85:3<243::AID-AJMG11>3.0.CO;2-E).
- [4] Ramocki MB, Tavyev YJ, Peters SU. The MECP2 duplication syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A* 2010;152A:1079–88. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.33184>.
- [5] Lugtenberg D, Kleefstra T, Oudakker AR, Nillesen WM, Yntema HG, Tzschach A, Raynaud M, Rating D, Journel H, Chelly J, Goizet C, Lacombe D, Pedespan J-M, Echenne B, Tariverdian G, O'Rourke D, King MD, Green A, van Kogelenberg M, Van Esch H, Gecz J, Hamel BCJ, van Bokhoven H, de Brouwer APM. Structural variation in Xq28: MECP2 duplications in 1% of patients with unexplained XLMR and in 2% of male patients with severe encephalopathy. *Eur J Hum Genet* 2009;17:444–53. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2008.208>.
- [6] Carvalho CMB, Ramocki MB, Pehlivan D, Franco LM, Gonzaga-Jauregui C, Fang P, McCall A, Pivnick EK, Hines-Dowell S, Seaver L, Friehling L, Lee S, Smith R, del Gaudio D, Withers M, Liu P, Cheung SW, Belmont JW, Zoghbi HY, Hastings PJ, Lupski JR. Inverted genomic segments and complex triplication rearrangements are mediated by inverted repeats in the human genome. *Nat Genet* 2011;43:1074–81. <https://doi.org/10.1038/ng.944>.
- [7] Chahrour M, Jung SY, Shaw C, Zhou X, Wong STC, Qin J, Zoghbi HY. MeCP2, a Key Contributor to Neurological Disease, Activates and Represses Transcription. *Science* 2008;320:1224–9. <https://doi.org/10.1126/science.1153252>.
- [8] Tillotson R, Bird A. The Molecular Basis of MeCP2 Function in the Brain. *J Mol Biol* 2020;432:1602–23. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.10.004>.
- [9] Shahbazian MD, Antalffy B, Armstrong DL, Zoghbi HY. Insight into Rett syndrome: MeCP2 levels display tissue- and cell-specific differences and correlate with neuronal maturation. *Hum Mol Genet* 2002;11:115–24. <https://doi.org/10.1093/hmg/11.2.115>.
- [10] Kishi N, Macklis JD. MECP2 is progressively expressed in post-migratory neurons and is involved in neuronal maturation rather than cell fate decisions. *Mol Cell Neurosci* 2004;27:306–21. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2004.07.006>.
- [11] Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet* 1999;23:185–8. <https://doi.org/10.1038/13810>.

- [12] Singer JW, Fleischman A, Al-Fayoumi S, Mascarenhas JO, Yu Q, Agarwal A. Inhibition of interleukin-1 receptor-associated kinase 1 (IRAK1) as a therapeutic strategy. *Oncotarget* 2018;9:33416–39. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26058>.
- [13] Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010;11:373–84. <https://doi.org/10.1038/ni.1863>.
- [14] Uematsu S, Sato S, Yamamoto M, Hirotani T, Kato H, Takeshita F, Matsuda M, Coban C, Ishii KJ, Kawai T, Takeuchi O, Akira S. Interleukin-1 receptor-associated kinase-1 plays an essential role for Toll-like receptor (TLR)7- and TLR9-mediated interferon- α induction. *J Exp Med* 2005;201:915–23. <https://doi.org/10.1084/jem.20042372>.
- [15] Jain A, Kaczanowska S, Davila E. IL-1 Receptor-Associated Kinase Signaling and Its Role in Inflammation, Cancer Progression, and Therapy Resistance. *Front Immunol* 2014;5:553. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00553>.
- [16] Vidya MK, Kumar VG, Sejian V, Bagath M, Krishnan G, Bhatta R. Toll-like receptors: Significance, ligands, signaling pathways, and functions in mammals. *International Reviews of Immunology* 2018;37:20–36. <https://doi.org/10.1080/08830185.2017.1380200>.
- [17] Antonczyk A, Krist B, Sajek M, Michalska A, Piaszyk-Borychowska A, Plens-Galaska M, Wesoly J, Bluysen HAR. Direct Inhibition of IRF-Dependent Transcriptional Regulatory Mechanisms Associated With Disease. *Frontiers in Immunology* 2019;10.
- [18] Gan L, Li L. Regulations and roles of the interleukin-1 receptor associated kinases (IRAKs) in innate and adaptive immunity. *Immunol Res* 2006;35:295–302. <https://doi.org/10.1385/IR:35:3:295>.
- [19] Gottipati S, Rao NL, Fung-Leung W-P. IRAK1: a critical signaling mediator of innate immunity. *Cell Signal* 2008;20:269–76. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.08.009>.
- [20] Friez MJ, Jones JR, Clarkson K, Lubs H, Abuelo D, Bier J-AB, Pai S, Simensen R, Williams C, Giampietro PF, Schwartz CE, Stevenson RE. Recurrent Infections, Hypotonia, and Mental Retardation Caused by Duplication of MECP2 and Adjacent Region in Xq28. *Pediatrics* 2006;118:e1687–95. <https://doi.org/10.1542/peds.2006-0395>.
- [21] Miguet M, Faivre L, Amiel J, Nizon M, Touraine R, Prieur F, Pasquier L, Lefebvre M, Thevenon J, Dubourg C, Julia S, Sarret C, Remerand G, Francannet C, Laffargue F, Boespflug-Tanguy O, David A, Isidor B, Vigneron J, Leheup B, Lambert L, Philippe C, Béri-Dexheimer M, Cuisset J-M, Andrieux J, Plessis G, Toutain A, Guibaud L, Cormier-Daire V, Rio M, Bonnefont J-P, Echenne B, Journel H, Burglen L, Chantot-Bastaraud S, Bienvenu T, Baumann C, Perrin L, Drunat S, Jouk P-S, Dieterich K, Devillard F, Lacombe D, Philip N, Sigaudy S, Moncla A, Missirian C, Badens C, Perreton N, Thauvin-Robinet C, AChro-Puce R, Pedespan J-M, Rooryck C, Goizet C, Vincent-Delorme C, Duban-Bedu B, Bahi-Buisson N, Afenjar A, Maincent K, Héron D, Alessandri J-L, Martin-Coignard D, Lesca G, Rossi M, Raynaud M, Callier P, Mosca-Boidron A-L, Marle N, Coutton C, Satre V, Caignec CL, Malan V, Romana S, Keren B, Tabet A-C, Kremer V, Scheidecker S, Vigouroux A, Lackmy-Port-Lis M, Sanlaville D, Till M, Carneiro M, Gilbert-Dussardier B, Willems M, Van Esch H, Portes VD, El Chehadeh S. Further delineation of the MECP2 duplication syndrome phenotype in 59 French male patients, with a particular focus on morphological and neurological features. *J Med Genet* 2018;55:359–71. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2017-104956>.

- [22] del Gaudio D, Fang P, Scaglia F, Ward PA, Craigen WJ, Glaze DG, Neul JL, Patel A, Lee JA, Irons M, Berry SA, Pursley AA, Grebe TA, Freedenberg D, Martin RA, Hsich GE, Khera JR, Friedman NR, Zoghbi HY, Eng CM, Lupski JR, Beaudet AL, Cheung SW, Roa BB. Increased MECP2 gene copy number as the result of genomic duplication in neurodevelopmentally delayed males. *Genet Med* 2006;8:784–92. <https://doi.org/10.1097/01.gim.0000250502.28516.3c>.
- [23] Shao L, Shaw CA, Lu X-Y, Sahoo T, Bacino CA, Lalani SR, Stankiewicz P, Yatsenko SA, Li Y, Neill S, Pursley AN, Chinault AC, Patel A, Beaudet AL, Lupski JR, Cheung SW. Identification of chromosome abnormalities in subtelomeric regions by microarray analysis: A study of 5,380 cases. *American Journal of Medical Genetics Part A* 2008;146A:2242–51. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.32399>.
- [24] Lindy AS, Stosser MB, Butler E, Downtain-Pickersgill C, Shanmugham A, Retterer K, Brandt T, Richard G, McKnight DA. Diagnostic outcomes for genetic testing of 70 genes in 8565 patients with epilepsy and neurodevelopmental disorders. *Epilepsia* 2018;59:1062–71. <https://doi.org/10.1111/epi.14074>.
- [25] Clayton-Smith J, Walters S, Hobson E, Burkitt-Wright E, Smith R, Toutain A, Amiel J, Lyonnet S, Mansour S, Fitzpatrick D, Ciccone R, Ricca I, Zuffardi O, Donnai D. Xq28 duplication presenting with intestinal and bladder dysfunction and a distinctive facial appearance. *Eur J Hum Genet* 2009;17:434–43. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2008.192>.
- [26] Bialer M. De novo trisomy Xq28-qter detected by subtelomeric FISH screening. *Am J Hum Genet* 2003.
- [27] Lachlan KL, Collinson MN, Sandford ROC, van Zyl B, Jacobs PA, Thomas NS. Functional disomy resulting from duplications of distal Xq in four unrelated patients. *Hum Genet* 2004;115:399–408. <https://doi.org/10.1007/s00439-004-1175-x>.
- [28] Sanlaville D, Prieur M, de Blois M-C, Genevieve D, Lapierre J-M, Ozilou C, Picq M, Gosset P, Morichon-Delvallez N, Munnich A, Cormier-Daire V, Baujat G, Romana S, Vekemans M, Turleau C. Functional disomy of the Xq28 chromosome region. *Eur J Hum Genet* 2005;13:579–85. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201384>.
- [29] Auber B, Burfeind P, Thiels C, Alsat EA, Shoukier M, Liehr T, Nelle H, Bartels I, Salinas-Riester G, Laccone F. An unbalanced translocation resulting in a duplication of Xq28 causes a Rett syndrome-like phenotype in a female patient. *Clin Genet* 2010;77:593–7. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2009.01363.x>.
- [30] Makrythanasis P, Moix I, Gimelli S, Fluss J, Aliferis K, Antonarakis SE, Morris MA, Béna F, Bottani A. De novo duplication of MECP2 in a girl with mental retardation and no obvious dysmorphic features. *Clin Genet* 2010;78:175–80. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2010.01371.x>.
- [31] Reardon W, Donoghue V, Murphy A-M, King MD, Mayne PD, Horn N, Birk Møller L. Progressive cerebellar degenerative changes in the severe mental retardation syndrome caused by duplication of MECP2 and adjacent loci on Xq28. *Eur J Pediatr* 2010;169:941–9. <https://doi.org/10.1007/s00431-010-1144-4>.
- [32] Mayo S, Monfort S, Roselló M, Orellana C, Oltra S, Armstrong J, Català V, Martínez F. De novo interstitial triplication of MECP2 in a girl with neurodevelopmental disorder and random X chromosome inactivation. *Cytogenet Genome Res* 2011;135:93–101. <https://doi.org/10.1159/000330917>.
- [33] Grasshoff U, Bonin M, Goehring I, Ekici A, Dufke A, Cremer K, Wagner N, Rossier E, Jauch A, Walter M, Bauer C, Bauer P, Horber K, Beck-Woedl S, Wiczorek D. De novo MECP2 duplication in two females with random X-inactivation and

- moderate mental retardation. *Eur J Hum Genet* 2011;19:507–12. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2010.226>.
- [34] Bijlsma EK, Collins A, Papa FT, Tejada MI, Wheeler P, Peeters E a. J, Gijsbers ACJ, van de Kamp JM, Kriek M, Losekoot M, Broekma AJ, Crolla JA, Pollazzon M, Mucciolo M, Katzaki E, Disciglio V, Ferreri MI, Marozza A, Mencarelli MA, Castagnini C, Dosa L, Ariani F, Mari F, Canitano R, Hayek G, Botella MP, Gener B, Mínguez M, Renieri A, Ruivenkamp C a. L. Xq28 duplications including MECP2 in five females: Expanding the phenotype to severe mental retardation. *Eur J Med Genet* 2012;55:404–13. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2012.02.009>.
- [35] Shimada S, Okamoto N, Hirasawa K, Yoshii K, Tani Y, Sugawara M, Shimojima K, Osawa M, Yamamoto T. Clinical manifestations of Xq28 functional disomy involving MECP2 in one female and two male patients. *Am J Med Genet A* 2013;161A:1779–85. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.35975>.
- [36] Scott Schwoerer J, Laffin J, Haun J, Raca G, Friez MJ, Giampietro PF. MECP2 duplication: possible cause of severe phenotype in females. *Am J Med Genet A* 2014;164A:1029–34. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36380>.
- [37] Fieremans N, Bauters M, Belet S, Verbeeck J, Jansen AC, Seneca S, Roelens F, De Baere E, Marynen P, Froyen G. De novo MECP2 duplications in two females with intellectual disability and unfavorable complete skewed X-inactivation. *Hum Genet* 2014;133:1359–67. <https://doi.org/10.1007/s00439-014-1469-6>.
- [38] Novara F, Simonati A, Sicca F, Battini R, Fiori S, Contaldo A, Criscuolo L, Zuffardi O, Ciccone R. MECP2 duplication phenotype in symptomatic females: report of three further cases. *Mol Cytogenet* 2014;7:10. <https://doi.org/10.1186/1755-8166-7-10>.
- [39] San Antonio-Arce V, Fenollar-Cortés M, Oancea Ionescu R, DeSantos-Moreno T, Gallego-Merlo J, Illana Cámara FJ, Cotarelo Pérez MC. MECP2 Duplications in Symptomatic Females: Report on 3 Patients Showing the Broad Phenotypic Spectrum. *Child Neurol Open* 2016;3:2329048X16630673. <https://doi.org/10.1177/2329048X16630673>.
- [40] El Chehadeh S, Touraine R, Prieur F, Reardon W, Bienvenu T, Chantot-Bastarud S, Doco-Fenzy M, Landais E, Philippe C, Marle N, Callier P, Mosca-Boidron A-L, Mugneret F, Le Meur N, Goldenberg A, Guerrot A-M, Chambon P, Satre V, Coutton C, Jouk P-S, Devillard F, Dieterich K, Afenjar A, Burglen L, Moutard M-L, Addor M-C, Lebon S, Martinet D, Alessandri J-L, Doray B, Miguët M, Devys D, Saugier-veber P, Drunat S, Aral B, Kremer V, Rondeau S, Tabet A-C, Thevenon J, Thauvin-Robinet C, Perretton N, Des Portes V, Faivre L. Xq28 duplication including MECP2 in six unreported affected females: what can we learn for diagnosis and genetic counselling? *Clin Genet* 2017;91:576–88. <https://doi.org/10.1111/cge.12898>.
- [41] Bauer M, Kölsch U, Krüger R, Unterwalder N, Hameister K, Kaiser FM, Vignoli A, Rossi R, Botella MP, Budisteanu M, Rosello M, Orellana C, Tejada MI, Papuc SM, Patat O, Julia S, Touraine R, Gomes T, Wenner K, Xu X, Afenjar A, Toutain A, Philip N, Jezela-Stanek A, Gortner L, Martinez F, Echenne B, Wahn V, Meisel C, Wiczorek D, El-Chehadeh S, Van Esch H, von Bernuth H. Infectious and immunologic phenotype of MECP2 duplication syndrome. *J Clin Immunol* 2015;35:168–81. <https://doi.org/10.1007/s10875-015-0129-5>.
- [42] Bauer M, Krüger R, Kölsch U, Unterwalder N, Meisel C, Wahn V, von Bernuth H. Antibiotic Prophylaxis, Immunoglobulin Substitution and Supportive Measures Prevent Infections in MECP2 Duplication Syndrome. *Pediatr Infect Dis J* 2018;37:466–8. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000001799>.

- [43] Smyk M, Obersztyn E, Nowakowska B, Nawara M, Cheung SW, Mazurczak T, Stankiewicz P, Bocian E. Different-sized duplications of Xq28, including MECP2, in three males with mental retardation, absent or delayed speech, and recurrent infections. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2008;147B:799–806. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.30683>.
- [44] Prescott TE, Rødningen OK, Bjørnstad A, Stray-Pedersen A. Two brothers with a microduplication including the MECP2 gene: rapid head growth in infancy and resolution of susceptibility to infection. *Clin Dysmorphol* 2009;18:78–82. <https://doi.org/10.1097/MCD.0b013e32831e19cd>.
- [45] Yang T, Ramocki MB, Neul JL, Lu W, Roberts L, Knight J, Ward CS, Zoghbi HY, Kheradmand F, Corry DB. Overexpression of methyl-CpG binding protein 2 impairs T(H)1 responses. *Sci Transl Med* 2012;4:163ra158. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004430>.
- [46] Kokalj-Vokac N, Marcun-Varda N, Zagorac A, Erjavec-Skerget A, Zagradisnik B, Todorovic M, Gregoric A. Subterminal deletion/duplication event in an affected male due to maternal X chromosome pericentric inversion. *Eur J Pediatr* 2004. <https://doi.org/10.1007/s00431-004-1519-5>.
- [47] Kirk EP, Malaty-Brevaud V, Martini N, Lacoste C, Levy N, Maclean K, Davies L, Philip N, Badens C. The clinical variability of the MECP2 duplication syndrome: description of two families with duplications excluding L1CAM and FLNA. *Clin Genet* 2009;75:301–3. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2008.01102.x>.
- [48] Casanova J-L, Abel L, Quintana-Murci L. Human TLRs and IL-1Rs in host defense: natural insights from evolutionary, epidemiological, and clinical genetics. *Annu Rev Immunol* 2011;29:447–91. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-030409-101335>.
- [49] Gay NJ, Symmons MF, Gangloff M, Bryant CE. Assembly and localization of Toll-like receptor signalling complexes. *Nat Rev Immunol* 2014;14:546–58. <https://doi.org/10.1038/nri3713>.
- [50] Lundberg AM, Drexler SK, Monaco C, Williams LM, Sacre SM, Feldmann M, Foxwell BM. Key differences in TLR3/poly I:C signaling and cytokine induction by human primary cells: a phenomenon absent from murine cell systems. *Blood* 2007;110:3245–52. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-02-072934>.
- [51] Joosten LAB, Abdollahi-Roodsaz S, Dinarello CA, O'Neill L, Netea MG. Toll-like receptors and chronic inflammation in rheumatic diseases: new developments. *Nat Rev Rheumatol* 2016;12:344–57. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2016.61>.
- [52] Lin Q, Li M, Fang D, Fang J, Su SB. The essential roles of Toll-like receptor signaling pathways in sterile inflammatory diseases. *International Immunopharmacology* 2011;11:1422–32. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2011.04.026>.
- [53] Frazão JB, Errante PR, Condino-Neto A. Toll-Like Receptors' Pathway Disturbances are Associated with Increased Susceptibility to Infections in Humans. *Arch Immunol Ther Exp* 2013;61:427–43. <https://doi.org/10.1007/s00005-013-0243-0>.
- [54] Wang JQ, Jeelall YS, Ferguson LL, Horikawa K. Toll-Like Receptors and Cancer: MYD88 Mutation and Inflammation. *Frontiers in Immunology* 2014;5.
- [55] O'Neill LAJ, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2007;7:353–64. <https://doi.org/10.1038/nri2079>.
- [56] Kawai T, Akira S. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med* 2007;13:460–9. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2007.09.002>.

