

Aus der Klinik für Kinderheilkunde mit Schwerpunkt  
Pneumologie und Immunologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Erhöhte Infektanfälligkeit bei Patienten mit  
*MECP2* Duplikations Syndrom:  
Infektiologisch-immunologische Phänotypisierung und  
*in vitro*-Untersuchung der Akut-Phase-Reaktion

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Michael Bauer

aus München

Datum der Promotion: 07.12.2018

## **Vorbemerkung**

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

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, Wieczorek D, El-Chehadeh S, Van Esch H, von Bernuth H. Infectious and immunologic phenotype of MECP2 duplication syndrome. *J Clin Immunol.* 2015 Feb;35(2):168-81. doi: 10.1007/s10875-015-0129-5. PubMed PMID: 25721700.

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	5
Abstract .....	7
1. Einleitung .....	9
1.1. Das <i>MECP2</i> Duplikations Syndrom .....	9
1.2. Diagnostik primärer Immundefekte .....	10
1.3. Die Akut-Phase-Reaktion .....	12
1.4. Rolle von IRAK1 im TLR-/IL1R-Signalweg.....	14
1.5. Bekannte Defekte im TLR-/IL1R-Signalweg .....	18
1.6. Bisherige Erkenntnisse zum immunologischen Phänotyp von Patienten mit <i>MECP2</i> Duplikations Syndrom.....	19
1.6.1. Humorale Immunität .....	19
1.6.2. Zelluläre Immunität .....	20
2. Zielsetzung und Hypothese .....	21
3. Material und Methoden .....	22
3.1. Votum der Ethikkommission .....	22
3.2. Patientenrekrutierung .....	22
3.3. Material .....	23
3.3.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien .....	23
3.3.2. Chemikalien .....	24
3.3.3. Lösungen .....	25
3.3.4. Zytokine, TLR-Agonisten, Antigene, Mitogene.....	25
3.3.5. Kits.....	26
3.3.6. Antikörper für die Durchflusszytometrie (FACS) .....	26
3.3.7. Western-Blot-Antikörper .....	27
3.4. Methoden .....	27
3.4.1. Fragebogendesign .....	27
3.4.2. Blutbild .....	28
3.4.3. Lymphozytenoberflächenmarker .....	28
3.4.4. Lymphozytentransformationstest.....	29
3.4.5. IFN $\gamma$ -Produktion nach ConA-Stimulation .....	29
3.4.6. Messung der Immunglobulin-Isotypen und -Subklassen.....	30
3.4.7. Impfantikörper .....	30
3.4.8. Zellkultur mit SV-40-immortalisierten Fibroblasten.....	31
3.4.9. Detektion von IRAK1-Expression und IRAK1-Abbau mittels Western- Blot .....	33
3.4.10. Densitometrische Auswertung.....	36

3.4.11.	Messung der NFkB-Translokation in den Zellkern von SV-40-immortalisierten Fibroblasten nach Stimulation mit IL-1 $\beta$ .....	36
3.4.12.	Interleukin-6-Produktion in Fibroblasten .....	39
3.4.13.	Interleukin-6-Produktion in Vollblut .....	40
4.	Ergebnisse .....	42
4.1.	Infektiologisch-immunologische Phänotypisierung .....	42
4.1.1.	Charakterisierung der Studienkohorte .....	42
4.1.2.	Infektiologischer Phänotyp .....	43
4.1.3.	Immunologischer Phänotyp .....	48
4.1.3.1.	Zelluläre Immunität .....	48
4.1.3.2.	Humorale Immunität .....	53
4.1.4.	Inflammatorischer Phänotyp .....	58
4.2.	<i>In vitro</i> Untersuchung der Akut-Phase-Reaktion .....	59
4.2.1.	IRAK1-Expression und Abbau .....	60
4.2.2.	NFkB-Translokation mittels Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) .....	62
4.2.3.	Interleukin-6-Produktion in Fibroblasten nach Aktivierung mit Interleukin-1 $\beta$ .....	64
4.2.4.	Interleukin-6-Produktion in Vollblut .....	65
5.	Diskussion .....	67
5.1.	Infektiologisch-immunologische Phänotypisierung .....	67
5.1.1.	Infektiologischer Phänotyp .....	67
5.1.2.	Immunologischer Phänotyp .....	68
5.2.	<i>In vitro</i> Untersuchung der Akut-Phase-Reaktion .....	71
5.2.1.	IRAK1-Expression und Abbau .....	71
5.2.2.	NFkB-Translokation mittels Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) .....	72
5.2.3.	Interleukin-6-Produktion in Fibroblasten nach Aktivierung mit Interleukin-1 $\beta$ .....	73
5.2.4.	Interleukin-6-Produktion in Vollblut .....	75
5.3.	Beantwortung der Forschungsfragen .....	77
5.4.	Beantwortung der Forschungshypothese .....	79
5.5.	Fazit und Ausblick .....	79
	Literaturverzeichnis .....	81
	Abkürzungsverzeichnis .....	96
	Eidesstattliche Versicherung .....	98
	Lebenslauf .....	100
	Publikationsliste .....	101
	Danksagung .....	103

## Zusammenfassung

Die Duplikation des *MECP2* (methyl CpG binding protein 2) - Gens führt zu einer schweren, syndromalen Form von Intelligenzminderung. Darüber hinaus leiden Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom oft an lebensbedrohlichen Infektionen, was für das zusätzliche Vorliegen eines Immundefekts spricht. Im ersten Teil dieser Arbeit wird der infektiologische und immunologische Phänotyp des *MECP2* Duplikations Syndroms erstmalig detailliert und systematisch beschrieben. 17 von 27 Patienten litten an Pneumonien, 5 von 27 Patientin hatten mindestens eine Sepsis erlitten. Das Erregerspektrum umfasste hauptsächlich bekapselte Bakterien (*S. pneumoniae*, *H. influenzae*). Bei 6 von 21 Patienten konnte ein IgG2-Mangel nachgewiesen werden – bei 4 von 21 Patienten verbunden mit einem IgA-Mangel. Darüber hinaus konnten bei 10 von 21 Patienten niedrige Pneumokokken-Impfantikörper festgestellt werden. Von den 4 Patienten mit einem IgA/IgG2-Mangel entwickelten 3 Patienten mehrfache, schwere Infektionen. Während infektiöser Episoden waren bei den Patienten häufig ausgeprägte Akut-Phase-Antworten festzustellen: 7 von 10 Patienten wiesen in der Infektion CRP-Werte über 200 mg/l auf.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte die Hypothese überprüft werden, ob diese starken Akut-Phase-Antworten auf die Duplikation des *IRAK1*-Gens zurückzuführen sind, welches – neben dem *MECP2*-Gen gelegen - bei den meisten Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom ebenfalls dupliziert ist und zu einer verstärkten Aktivierung des Toll-like-receptor-/Interleukin-1-receptor-Signalweges führen könnte. In SV40-transfizierten Fibroblasten eines Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom zeigte sich zwar eine erhöhte Expression eines funktionell aktiven IRAK1-Proteins, jedoch im Vergleich zu SV40-transfizierten Fibroblasten von vier gesunden Kontrollpersonen keine erhöhte Interleukin-6-Produktion nach Stimulation mit Interleukin-1 $\beta$ . Allerdings konnte bei der Stimulation von Vollblut mit Interleukin-1 $\beta$  bei 4 von 5 Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom eine höhere Interleukin-6-Produktion als bei Kontrollpersonen festgestellt werden.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass die erhöhte Anfälligkeit von Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom für schwere Infektionen mit einem IgA/IgG2-Mangel, niedrigen Pneumokokken-Antikörpern und einer ausgeprägten Akut-Phase-Antwort assoziiert ist. Die Ätiologie der starken Akut-Phase-Reaktion ist nicht abschließend

geklärt. Es erscheint sinnvoll, Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom gegen Pneumokokken zu impfen und gegebenenfalls Boosterimpfungen durchzuführen. Bei Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom, welche einen IgG2-Mangel und/oder niedrige Pneumokokken-Antikörper nach Impfung aufweisen und an rezidivierenden Infektionen leiden, erscheint die Immunglobulin-Substitution als eine sinnvolle Strategie, um Infektionen zu vermeiden – eventuell in Kombination mit der prophylaktischen Gabe von Antibiotika.

## Abstract

*MECP2* (methyl CpG binding protein 2) duplication causes syndromic intellectual disability. Patients with *MECP2* Duplication Syndrome often suffer from life threatening infections, suggesting an additional immunodeficiency. In the first part of this study the detailed infectious and immunological phenotype of *MECP2* duplication syndrome is described systematically. 17/27 analyzed patients suffered from pneumonia, 5/27 from at least one episode of sepsis. Encapsulated bacteria (*S.pneumoniae*, *H.influenzae*) were frequently isolated. In 6/21 patients IgG2-deficiency was detected – in 4/21 patients accompanied by IgA-deficiency, 10/21 patients showed low antibody titers against pneumococci. Three of the four patients with IgA/IgG2-deficiency developed multiple severe infections. Upon infections pronounced acute-phase responses were common: 7/10 patients showed CRP values above 200 mg/l.