- [57] De Nardo D. Toll-like receptors: Activation, signalling and transcriptional modulation. *Cytokine* 2015;74:181–9. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.02.025>.
- [58] Balka KR, De Nardo D. Understanding early TLR signaling through the Myddosome. *Journal of Leukocyte Biology* 2019;105:339–51. <https://doi.org/10.1002/JLB.MR0318-096R>.
- [59] Heller S, Kölsch U, Magg T, Krüger R, Scheuern A, Schneider H, Eichinger A, Wahn V, Unterwalder N, Lorenz M, Schwarz K, Meisel C, Schulz A, Hauck F, von Bernuth H. T Cell Impairment Is Predictive for a Severe Clinical Course in NEMO Deficiency. *J Clin Immunol* 2020;40:421–34. <https://doi.org/10.1007/s10875-019-00728-y>.
- [60] Gottschalk I, Kölsch U, Wagner DL, Kath J, Martini S, Krüger R, Puel A, Casanova J-L, Jezela-Stanek A, Rossi R, Chehadeh SE, Van Esch H, von Bernuth H. IRAK1 Duplication in MECP2 Duplication Syndrome Does Not Increase Canonical NF- κ B-Induced Inflammation. *J Clin Immunol* 2023;43:421–39. <https://doi.org/10.1007/s10875-022-01390-7>.
- [61] Bustamante J, Zhang S-Y, von Bernuth H, Abel L, Casanova J-L. From infectious diseases to primary immunodeficiencies. *Immunol Allergy Clin North Am* 2008;28:235–58, vii. <https://doi.org/10.1016/j.iac.2008.01.009>.
- [62] von Bernuth H, Ku C-L, Rodriguez-Gallego C, Zhang S, Garty B-Z, Maródi L, Chapel H, Chrabieh M, Miller RL, Picard C, Puel A, Casanova J-L. A fast procedure for the detection of defects in Toll-like receptor signaling. *Pediatrics* 2006;118:2498–503. <https://doi.org/10.1542/peds.2006-1845>.
- [63] von Bernuth H, Picard C, Jin Z, Pankla R, Xiao H, Ku C-L, Chrabieh M, Mustapha IB, Ghandil P, Camcioglu Y, Vasconcelos J, Sirvent N, Guedes M, Vitor AB, Herrero-Mata MJ, Aróstegui JI, Rodrigo C, Alsina L, Ruiz-Ortiz E, Juan M, Fortuny C, Yagüe J, Antón J, Pascal M, Chang H-H, Janniere L, Rose Y, Garty B-Z, Chapel H, Issekutz A, Maródi L, Rodriguez-Gallego C, Banchereau J, Abel L, Li X, Chaussabel D, Puel A, Casanova J-L. Pyogenic bacterial infections in humans with MyD88 deficiency. *Science* 2008;321:691–6. <https://doi.org/10.1126/science.1158298>.
- [64] Picard C, Puel A, Bonnet M, Ku C-L, Bustamante J, Yang K, Soudais C, Dupuis S, Feinberg J, Fieschi C, Elbim C, Hitchcock R, Lammas D, Davies G, Al-Ghoniaim A, Al-Rayes H, Al-Jumaah S, Al-Hajjar S, Al-Mohsen IZ, Frayha HH, Rucker R, Hawn TR, Aderem A, Tufenkeji H, Haraguchi S, Day NK, Good RA, Gougerot-Pocidallo M-A, Ozinsky A, Casanova J-L. Pyogenic bacterial infections in humans with IRAK-4 deficiency. *Science* 2003;299:2076–9. <https://doi.org/10.1126/science.1081902>.
- [65] Picard C, von Bernuth H, Ghandil P, Chrabieh M, Levy O, Arkwright PD, McDonald D, Geha RS, Takada H, Krause JC, Creech CB, Ku C-L, Ehl S, Maródi L, Al-Muhsen S, Al-Hajjar S, Al-Ghoniaim A, Day-Good NK, Holland SM, Gallin JI, Chapel H, Speert DP, Rodriguez-Gallego C, Colino E, Garty B-Z, Roifman C, Hara T, Yoshikawa H, Nonoyama S, Domachowske J, Issekutz AC, Tang M, Smart J, Zitnik SE, Hoarau C, Kumararatne DS, Thrasher AJ, Davies EG, Bethune C, Sirvent N, de Ricaud D, Camcioglu Y, Vasconcelos J, Guedes M, Vitor AB, Rodrigo C, Almazán F, Méndez M, Aróstegui JI, Alsina L, Fortuny C, Reichenbach J, Verbsky JW, Bossuyt X, Doffinger R, Abel L, Puel A, Casanova J-L. Clinical features and outcome of patients with IRAK-4 and MyD88 deficiency. *Medicine (Baltimore)* 2010;89:403–25. <https://doi.org/10.1097/MD.0b013e3181fd8ec3>.
- [66] Webster JD, Vucic D. The Balance of TNF Mediated Pathways Regulates Inflammatory Cell Death Signaling in Healthy and Diseased Tissues. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 2020;8.

- [67] Ai W, Li H, Song N, Li L, Chen H. Optimal Method to Stimulate Cytokine Production and Its Use in Immunotoxicity Assessment. *Int J Environ Res Public Health* 2013;10:3834–42. <https://doi.org/10.3390/ijerph10093834>.
- [68] Sakumura N, Yokoyama T, Usami M, Hosono Y, Inoue N, Matsuda Y, Tasaki Y, Wada T. CD169 expression on monocytes as a marker for assessing type I interferon status in pediatric inflammatory diseases. *Clinical Immunology* 2023;250:109329. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2023.109329>.
- [69] Biesen R, Demir C, Barkhudarova F, Grün JR, Steinbrich-Zöllner M, Backhaus M, Häupl T, Rudwaleit M, Riemekasten G, Radbruch A, Hiepe F, Burmester G-R, Grützkau A. Sialic acid-binding Ig-like lectin 1 expression in inflammatory and resident monocytes is a potential biomarker for monitoring disease activity and success of therapy in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2008;58:1136–45. <https://doi.org/10.1002/art.23404>.
- [70] Crow YJ. Type I interferonopathies: a novel set of inborn errors of immunity. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2011;1238:91–8. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06220.x>.
- [71] Crow YJ. Type I interferonopathies: Mendelian type I interferon up-regulation. *Current Opinion in Immunology* 2015;32:7–12. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.10.005>.
- [72] Ciancanelli MJ, Huang SXL, Luthra P, Garner H, Itan Y, Volpi S, Lafaille FG, Trouillet C, Schmolke M, Albrecht RA, Israelsson E, Lim HK, Casadio M, Hermesh T, Lorenzo L, Leung LW, Pedergrana V, Boisson B, Okada S, Picard C, Ringuier B, Troussier F, Chaussabel D, Abel L, Pellier I, Notarangelo LD, García-Sastre A, Basler CF, Geissmann F, Zhang S-Y, Snoeck H-W, Casanova J-L. Infectious disease. Life-threatening influenza and impaired interferon amplification in human IRF7 deficiency. *Science* 2015;348:448–53. <https://doi.org/10.1126/science.aaa1578>.
- [73] Zhang Q, Bastard P, Liu Z, Le Pen J, Moncada-Velez M, Chen J, Ogishi M, Sabli IKD, Hodeib S, Korol C, Rosain J, Bilguvar K, Ye J, Bolze A, Bigio B, Yang R, Arias AA, Zhou Q, Zhang Y, Onodi F, Korniotis S, Karpf L, Philippot Q, Chbihi M, Bonnet-Madin L, Dorgham K, Smith N, Schneider WM, Razoooky BS, Hoffmann H-H, Michailidis E, Moens L, Han JE, Lorenzo L, Bizien L, Meade P, Neehus A-L, Ugurbil AC, Corneau A, Kerner G, Zhang P, Rapaport F, Seeleuthner Y, Manry J, Masson C, Schmitt Y, Schlüter A, Le Voyer T, Khan T, Li J, Fellay J, Roussel L, Shahrooei M, Alosaimi MF, Mansouri D, Al-Saud H, Al-Mulla F, Almourfi F, Al-Muhsen SZ, Alsohime F, Al Turki S, Hasanato R, van de Beek D, Biondi A, Bettini LR, D'Angio' M, Bonfanti P, Imberti L, Sottini A, Paghera S, Quiros-Roldan E, Rossi C, Oler AJ, Tompkins MF, Alba C, Vandernoot I, Goffard J-C, Smits G, Migeotte I, Haerynck F, Soler-Palacin P, Martin-Nalda A, Colobran R, Morange P-E, Keles S, Çölkesen F, Ozcelik T, Yasar KK, Senoglu S, Karabela ŞN, et al. Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19. *Science* 2020;370:eabd4570. <https://doi.org/10.1126/science.abd4570>.
- [74] Crow YJ, Stetson DB. The type I interferonopathies: 10 years on. *Nat Rev Immunol* 2022;22:471–83. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00633-9>.
- [75] Pin A, Monasta L, Taddio A, Piscianz E, Tommasini A, Tesser A. An Easy and Reliable Strategy for Making Type I Interferon Signature Analysis Comparable among Research Centers. *Diagnostics* 2019;9:113. <https://doi.org/10.3390/diagnostics9030113>.
- [76] Baechler EC, Bauer JW, Slattery CA, Ortmann WA, Espe KJ, Novitzke J, Ytterberg SR, Gregersen PK, Behrens TW, Reed AM. An Interferon Signature in the

- Peripheral Blood of Dermatomyositis Patients is Associated with Disease Activity. *Mol Med* 2007;13:59–68. <https://doi.org/10.2119/2006-00085.Baechler>.
- [77] Hall JC, Rosen A. Type I interferons: crucial participants in disease amplification in autoimmunity. *Nat Rev Rheumatol* 2010;6:40–9. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2009.237>.
- [78] Walsh RJ, Kong SW, Yao Y, Jallal B, Kiener PA, Pinkus JL, Beggs AH, Amato AA, Greenberg SA. Type I interferon-inducible gene expression in blood is present and reflects disease activity in dermatomyositis and polymyositis. *Arthritis Rheum* 2007;56:3784–92. <https://doi.org/10.1002/art.22928>.
- [79] Rodero MP, Crow YJ. Type I interferon-mediated monogenic autoinflammation: The type I interferonopathies, a conceptual overview. *J Exp Med* 2016;213:2527–38. <https://doi.org/10.1084/jem.20161596>.
- [80] Bourgoin P, Soliveres T, Ahriz D, Arnoux I, Meisel C, Unterwalder N, Morange P-E, Michelet P, Malergue F, Markarian T. Clinical research assessment by flow cytometry of biomarkers for infectious stratification in an Emergency Department. *Biomarkers in Medicine* 2019;13:1373–86. <https://doi.org/10.2217/bmm-2019-0214>.
- [81] Bourgoin P, Biéché G, Ait Belkacem I, Morange P, Malergue F. Role of the interferons in CD64 and CD169 expressions in whole blood: Relevance in the balance between viral- or bacterial-oriented immune responses. *Immun Inflamm Dis* 2020;8:106–23. <https://doi.org/10.1002/iid3.289>.
- [82] von Stuckrad SL, Klotsche J, Biesen R, Lieber M, Thumfart J, Meisel C, Unterwalder N, Kallinich T. SIGLEC1 (CD169) is a sensitive biomarker for the deterioration of the clinical course in childhood systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2020;29:1914–25. <https://doi.org/10.1177/0961203320965699>.
- [83] Orak B, Ngoumou G, Ebstein F, Zieba B, Goetzke CC, Knierim E, Kaindl AM, Panzer A, Theophil M, Berns M, Krüger E, Meisel C, Unterwalder N, Kallinich T. SIGLEC1 (CD169) as a potential diagnostical screening marker for monogenic interferonopathies. *Pediatric Allergy and Immunology* 2021;32:621–5. <https://doi.org/10.1111/pai.13400>.
- [84] Reimer T, Brcic M, Schweizer M, Jungi TW. poly(I:C) and LPS induce distinct IRF3 and NF- κ B signaling during type-I IFN and TNF responses in human macrophages. *Journal of Leukocyte Biology* 2008;83:1249–57. <https://doi.org/10.1189/jlb.0607412>.
- [85] CHEN Y, LIN J, ZHAO Y, MA X, YI H. Toll-like receptor 3 (TLR3) regulation mechanisms and roles in antiviral innate immune responses. *J Zhejiang Univ Sci B* 2021;22:609–32. <https://doi.org/10.1631/jzus.B2000808>.
- [86] Yi L, Sun D, Han Q, Liu Z, Zeng Z, Wu Y, Chai X, Liu X. Interferon regulatory factor 3 mediates Poly(I:C)-induced innate immune response and apoptosis in non-small cell lung cancer. *International Journal of Oncology* 2018;52:1623–32. <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4300>.
- [87] Kanakaraj P, Schafer PH, Cavender DE, Wu Y, Ngo K, Grealish PF, Wadsworth SA, Peterson PA, Siekierka JJ, Harris CA, Fung-Leung WP. Interleukin (IL)-1 receptor-associated kinase (IRAK) requirement for optimal induction of multiple IL-1 signaling pathways and IL-6 production. *J Exp Med* 1998;187:2073–9. <https://doi.org/10.1084/jem.187.12.2073>.
- [88] Thomas JA, Allen JL, Tsen M, Dubnicoff T, Danao J, Liao XC, Cao Z, Wasserman SA. Impaired cytokine signaling in mice lacking the IL-1 receptor-associated kinase. *J Immunol* 1999;163:978–84.

- [89] Chandra R, Federici S, Bishwas T, Németh ZH, Deitch EA, Thomas JA, Spolarics Z. IRAK1-dependent signaling mediates mortality in polymicrobial sepsis. *Inflammation* 2013;36:10.1007/s10753-013-9692-1. <https://doi.org/10.1007/s10753-013-9692-1>.
- [90] Swantek JL, Tsen MF, Cobb MH, Thomas JA. IL-1 receptor-associated kinase modulates host responsiveness to endotoxin. *J Immunol* 2000;164:4301–6. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.8.4301>.
- [91] Pauls E, Nanda SK, Smith H, Toth R, Arthur JSC, Cohen P. Two Phases of Inflammatory Mediator Production Defined by the Study of IRAK2 and IRAK1 Knock-in Mice. *The Journal of Immunology* 2013;191:2717–30. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1203268>.
- [92] Della Mina E, Borghesi A, Zhou H, Bougarn S, Boughorbel S, Israel L, Meloni I, Chrabieh M, Ling Y, Itan Y, Renieri A, Mazzucchelli I, Basso S, Pavone P, Falsaperla R, Ciccone R, Cerbo RM, Stronati M, Picard C, Zuffardi O, Abel L, Chaussabel D, Marr N, Li X, Casanova J-L, Puel A. Inherited human IRAK-1 deficiency selectively impairs TLR signaling in fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017;114:E514–23. <https://doi.org/10.1073/pnas.1620139114>.
- [93] Sack JR GH. Human cell transformation by simian virus 40--a review. *In Vitro* 1981;17:1–19. <https://doi.org/10.1007/BF02618025>.
- [94] Shein HM, Enders JF. Transformation induced by simian virus 40 in human renal cell cultures. I. Morphology and growth characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1962;48:1164–72. <https://doi.org/10.1073/pnas.48.7.1164>.
- [95] Ariani F, Mari F, Pescucci C, Longo I, Bruttini M, Meloni I, Hayek G, Rocchi R, Zappella M, Renieri A. Real-time quantitative PCR as a routine method for screening large rearrangements in Rett syndrome: Report of one case of MECP2 deletion and one case of MECP2 duplication. *Human Mutation* 2004;24:172–7. <https://doi.org/10.1002/humu.20065>.
- [96] Hanchard NA, Carvalho CM, Bader P, Thome A, Omo-Griffith L, del Gaudio D, Pehlivan D, Fang P, Schaaf CP, Ramocki MB, Lupski JR, Cheung SW. A partial MECP2 duplication in a mildly affected adult male: a putative role for the 3' untranslated region in the MECP2 duplication phenotype. *BMC Med Genet* 2012;13:71. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-13-71>.
- [97] Philippe O, Rio M, Malan V, Van Esch H, Baujat G, Bahi-Buisson N, Valayannopoulos V, Gesny R, Bonnefont J-P, Munnich A, Froyen G, Amiel J, Boddaert N, Colleaux L. NF- κ B signalling requirement for brain myelin formation is shown by genotype/MRI phenotype correlations in patients with Xq28 duplications. *Eur J Hum Genet* 2013;21:195–9. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2012.140>.
- [98] Yi Z, Wang S, Li L, Wu H, Ma Y, Qi Y, Pan H. [Diagnosis of MECP2 duplication syndrome with molecular genetic techniques]. *Zhonghua Er Ke Za Zhi* 2014;52:937–41.
- [99] Wang Y, Zhang J, Qin L, Meng L, Jiang T, Ma D, Hui W, Hu P, Xu Z. [Single nucleotide polymorphism array detection of Xq28 duplication in a child with mental retardation]. *Zhonghua Er Ke Za Zhi* 2014;52:227–8.
- [100] Jiang C, Pan N, Lyu W, Peng Y, Liu J, Guo R, Chang J, Liang D, Wu L. [Molecular diagnosis and functional study of a pedigree affected with Lubs X-linked mental retardation syndrome]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2019;36:340–3. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2019.04.012>.
- [101] Liu J, Xi H, Peng Y, Pang J, Hu J, Ma N, Jia Z, Wang H. [Genetic analysis of a pedigree with MECP duplication syndrome]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2020;37:1146–9. <https://doi.org/10.3760/cma.j.cn511374-20191014-00525>.

- [102] Froyen G, Van Esch H, Bauters M, Hollanders K, Frints SGM, Vermeesch JR, Devriendt K, Fryns J-P, Marynen P. Detection of genomic copy number changes in patients with idiopathic mental retardation by high-resolution X-array-CGH: important role for increased gene dosage of XLMR genes. *Hum Mutat* 2007;28:1034–42. <https://doi.org/10.1002/humu.20564>.
- [103] Honda S, Hayashi S, Imoto I, Toyama J, Okazawa H, Nakagawa E, Goto Y, Inazawa J. Copy-number variations on the X chromosome in Japanese patients with mental retardation detected by array-based comparative genomic hybridization analysis. *Journal of Human Genetics* 2010;55:590–9. <https://doi.org/10.1038/jhg.2010.74>.
- [104] Magini P, Poscente M, Ferrari S, Vargiolu M, Bacchelli E, Graziano C, Wischmeijer A, Turchetti D, Malaspina E, Marchiani V, Cordelli DM, Franzoni E, Romeo G, Seri M. Cytogenetic and molecular characterization of a recombinant X chromosome in a family with a severe neurologic phenotype and macular degeneration. *Mol Cytogenet* 2015;8:58. <https://doi.org/10.1186/s13039-015-0164-1>.
- [105] Bartsch O, Gebauer K, Lechno S, Esch H van, Froyen G, Bonin M, Seidel J, Thamm-Mücke B, Horn D, Klopocki E, Hertzberg C, Zechner U, Haaf T. Four unrelated patients with lubs X-linked mental retardation syndrome and different Xq28 duplications. *American Journal of Medical Genetics Part A* 2010;152A:305–12. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.33198>.
- [106] Sanmann JN, Bishay DL, Starr LJ, Bell CA, Pickering DL, Stevens JM, Kahler SG, Olney AH, Schaefer GB, Sanger WG. Characterization of six novel patients with MECP2 duplications due to unbalanced rearrangements of the X chromosome. *Am J Med Genet A* 2012;158A:1285–91. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.35347>.
- [107] Moirangthem A, Tuteja Bhatia M, Srivastava P, Mandal K, Rai A, Phadke SR. Expansion of the phenotypic spectrum in three families of methyl CpG-binding protein 2 duplication syndrome. *Clin Dysmorphol* 2017;26:73–7. <https://doi.org/10.1097/MCD.000000000000171>.
- [108] Goodman BK, Shaffer LG, Rutberg J, Leppert M, Harum K, Gagos S, Ray JH, Bialer MG, Zhou X, Pletcher BA, Shapira SK, Geraghty MT. Inherited duplication Xq27-qter at Xp22.3 in severely affected males: molecular cytogenetic evaluation and clinical description in three unrelated families. *Am J Med Genet* 1998;80:377–84. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-8628\(19981204\)80:4<377::aid-ajmg14>3.0.co;2-7](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-8628(19981204)80:4<377::aid-ajmg14>3.0.co;2-7).
- [109] Lammer EJ, Punglia DR, Fuchs AE, Rowe AG, Cotter PD. Inherited duplication of Xq27.2 ← qter: phenocopy of infantile Prader-Willi syndrome. *Clinical Dysmorphology* 2001;10:141–4.
- [110] Takeguchi R, Takahashi S, Akaba Y, Tanaka R, Nabatame S, Kurosawa K, Matsuishi T, Itoh M. Early diagnosis of MECP2 duplication syndrome: Insights from a nationwide survey in Japan. *Journal of the Neurological Sciences* 2021;422:117321. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2021.117321>.
- [111] Lin D-S, Chuang T-P, Chiang M-F, Ho C-S, Hsiao C-D, Huang Y-W, Wu T-Y, Wu J-Y, Chen Y-T, Chen T-C, Li L-H. De novo MECP2 duplication derived from paternal germ line result in dysmorphism and developmental delay. *Gene* 2014;533:78–85. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.10.001>.
- [112] Chow C, H M Lai A. Cytogenomic Delineation and Clinical Characterization of Three Cases of MECP2 Duplication Syndrome. *J Clin Med Genomics* 2015;3. <https://doi.org/10.4172/2472-128X.1000125>.
- [113] Giudice-Nairn P, Downs J, Wong K, Wilson D, Ta D, Gattas M, Amor D, Thompson E, Kirrali-Borri C, Ellaway C, Leonard H. The incidence, prevalence and clinical

- features of MECP2 duplication syndrome in Australian children. *J Paediatr Child Health* 2019;55:1315–22. <https://doi.org/10.1111/jpc.14399>.
- [114] Honda S, Hayashi S, Nakane T, Imoto I, Kurosawa K, Mizuno S, Okamoto N, Kato M, Yoshihashi H, Kubota T, Nakagawa E, Goto Y, Inazawa J. The incidence of hypoplasia of the corpus callosum in patients with dup (X)(q28) involving MECP2 is associated with the location of distal breakpoints. *American Journal of Medical Genetics Part A* 2012;158A:1292–303. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.35321>.
- [115] Kroes HY. Chromosomal abnormalities resembling Joubert syndrome: two cases illustrating the diagnostic pitfalls 2011.
- [116] Shimada S, Okamoto N, Ito M, Arai Y, Momosaki K, Togawa M, Maegaki Y, Sugawara M, Shimojima K, Osawa M, Yamamoto T. MECP2 duplication syndrome in both genders. *Brain Dev* 2013;35:411–9. <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2012.07.010>.
- [117] Fukushi D, Yamada K, Nomura N, Naiki M, Kimura R, Yamada Y, Kumagai T, Yamaguchi K, Miyake Y, Wakamatsu N. Clinical characterization and identification of duplication breakpoints in a Japanese family with Xq28 duplication syndrome including MECP2. *Am J Med Genet A* 2014;164A:924–33. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36373>.
- [118] Nascimento FA, Faghfoury H, Krings T, Ali A, Fridhandler JD, Lozano A, Wennberg R, Andrade DM. Deep brain stimulation for the management of seizures in MECP2 duplication syndrome. *Seizure* 2014;23:405–7. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2014.01.021>.
- [119] Deshwar AR, Dupuis L, Bergmann C, Stavropoulos J, Mendoza-Londono R. Severe rhizomelic shortening in a child with a complex duplication/deletion rearrangement of chromosome X. *American Journal of Medical Genetics Part A* 2018;176:450–4. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.38570>.
- [120] van Baelen A, Verhoustraeten L, Kenis S, Meuwissen M, Boudewyns A, van Hoorenbeeck K, Verhulst S. Sleep-disordered breathing and nocturnal hypoventilation in children with the MECP2 duplication syndrome: A case series and review of the literature. *Am J Med Genet A* 2020. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.61790>.
- [121] Peters SU, Fu C, Suter B, Marsh E, Benke TA, Skinner SA, Lieberman DN, Standridge S, Jones M, Beisang A, Feyma T, Heydeman P, Ryther R, Kaufmann WE, Glaze DG, Neul JL, Percy AK. Characterizing the phenotypic effect of Xq28 duplication size in MECP2 duplication syndrome. *Clin Genet* 2019;95:575–81. <https://doi.org/10.1111/cge.13521>.
- [122] Yon DK, Park JE, Kim SJ, Shim SH, Chae KY. A sibship with duplication of Xq28 inherited from the mother; genomic characterization and clinical outcomes. *BMC Med Genet* 2017;18:30. <https://doi.org/10.1186/s12881-017-0394-7>.
- [123] Nageshappa S, Carromeu C, Trujillo CA, Mesci P, Espuny-Camacho I, Pasciuto E, Vanderhaeghen P, Verfaillie C, Raitano S, Kumar A, Carvalho CMB, Bagni C, Ramocki MB, Araujo BHS, Torres LB, Lupski JR, Van Esch H, Muotri AR. Altered neuronal network and rescue in a human MECP2 duplication model. *Mol Psychiatry* 2016;21:178–88. <https://doi.org/10.1038/mp.2015.128>.
- [124] Bauer M. Erhöhte Infektanfälligkeit bei Patienten mit MECP2 Duplikations Syndrom: Infektiologisch-immunologische Phänotypisierung und in vitro-Untersuchung der Akut-Phase-Reaktion. Medizinische Fakultät, Charité – Universitätsmedizin Berlin, 2018.
- [125] Ta D, Downs J, Baynam G, Wilson A, Richmond P, Schmidt A, Decker A, Leonard H. Development of an International Database for a Rare Genetic Disorder: The

- MECP2 Duplication Database (MDBase). *Children* (Basel) 2022;9:1111. <https://doi.org/10.3390/children9081111>.
- [126] Ta D, Downs J, Baynam G, Wilson A, Richmond P, Leonard H. Medical Comorbidities in MECP2 Duplication Syndrome: Results from the International MECP2 Duplication Database. *Children* 2022;9:633. <https://doi.org/10.3390/children9050633>.
- [127] Sugitate R, Muramatsu K, Ogata T, Goto M, Hayashi S, Sawaura N, Kawada-Nagashima M, Matsui A, Yamagata T. Recurrent pneumonia in three patients with MECP2 duplication syndrome with aspiration as the possible cause. *Brain Dev* 2022;44:486–91. <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2022.03.005>.
- [128] Bertini E, Cusmai R, de Saint Basile G, Le Deist F, Di Capua M, Gaggero DR, Dionisi-Vici C, Santillo C, Caniglia M. Congenital X-linked ataxia, progressive myoclonic encephalopathy, macular degeneration and recurrent infections. *Am J Med Genet* 1992;43:443–51. <https://doi.org/10.1002/ajmg.1320430167>.
- [129] Lockett A, Goebel MG, Harrington MA. Transient membrane recruitment of IRAK-1 in response to LPS and IL-1 β requires TNF R1. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 2008;295:C313–23. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00500.2007>.
- [130] von Bernuth H, Picard C, Puel A, Casanova J-L. Experimental and natural infections in MyD88- and IRAK-4-deficient mice and humans. *Eur J Immunol* 2012;42:3126–35. <https://doi.org/10.1002/eji.201242683>.
- [131] Dakhama A, Al Mubarak R, Pavelka N, Voelker D, Seibold M, Ledford JG, Kraft M, Li L, Chu HW. Tollip Inhibits ST2 Signaling in Airway Epithelial Cells Exposed to Type 2 Cytokines and Rhinovirus. *JIN* 2020;12:103–15. <https://doi.org/10.1159/000497072>.
- [132] Ganesan S, Pham D, Jing Y, Farazuddin M, Hudy MH, Unger B, Comstock AT, Proud D, Lauring AS, Sajjan US. TLR2 Activation Limits Rhinovirus-Stimulated CXCL-10 by Attenuating IRAK-1–Dependent IL-33 Receptor Signaling in Human Bronchial Epithelial Cells. *The Journal of Immunology* 2016;197:2409–20. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502702>.
- [133] Cronk JC, Herz J, Kim TS, Louveau A, Moser EK, Sharma AK, Smirnov I, Tung KS, Braciale TJ, Kipnis J. Influenza A induces dysfunctional immunity and death in MeCP2-overexpressing mice. *JCI Insight* 2017;2:e88257. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.88257>.
- [134] Bluhmki T, Traub S, Müller A-K, Bitzer S, Schruf E, Bammert M-T, Leist M, Gantner F, Garnett JP, Heilker R. Functional human iPSC-derived alveolar-like cells cultured in a miniaturized 96-Transwell air–liquid interface model. *Sci Rep* 2021;11:17028. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96565-4>.
- [135] Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Abel L, Casanova J-L. Mendelian susceptibility to mycobacterial disease: genetic, immunological, and clinical features of inborn errors of IFN- γ immunity. *Semin Immunol* 2014;26:454–70. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.09.008>.
- [136] Rosain J, Kong X-F, Martinez-Barricarte R, Oleaga-Quintas C, Ramirez-Alejo N, Markle J, Okada S, Boisson-Dupuis S, Casanova J-L, Bustamante J. Mendelian susceptibility to mycobacterial disease: 2014-2018 update. *Immunol Cell Biol* 2019;97:360–7. <https://doi.org/10.1111/imcb.12210>.
- [137] Shao Y, Sztainberg Y, Wang Q, Bajjkar SS, Trostle AJ, Wan Y-W, Jafar-Nejad P, Rigo F, Liu Z, Tang J, Zoghbi HY. Antisense oligonucleotide therapy in a humanized mouse model of MECP2 duplication syndrome. *Sci Transl Med* 2021;13:eaaz7785. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaz7785>.

- [138] Akahoshi K, Nakagawa E, Goto Y, Inoue K. Duplication within two regions distal to MECP2: clinical similarity with MECP2 duplication syndrome. *BMC Med Genomics* 2023;16:43. <https://doi.org/10.1186/s12920-023-01465-3>.
- [139] Maino E, Scott O, Rizvi SZ, Visuvanathan S, Zablah YB, Li H, Sengar AS, Salter MW, Jia Z, Rossant J, Cohn RD, Gu B, Ivakine EA. A Cas9-fusion proximity-based approach generates an Irak1-Mecp2 tandem duplication mouse model for the study of MeCP2 duplication syndrome 2023:2023.02.07.527511. <https://doi.org/10.1101/2023.02.07.527511>.
- [140] Maino E, Wojtal D, Evagelou SL, Farheen A, Wong TWY, Lindsay K, Scott O, Rizvi SZ, Hyatt E, Rok M, Visuvanathan S, Chiodo A, Schneeweiss M, Ivakine EA, Cohn RD. Targeted genome editing in vivo corrects a Dmd duplication restoring wild-type dystrophin expression. *EMBO Mol Med* 2021;13:e13228. <https://doi.org/10.15252/emmm.202013228>.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Ilona Gottschalk, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Das MECP2/IRAK1-Duplikationssyndrom: Systematische Literaturrecherche und Untersuchung des IRAK1-kontrollierten NF-κB-Signalwegs“; „The MECP2/IRAK1 Duplication Syndrome: Systematic Literature Review and Investigation of the IRAK1-driven NF-κB-Pathway“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

Frau Ilona Gottschalk hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Gottschalk I, Kölsch U, Wagner DL, Kath J, Martini S, Krüger R, Puel A, Casanova JL, Jezela-Stanek A, Rossi R, Chehadeh SE, Van Esch H, von Bernuth H. IRAK1 Duplication in MECP2 Duplication Syndrome Does Not Increase Canonical NF- κ B-Induced Inflammation. *J Clin Immunol.* 2023 Feb;43(2):421-439. doi: 10.1007/s10875-022-01390-7. Epub 2022 Nov 2. PMID: 36319802; PMCID: PMC9628328.

- Konzeption der Studie gemeinsam mit Horst von Bernuth
- Planung der Experimente gemeinsam mit Horst von Bernuth
- systematische Literaturrecherche und detaillierte Übersicht über bereits publizierte Patienten, daraus ist Tabelle 1 entstanden
- Patientenrekrutierung, Organisation des internationalen Versands des Patientenbluts, Überarbeitung des Patientenfragebogens
- Datenerhebung und -auswertung der Patientenfragebögen, daraus sind Abb. 2 und Tabelle 2 entstanden
- Durchführung, Datenerhebung, -analyse und -auswertung folgender Experimente:
 - Messung der IRAK1- und IRAK4-Proteinexpression mittels Western Blot, daraus ist Abb. 3 entstanden
 - Messung von IRAK1-Phosphorylierung und -Abbau sowie I κ B α -Abbau nach Stimulation mittels Western Blot, daraus ist Abb. 5a-b entstanden
 - Bestimmung der IL-6 und IL-8 Produktion nach Stimulation in SV40-Fibroblasten und PBMC mittels ELISA, daraus ist Abb. 4a-d entstanden
- Datenauswertung der von Uwe Kölsch durchgeführten Versuche zur Zytokin-Bestimmung nach Stimulation in Vollblut mittels ELISA, daraus ist Abb. 4e-f entstanden
- Erstellung des Manuskripts (Korrekturen Horst von Bernuth)

Unterschrift der Doktorandin

Druckexemplar der Publikation

Journal of Clinical Immunology (2023) 43:421–439
<https://doi.org/10.1007/s10875-022-01390-7>

ORIGINAL ARTICLE



IRAK1 Duplication in MECP2 Duplication Syndrome Does Not Increase Canonical NF- κ B–Induced Inflammation

Ilona Gottschalk^{1,2} · Uwe Kölsch³ · Dimitrios L. Wagner^{2,4,5,6} · Jonas Kath^{2,4} · Stefania Martini² · Renate Krüger¹ · Anne Puelj^{7,8} · Jean-Laurent Casanova^{7,8,9,10,11} · Aleksandra Jezela-Stanek¹² · Rainer Rossi¹³ · Salima El Chehadeh¹⁴ · Hilde Van Esch¹⁵ · Horst von Bernuth^{1,2,3,16}

Received: 25 February 2022 / Accepted: 20 October 2022 / Published online: 2 November 2022
 © The Author(s) 2022

Abstract

Purpose Besides their developmental and neurological phenotype, most patients with *MECP2/IRAK1* duplication syndrome present with recurrent and severe infections, accompanied by strong inflammation. Respiratory infections are the most common cause of death. Standardized pneumological diagnostics, targeted anti-infectious treatment, and knowledge of the underlying pathomechanism that triggers strong inflammation are unmet clinical needs. We investigated the influence of IRAK1 overexpression on the canonical NF- κ B signaling as a possible cause for excessive inflammation in these patients.

Methods NF- κ B signaling was examined by measuring the production of proinflammatory cytokines and evaluating the IRAK1 phosphorylation and degradation as well as the I κ B α degradation upon stimulation with IL-1 β and TLR agonists in SV40-immortalized fibroblasts, PBMCs, and whole blood of 9 patients with *MECP2/IRAK1* duplication syndrome, respectively.

Results Both, *MECP2/IRAK1*-duplicated patients and healthy controls, showed similar production of IL-6 and IL-8 upon activation with IL-1 β and TLR2/6 agonists in immortalized fibroblasts. In PBMCs and whole blood, both patients and controls had a similar response of cytokine production after stimulation with IL-1 β and TLR4/2/6 agonists. Patients and controls had equivalent patterns of IRAK1 phosphorylation and degradation as well as I κ B α degradation upon stimulation with IL-1 β .

Conclusion Patients with *MECP2/IRAK1* duplication syndrome do not show increased canonical NF- κ B signaling in immortalized fibroblasts, PBMCs, and whole blood. Therefore, we assume that these patients do not benefit from a therapeutic suppression of this pathway.