The aim of the second part of this study was to test the hypothesis that these pronounced acute-phase-responses are due to the duplication of the *IRAK1*- gene, which is also duplicated in most patients with *MECP2* Duplication Syndrome and could eventually lead to enhanced Toll-like-receptor/Interleukin-1-receptor-controlled signaling. An increased expression of functional active IRAK1 could be detected in SV40-transfected fibroblasts of a patient with *MECP2* duplication syndrome, but no elevated Interleukin-6 production could be determined in the SV40-transfected fibroblasts of this patient compared to SV40-transfected fibroblasts of four healthy control persons upon stimulation with Interleukin-1 $\beta$ . However, stimulation of whole blood with Interleukin-1 $\beta$  led to higher Interleukin-6 production compared to respective controls in 4 of 5 patients with *MECP2* duplication syndrome.

The data of this study show systematically that increased susceptibility to severe and recurrent infections in *MECP2* duplication syndrome is associated with IgA/IgG2-deficiency, low antibody titers against pneumococci and elevated acute-phase responses. The etiology of the pronounced acute-phase-responses is not yet resolved definitely. It seems plausible to vaccinate patients with *MECP2* duplication syndrome against pneumococci and to perform booster vaccinations if necessary. In patients with *MECP2* duplication syndrome, suffering from recurrent infections, who present with an IgA/IgG2-deficiency and/or low post-vaccination titers against pneumococci prophylactic

substitution of IgG seems a plausible strategy to prevent infections – eventually in combination with the use of prophylactic antibiotics.



## 1. Einleitung

### 1.1. Das *MECP2* Duplikations Syndrom

Die Duplikation des *MECP2* (methyl CpG binding protein 2) - Gens auf Chromosom Xq28 führt zu einer schweren, syndromalen Form von Intelligenzminderung. Die Krankheitsentität wurde klinisch zunächst als Lubs Syndrom beschrieben (1), bevor im Jahr 2005 die Duplikation von *MECP2* als zugrundeliegende genetische Ursache identifiziert wurde (1-3). Bisher sind ca. 350 Patienten mit dem als „*MECP2* Duplikations Syndrom“ bezeichneten Krankheitsbild in der Literatur beschrieben (1-70). Die Prävalenz ist bisher unbekannt. Die bisher durchgeführten Screening-Untersuchungen legen nahe, dass die Duplikation von *MECP2* etwa 1% der Fälle von schwerer X-chromosomal-gebundener Intelligenzminderung verursachen könnte (71).

Die Hauptsymptome des *MECP2* Duplikations Syndroms beinhalten eine Entwicklungsverzögerung mit schwerer Intelligenzminderung und minimaler bis ausbleibender Sprachentwicklung, muskuläre Hypotonie und milde Dysmorphie-Zeichen (71). Fakultativ können Spastizität, Epilepsie und Autismus als weitere neurologische Symptomenkomplexe in unterschiedlicher Kombination und Ausprägung auftreten. In mehreren Fallstudien wird von Patienten berichtet, die zusätzlich zu dem schweren neurologischen Phänotyp auch an rezidivierenden, schweren Infektionen erkranken. Die Infektionen werden als ein Hauptgrund für die frühe Sterblichkeit der Patienten angeführt (71,72).

Mit der Veröffentlichung weiterer Fallstudien wird zunehmend klar, dass nicht nur Jungen von dem X-chromosomal gebundenen Syndrom betroffen sind, sondern auch Mädchen mit gestörter X-Inaktivierung alle Hauptsymptome des Syndroms in gleich starker Ausprägung wie Jungen entwickeln können (37). Die Duplikation auf dem Chromosom Xq28 kann bei Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom verschiedene Größen aufweisen und weitere Gene beinhalten. Bis vor kurzem wurde die Duplikation der Gene *MECP2* und des benachbarten *IRAK1* als die „minimal critical region“ angesehen, welche das Syndrom verursacht (15,17,71). Zwei Fallstudien beschreiben jedoch auch 2 Patienten mit einer alleinigen *MECP2*-Duplikation, welche die Hauptsymptome des Syndroms aufweisen (37,42). Die Duplikationen entstehen zumeist *de novo* mit einigen Ausnahmen, bei denen die Duplikation mütterlicherseits vererbt wurde.

MECP2 ist ein pleiotropes DNA-bindendes Protein, das bevorzugt an methylierte CpGs bindet und die Genexpression reguliert. Mutationen im *MECP2*-Gen verursachen das Rett-Syndrom. Die Duplikation des *MECP2*-Gens wird als ursächlich für die neurologische Symptomatik von Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom angesehen (71). Der Grund für die bei manchen Patienten auftretenden Infektionen ist bislang nicht geklärt. Auf einen möglichen Zusammenhang des immunologischen Phänotyps mit dem *IRAK1*-Gen, das in der Mehrzahl der Patienten neben *MECP2* auch dupliziert ist, wurde zwar mehrfach hingewiesen, ein pathophysiologisches Verständnis für die erhöhte Neigung zu Infektionen fehlt jedoch bisher (10,16). Darüber hinaus wurde bisher kein Versuch unternommen, den immunologischen und infektiologischen Phänotyp der Patienten mittels einer systematischen Datenerhebung zu beschreiben.

## **1.2. Diagnostik primärer Immundefekte**

Angeborene Störungen des Immunsystems werden als „Primäre Immundefekte“ (PID) bezeichnet. Bis heute sind beinahe 300 unterschiedliche, molekulargenetisch definierte primäre Immundefekte beschrieben (73-75). Als kennzeichnend wird meist die pathologische Infektanfälligkeit angesehen, wobei jedoch zu beachten ist, dass Immundefekte nicht immer primär durch Infektionen, sondern auch durch Immundysregulationen, wie Autoimmunerkrankungen, Autoinflammation oder Tumorerkrankungen auffallen können (76,77).

Zur Beurteilung, ob es sich bei wiederholten Infektionen um eine pathologische Infektanfälligkeit handelt, sollten folgende fünf Gesichtspunkte berücksichtigt werden: 1. Art der Erreger, 2. Lokalisation der Erreger, 3. Verlauf, 4. Intensität und 5. Summe der Infektionen. Vor allem Infektionen durch opportunistische Erreger weisen auf einen PID hin. Hinsichtlich der Lokalisation sind es polytope Infektionen, die an Abwehrdefekte denken lassen sollten, die sich systemisch manifestieren. Untypische Lokalisationen für einzelne Erreger weisen ebenfalls auf einen PID hin. Ein unerwartet chronischer Verlauf oder ungewöhnlich schwer verlaufende Infektionen sind weitere Warnhinweise, die für das Vorliegen eines PID sprechen. Hinsichtlich der Summe der Infektionen existiert jedoch kein allgemein anerkannter Cut-Off-Wert, der die pathologische Infektanfälligkeit definiert. Neben der pathologischen Infektanfälligkeit gelten eine indizierte antibiotische Therapie ohne heilenden Effekt, eine Gedeihstörung, Komplikationen nach

Lebendimpfung, eine auffällige Familienanamnese und Laborauffälligkeiten wie etwa Lymphopenie oder Neutropenie als Warnzeichen für einen primären Immundefekt. Im Säuglingsalter können eine persistierende Dermatitis und ein verspäteter Abfall der Nabelschnur hinweisend für einen primären Immundefekt sein (76,77).

In der Abklärung eines möglichen primären Immundefekts stellt die Anamnese den ersten Schritt des diagnostischen Algorithmus dar. Herausragende klinische Befunde können entscheidende Hinweise auf den zugrundeliegenden PID geben, da viele der bereits bekannten, definierten primären Immundefekte mit besonders typischen klinischen Manifestationen einhergehen, wie zum Beispiel „kalte“ Hautabszesse bei Hyper-IgE-Syndrom (78). Die sich anschließende Labordiagnostik kann Befundkonstellationen aufweisen, die ebenfalls typisch für einzelne primäre Immundefekte sind. Ein niedriges CRP trotz schwerer bakterieller Infektionen kommt beispielsweise häufig bei Defekten der „innate immunity“ vor (79). Da viele der unterschiedlichen primären Immundefekte jeweils für Infektionen mit bestimmten Erregern prädisponieren, kommt der Aufdeckung des individuellen Erregerspektrums der Infektionen eine besondere Bedeutung zu. Der IgG2-Subklassendefekt prädisponiert etwa für Infektionen durch bekapselte Bakterien (80). Störungen im IFN $\gamma$ -/IL12-Signalweg führen zu einer Anfälligkeit für schwere, invasive Mykobakterien-Infektionen (81-83).

Klinisch und labordiagnostisch kann somit schon initial im diagnostischen Algorithmus der Verdacht bestehen auf 1. einen humoralen Defekt (B-Zell-System), 2. einen zellulären Defekt (T-Zell-System) oder 3. spezifischere Defekte, wie Zytotoxizitätsdefekte (NK-Zellen), Defekte im Phagozytensystem, Defekte der „innate immunity“ oder Defekte im Komplementsystem (76). Die Abklärung von Defekten der spezifischen humoralen Immunität erfolgt durch die Bestimmung der Immunglobulin-Isotypen (IgG, IgA, IgM), der Impfantikörper (spezifische Antikörper gegenüber Tetanus und Pneumokokken), der B-Zell-Oberflächenmarker und der Immunglobulin-Subklassen (jenseits des 4. Lebensjahres). Besteht der Verdacht auf einen Defekt des T-Zell-Systems bietet sich die Bestimmung und Quantifizierung der T-Zell-Oberflächenmarker inklusive Subpopulationen an. Die Funktionalität der T-Zellen kann im Lymphozytentransformationstest auf Mitogene und Antigene getestet werden (84). Bestimmte Defekte der „innate immunity“ können unter anderem mittels eines funktionellen Assays überprüft werden, in dem die Interleukin-6 Produktion auf Stimulation mit TLR-Agonisten und Interleukin-1 $\beta$  in Vollblut gemessen wird (76,85,86).