Keywords Xq28 Duplication syndrome · Methyl CpG binding protein 2 (*MECP2*) duplication syndrome · Methyl CpG binding protein 2 (*MECP2*) · Interleukin-1 receptor–associated kinase 1 (*IRAK1*) · Canonical NF- κ B signaling · Inborn errors of immunity

Introduction

Patients with duplication of *methyl CpG binding protein 2 (MECP2)* on chromosome Xq28 were first described in 2005 [1, 2]. The clinical phenotype is characterized by developmental delay, hypotonia, epileptic seizures, as well as recurrent infections [1, 2]. Approximately 1% of severe X-linked intellectual disability in males might be explained by *MECP2* duplication syndrome (MDS) [3]. Reviewing the literature, we identified 102 articles describing patients

with duplications in Xq28 of varying sizes but encompassing at least the *MECP2* and *interleukin-1 receptor–associated kinase 1 (IRAK1)* gene, 14 of them published before the initial description of MDS (Table 1). From 1987 until now, at least 545 cases with confirmed genotype were published (504 males and 41 symptomatic females) (Table 1). Additionally, the duplication was suspected in 39 related patients (Table 1). However, the numbers of patients might be underestimated regarding the unevenly distributed origin of publications (43 European, 25 North American, 23 East-Asian, 5 rest of Asia including Russia, 3 Australian, 2 South American, 1 African) (Table 1). Most females with *MECP2* duplication are unaffected carriers showing a favorably skewed X chromosome inactivation (XCI) pattern [1, 4–6]. However,

✉ Horst von Bernuth
horst.von-bernuth@charite.de

Extended author information available on the last page of the article

Table 1 Overview of published patients suffering from *MECP2* duplication syndrome. We included all publications describing patients with duplication or triplication of at least *MECP2* and */RAKI*. Also, we included publications describing patients with duplications in the region which included *RAKI* although this gene was not described by them. Republished cases were only counted once as far as traceable. Note: Throughout the publications, the criteria for intellectual disability and developmental delay differ a lot. ND, not determined

Reference	Country	Published patients	Thereof male	Thereof female	Relatives with suspected disease	Intellectual disability or developmental delay	Infantile hypotonia	Epileptic seizures	Recurrent or severe infections	Thereof respiratory infections
Mohandas 1987 [22]	USA	1	1			1/1	ND	ND	ND	ND
Bertini 1992 [23]	Italy	2	2		5	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
Lahn 1994 [24]	USA	3	3			3/3	3/3	3/3	ND	ND
Vasquez 1995 [25]	Mexico	2	2		1	2/2	2/2	ND	2/2	2/2
Pai 1997 [26]	USA	5	5		1	5/5	ND	4/5	4/4	4/4
Goodman 1998 [27]	USA	4	4		1	4/4	4/4	1/4	2/4	2/2
Lubs 1999 [7]	USA	5	5			5/5	5/5	2/5	5/5	5/5
Lammer 2001 [28]	USA	1	1		3	1/1	1/1	ND	1/1	1/1
Akiyama 2001 [29]	Japan	1	1			1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
Bialer 2003 [7]	USA	1		1		1/1	1/1	ND	1/1	1/1
Novelli 2004 [30]	Italy	1	1			1/1	1/1	ND	1/1	1/1
Kokalj-Vokac 2004 [31]	Slovenia	1	1			1/1	1/1	0/1	1/1	1/1
Lachlan 2004 [8]	UK	2	1	1		2/2	2/2	0/2	2/2	1/1
Teek 2004 [32]	Estonia	1	1			1/1	ND	ND	1/1	1/1
Meins 2005 [2]	Germany	1	1			1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
Sanlaville 2005 ^a [9]	France	2	1	1		2/2	2/2	0/2	2/2	2/2
Van Esch 2005 [1]	Belgium	13	13			12/12	11/11	4/9	5/9	5/5
Friez 2006 ^a [33]	USA	13	13			13/13	12/13	9/13	13/13	12/12
Rosenberg 2006 [34]	Brazil	1	1		2	1/1	ND	ND	ND	ND
del Gaudio 2006 [4]	USA	7	7			7/7	7/7	1/7	4/7	4/4
Froyen 2007 ^b [35]	Belgium									
Madrigal 2007 [36]	Spain	1	1		2	1/1	1/1	ND	1/1	1/1
Bauters 2008 ^a [37]	France	4	4			ND	ND	ND	1/1	1/1

Table 1 (continued)

Reference	Country	Published patients	Thereof male	Thereof female	Relatives with suspected disease	Intellectual disability or developmental delay	Infantile hypotonia	Epileptic seizures	Recurrent or severe infections	Thereof respiratory infections
Smyk 2008 [38]	Poland	3	3		2	3/3	3/3	1/3	3/3	2/2
Lugtenberg 2009 [6]	Netherlands	13	13		1	13/13	13/13	7/13	3/13	3/3
Clayton-Smith 2009 [5]	UK	15	15			14/15	12/15	8/15	14/15	14/14
Prescott 2009 [39]	Norway	2	2			2/2	ND	1/2	2/2	2/2
Ramocki 2009 ^a [40]	USA	8	8		5	8/8	8/8	4/8	6/8	6/6
Velinov 2009 [41]	USA	1	1			1/1	1/1	0/1	0/1	ND
Echenne 2009 [42]	France	5	5			5/5	5/5	4/5	0/5	ND
Kirk 2009 [43]	Australia	3	3			3/3	1/1	2/2	2/2	2/2
Bartsch 2010 [44]	Germany	4	4			4/4	4/4	2/4	4/4	2/2
Honda 2010 ^c [45]	Japan									
Belligni 2010 [46]	Italy	1	1			1/1	1/1	ND	1/1	1/1
Reardon 2010 [12]	Ireland	8	7	1		8/8	2/2	4/8	7/8	7/7
Auber 2010 [10]	Germany	1		1		1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
Campos 2010 [47]	Brazil	3	3			3/3	1/1	2/2	ND	ND
Fernandez 2010 [48]	Spain	1	1		1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
Kroes 2011 [49]	Netherlands	1	1			1/1	1/1	ND	1/1	1/1
Neill 2011 [50]	USA	1	1			1/1	ND	ND	ND	ND
Mayo 2011 [13]	Spain	1		1		1/1	0/1	1/1	ND	ND
Budisteanu 2011 [51]	Romania	1	1			1/1	1/1	0/1	1/1	1/1
Grasshoff 2011 [14]	Germany	2		2		2/2	ND	0/2	1/2	1/1
Breman 2011 [52]	USA	6	6			6/6	6/6	0/6	5/6	ND

Table 1 (continued)

Reference	Country	Published patients	Thereof male	Thereof female	Relatives with suspected disease	Intellectual disability or developmental delay	Infantile hypotonia	Epileptic seizures	Recurrent or severe infections	Thereof respiratory infections
Jezela-Stanek 2011 [53]	Poland	1	1			1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
Carvalho 2011 ^a [54]	USA	7	7			7/7	7/7	2/7	6/6	6/6
Honda 2012 [55]	Japan	12	12			12/12	10/12	9/12	10/12	10/10
Honda 2012 [56]	Japan	2	2	1	1	2/2	2/2	2/2	2/2	1/1
Van Esch 2012 [57]	Belgium	15	15			13/13	14/14	8/14	9/13	ND
Bijlsma 2012 ^a [15]	USA	4		4		3/4	2/4	0/4	3/4	2/3
De Palma 2012 [58]	Italy	1	1			1/1	ND	1/1	1/1	1/1
Vignoli 2012 [59]	Italy	8	8			8/8	5/5	6/8	6/6	6/6
Sanmann 2012 [60]	USA	6	6	4	4	6/6	3/3	2/2	5/5	5/5
Xu 2012 [61]	China	2	2			2/2	2/2	0/2	0/2	ND
Utine 2012 [62]	Turkey	1	1			1/1	1/1	0/1	1/1	1/1
Tang 2012 [63]	UK	2	2			3/3	3/3	2/2	3/3	3/3
Lund 2013 [64]	Norway	1	1			1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
Peters 2013 ^c [65]	USA	10	10			ND	9/10	ND	10/10	ND
Peters 2013 ^c [66]	USA	6	6			ND	ND	ND	ND	ND
Shimada 2013 [67]	Japan	4	3	1		4/4	3/3	3/4	4/4	3/3
Shimada 2013 [16]	Japan	3	2	1		3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Yamamoto 2014 ^a [68]	Japan	4	4			4/4	2/2	3/4	1/1	ND
Caumes 2014 [69]	France	8	8			8/8	8/8	8/8	3/8	ND
Scott Schwoerer 2014 [17]	USA	2		2		2/2	2/2	2/2	1/2	1/1
Fukushi 2014 [70]	Japan	5	5			5/5	4/4	5/5	5/5	4/4
Fieremans 2014 [18]	Belgium	2		2		2/2	ND	0/1	ND	ND

Table 1 (continued)

Reference	Country	Published patients	Thereof male	Thereof female	Relatives with suspected disease	Intellectual disability or developmental delay	Infantile hypotonia	Epileptic seizures	Recurrent or severe infections	Thereof respiratory infections
Nascimento 2014 [71]	Canada	1	1			1/1	ND	1/1	ND	ND
Yi 2014 ^d [72]	China									
Wang 2014 ^d [73]	China									
Novara 2014 [19]	Italy	3	3	2		3/3	3/3	ND	0/3	ND
Lin 2014 [74]	Taiwan	1	1			1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
Chow 2015 [75]	Singapore	3	3			3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Bauer 2015 [76]	Germany	12	12			ND	ND	ND	10/10	9/10
Zhang 2015 [77]	China	1	1	2		1/1	1/1	0/1	1/1	1/1
Voinova 2015 [78]	Russia	4	4			4/4	4/4	2/4	4/4	ND
Magini 2015 ^b [79]	Italy									
Yi 2016 [80]	China	16	15	1		16/16	16/16	6/16	16/16	ND
El Chehadeh 2016 ^c [81]	France					ND	ND	15/30	ND	ND
Ha 2016 [82]	USA	1	1	1		1/1	1/1	0/1	ND	ND
Tug 2016 [83]	Turkey	1	1			1/1	1/1	0/1	1/1	ND
Trobaugh-Lotrario 2016 [84]	USA	1	1			1/1	ND	1/1	1/1	1/1
San Antonio-Arce 2016 [20]	Spain	2		2		2/2	1/2	1/2	2/2	2/2
Lim 2017 [85]	Australia	56	49	7		45/55	35/55	24/45	41/56	41/41
El Chehadeh 2017 [21]	France	4	4			4/4	3/4	2/4	3/4	0/2
Moirangthem 2017 [86]	India	2	2			2/2	1/1	0/2	1/2	1/1
Tsuji-Hosokawa 2017 [87]	Japan	1	1			1/1	ND	0/1	1/1	1/1
Yon 2017 [88]	Korea	2	2			2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
Tang 2017 ^d [89]	China	3	3			2/2	3/3	2/2	3/3	ND
Li 2017 [90]	China	5	5		1	5/5	5/5	4/5	4/5	4/4
Deshwar 2018 [91]	Canada	1	1			1/1	1/1	ND	1/1	1/1
Mignuet 2018 [92]	France	86	86			59/59	57/58	35/59	49/55	49/49

Table 1 (continued)

Reference	Country	Published patients	Thereof male	Thereof female	Relatives with suspected disease	Intellectual disability or developmental delay	Infantile hypotonia	Epileptic seizures	Recurrent or severe infections	Thereof respiratory infections
Grudice-Naim 2019 ^c [93]	Australia	20	16	4		19/20	15/20	11/20	18/20	15/18
Jiang 2019 ^d [94]	China									
Peters 2019 [95]	USA	48	43	5		31/48	42/48	21/48	27/48	27/27
Hirabayashi 2019 [96]	Japan	1	1			1/1	1/1	1/1	1/1	ND
Pascual-Alonso 2020 ^a [97]	Spain	19	18	1		19/19	17/19	19/19	14/18	14/14
Choi 2020 [98]	Hong Kong	1	1			1/1	1/1	0/1	1/1	1/1
Tekendo-Ngongang 2020 [99]	Cameroon	1	1		1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
van Baelen 2020 [100]	Belgium	3	3			2/2	2/2	ND	3/3	3/3
Liu 2020 ^d [101]	China									
Gutierrez-Sanchez 2020 ^e [102]	Spain	2	2			2/2	1/1	ND	2/2	1/1
Takeguchi 2021 [103]	Japan	24	24			18/18	18/21	16/24	18/23	14/18
		545	504	41	39	462/491	411/454	257/459	376/479	316/324
			92%	8%		94%	91%	56%	78%	98%

^aPart of cohort not included in calculation as published elsewhere

^bWhole cohort was published elsewhere

^cNot included in calculation a possibly published elsewhere

^dArticle available in Chinese only

some females show a mild to severe phenotype. The main hypotheses are that symptoms in females might be caused, on the one hand, by the location of the duplicated material into an autosome or, on the other hand, by an unfavorable skewed X chromosome inactivation (XCI) [7–20]. However, the extent of the symptoms in females with *MECP2* duplication cannot be correlated with their XCI pattern, at least as assessed in peripheral blood [21].

Seventy-eight percent of reported patients (376/479) suffer from recurrent or severe infections (Table 1). Most common are respiratory infections with 98% of reported cases (316/324), but patients also present with otitis media, urinary tract infections, and sepsis (Table 1). Early death (defined as < 25 years) is reported with a frequency of 4 to 55% [1, 57, 92, 95]. Among the 67 patients with described cause of early death, 58 (87%) died in the context of a severe infection at the age of 3 weeks to 24 years (median 11 years; data available for 43 patients only) [1, 2, 5–7, 9, 12, 25, 26, 32, 33, 38, 39, 43, 54–57, 63, 67, 70, 75, 76, 80, 84, 86, 87, 90, 92, 93, 95, 97, 99, 104]. Eighty-two percent (328/398) of males suffer from recurrent or severe infections but only 61% (20/33) of the described females. Few studies further examined the detailed infectious and the underlying immunological phenotype of the patients. In contrast to the widespread notion of “recurrent severe infections,” information about identified pathogens is only available for 19 patients [7, 12, 16, 54, 76, 100, 105]. Among the 55 isolated pathogens were 45 bacteria (most of all *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *E. coli*, and *S. aureus*), 6 viruses, and 4 *Candida* (Table S1). However, as the total viable counts are not stated, it remains unclear if these were the disease-causing pathogens. Bronchoalveolar lavage for the identification of pathogens was only performed in 7 patients [76, 105].

Few studies have examined patients for their immunological phenotype [33, 39, 76, 88, 100]. The most common characteristic is a poor response to vaccination especially against *Streptococcus pneumoniae* which was described in 15/26 patients [33, 39, 76]. Some patients show selective deficiency of immunoglobulin (Ig) A (11/47) and/or IgG2 (7/24) [23, 26, 30, 33, 39, 46, 56, 63, 75, 76, 88, 100, 104]. Moreover, several patients present with episodes of unexplained fever and remarkably high C-reactive protein (CRP) values during non-invasive infections [24, 43, 54, 70, 76, 105]. In 2015, Bauer et al. suggested the substitution of polyvalent IgG in patients with an IgG2 subclass deficiency and/or low post-vaccination titers against pneumococci who suffer from recurrent infections—eventually combined with prophylactic antibiotics [76, 105]. In the 26 studies published since 2016, only three evaluated the immunoglobulin levels, and none mentioned the response to vaccination [88, 100, 103]. Four patients were mentioned to receive antibiotic prophylaxis [93, 100, 105]. As infections still limit the quality of life and are the most common cause of death in MDS

patients, there seems to be an unmet clinical need regarding pneumological and microbiological diagnostics as well as targeted anti-infectious treatment [92].

It remains unknown whether recurrent fever and strong acute phase response in these patients are rather driven by infections which are difficult to clear and/or by autoinflammation. Throughout the manuscript, we use the term autoinflammation which describes systemic inflammatory processes due to a non-infectious (auto)activation of the innate immune system. Both hypotheses, the one of an “infectious fever” and the one of an “autoinflammatory fever,” are not mutually exclusive [31, 104, 106, 107]. In 2009, Kirk et al. suspected a link between *IRAK1* duplication and susceptibility to infection [43]. *IRAK1* participates in multiple IL-1 and TLR-driven signaling processes that regulate immunity and inflammation [108–114]. For instance, *IRAK1* plays an important role in the regulation of both, the interleukin-1 (IL-1)-mediated and the Toll-like receptor (TLR)-mediated, so-called canonical signaling pathways of NF- κ B (nuclear factor “kappa-light-chain-enhancer” of activated B cells) (Fig. 1). Upon binding, IL-1 receptors with their respective cytokine or TLR with their respective ligand recruit the adaptor protein myeloid differentiation primary response 88 (MyD88) which associates with *IRAK4* via a homophilic interaction between their death domains. *IRAK4* induces the phosphorylation of *IRAK1*. The hyperphosphorylated *IRAK1* then dissociates from the complex and associates with TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6) to activate TAK-1/TAB (TGF- β -activated kinase/TAK1-binding proteins). The latter enhances the activity of the I κ B kinase (IKK) complex, which in turn leads to phosphorylation and degradation of inhibitors of nuclear factor kappa B (I κ B). Thereby, NF- κ B dimers comprising p65 (RelA), c-Rel, and p50 are activated and migrate into the nucleus which results in gene transcription and the induction of inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor α (TNF- α), IL-1 β , IL-6, and IL-12 [108–114].

Della Mina et al. examined the canonical NF- κ B signaling in an *IRAK1*-null patient [115]. The patient’s fibroblasts showed poor responses upon stimulation with TLR2/6 and TLR4 agonists but unimpaired responses to IL-1 β . The patient’s peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) responded normally to IL-1 β as well as TLR2/6 and TLR4 agonists [115]. Responses to TLR3 agonist Poly(I:C) were not influenced as it signals via TRIF-dependent pathways [115].

The combination of the clinical phenotype in MDS and the duplication of the *IRAK1* gene brings up the question if *IRAK1* overexpression causes increased canonical NF- κ B signaling and detrimentally increased acute phase responses. Considering the results of Della Mina et al., we hypothesized that patients with *MECP2/IRAK1* duplication might show enhanced cytokine production in fibroblasts upon

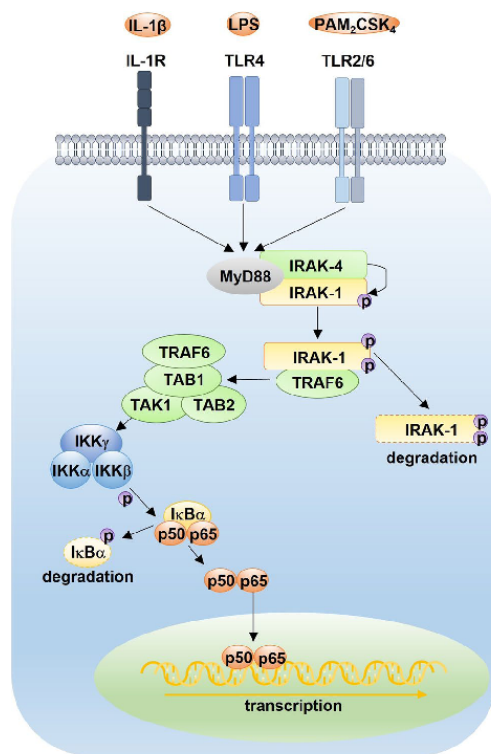


Fig. 1 Canonical pathway of NF- κ B signaling. Upon binding of ligands, such as IL-1 to the IL-1R, LPS to TLR4, or diacylated lipopeptides like PAM2CSK4 to TLR2/6, the inflammatory signaling is mediated via the myddosome complex which consists of MyD88 and IRAK family kinases. MyD88 associates with IRAK4 via a homophilic interaction between their death domains. IRAK4 induces the phosphorylation of IRAK1. The hyperphosphorylated IRAK1 then dissociates from the complex and associates with TRAF6 to activate TAK-1/TAB complex. The latter enhances the activity of the IKK complex which then leads to phosphorylation and degradation of I κ B. Thereby, NF- κ B dimers such as p65 (RelA) and p50 are activated and migrate into the nucleus which results in gene transcription and the induction of inflammatory cytokines. (Adapted from Heller S, Kölsch U, Magg T, et al. T Cell Impairment Is Predictive for a Severe Clinical Course in NEMO Deficiency. *J Clin Immunol.* 2020;40(3):421–434. Used with permission.) I κ B α , NF- κ B inhibitor α ; IKK, I κ B kinase; IL-1R, interleukin-1 receptor; IRAK, interleukin-1 receptor-associated kinase; LPS, lipopolysaccharide; MyD88, myeloid differentiation primary response 88; TAB, TAK1-binding proteins; TAK-1, TGF- β -activated kinase 1; TLR, toll-like receptor; TRAF, TNF receptor-associated factor. The canonical NF- κ B pathway can be disturbed through disease-causing mutations within multiple genes. Described correlations between phenotype and genotype are listed in the OMIM database (OMIM numbers: I κ B α *164,008, IKK α *600,664, IKK β *603,258, IKK γ *300,248, IRAK1*300,283, IRAK4*606,883, MyD88*602,170, p50*164,011, p65*164,014)

simulation with TLR2/6 and TLR4 agonists. Therefore, we evaluated the production of proinflammatory cytokines as well as the I κ B α degradation and IRAK1 phosphorylation upon stimulation with IL-1 β and TLR agonists in SV40-immortalized fibroblasts of 9 patients with *MECP2/IRAK1* duplication syndrome, respectively. Additionally, we investigated the production of proinflammatory cytokines not only in PBMCs but also whole blood.