Auch bei Verdacht auf Zytotoxizitätsdefekte (NK-Zellen), Defekte im Phagozytensystem oder Defekte im Komplementsystem stehen spezifische Tests zur Verfügung, auf welche hier nicht näher eingegangen wird.

Idealerweise führt der aufgezeigte diagnostische Algorithmus, welcher Defekte in den einzelnen Subsystemen des Immunsystems aufzeigt, dann letztlich zu spezifischer molekulargenetischer Diagnostik, die das Vorliegen eines genetisch definierten primären Immundefekts sichert. In zunehmendem Maße kommt hierfür whole exome sequencing (WES) zum Einsatz (87).

### **1.3. Die Akut-Phase-Reaktion**

In der systematischen Einteilung des Immunsystems wird zwischen der angeborenen Immunität („innate immunity“) und der erworbenen Immunität („adaptive immunity“) unterschieden. Die adaptive Immunantwort ist Antigen-spezifisch, erfordert genetisches Re-arrangement und läuft dadurch vergleichsweise langsam ab. Demgegenüber werden die immunologischen Antworten der angeborenen Immunität über fixierte und evolutionär hochkonservierte Rezeptoren vermittelt und erfordern keine Ausreifung. Aus diesem Grund kann das angeborene Immunsystem auf Pathogene sehr schnell reagieren (88).

Unter dem Begriff der „Akut-Phase-Reaktion“ wird die rasch ablaufende Antwort des angeborenen Immunsystems auf Infektionen und Gewebeschädigungen verstanden, die darauf abzielt, die Homöostase des Organismus wiederherzustellen und unter Aufrechterhaltung der Vitalfunktionen den Grund für die Störung der Homöostase zu beseitigen (89-91). Die Akut-Phase-Reaktion läuft sowohl lokal, als auch systemisch im Sinne von neurologischen, endokrinen und metabolischen Änderungen ab (92). Die charakteristischen Merkmale einer systemisch ablaufenden Akut-Phase-Reaktion sind Fieber, Leukozytose, Anämie, Erhöhung der Gefäßpermeabilität, Aktivierung der Hämostase, hormonelle Veränderungen, Veränderungen im Lipidstoffwechsel, eine verstärkte Gluconeogenese und ein erhöhter Muskelproteinkatabolismus mit Transfer der Aminosäuren vom Muskel in die Leber (89-92).

Der Begriff „Akut-Phase-Reaktion“ wurde 1941 von Abernethy & Avery eingeführt, welche Seren von Patienten mit fieberhaften Krankheitsepisoden untersuchten und dort das C-reaktive Protein (CRP) nachweisen konnten, welches während der febrilen Episoden

gebildet worden war (93,94). Unter der Vielzahl der bis heute beschriebenen Proteine, welche während der Akut-Phase-Reaktion verstärkt exprimiert werden und die systemischen Effekte vermitteln, werden im Menschen vor allem das C-reaktive Protein und Serum-Amyloid-A als „Akut-Phase-Proteine“ verstärkt gebildet (94). Allgemein werden Akut-Phase-Proteine definiert als Proteine, deren Plasma-Konzentration während entzündlicher Krankheitsepisoden um mindestens 25% zunimmt (positive Akut-Phase-Proteine) oder um mindestens 25 % abnimmt (negative Akut-Phase-Proteine) (95). Die Akut-Phase-Proteine werden fast ausschließlich in der Leber gebildet (89). Die Bildung der Akut-Phase-Proteine in der Leber wird vornehmlich durch 2 Gruppen von Zytokinen gesteuert: IL1-Typ-Zytokine und IL6-Typ-Zytokine. Die Zellpopulationen, welche im Rahmen der Akut-Phase-Reaktion die Zytokine bereitstellen, welche schließlich zur Produktion der Akut-Phase-Proteine benötigt werden, sind hauptsächlich Monozyten/Makrophagen und Fibroblasten. Als initial auslösend für den Ablauf der Akut-Phase-Reaktion gelten Monozyten und Makrophagen (92,94).

Die Erkennung der Erreger erfolgt über sogenannte „pathogen associated molecular patterns“ (PAMPs). PAMPs sind Moleküle, welche innerhalb einer Klasse von Erregern konserviert sind und deshalb als charakteristisches Erkennungsmerkmal dieser Klasse von Erregern fungieren. Ein typisches Beispiel für PAMPs ist das Lipopolysaccharid (LPS). Die PAMPs werden über sog. „pattern recognition receptors“ (PRRs) erkannt. Die prototypischen Vertreter der PRRs sind die Toll-like-Rezeptoren (96). Es sind 10 verschiedene Toll-like-Rezeptoren im Menschen beschrieben (97). Sie sind sowohl extrazellulär (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR10) als auch intrazellulär (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9) exprimiert (98). Jeder der Toll-like-Rezeptoren erkennt bestimmte spezifische Komponenten von Pathogenen. So wird etwa LPS vom Toll-like-Rezeptor 4 erkannt. Das Lipopeptid PAM<sub>2</sub>CSK<sub>4</sub> bindet an TLR2/6. Der zytoplasmatische Anteil der Zellmembran-ständigen Toll-like-Rezeptoren weist eine hohe Ähnlichkeit mit der Familie der Interleukin-1-Rezeptoren auf, weshalb dieser auch Toll-/IL1-Rezeptor (TIR)- Domäne genannt wird und die hiervon abhängige Signalkaskade als Toll-like-Rezeptor-/Interleukin-1-Rezeptor-Signalweg bezeichnet wird (99).

#### 1.4. Rolle von IRAK1 im TLR-/IL1R-Signalweg

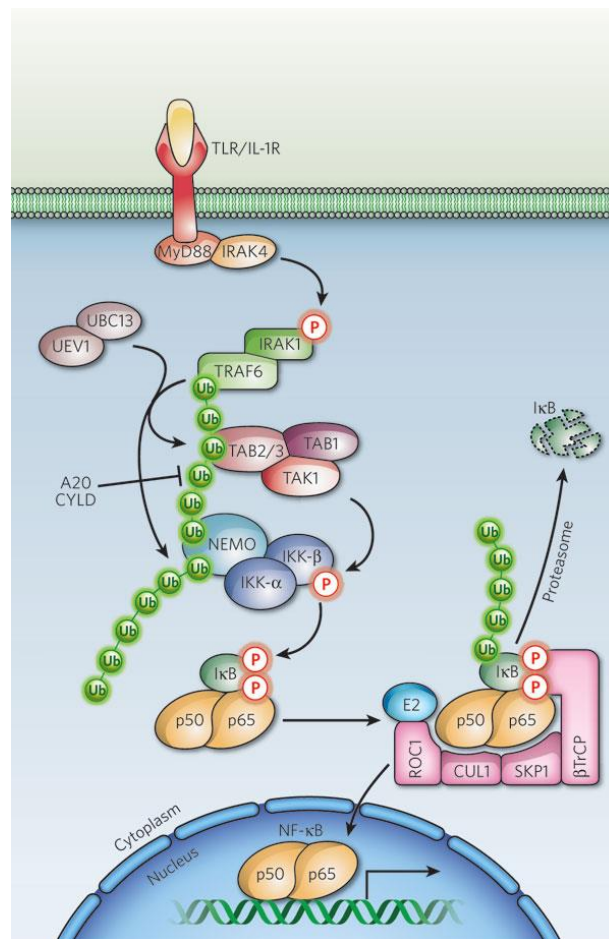
Bis auf 2 Patienten, die kürzlich in Fallstudien beschrieben wurden (37,42), weisen alle der bisher publizierten Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom eine Duplikation auf dem Chromosom Xq28 auf, die zumindest *MECP2* und das benachbarte *IRAK1* umfasst (1-36,38-41,43-70).

Die Interleukin-1 receptor associated kinases (IRAKs) sind Adapterproteine im Toll-like-receptor-/Interleukin-1-Signalweg und somit Vermittler der Abwehrmechanismen der angeborenen Immunität (innate immunity) (100). Die Toll-like-Rezeptoren sind - wie bereits angesprochen - in der Lage, hochkonservierte Motive von Mikroorganismen („pathogen associated molecular patterns“, PAMPS) zu erkennen (101). Interleukin-1 gilt als eines der Schlüssel-Zytokine zur Vermittlung von Inflammation etwa durch die Induktion von Interleukin-6 und TNF $\alpha$ . Der TLR-/IL1R-Signalweg nimmt somit eine wichtige Stellung in der Vermittlung der anti-pathogenen Immunantwort, der Inflammation generell und auch der Autoimmunität ein (102).

Die Familie der IRAK-Proteine besteht aus IRAK1, IRAK2, IRAK-M (auch: IRAK3) und IRAK4. Von diesen 4 IRAK-Proteinen war IRAK1 das erste, für welches eine Rolle im Interleukin-1-Signaling gezeigt wurde (103). Das *IRAK1*-Gen besteht aus 14 Exons und ist auf dem Chromosom Xq28 lokalisiert (104). Das IRAK1 Protein besteht aus 712 Aminosäuren (aa) und hat eine Masse von ~85 kDa. IRAK1 ist ubiquitär in allen menschlichen Körperzellen exprimiert. Es beinhaltet eine N-terminale death domain (aa 1-103), eine undefinierte Domäne (aa 104-198), eine zentrale Kinase-Domäne (aa 199-522) mit einer activation loop (aa 364-388) und die C-terminalen C1- und C2-Domänen (aa 523-618 und aa 619-712) (99). Es existieren 3 Splicevarianten, wobei IRAK1c die prädominante Form von IRAK1 im zentralen Nervensystem ist (105).