Methods

Patients

The study was conducted in accordance with the ethical standards of the 1964 Helsinki declaration and the institutional research committee (Charité-Universitätsmedizin Berlin, Germany, EA2/063/12). Informed consent was obtained from each patient or the patients' parents. Our cohort consists of 9 male patients diagnosed with MDS. We recruited them by contacting patients who participated as well as physicians who cooperated in our previous study [76]. Five of the patients were described before [76, 105, 116]. A duplication of at least *MECP2* and *IRAK1* was confirmed in all patients enrolled by array-based Comparative Genomic Hybridization (array-CGH) prior to this study. We standardized the ranges of the duplications to Genome Reference Consortium Human Build 37 (GRCh37) by the NCBI Genome Remapping Service to compare the duplication size of all patients.

Material

Fibroblasts of P1, P2, P3, and P4 as well as of 4 healthy individuals were obtained by skin biopsies and immortalized by simian virus (SV40) as described previously [76, 117]. Blood samples of P3, P5, P6, P7, P8, and P9 as well as of healthy controls were acquired in parallel to routine blood tests. As P1 and P2 deceased, and we were not able to contact P4 recently, we were not able to obtain current blood samples from P1, P2, and P4. P5–9 did not donate fibroblasts. We isolated the PBMCs and performed the analysis in our laboratory with the same methods and equipment.

Cell Stimulation and Cytokine Determination (ELISA)

Levels of IL-6 and IL-8 production were assessed in SV40-fibroblasts of P1, P2, P3, and P4 as well as of healthy controls and IRAK1-deficient and IRAK4-deficient controls incubated for 24 h in the presence of IL-1 β (1 ng/ml, R&D Systems), TNF- α (20 ng/ml, R&D Systems), Phorbol-12-Myristat-13-Acetate (PMA)/Ionomycin (1×10^{-7} M/ 1×10^{-5} M, Sigma-Aldrich), or TLR agonists

(TLR4 agonist LPS (10 µg/ml, Sigma-Aldrich), TLR2/6 agonist PAM₂CSK₄ (10 µg/ml, Invivogen), or TLR3 agonist Poly(I:C) (25 µg/ml, Invivogen)), as well as in PBMCs of P3, P5, P6, P7, P8, and P9 as well as of healthy controls incubated for 48 h in the presence of IL-1β (1 ng/ml, R&D Systems), TNF-α (20 ng/ml, R&D Systems), PMA/Ionomycin (1 × 10⁻⁷ M/1 × 10⁻⁵ M, Sigma-Aldrich), or TLR agonists (TLR4 agonist LPS (1 ng/ml, Sigma-Aldrich) or TLR2/6 agonist PAM₂CSK₄ (1 µg/ml, Invivogen)). Cytokine concentrations in cell culture supernatants were assessed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using “PeliPair reagent” sets (Sanquin) for human IL-6 and IL-8 according to the manufacturer’s protocol. The experiment was conducted three times.

IL-6 and IL-10 levels were measured in heparinized whole blood of P3, P5, P6, P7, P8, and P9 incubated for 48 h in the presence of IL-1β (20 ng/ml, R&D Systems), TNF-α (20 ng/ml, R&D Systems), PMA/Ionomycin (1 × 10⁻⁷ M/1 × 10⁻⁵ M, Sigma-Aldrich), or TLR agonists (TLR4 agonist LPS (1 ng/ml, Sigma-Aldrich) or TLR2/6 agonist PAM₂CSK₄ (100 ng/ml, Invivogen)). The cytokine concentrations were measured by ECLIA by Labor Berlin on an IMMULITE® 1000 (Siemens) and compared to a cohort of healthy controls assessed in our laboratory (*n* = 179) [118].

Western Blots

To analyze IRAK1 expression and IκBα degradation, we stimulated SV40-immortalized fibroblasts of P1, P2, P3, and P4 as well as of healthy controls and IRAK1-deficient and IRAK4-deficient controls with IL-1β (10 ng/ml, R&D Systems) and TNF-α (20 ng/ml, R&D Systems) for 15, 30, 45, 60, and 90 min as well as with IL-1β (10 ng/ml, R&D Systems), TLR4 agonist lipopolysaccharide (LPS) (10 µg/

ml, Sigma-Aldrich), and TNF-α (20 ng/ml, R&D Systems) for 20, 60, 120, and 240 min, respectively. The further steps were performed as described previously using the following antibodies: IκBα (610,690, BD Biosciences), IRAK1 (sc-7883, Santa Cruz Biotechnology), IRAK-4 (ADI-KAP-ST206-E, Enzo), glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH) (sc-25778, Santa Cruz Biotechnology), Goat Anti Rabbit IgG (111–035-045, Dianova), and Goat Anti Mouse IgG (115–035-062, Dianova) [118]. Detailed protocols are available upon request.

Graphs and Statistical Information

Graphs were created using GraphPad Prism 9 software (GraphPad Software Inc.) and PowerPoint (Microsoft Office). Statistical analyses were performed using SPSS V28.0.1.0 (IBM). Data sets were tested for normal distribution, and statistical comparisons were done using a Mann–Whitney *U* test. For comparison of multiple groups, Kruskal–Wallis test was used. *P* values of less than 0.05 after adjusting by Bonferroni method were considered significant. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, *****P* < 0.0001.

Results

Patients with *MECP2*/*IRAK1* Duplication Suffer from Recurrent Respiratory Infections

Our 9 patients show duplications of variable sizes at least encompassing the neighboring genes *MECP2* and *IRAK1* (Fig. 2). In patients 5 and 8, part of the region is triplicated. The exact boundaries and the included genes are shown in the Supplementary Information. All patients suffered from

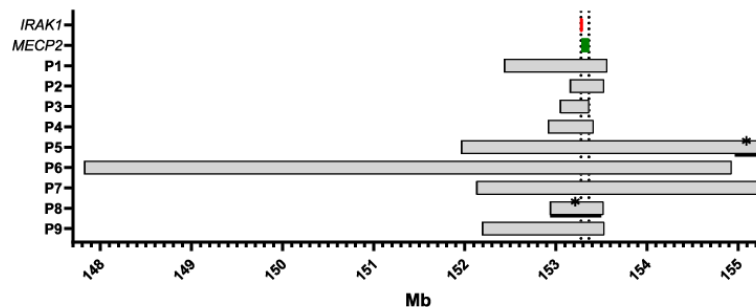


Fig. 2 Size of duplications on chromosome Xq28 based on human genome assembly GRCh37 (hg19) in mega base pairs (Mb). Position of *IRAK1* is indicated in red and position of *MECP2* is indicated in green. Vertical dotted lines show the minimal duplicated region

including *IRAK1* and *MECP2*. *Black bars with a star indicate triplicated segments. This figure was created using Prism 9 (GraphPad). The exact boundaries and the included genes are shown in the Supplementary Information

recurrent or severe infections, mostly respiratory infections, which often required hospitalization.

Patient 3 is a 25-year-old patient who is followed-up in our department at least 4 times a year and was clinically and molecularly characterized before [P1 in 76, 105]. Array comparative genome hybridization (array-CGH) confirmed a duplication of 1.1 Mb at Xq28. He first presented with global developmental delay, muscular hypotonia, and spastic tetra paresis. He suffers from epilepsy and recurrent severe infections. Of his in total 64 episodes of pneumonia, he had developed 47 until his 14th y/a. After starting an immunoglobulin substitution (at 12 y/a) as well as supportive measures and antibiotic prophylaxis (at 14 y/a), the frequency of infections declined, leading to 3 episodes of pneumonia only in the following 8 years. Despite this treatment, we recorded an increase of hospital admissions due to infections in the last 2 years including 12 episodes of pneumonia and 2 episodes of sepsis (Fig. S1). Throughout the last years, the boy developed chronic aspiration and shows bronchiectasis in his latest CT scans (Fig. S2). We are now detecting opportunistic pathogens such as a multidrug-resistant *Citrobacter freundii* as well as *Candida glabrata* and *Trichosporon asahii* in bronchoalveolar lavages. He is currently under prophylactic anti-infective treatment with cotrimoxazole, penicillin, and fluconazole. In all infectious episodes, our patients presented with fever above 39 °C and high CRP levels, typically above > 100 mg/dl, already during the first 3 days of the infection. The boy shows a normal total immunoglobulin titer but deficiency of IgG2, IgG4, IgA, and IgM. A polysaccharide-specific antibody deficiency persisted despite repeated vaccinations.

The baseline clinical features of all patients in our cohort are summarized in Table 2. Detailed case reports of P1, P2, and P4–P9 are provided in the Supplementary Information.

IRAK1 Duplication Leads to Increased Protein Levels in Patient-Derived Fibroblast Cell Lines

First, we characterized the SV40-immortalized fibroblasts cell lines of both patients and healthy controls for their expression of IRAK1, IRAK4, and GAPDH (Fig. 3). We used an IRAK1-deficient and an IRAK4-deficient cell line as negative controls. The patients' cells (P1–P4) contained at least twice as much IRAK1 as the cells of the healthy controls (C1–C4) (Fig. 3). The calculated ratios are stated in the Supplementary Information.

IRAK1 Duplication Does Promote Excessive Cytokine Production Neither in Fibroblasts Nor in PBMC Nor in Whole Blood

We hypothesized that the susceptibility to infection could be caused by a hyperinflammatory immune response due

Table 2 Clinical baseline characteristics of the cohort. UTI, urinary tract infections; SV40, SV40-immortalized fibroblasts; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; ND, not determined; x, present; /, absent

Patient	Sex	Age at last consultation	Origin	Intellectual disability or developmental delay	Infantile hypotonia	Epileptic seizures	Recurrent or severe infections	Number of			Material	
								Pneumonia	Sepsis	UTI	Purulent otitis	
1 ^a	Male	15 [†]	Germany	x	x	x	x	14	0	7	2	SV40
2 ^a	Male	15 [†]	Belgium	x	x	x	x	50	1	ND	3	SV40
3 ^a	Male	25	Germany	x	x	x	x	58	>5	>1	>3	SV40, PBMCs, whole blood
4 ^a	Male	8	France	x	x	ND	x	2	0	ND	>4	SV40
5	Male	21	Belgium	x	x	x	x	32	1	1	ND	PBMCs, whole blood
6	Male	10	Belgium	x	x	x	x	3	0	0	ND	PBMCs, whole blood
7	Male	5	Poland	x	x	/	x	5	1	2	ND	PBMCs, whole blood
8	Male	10	Germany	x	x	/	x	>1	0	ND	ND	PBMCs, whole blood
9 ^a	Male	10	Germany	x	x	ND	x	7	ND	5	1	PBMCs, whole blood
				9/9	9/9	5/7	9/9					

^aPublished elsewhere, see Supplementary Information

[†]Deceased

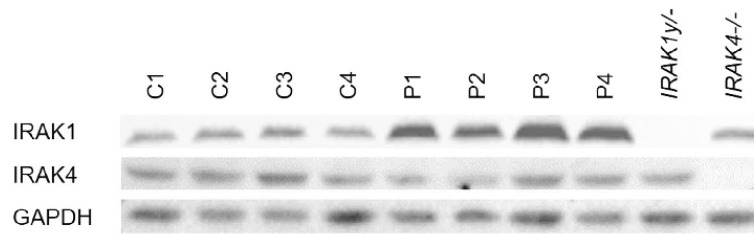


Fig. 3 Characterization of SV40-immortalized fibroblasts. Western blot analysis of IRAK-1 and IRAK-4 protein levels in cell lysates from SV40-immortalized fibroblasts of healthy controls ($n=4$),

patients ($n=4$), an IRAK1-deficient patient, and an IRAK4-deficient patient. Pictures were cropped and adjusted. Quantitation is shown in Table S2

to increased canonical NF- κ B signaling because of IRAK1 overexpression. Therefore, we determined the impact of the *MECP2* and *IRAK1* duplication on the canonical NF- κ B signaling. Hence, we performed an ELISA to measure the cytokine production in the cell culture supernatants of SV40-immortalized fibroblasts, PBMCs, and whole blood upon stimulation with IL-1 β as well as the TLR agonists LPS (TLR4), PAM₂CSK₄ (TLR2/6), and Poly(I:C) (TLR3). We used TNF- α and PMA/Ionomycin as NF- κ B-independent intra-assay controls.

Production of IL-6 and IL-8 upon stimulation with IL-1 β or TLR2/6 agonist PAM₂CSK₄ was increased in fibroblasts of both healthy controls and *MECP2/IRAK1*-duplicated patients, but we did not see a difference between the two groups (Fig. 4a and 4b). Interestingly and in contrast to our hypothesis, the data suggests that the cytokine production upon stimulation with TLR4 agonist (LPS) in immortalized fibroblasts of *MECP2/IRAK1*-duplicated patients is lower than in healthy controls. In IRAK4-deficient fibroblasts, cytokine production upon stimulation with IL-1 β , TLR4 agonist LPS, and TLR2/6 agonist PAM₂CSK₄ was absent (Fig. 4a and 4b). In IRAK1-deficient fibroblasts, we found no response to TLR4 agonist LPS and TLR2/6 agonist PAM₂CSK₄ but an almost unimpaired response to IL-1 β (Fig. 4a and 4b). All fibroblasts showed increased cytokine production upon activation with TLR3 agonist Poly(I:C), TNF- α , and PMA/Ionomycin (Fig. 4a and 4b). The response upon stimulation with IL-1 β , TLR agonists, and TNF- α was similar for PBMCs and whole blood in both groups (Fig. 4c–f). *P* values for significant differences are indicated in Fig. 4. If there was no statistically significant difference (patients vs. *IRAK1y*^{-/-}; patients vs. *IRAK4*^{-/-} and *IRAK1y*^{-/-} vs. *IRAK4*^{-/-}), *P* values were not plotted (Fig. 4a and 4b).

These results indicate that *MECP2/IRAK1* duplication does not lead to a higher amount of inflammatory cytokines upon

stimulation in immortalized fibroblasts, PBMCs, and whole blood.

Normal IRAK1 and I κ B α Degradation Indicates Regular NF- κ B Signaling in Patient-Derived Fibroblasts with *IRAK1* Duplication

Having observed that *MECP2/IRAK1* duplication does not cause an increased acute inflammatory response in vitro, we hypothesized that canonical NF- κ B signaling may be altered regarding the phosphorylation and degradation of involved proteins such as IRAK1 and I κ B α . To further delineate this pathway, we performed Western blots on whole cell lysates of SV40 fibroblasts of P1–P4, a healthy control (C), as well as IRAK1- and IRAK4-deficient controls stimulated with IL-1 β as well as TNF- α as an NF- κ B-independent intra-assay control (Fig. 5a). Upon activation, IRAK1 is phosphorylated leading to a higher mass of the molecule. Phosphorylated IRAK1 becomes hence visible as a smear above the band of non-phosphorylated IRAK1. It appears as if there is still non-phosphorylated IRAK1 left 90 min after stimulation with IL-1 β (Fig. 5a). In a second experiment, we assessed the IRAK1 phosphorylation upon IL1 β and TNF- α for longer time frames up to 240 min and additionally stimulated the SV40 fibroblasts with TLR4 agonist LPS (Fig. 5b). Both, the patients' and the control's cells showed a similar pattern of IRAK1 phosphorylation and degradation upon activation with IL-1 β , whereas it was absent in IRAK4-deficient fibroblasts (Fig. 5a and 5b). Self-explanatory, the IRAK1-deficient fibroblasts did not contain any IRAK1 protein, and therefore, it could not be phosphorylated or degraded (Fig. 5a and 5b). IRAK1 phosphorylation and degradation could not be induced by LPS or TNF- α stimulation in any of the cell lysates (Fig. 5a and 5b). The time pattern of I κ B α degradation upon IL-1 β stimulation and the reoccurrence of non-phosphorylated I κ B α was similar

Fig. 4 Cytokine production upon stimulation measured in cell culture supernatants. Bars indicate median values. **a** and **b** Cytokine production in patients' SV40-immortalized fibroblasts ($n=4$) upon stimulation with IL-1 β (1 ng/ml), TLR agonists (LPS for TLR4 (10 μ g/ml), PAM₂CSK₄ for TLR2/TLR6 (10 μ g/ml), Poly(I:C) for TLR3 (25 μ g/ml), PMA/Iono (1×10^{-7} M/ 1×10^{-5} M), and TNF- α (20 ng/ml). SV40-immortalized fibroblasts of healthy controls ($n=4$), an *IRAK1*-null patient, and an *IRAK4*-null patient were used as intra-assay controls. The experiment was conducted three times. **a** IL-6 production. **b** IL-8 production. **c** and **d** Cytokine production in patients' PBMCs upon stimulation with IL-1 β (1 ng/ml), TLR agonists (LPS for TLR4 (1 ng/ml), PAM₂CSK₄ for TLR2/TLR6 (1 μ g/ml), PMA/Iono (1×10^{-7} M/ 1×10^{-5} M), and TNF- α (20 ng/ml). PBMCs of healthy controls were used as intra-assay controls. **c** IL-6 production ($n=8$ for patients and $n=11$ for healthy controls). **d** IL-8 production ($n=7$ for patients and $n=9$ for healthy controls). # zero values. **e** and **f** Cytokine production in patients' whole blood ($n=6$) upon stimulation with IL-1 β (20 ng/ml), TLR agonists (LPS for TLR4 (1 ng/ml), PAM₂CSK₄ for TLR2/TLR6 (100 ng/ml), PMA/Iono (1×10^{-7} M/ 1×10^{-5} M), and TNF- α (20 ng/ml). The analyses were performed in comparison to a cohort of healthy controls assessed in our laboratory ($n=179$, whiskers 5–95 percentile). **e** IL-6 production. **f** IL-10 production. This figure was created using Prism 9 (Graph-Pad). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, ns, not significant. If there was no statistically significant difference (patients vs. *IRAK1*^{-/-}; patients vs. *IRAK4*^{-/-} and *IRAK1*^{-/-} vs. *IRAK4*^{-/-}), P values were not plotted (Fig. 4a and 4b). *IRAK1*, IL-1 receptor-associated kinase 1; IL-1 β , interleukin-1 β ; LPS, lipopolysaccharide; PAM₂, PAM₂CSK₄; PMA/I, phorbol myristate acetate/ionomycin; TLR, toll-like receptor; TNF- α , tumor necrosis factor α