Vor der Aktivierung der TLR-/IL1R-Signalkaskade liegt IRAK1 im Cytosol in Bindung an TOLLIP (toll interacting protein) vor (106,107). Die Aktivierung des TLR-/IL1R-Signalweges erfolgt durch die Bindung von Toll-like-Rezeptor-Liganden an die Toll-like-Rezeptoren bzw. die Bindung von Interleukin-1 an den Interleukin-1-Rezeptor, woraufhin der myeloid differentiation factor 88 (MyD88) an den jeweiligen Rezeptor assoziiert und über TIR-Domänen bindet, welche sowohl im TLR-/IL1R-Komplex als auch in MyD88 vorhanden sind. Daraufhin binden sowohl IRAK4, als auch IRAK1 über ihre death domains mit MyD88, wodurch es zur Bildung des Myddosome-Komplexes kommt (108).

IRAK4 phosphoryliert IRAK1 und aktiviert dadurch die Kinaseaktivität von IRAK1, was zur Bildung von hyperphosphoryliertem IRAK1 durch Auto-Phosphorylierung führt. Da MyD88 nur unphosphoryliertes IRAK1 bindet, wird das hyper-phosphorylierte IRAK1 vom Rezeptorkomplex freigesetzt. Auch die Bindung von TOLLIP und IRAK1 löst sich durch die Hyperphosphorylierung. Das zytosolisch frei vorliegende, hyperphosphorylierte IRAK1 geht einen Komplex mit TRAF6 ein, wodurch TRAF6 polyubiquitiniert wird. Dies hat die Bindung von TAK1 mit dem IRAK1-TRAF6-Komplex zur Folge. TAK1 ist für die weitere Vermittlung der Signaltransduktion verantwortlich, indem es den MAP-Kinase-Signalweg und die NFκB-Signalkaskade aktiviert, während das phosphorylierte IRAK1 ubiquitiniert und degradiert wird (99) (**Abbildung 1**).



**Abbildung 1:** Aktivierung von NFκB über den TLR-/ILR-Signalweg. Abb. aus Bhoj et al. (109)

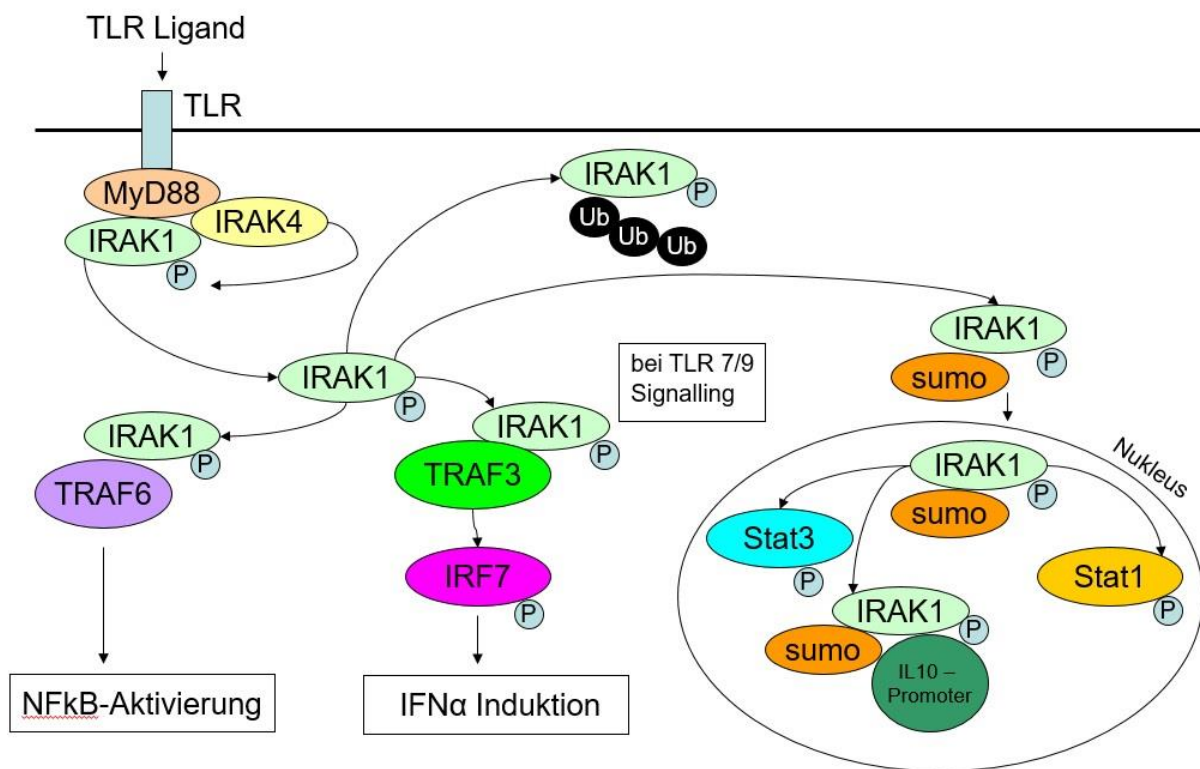
NFκB reguliert als Transkriptionsfaktor die Expression von proinflammatorischen Zytokinen. Es sind 5 NFκB-Untereinheiten bekannt, die miteinander homo- und heterodimere Komplexe bilden: p65 (RelA), RelB, c-Rel, p105/p50 (NF-κB1), und