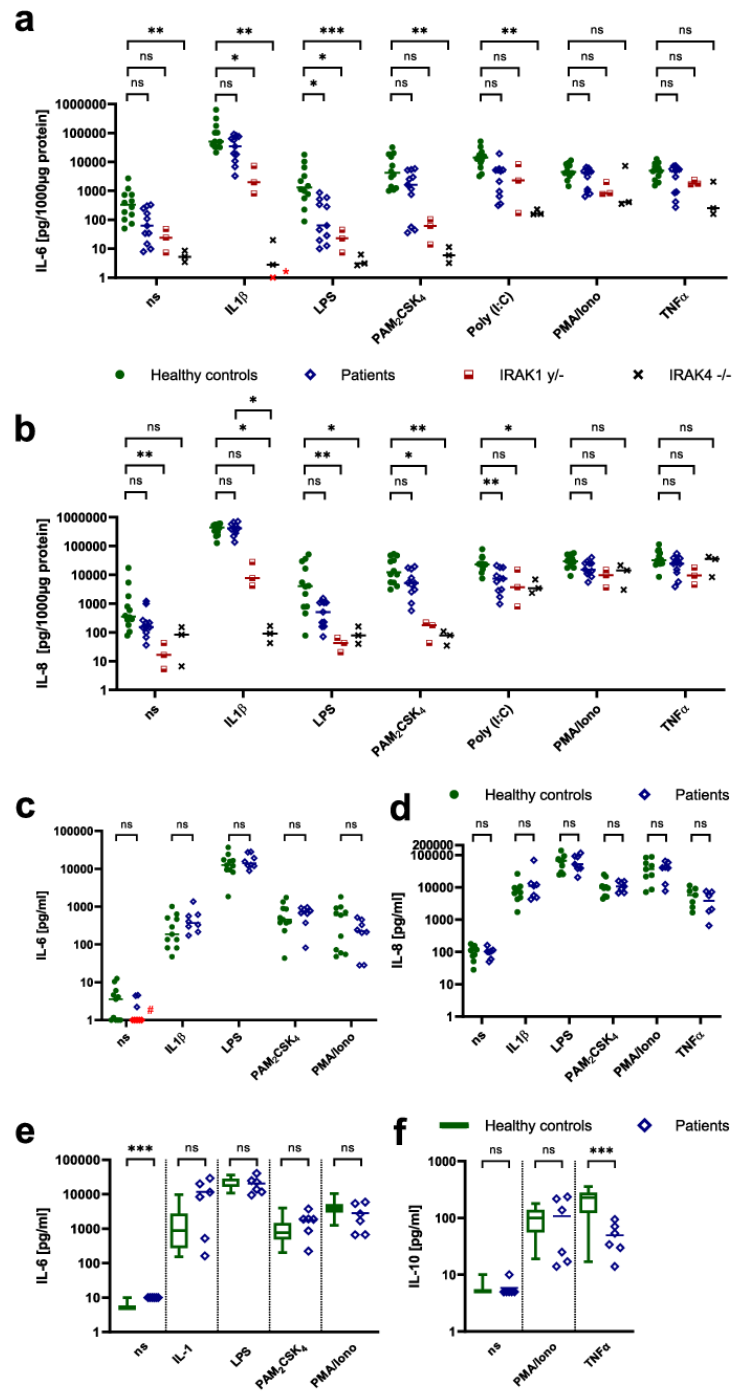
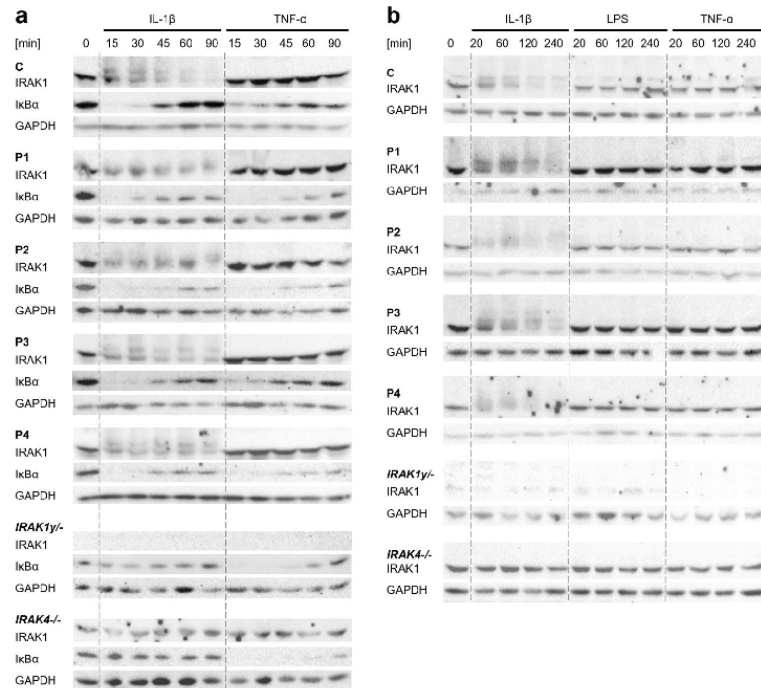


Fig. 5 Immunological phenotype of SV40-immortalized fibroblasts. **a** IRAK1 phosphorylation and I κ B α degradation upon stimulation with IL-1 β (10 ng/ml) and TNF- α (20 ng/ml). **b** IRAK1 phosphorylation upon stimulation with IL-1 β (10 ng/ml), TLR4 agonist LPS (10 μ g/ml), and TNF- α (20 ng/ml). Cell lysates were analyzed by performing Western blots specific to IRAK1, I κ B α , and GAPDH. Phosphorylated IRAK1 forms a smear above the band of the non-phosphorylated IRAK1. GAPDH was used as a loading control. Pictures were cropped and adjusted. IRAK1, IL-1 receptor-associated kinase 1; I κ B α , NF- κ B inhibitor α ; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase; IL-1 β , interleukin-1 β ; LPS, lipopolysaccharide; TNF- α , tumor necrosis factor α



in cells of the patients and the control tested, whereas it was absent in IRAK1- and IRAK4-deficient fibroblasts (Fig. 5a). Overall, our data suggests that there is no difference in the activity of the canonical NF- κ B signaling in *MECP2/IRAK1*-duplicated patients.

Discussion

Although research on *MECP2/IRAK1* duplication syndrome has increased, a comprehensive pathophysiological mechanism that explains the frequency and severity of infections, the most common cause of death, remains unknown. Numerous publications describe patients who repeatedly require hospitalization, invasive ventilation, and intensive care admission [63, 75, 76, 103, 105]. In P3, pneumococcal immunization and antibiotic prophylaxis reduced the number of infections per year drastically for many years (Fig. S1). However, after successful long-term prophylaxis on antibiotics and IgG, he has been presenting multiple times with pneumonia caused by multidrug-resistant and rare pathogens since the age of 23. Patients like these show that the control of infections clearly is still an unmet clinical need.

IRAK1 participates in multiple IL-1 and TLR-driven signaling processes that regulate immunity and inflammation [108–113]. Therefore, we hypothesized that the infections

may be triggered by a strong acute phase response due to IRAK1 overexpression and subsequently increased canonical NF- κ B signaling. However, in our cohort, we did not see any evidence of increased IRAK1-dependent degradation of I κ B α . We demonstrated that the production of proinflammatory cytokines IL-6 and IL-8 upon stimulation with IL-1 β and TLR2/6 agonist PAM₂CSK₄ is similar in immortalized fibroblasts as well as PBMCs and whole blood of patients with *MECP2/IRAK1* duplication and healthy controls. Also, we did not see an enhanced response upon stimulation with TLR4 agonist LPS in PBMCs and whole blood of patients compared to healthy controls. The results in our healthy controls as well as our IRAK1- and IRAK4-deficient controls were similar to the results of Della Mina et al. [115]. Response to IL-1 β and TLR agonists seems to be normal not only in PBMCs but also whole blood which suggests that canonical NF- κ B signaling is also neither increased nor impaired in neutrophilic granulocytes of patients with *MECP2/IRAK1* duplication.

This raises the question of whether the inflammation (as documented by high CRP levels in many patients) observed in MDS patients might rather be driven by an infectious than an autoinflammatory process. Ninety-one percent (411/454) of the published patients suffered from muscle hypotonia suggesting that an insufficient occlusion of the gastric sphincter, as well as swallowing difficulties, could favor aspiration

(Table 1). Gastroesophageal reflux with subsequent aspiration was suggested as a cause for frequent respiratory tract infections [31, 104]. However, only 55% (149/270) of the patients were described to suffer from reflux, whereas 78% of the patients (376/479) were described to suffer from recurrent or severe infections ([3, 5, 6, 9, 15, 18, 26, 27, 31, 33, 38, 52, 54–56, 60, 67, 75, 84, 85, 92, 93, 95, 97, 98, 100, 103, 104, 119], Table 1).

The NF- κ B signaling in fibroblasts and blood seems to be unimpaired. However, this might be different in other tissues such as lung epithelia. On the one hand, IRAK-1 was shown to be essential for IL-8 production in human airway epithelial cells [120]. On the other hand, IRAK-1 is necessary for the rhinovirus-stimulated induction of CXCL-10 in airway epithelial cells and macrophages [121]. Both excessive production of IL-8 and CXCL-10 could contribute to lung inflammation leading to the clinical phenotype of MDS patients. From a scientific point of view, it seems interesting to study the cytokine production and CXCL-10 induction in airway epithelial cells of patients with *MECP2/IRAK1* duplication. However, it seems almost impossible to obtain sufficient amounts of primary lung tissue from children with such a rare disease in a standardized way, let alone enough to culture lung epithelia. An alternative strategy to investigate the role of IRAK1 in lung epithelia might be to differentiate human-induced pluripotent stem cells (hiPSCs) to lung epithelial cells [122].

Yang et al. proposed that severe infections in MDS patients occur due to the lack of TH1 response and subsequently low IFN- γ activity [106]. However, a generally impaired IFN- γ secretion could not be reproduced by Bauer et al. [76]. Furthermore, complete IFN- γ deficiency is characterized by a selective predisposition to infections caused by mycobacteria, *Salmonella*, or *Candida* species [123, 124]. This does not correlate with the clinical phenotype of MDS patients who typically show purulent bronchitis caused by bacteria which are capable of building a capsule such as *Streptococcus pneumoniae* or *Haemophilus influenzae* [76]. In the so far published cases of MDS, an infection with mycobacteria was only described once [76].

Besides its role for canonical NF- κ B signaling, IRAK1 controls the induction of interferons via interferon regulatory factor 7 (IRF7) [109, 111, 114]. In human IRF7 deficiency, individuals are selectively susceptible to severe infections by influenza and SARS-CoV-2 and show an impaired type I IFN signature [125, 126]. In vitro, IRAK-1 regulates the transcriptional activation of IRF7 by directly binding and phosphorylating it. TLR7- and TLR9-mediated IFN α production is abolished in IRAK1-deficient mice, whereas inflammatory cytokine production is not impaired [111]. This brings up the question whether duplication of the *IRAK1* gene and thus IRAK1 overexpression causes an increased activation of the TLR7- and TLR9-mediated interferon- α induction pathway leading to an increased release of interferons and consequently to a hyperinflammatory immune response. However,

CD169 expression on monocytes, which is correlated with systemic type I IFN levels, was normal in P3 both while he suffered from an infection and when he was free of infections [127, 128]. Further, *MECP2*-overexpressing mice had been described as particularly susceptible for severe influenza A infection. During infection, they show neutrophilia, increased cytokine production, excessive corticosterone levels, defective adaptive immunity, and vascular pathology. This raises the question if the inflammation-underlying pathomechanism in humans suffering from *MECP2* duplication syndrome is rather caused by the overexpression of *MECP2* than the overexpression of IRAK1 [107]. In a humanized mouse model of MDS, intracerebroventricular antisense oligonucleotide (ASO) therapy was shown to decrease *MECP2* expression in the brain and to reduce behavioral deficits as well as to restore/correct reduced IFN- γ mRNA levels in the blood [129]. If inflammation in MDS is rather caused by the duplication of *MECP2* itself, than by duplication of *IRAK1*, ASO against *MECP2* might be a feasible treatment option for these patients. The effects of such ASO therapy, applied in compartments such as the blood and lungs, may also warrant further investigation.

In summary, patients with *MECP2* duplication syndrome do not show increased canonical NF- κ B signaling in whole blood, PBMCs, or SV40-immortalized fibroblasts. Therefore, we assume that these patients do not benefit from a therapeutic suppression of this pathway.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s10875-022-01390-7>.

Author Contribution I.G. designed this study, planned and performed experiments, analyzed results, interpreted the data, and wrote the manuscript. U.K. provided reagents, performed experiments, and analyzed results. D.L.W., J.K., and S.M. provided reagents and supported experiments. R.K., A.J., R.R., S.E., and H.V.E. took care of patients and provided patient material. A.P. and J.-L.C. provided the *IRAK1*^{-/-} and *IRAK4*^{-/-} cell lines. H.v.B. designed and led the study, took care of patients, provided patient material, planned experiments, analyzed results, interpreted data, and edited the manuscript. The first draft of the manuscript was written by I.G., and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the manuscript in its final form.

Funding Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

Data Availability The datasets generated during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Declarations

Ethics Approval The study was conducted in accordance with the ethical standards of the 1964 Helsinki declaration and the institutional research committee (Charité-Universitätsmedizin Berlin, Germany, EA2/063/12).

Consent to Participate Informed consent was obtained from the parents of all individual participants included in the study.

Consent for Publication The authors affirm that human research participants' legal guardians provided informed consent for publication of the data of their children.

Competing Interests The authors declare no competing interests.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

1. Van Esch H, Bauters M, Ignatius J, Jansen M, Raynaud M, Holders K, et al. Duplication of the MECP2 region is a frequent cause of severe mental retardation and progressive neurological symptoms in males. *Am J Hum Genet.* 2005;77:442–53. <https://doi.org/10.1086/444549>.
2. Meins M, Lehmann J, Gerresheim F, Herchenbach J, Hagedorn M, Hameister K, et al. Submicroscopic duplication in Xq28 causes increased expression of the MECP2 gene in a boy with severe mental retardation and features of Rett syndrome. *J Med Genet.* 2005;42:e12. <https://doi.org/10.1136/jmg.2004.023804>.
3. Ramocki MB, Tavayev YJ, Peters SU. The MECP2 duplication syndrome. *Am J Med Genet A.* 2010;152A:1079–88. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.33184>.
4. del Gaudio D, Fang P, Scaglia F, Ward PA, Craigen WJ, Glaze DG, et al. Increased MECP2 gene copy number as the result of genomic duplication in neurodevelopmentally delayed males. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet.* 2006;8:784–92. <https://doi.org/10.1097/01.gim.0000250502.28516.3c>.
5. Clayton-Smith J, Walters S, Hobson E, Burkitt-Wright E, Smith R, Toutain A, et al. Xq28 duplication presenting with intestinal and bladder dysfunction and a distinctive facial appearance. *Eur J Hum Genet EJHG.* 2009;17:434–43. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2008.192>.
6. Lugtenberg D, Kleefstra T, Oudakker AR, Nillesen WM, Yntema HG, Tzschach A, et al. Structural variation in Xq28: MECP2 duplications in 1% of patients with unexplained XLMR and in 2% of male patients with severe encephalopathy. *Eur J Hum Genet EJHG.* 2009;17:444–53. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2008.208>.
7. Bialer M. De novo trisomy Xq28-qter detected by subtelomeric FISH screening. *Am J Hum Genet* 2003.
8. Lachlan KL, Collinson MN, Sandford ROC, van Zyl B, Jacobs PA, Thomas NS. Functional disomy resulting from duplications of distal Xq in four unrelated patients. *Hum Genet.* 2004;115:399–408. <https://doi.org/10.1007/s00439-004-1175-x>.
9. Sanlaville D, Prieur M, de Blois M-C, Genevieve D, Lapierre J-M, Ozilou C, et al. Functional disomy of the Xq28 chromosome region. *Eur J Hum Genet EJHG.* 2005;13:579–85. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201384>.
10. Auber B, Burfeind P, Thiels C, Alsat EA, Shoukier M, Liehr T, et al. An unbalanced translocation resulting in a duplication of Xq28 causes a Rett syndrome-like phenotype in a female patient. *Clin Genet.* 2010;77:593–7. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2009.01363.x>.
11. Makrythanasis P, Moix I, Gimelli S, Fluss J, Aliferis K, Antonarakis SE, et al. De novo duplication of MECP2 in a girl with mental retardation and no obvious dysmorphic features. *Clin Genet.* 2010;78:175–80. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2010.01371.x>.
12. Reardon W, Donoghue V, Murphy A-M, King MD, Mayne PD, Horn N, et al. Progressive cerebellar degenerative changes in the severe mental retardation syndrome caused by duplication of MECP2 and adjacent loci on Xq28. *Eur J Pediatr.* 2010;169:941–9. <https://doi.org/10.1007/s00431-010-1144-4>.
13. Mayo S, Monfort S, Roselló M, Orellana C, Oltra S, Armstrong J, et al. De novo interstitial triplication of MECP2 in a girl with neurodevelopmental disorder and random X chromosome inactivation. *Cytogenet Genome Res.* 2011;135:93–101. <https://doi.org/10.1159/000330917>.
14. Grasshoff U, Bonin M, Goehring I, Ekici A, Dufke A, Cremer K, et al. De novo MECP2 duplication in two females with random X-inactivation and moderate mental retardation. *Eur J Hum Genet EJHG.* 2011;19:507–12. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2010.226>.
15. Bijlsma EK, Collins A, Papa FT, Tejada MI, Wheeler P, Peeters EAJ, et al. Xq28 duplications including MECP2 in five females: expanding the phenotype to severe mental retardation. *Eur J Med Genet.* 2012;55(6–7):404–13. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2012.02.009>.
16. Shimada S, Okamoto N, Hirasawa K, Yoshii K, Tani Y, Sugawara M, et al. Clinical manifestations of Xq28 functional disomy involving MECP2 in one female and two male patients. *Am J Med Genet A.* 2013;161A:1779–85. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.35975>.
17. Scott Schwoerer J, Laffin J, Haun J, Raca G, Friez MJ, Giampietro PF. MECP2 duplication: possible cause of severe phenotype in females. *Am J Med Genet A.* 2014;164A:1029–34. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36380>.
18. Fieremans N, Bauters M, Belet S, Verbeeck J, Jansen AC, Seneca S, et al. De novo MECP2 duplications in two females with intellectual disability and unfavorable complete skewed X-inactivation. *Hum Genet.* 2014;133:1359–67. <https://doi.org/10.1007/s00439-014-1469-6>.
19. Novara F, Simonati A, Sicca F, Battini R, Fiori S, Contaldo A, et al. MECP2 duplication phenotype in symptomatic females: report of three further cases. *Mol Cytogenet.* 2014;7:10. <https://doi.org/10.1186/1755-8166-7-10>.
20. San Antonio-Arce V, Fenollar-Cortés M, Oancea Ionescu R, DeSantos-Moreno T, Gallego-Merlo J, Illana Cámara FJ, et al. MECP2 duplications in symptomatic females: report on 3 patients showing the broad phenotypic spectrum. *Child Neurol Open* 2016;3:2329048X16630673. <https://doi.org/10.1177/2329048X16630673>.
21. El Chehadeh S, Touraine R, Prieur F, Reardon W, Bienvenu T, Chantot-Bastaraud S, et al. Xq28 duplication including MECP2 in six unreported affected females: what can we learn for diagnosis and genetic counselling? *Clin Genet.* 2017;91:576–88. <https://doi.org/10.1111/cge.12898>.
22. Mohandas T, Geller RL, Yen PH, Rosendorff J, Bernstein R, Yoshida A, et al. Cytogenetic and molecular studies on a recombinant human X chromosome: implications for the spreading of X chromosome inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84:4954–8.
23. Bertini E, Cusmai R, de Saint BG, Le Deist F, Di Capua M, Gaggero DR, et al. Congenital X-linked ataxia, progressive myoclonic encephalopathy, macular degeneration and recurrent infections. *Am J Med Genet.* 1992;43:443–51. <https://doi.org/10.1002/ajmg.1320430167>.

24. Lahn BT, Ma N, Breg WR, Stratton R, Surti U, Page DC. Xq–Yq interchange resulting in supernormal X-linked gene expression in severely retarded males with 46, XYq,- karyotype. *Nat Genet.* 1994;8:243–50. <https://doi.org/10.1038/ng1194-243>.
25. Vasquez AI, Rivera H, Bobadilla L, Crolla JA. A familial Xp+ chromosome, dup (Xq26.3→qter). *J Med Genet.* 1995;32:891–3. <https://doi.org/10.1136/jmg.32.11.891>.
26. Pai GS, Hane B, Joseph M, Nelson R, Hammond LS, Arena JF, et al. A new X linked recessive syndrome of mental retardation and mild dysmorphism maps to Xq28. *J Med Genet.* 1997;34:529–34. <https://doi.org/10.1136/jmg.34.7.529>.
27. Goodman BK, Shaffer LG, Rutberg J, Leppert M, Harum K, Gagos S, et al. Inherited duplication Xq27-qter at Xp22.3 in severely affected males: molecular cytogenetic evaluation and clinical description in three unrelated families. *Am J Med Genet.* 1998;80:377–84. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-8628\(19981204\)80:4%3c377::aid-ajmg14%3e3.0.co;2-7](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-8628(19981204)80:4%3c377::aid-ajmg14%3e3.0.co;2-7).
28. Lammer EJ, Punglia DR, Fuchs AE, Rowe AG, Cotter PD. Inherited duplication of Xq27.2 ← qter: phenocopy of infantile Prader-Willi syndrome. *Clin Dysmorphol.* 2001;10:141–4.
29. Akiyama M, Kawane H, Ohashi H, Tohma T, Ohta H, Shishikura A, et al. Functional disomy for Xq26.3-qter in a boy with an unbalanced t(X;21)(q26.3;p11.2) translocation. *Am J Med Genet.* 2001;99:111–4. [https://doi.org/10.1002/1096-8628\(2001\)9999:9999%3c::aid-ajmg1150%3e3.0.co;2-c](https://doi.org/10.1002/1096-8628(2001)9999:9999%3c::aid-ajmg1150%3e3.0.co;2-c).
30. Novelli A, Bernardini L, Salpietro DC, Briuglia S, Merlino MV, Mingarelli R, et al. Disomy of distal Xq in males: case report and overview. *Am J Med Genet A.* 2004;128A:165–9. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.30088>.
31. Kokalj-Vokac N, Marcun-Varda N, Zagorac A, Erjavec-Skerget A, Zagradisnik B, Todorovic M, et al. Subterminal deletion/duplication event in an affected male due to maternal X chromosome pericentric inversion. *Eur J Pediatr.* 2004. <https://doi.org/10.1007/s00431-004-1519-5>.
32. Teek R ÖK. Case report: boy with severe hypotonia, hypogenitalism, chronic interstitial pneumonia, and partial X disomy, karyotype 46,X,der(Y)t(X;Y)(q28;q11.2). *Eur J Hum Genet.* 2004.
33. Friez MJ, Jones JR, Clarkson K, Lubs H, Abuelo D, Bier J-AB, et al. Recurrent infections, hypotonia, and mental retardation caused by duplication of MECP2 and adjacent region in Xq28. *Pediatrics.* 2006;118:e1687-95.
34. Rosenberg C, Knijnenburg J, Bakker E, Vianna-Morgante AM, Sloos W, Otto PA, et al. Array-CGH detection of micro rearrangements in mentally retarded individuals: clinical significance of imbalances present both in affected children and normal parents. *J Med Genet.* 2006;43:180–6. <https://doi.org/10.1136/jmg.2005.032268>.
35. Froyen G, Van Esch H, Bauters M, Hollanders K, Frints SGM, Vermeesch JR, et al. Detection of genomic copy number changes in patients with idiopathic mental retardation by high-resolution X-array-CGH: important role for increased gene dosage of XLMR genes. *Hum Mutat.* 2007;28:1034–42. <https://doi.org/10.1002/humu.20564>.
36. Madrigal I, Rodríguez-Revenga L, Armengol L, González E, Rodríguez B, Badenas C, et al. X-chromosome tiling path array detection of copy number variants in patients with chromosome X-linked mental retardation. *BMC Genomics.* 2007;8:443. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-443>.
37. Bauters M, Van Esch H, Friez MJ, Boespflug-Tanguy O, Zenker M, Vianna-Morgante AM, et al. Nonrecurrent MECP2 duplications mediated by genomic architecture-driven DNA breaks and break-induced replication repair. *Genome Res.* 2008;18:847–58. <https://doi.org/10.1101/gr.075903.107>.
38. Smyk M, Obersztyn E, Nowakowska B, Nawara M, Cheung SW, Mazurczak T, et al. Different-sized duplications of Xq28, including MECP2, in three males with mental retardation, absent or delayed speech, and recurrent infections. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet Off Publ Int Soc Psychiatr Genet.* 2008;147B:799–806. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.30683>.
39. Prescott TE, Rødningsen OK, Bjørnstad A, Stray-Pedersen A. Two brothers with a microduplication including the MECP2 gene: rapid head growth in infancy and resolution of susceptibility to infection. *Clin Dysmorphol.* 2009;18:78–82. <https://doi.org/10.1097/MCD.0b013e32831e19cd>.
40. Ramocki MB, Peters SU, Tavyev YJ, Zhang F, Carvalho CMB, Schaaf CP, et al. Autism and other neuropsychiatric symptoms are prevalent in individuals with MECP2 duplication syndrome. *Ann Neurol.* 2009;66:771–82. <https://doi.org/10.1002/ana.21715>.
41. Velinov M, Novelli A, Gu H, Fenko M, Dolzhanskaya N, Bernardini L, et al. De-novo 2.15 Mb terminal Xq duplication involving MECP2 but not LICAM gene in a male patient with mental retardation. *Clin Dysmorphol.* 2009;18:9–12. <https://doi.org/10.1097/mcd.0b013e3283157ead>.
42. Echenne B, Roubertie A, Lugtenberg D, Kleefstra T, Hamel BCJ, Van Bokhoven H, et al. Neurologic aspects of MECP2 gene duplication in male patients. *Pediatr Neurol.* 2009;41:187–91. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2009.03.012>.
43. Kirk EP, Malaty-Brevaud V, Martini N, Lacosse C, Levy N, Maclean K, et al. The clinical variability of the MECP2 duplication syndrome: description of two families with duplications excluding LICAM and FLNA. *Clin Genet.* 2009;75:301–3. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2008.01102.x>.
44. Bartsch O, Gebauer K, Lechno S, van Esch H, Froyen G, Bonin M, et al. Four unrelated patients with lubs X-linked mental retardation syndrome and different Xq28 duplications. *Am J Med Genet A.* 2010;152A:305–12. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.33198>.
45. Honda S, Hayashi S, Imoto I, Toyama J, Okazawa H, Nakagawa E, et al. Copy-number variations on the X chromosome in Japanese patients with mental retardation detected by array-based comparative genomic hybridization analysis. *J Hum Genet.* 2010;55:590–9. <https://doi.org/10.1038/jhg.2010.74>.
46. Belligni EF, Palmer RW, Hennekam RCM. MECP2 duplication in a patient with congenital central hypoventilation. *Am J Med Genet A.* 2010;152A:1591–3. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.33311>.
47. Campos M, Churchman SM, Santos-Rebouças CB, Ponchel F, Pimentel MMG. High frequency of nonrecurrent MECP2 duplications among Brazilian males with mental retardation. *J Mol Neurosci MN.* 2010;41:105–9. <https://doi.org/10.1007/s12031-009-9296-2>.
48. Fernández RM, Núñez-Torres R, González-Meneses A, Antiñolo G, Borrego S. Novel association of severe neonatal encephalopathy and Hirschsprung disease in a male with a duplication at the Xq28 region. *BMC Med Genet.* 2010;11:137. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-11-137>.
49. Kroes HY. Chromosomal abnormalities resembling Joubert syndrome: two cases illustrating the diagnostic pitfalls 2011.
50. Neill NJ, Ballif BC, Lamb AN, Parikh S, Ravnan JB, Schultz RA, et al. Recurrence, submicroscopic complexity, and potential clinical relevance of copy gains detected by array CGH that are shown to be unbalanced insertions by FISH. *Genome Res.* 2011;21:535–44. <https://doi.org/10.1101/gr.114579.110>.
51. Budisteanu M, Papuc SM, Tutulan-Cunita A, Budisteanu B, Arghir A. Novel clinical finding in MECP2 duplication syndrome. *Eur Child Adolesc Psychiatry.* 2011;20:373–5. <https://doi.org/10.1007/s00787-011-0184-2>.
52. Breman AM, Ramocki MB, Kang S-HL, Williams M, Freedenberg D, Patel A, et al. MECP2 duplications in six patients with complex sex chromosome rearrangements. *Eur J Hum Genet.* 2011;19:409–15. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2010.195>.
53. Jezela-Stanek A, Ciara E, Juszcak M, Pelc M, Materna-Kiryłuk A, Krajewska-Walasek M. Cryptic x; autosome translocation in a


- boy—delineation of the phenotype. *Pediatr Neurol.* 2011;44:221–4. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2010.10.007>.
54. Carvalho CMB, Ramocki MB, Pehlivan D, Franco LM, Gonzaga-Jauregui C, Fang P, et al. Inverted genomic segments and complex triplication rearrangements are mediated by inverted repeats in the human genome. *Nat Genet.* 2011;43:1074–81. <https://doi.org/10.1038/ng.944>.
 55. Honda S, Hayashi S, Nakane T, Imoto I, Kurosawa K, Mizuno S, et al. The incidence of hypoplasia of the corpus callosum in patients with dup (X)(q28) involving MECP2 is associated with the location of distal breakpoints. *Am J Med Genet A.* 2012;158A:1292–303. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.35321>.
 56. Honda S, Satomura S, Hayashi S, Imoto I, Nakagawa E, Goto Y, et al. Concomitant microduplications of MECP2 and ATRX in male patients with severe mental retardation. *J Hum Genet.* 2012;57:73–7. <https://doi.org/10.1038/jhg.2011.131>.
 57. Van Esch H. MECP2 Duplication Syndrome. *Mol Syndromol.* 2012;2:128–36. <https://doi.org/10.1159/000329580>.
 58. de Palma L, Boniver C, Cassina M, Toldo I, Nosadini M, Clementi M, et al. Eating-induced epileptic spasms in a boy with MECP2 duplication syndrome: insights into pathogenesis of genetic epilepsies. *Epileptic Disord.* 2012;14:414–7. <https://doi.org/10.1684/epd.2012.0546>.
 59. Vignoli A, Borgatti R, Peron A, Zucca C, Ballarati L, Bonaglia C, et al. Electroclinical pattern in MECP2 duplication syndrome: eight new reported cases and review of literature. *Epilepsia.* 2012;53:1146–55. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2012.03501.x>.
 60. Sanmann JN, Bishay DL, Starr LJ, Bell CA, Pickering DL, Stevens JM, et al. Characterization of six novel patients with MECP2 duplications due to unbalanced rearrangements of the X chromosome. *Am J Med Genet A.* 2012;158A:1285–91. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.35347>.
 61. Xu X, Xu Q, Zhang Y, Zhang X, Cheng T, Wu B, et al. A case report of Chinese brothers with inherited MECP2-containing duplication: autism and intellectual disability, but not seizures or respiratory infections. *BMC Med Genet.* 2012;13:75. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-13-75>.
 62. Utine GE, Kiper PÖ, Alanay Y, Haliloğlu G, Aktaş D, Boduroğlu K, et al. Searching for copy number changes in nonsyndromic X-linked intellectual disability. *Mol Syndromol.* 2012;2:64–71. <https://doi.org/10.1159/000334289>.
 63. Tang SS, Fernandez D, Lazarou LP, Singh R, Fallon P. MECP2 triplication in 3 brothers - a rarely described cause of familial neurological regression in boys. *Eur J Paediatr Neurol EJPEN Off J Eur Paediatr Neurol Soc.* 2012;16:209–12. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2011.07.011>.
 64. Lund C, Brodtkorb E, Røsby O, Rødningen OK, Selmer KK. Copy number variants in adult patients with Lennox-Gastaut syndrome features. *Epilepsy Res.* 2013;105:110–7. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2013.01.009>.
 65. Peters SU, Hundley RJ, Wilson AK, Warren Z, Vehorn A, Carvalho C, et al. The behavioral phenotype in MECP2 duplication syndrome: a comparison to idiopathic autism. *Autism Res Off J Int Soc Autism Res.* 2013;6:42–50. <https://doi.org/10.1002/aur.1262>.
 66. Peters SU, Hundley RJ, Wilson AK, Carvalho CMB, Lupski JR, Ramocki MB. Brief report: regression timing and associated features in MECP2 duplication syndrome. *J Autism Dev Disord.* 2013;43:2484–90. <https://doi.org/10.1007/s10803-013-1796-9>.
 67. Shimada S, Okamoto N, Ito M, Arai Y, Momosaki K, Togawa M, et al. MECP2 duplication syndrome in both genders. *Brain Dev.* 2013;35:411–9. <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2012.07.010>.
 68. Yamamoto T, Shimojima K, Shimada S, Yokochi K, Yoshitomi S, Yanagihara K, et al. Clinical impacts of genomic copy number gains at Xq28. *Hum Genome Var.* 2014;1:14001. <https://doi.org/10.1038/hgv.2014.1>.
 69. Caumes R, Boespflug-Tanguy O, Villeneuve N, Lambert L, Delanoe C, Leheup B, et al. Late onset epileptic spasms is frequent in MECP2 gene duplication: electroclinical features and long-term follow-up of 8 epilepsy patients. *Eur J Paediatr Neurol.* 2014;18:475–81. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2014.03.005>.
 70. Fukushi D, Yamada K, Nomura N, Naiki M, Kimura R, Yamada Y, et al. Clinical characterization and identification of duplication breakpoints in a Japanese family with Xq28 duplication syndrome including MECP2. *Am J Med Genet A.* 2014;164A:924–33. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36373>.
 71. Nascimento FA, Faghfoury H, Krings T, Ali A, Fridhandler JD, Lozano A, et al. Deep brain stimulation for the management of seizures in MECP2 duplication syndrome. *Seizure.* 2014;23:405–7. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2014.01.021>.
 72. Yi Z, Wang S, Li L, Wu H, Ma Y, Qi Y, et al. Diagnosis of MECP2 duplication syndrome with molefication genetic techniques. *Zhonghua Er Ke Za Zhi Chin J Pediatr.* 2014;52:937–41.
 73. Wang Y, Zhang J, Qin L, Meng L, Jiang T, Ma D, et al. Single nucleotide polymorphism array detection of Xq28 duplication in a child with mental retardation. *Zhonghua Er Ke Za Zhi Chin J Pediatr.* 2014;52:227–8.
 74. Lin D-S, Chuang T-P, Chiang M-F, Ho C-S, Hsiao C-D, Huang Y-W, et al. De novo MECP2 duplication derived from paternal germ line result in dysmorphism and developmental delay. *Gene.* 2014;533:78–85. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.10.001>.
 75. Chow C, H M Lai A. Cytogenomic delineation and clinical characterization of three cases of MECP2 duplication syndrome. *J Clin Med Genomics* 2015;3. <https://doi.org/10.4172/2472-128X.1000125>.
 76. Bauer M, Kölsch U, Krüger R, Unterwalder N, Hameister K, Kaiser FM, et al. Infectious and immunologic phenotype of MECP2 duplication syndrome. *J Clin Immunol.* 2015;35:168–81. <https://doi.org/10.1007/s10875-015-0129-5>.
 77. Zhang Q, Zhao Y, Yang Y, Bao X. MECP2 duplication syndrome in a Chinese family. *BMC Med Genet.* 2015;16:112. <https://doi.org/10.1186/s12881-015-0264-0>.
 78. Voinova VY, Vorsanova SG, Yurov YB, Kolotiy AD, Davidova YI, Demidova IA, et al. Clinical and genetic characteristics of the X chromosome distal long arm microduplications encompassing the MECP2 gene. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova.* 2015;115(10):6. <https://doi.org/10.17116/jnevro201511510110-16>.
 79. Magini P, Poscente M, Ferrari S, Vargiolu M, Bacchelli E, Graziano C, et al. Cytogenetic and molecular characterization of a recombinant X chromosome in a family with a severe neurologic phenotype and macular degeneration. *Mol Cytogenet.* 2015;8:58. <https://doi.org/10.1186/s13039-015-0164-1>.
 80. Yi Z, Pan H, Li L, Wu H, Wang S, Ma Y, et al. Chromosome Xq28 duplication encompassing MECP2: clinical and molecular analysis of 16 new patients from 10 families in China. *Eur J Med Genet.* 2016;59:347–53. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2016.05.004>.
 81. El Chehadeh S, Faivre L, Mosca-Boidron A-L, Malan V, Amiel J, Nizon M, et al. Large national series of patients with Xq28 duplication involving MECP2: delineation of brain MRI abnormalities in 30 affected patients. *Am J Med Genet A.* 2016;170A:116–29. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.37384>.
 82. Ha K, Shen Y, Graves T, Kim C-H, Kim H-G. The presence of two rare genomic syndromes, 1q21 deletion and Xq28 duplication, segregating independently in a family with intellectual disability. *Mol Cytogenet.* 2016;9:74. <https://doi.org/10.1186/s13039-016-0286-0>.
 83. Tug E, Ergun MA, Percin EF. MECP2 duplication syndrome with additional findings. *Genet Couns Geneva Switz.* 2016;27:471–8.
 84. Trobaugh-Lotrario A, Martin J, López-Terrada D. Hepatoblastoma in a male with MECP2 duplication syndrome. *Am J Med Genet A.* 2016;170:790–1. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.37474>.
 85. Lim Z, Downs J, Wong K, Ellaway C, Leonard H. Expanding the clinical picture of the MECP2 duplication syndrome. *Clin Genet.* 2017;91:557–63. <https://doi.org/10.1111/cge.12814>.

86. Moirangthem A, Tuteja Bhatia M, Srivastava P, Mandal K, Rai A, Phadke SR. Expansion of the phenotypic spectrum in three families of methyl CpG-binding protein 2 duplication syndrome. *Clin Dysmorphol*. 2017;26:73–7. <https://doi.org/10.1097/MCD.0000000000000171>.
87. Tsuji-Hosokawa A, Matsuda N, Kurosawa K, Kashimada K, Morio T. A case of MECP2 duplication syndrome with gonadotropin-dependent precocious puberty. *Horm Res Paediatr*. 2017;87:271–6. <https://doi.org/10.1159/000449222>.
88. Yon DK, Park JE, Kim SJ, Shim SH, Chae KY. A sibship with duplication of Xq28 inherited from the mother; genomic characterization and clinical outcomes. *BMC Med Genet*. 2017;18:30. <https://doi.org/10.1186/s12881-017-0394-7>.
89. Tang D-X, Li D-F, Wu R-H, Zhang L-N, Luo X-Y [MECP2 duplication syndrome: a clinical analysis of three cases and literature review]. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi Chin J Contemp Pediatr*. 2017;19:489–93.
90. Li X, Xie H, Chen Q, Yu X, Yi Z, Li E, et al. Clinical and molecular genetic characterization of familial MECP2 duplication syndrome in a Chinese family. *BMC Med Genet*. 2017;18:131. <https://doi.org/10.1186/s12881-017-0486-4>.
91. Deshwar AR, Dupuis L, Bergmann C, Stavropoulos J, Mendoza-Londono R. Severe rhizomelic shortening in a child with a complex duplication/deletion rearrangement of chromosome X. *Am J Med Genet A*. 2018;176:450–4. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.38570>.
92. Miguet M, Faivre L, Amiel J, Nizon M, Touraine R, Prieur F, et al. Further delineation of the MECP2 duplication syndrome phenotype in 59 French male patients, with a particular focus on morphological and neurological features. *J Med Genet*. 2018;55:359–71. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2017-104956>.
93. Giudice-Nairn P, Downs J, Wong K, Wilson D, Ta D, Gattas M, et al. The incidence, prevalence and clinical features of MECP2 duplication syndrome in Australian children. *J Paediatr Child Health*. 2019;55:1315–22. <https://doi.org/10.1111/jpc.14399>.
94. Jiang C, Pan N, Lyu W, Peng Y, Liu J, Guo R, et al. Molecular diagnosis and functional study of a pedigree affected with Lubs X-linked mental retardation syndrome. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi Zhonghua Yixue Yichuanxue Zazhi Chin J Med Genet*. 2019;36:340–3. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2019.04.012>.
95. Peters SU, Fu C, Suter B, Marsh E, Benke TA, Skinner SA, et al. Characterizing the phenotypic effect of Xq28 duplication size in MECP2 duplication syndrome. *Clin Genet*. 2019;95:575–81. <https://doi.org/10.1111/cge.13521>.
96. Hirabayashi K, Uehara DT, Abe H, Ishii A, Moriyama K, Hirose S, et al. Copy number variation analysis in 83 children with early-onset developmental and epileptic encephalopathy after targeted resequencing of a 109-epilepsy gene panel. *J Hum Genet*. 2019;64:1097–106. <https://doi.org/10.1038/s10038-019-0661-x>.
97. Pascual-Alonso A, Blasco L, Vidal S, Gean E, Rubio P, O'Callaghan M, et al. Molecular characterization of Spanish patients with MECP2 duplication syndrome. *Clin Genet*. 2020;97:610–20. <https://doi.org/10.1111/cge.13718>.
98. Choi Y-LJ, Wong T-KM, Ng KKD. Anesthetic management for a patient with MECP2 duplication syndrome: a case report. *AA Pract*. 2020;14(6):e01202. <https://doi.org/10.1213/XAA.0000000000001202>.
99. Tekendo-Ngongang C, Dahoun S, Nguefack S, Moix I, Gimelli S, Zambo H, et al. MECP2 duplication syndrome in a patient from Cameroon. *Am J Med Genet A*. 2020;182:619–22. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.61510>.
100. van Baelen A, Verhoustraeten L, Kenis S, Meuwissen M, Boudewyns A, van Hoorenbeeck K, et al. Sleep-disordered breathing and nocturnal hypoventilation in children with the MECP2 duplication syndrome: a case series and review of the literature. *Am J Med Genet A*. 2020. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.61790>.
101. Liu J, Xi H, Peng Y, Pang J, Hu J, Ma N, et al. Genetic analysis of a pedigree with MECP2 duplication syndrome. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi Zhonghua Yixue Yichuanxue Zazhi Chin J Med Genet*. 2020;37:1146–9. <https://doi.org/10.3760/cma.j.cn511374-20191014-00525>.
102. Gutiérrez-Sánchez AM, Marín-Andrés M, López-Lafuente A, Monge-Galindo L, López-Pisón J, Peña-Segura JL. Familial MECP2 duplication syndrome. *Rev Neurol*. 2020;70:309–10.
103. Takeguchi R, Takahashi S, Akaba Y, Tanaka R, Nabatame S, Kurosawa K, et al. Early diagnosis of MECP2 duplication syndrome: insights from a nationwide survey in Japan. *J Neurol Sci*. 2021;422:117321. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2021.117321>.
104. Lubs H, Abidi F, Bier J-AB, Abuelo D, Ouzts L, Voeller K, et al. XLMR syndrome characterized by multiple respiratory infections, hypertelorism, severe CNS deterioration and early death localizes to distal Xq28. *Am J Med Genet*. 1999;85:243–8. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-8628\(19990730\)85:3%3C243::AID-AJMG11%3E3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-8628(19990730)85:3%3C243::AID-AJMG11%3E3.0.CO;2-E).
105. Bauer M, Krüger R, Kölsch U, Unterwalder N, Meisel C, Wahn V, et al. Antibiotic prophylaxis, immunoglobulin substitution and supportive measures prevent infections in MECP2 duplication syndrome. *Pediatr Infect Dis J*. 2018;37:466–8. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000001799>.
106. Yang T, Ramocki MB, Neul JL, Lu W, Roberts L, Knight J, et al. Overexpression of methyl-CpG binding protein 2 impairs T(H)1 responses. *Sci Transl Med*. 2012;4:163158. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004430>.
107. Cronk JC, Herz J, Kim TS, Louveau A, Moser EK, Sharma AK, et al. Influenza A induces dysfunctional immunity and death in MeCP2-overexpressing mice. *JCI Insight*. 2017;2:e88257. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.88257>.
108. Moynagh PN. The NF-kappaB pathway. *J Cell Sci*. 2005;118:4589–92. <https://doi.org/10.1242/jcs.02579>.
109. Singer JW, Fleischman A, Al-Fayoumi S, Mascarenhas JO, Yu Q, Agarwal A. Inhibition of interleukin-1 receptor-associated kinase 1 (IRAK1) as a therapeutic strategy. *Oncotarget*. 2018;9:33416–39.
110. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2004;4:499–511. <https://doi.org/10.1038/nri1391>.
111. Uematsu S, Sato S, Yamamoto M, Hirotsu T, Kato H, Takeshita F, et al. Interleukin-1 receptor-associated kinase-1 plays an essential role for Toll-like receptor (TLR)7- and TLR9-mediated interferon- α induction. *J Exp Med*. 2005;201:915–23. <https://doi.org/10.1084/jem.20042372>.
112. Jain A, Kaczanowska S, Davila E. IL-1 receptor-associated kinase signaling and its role in inflammation, cancer progression, and therapy resistance. *Front Immunol*. 2014;5:553. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00553>.
113. Vidya MK, Kumar VG, Sejian V, Bagath M, Krishnan G, Bhatta R. Toll-like receptors: significance, ligands, signaling pathways, and functions in mammals. *Int Rev Immunol*. 2018;37:20–36. <https://doi.org/10.1080/08830185.2017.1380200>.
114. Antonczyk A, Krist B, Sajek M, Michalska A, Piaszyk-Borychowska A, Plens-Galaska M, et al. Direct inhibition of IRF-dependent transcriptional regulatory mechanisms associated with disease. *Front Immunol* 2019;10.
115. Della Mina E, Borghesi A, Zhou H, Bougarn S, Boughorbel S, Israel L, et al. Inherited human IRAK-1 deficiency selectively impairs TLR signaling in fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114:E514–23. <https://doi.org/10.1073/pnas.1620139114>.
116. Nageshappa S, Carromeu C, Trujillo CA, Mesci P, Espuny-Camacho I, Pasciuto E, et al. Altered neuronal network and rescue in a human MECP2 duplication model. *Mol Psychiatry*. 2016;21:178–88. <https://doi.org/10.1038/mp.2015.128>.
117. von Bemuth H, Picard C, Jin Z, Pankla R, Xiao H, Ku C-L, et al. Pyogenic bacterial infections in humans with MyD88 deficiency. *Science*. 2008;321:691–6. <https://doi.org/10.1126/science.1158298>.
118. Heller S, Kölsch U, Magg T, Krüger R, Scheuern A, Schneider H, et al. T cell impairment is predictive for a severe clinical course in NEMO deficiency. *J Clin Immunol*. 2020;40:421–34. <https://doi.org/10.1007/s10875-019-00728-y>.

119. Peters SU, Hundley RJ, Wilson AK, Warren Z, Vehom A, Carvalho CMB, et al. The behavioral phenotype in *MECP2* duplication syndrome: a comparison with idiopathic autism: behavioral phenotype in *MECP2* duplications. *Autism Res.* 2013;6:42–50. <https://doi.org/10.1002/aur.1262>.
120. Dakhama A, Al Mubarak R, Pavelka N, Voelker D, Seibold M, Ledford JG, et al. Tollip inhibits ST2 signaling in airway epithelial cells exposed to type 2 cytokines and rhinovirus. *J Innate Immun.* 2020;12:103–15. <https://doi.org/10.1159/000497072>.
121. Ganesan S, Pham D, Jing Y, Farazuddin M, Hudy MH, Unger B, et al. TLR2 activation limits rhinovirus-stimulated CXCL-10 by attenuating IRAK-1-dependent IL-33 receptor signaling in human bronchial epithelial cells. *J Immunol.* 2016;197:2409–20. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502702>.
122. Bluhmki T, Traub S, Müller A-K, Bitzer S, Schruf E, Bammert M-T, et al. Functional human iPSC-derived alveolar-like cells cultured in a miniaturized 96-transwell air-liquid interface model. *Sci Rep.* 2021;11:17028. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96565-4>.
123. Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Abel L, Casanova J-L. Mendelian susceptibility to mycobacterial disease: genetic, immunological, and clinical features of inborn errors of IFN- γ immunity. *Semin Immunol.* 2014;26:454–70. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.09.008>.
124. Rosain J, Kong X-F, Martínez-Barricarte R, Oleaga-Quintas C, Ramirez-Alejo N, Markle J, et al. Mendelian susceptibility to mycobacterial disease: 2014–2018 update. *Immunol Cell Biol.* 2019;97:360–7. <https://doi.org/10.1111/imcb.12210>.
125. Ciancanelli MJ, Huang SXL, Luthra P, Garner H, Itan Y, Volpi S, et al. Infectious disease Life-threatening influenza and impaired interferon amplification in human IRF7 deficiency. *Science.* 2015;348:448–53. <https://doi.org/10.1126/science.aaa1578>.
126. Zhang Q, Bastard P, Liu Z, Le Pen J, Moncada-Velez M, Chen J, et al. Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19. *Science* 2020;370:eabd4570. <https://doi.org/10.1126/science.abd4570>.
127. York MR, Nagai T, Mangini AJ, Lemaire R, van Seventer JM, Lafyatis R. A macrophage marker, siglec-1, is increased on circulating monocytes in patients with systemic sclerosis and induced by type I interferons and toll-like receptor agonists. *Arthritis Rheum.* 2007;56:1010–20. <https://doi.org/10.1002/art.22382>.
128. Biesen R, Demir C, Barkhudarova F, Grün JR, Steinbrich-Zöllner M, Backhaus M, et al. Sialic acid-binding Ig-like lectin 1 expression in inflammatory and resident monocytes is a potential biomarker for monitoring disease activity and success of therapy in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2008;58:1136–45. <https://doi.org/10.1002/art.23404>.
129. Shao Y, Sztainberg Y, Wang Q, Bajikar SS, Trostle AJ, Wan Y-W, et al. Antisense oligonucleotide therapy in a humanized mouse model of *MECP2* duplication syndrome. *Sci Transl Med* 2021;13:eaaz7785. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaz7785>.

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Authors and Affiliations

Ilona Gottschalk^{1,2} · Uwe Kölsch³ · Dimitrios L. Wagner^{2,4,5,6} · Jonas Kath^{2,4} · Stefania Martini² · Renate Krüger¹ · Anne Puel^{7,8} · Jean-Laurent Casanova^{7,8,9,10,11} · Aleksandra Jezela-Stanek¹² · Rainer Rossi¹³ · Salima El Chehadeh¹⁴ · Hilde Van Esch¹⁵ · Horst von Bernuth^{1,2,3,16} 

¹ Department of Pediatric Respiratory Medicine, Immunology and Critical Care Medicine, Charité-Universitätsmedizin Berlin, corporate member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin, and Berlin Institute of Health (BIH), Berlin, Germany

² Berlin-Brandenburg Center for Regenerative Therapies (BCRT), Berlin Institute of Health (BIH), Charité-Universitätsmedizin Berlin, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin, Germany

³ Labor Berlin GmbH, Department of Immunology, Berlin, Germany

⁴ Berlin Center for Advanced Therapies (BeCAT), Charité-Universitätsmedizin Berlin, Corporate Member of Freie Universität, Berlin, Humboldt-Universität Zu Berlin, and Berlin Institute of Health (BIH), Berlin, Germany

⁵ Institute of Transfusion Medicine, Charité-Universitätsmedizin Berlin, corporate member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin, and Berlin Institute of Health (BIH), Berlin, Germany

⁶ Institute of Medical Immunology, Charité-Universitätsmedizin Berlin, corporate member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin, and Berlin Institute of Health (BIH), Campus Virchow-Klinikum, Berlin, Germany

⁷ Laboratory of Human Genetics of Infectious Diseases, Necker Branch, INSERM U1163, Necker Hospital for Sick Children, Paris, France

⁸ Imagine Institute, University of Paris, Paris, France

⁹ St. Giles Laboratory of Human Genetics of Infectious Diseases, Rockefeller Branch, The Rockefeller University, New York, NY, USA

¹⁰ Howard Hughes Medical Institute, New York, NY, USA

¹¹ Pediatric Hematology and Immunology Unit, Necker Hospital for Sick Children, AP-HP Paris, France

¹² Department of Genetics and Clinical Immunology, National Institute of Tuberculosis and Lung Diseases, Warsaw, Poland

¹³ Childrens' Hospital Neukölln, Vivantes GmbH, Berlin, Germany

¹⁴ Institute of Medical Genetics of Alsace (IGMA), Strasbourg, France

¹⁵ Center for Human Genetics, University Hospitals Leuven, Louvain, Belgium

¹⁶ Berlin Institute of Health, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Komplette Publikationsliste

Originalarbeit mit Peer-Review-Verfahren

Gottschalk I, Kölsch U, Wagner DL, Kath J, Martini S, Krüger R, Puel A, Casanova JL, Jezela-Stanek A, Rossi R, Chehadeh SE, Van Esch H, von Bernuth H. IRAK1 Duplication in MECP2 Duplication Syndrome Does Not Increase Canonical NF- κ B-Induced Inflammation. *J Clin Immunol.* 2023 Feb;43(2):421-439. doi: 10.1007/s10875-022-01390-7. Epub 2022 Nov 2. PMID: 36319802; PMCID: PMC9628328.

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Horst von Bernuth, der mich einerseits exzellent wissenschaftlich betreut hat, mich ebenso wunderbar persönlich und beruflich beraten hat und stets für mich da war.

Ebenso bedanken möchte ich mich bei meiner Arbeitsgruppe für ihre technische Hilfestellung bei der Durchführung und Auswertung der Experimente: Dr. med. Uwe Kölsch, Dr. rer. nat. Stephanie Heller, Dr. med. Christian Meisel und Christine Seib.

Ein großes Dankeschön möchte ich an die wundervollen Kolleginnen und Kollegen aus anderen Arbeitsgruppen in dem Labor aussprechen, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen: Dr. Dimitrios Laurin Wagner, Stefania Martini und Jonas Kath.

Danke auch an alle die Kolleginnen und Kollegen aus dem Labor Berlin, aus der Immundefektambulanz der Charité und aus der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Pneumologie, Immunologie und Intensivmedizin unter Leitung von Prof. Dr. med. Marcus Mall.

Vielen Dank an meinen Vater Wolfgang Gottschalk für das Korrekturlesen.

Meiner Familie, meiner Freundin Amélie Göhlich und meinem Partner Thibaud Delaye danke ich für die unentwegte persönliche Unterstützung während meines Studiums und meiner Dissertation.

Mein besonderer Dank gilt allen Patienten, ihren Eltern und ihren Ärztinnen und Ärzten.