p100/52 (NF- $\kappa$ B2). Das p50/p65- Heterodimer stellt die häufigste Form dar (110). NF $\kappa$ B liegt im Zytosol an die drei Isoformen von I $\kappa$ B (alpha, beta, epsilon) gebunden und damit inaktiv vor, da es in dieser Form nicht in den Zellkern translozieren kann. Durch den IKK-Kinase-Komplex, bestehend aus den 3 Untereinheiten IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  and IKK $\gamma$  (NEMO), können die Isoformen von I $\kappa$ B phosphoryliert, polyubiquitiniert und proteasomal abgebaut werden, wodurch die Bindung von NF $\kappa$ B im Zytosol aufgehoben wird und NF $\kappa$ B in den Zellkern translozieren kann (111). Die Aktivierung des IKK-Komplexes, die somit letztlich zur Translokation von NF $\kappa$ B in den Zellkern führt, kann von einer Vielzahl unterschiedlicher intrazellulärer Stimuli initiiert werden. Im Falle der bereits geschilderten TLR-/IL1R-Signalkaskade ist es das Protein TAK1, welches den IKK-Komplex aktiviert (**Abbildung 1**).

NF $\kappa$ B wird nach Aktivierung periodisch vom Zytosol in den Zellkern und anschließend wieder vom Zellkern in das Zytosol transloziert. Dieses Verhalten wird als „Cycling“ bezeichnet und führt zu oszillierender NF $\kappa$ B-Aktivität (112). Der Grund für dieses oszillierende Verhalten von NF $\kappa$ B sind mehrere „negative feedback loops“, welche bei Aktivierung von NF $\kappa$ B initiiert werden, darunter vor allem die Autoinhibition durch I $\kappa$ B $\alpha$  (113): Nach Translokation in den Zellkern bewirkt NF $\kappa$ B unter anderem auch die Transkription von I $\kappa$ B $\alpha$ . Neu synthetisiertes freies I $\kappa$ B $\alpha$  wird in den Zellkern geschleust, wo es an NF $\kappa$ B bindet und dessen Dissoziation von der DNA und Rückführung in das Zytoplasma bewirkt (114).

Neben der Aktivierung von NF $\kappa$ B gibt es Hinweise für weitere Signaltransduktionen innerhalb des TLR-/IL1R-Signalweges, die direkt über IRAK1 vermittelt werden. Es wurde gezeigt, dass phosphoryliertes IRAK1 nicht nur ubiquitinyliert und abgebaut wird, sondern auch sumoyliert wird und in dieser Form in den Zellkern transloziert wird (105). Huang et al. zeigten, dass IRAK1 im Zellkern den Transkriptionsfaktor STAT3 phosphoryliert, aber auch direkt an den Promotor des *IL10*-Gens bindet (115). Darüberhinaus wurde berichtet, dass zytosolisches, phosphoryliertes IRAK1 bei Aktivierung der Signalkaskade über TLR7 und TLR9 direkt den Interferon-regulatory factor 7 (IRF7) bindet. Diese Bindung führt zur Phosphorylierung und Aktivierung von IRF7, welches daraufhin in den Zellkern transloziert wird und die Produktion von Interferon- $\alpha$  bewirkt (116) (**Abbildung 2**).





**Abbildung 2:** Darstellung der über IRAK1 vermittelten Signaltransduktionen

IRAK1-defiziente menschliche Fibroblasten produzieren signifikant erniedrigte Mengen an Interleukin-6, wenn sie mit Interleukin-1 stimuliert werden (117). Dass die Produktion von Interleukin-6 in diesen Zellen jedoch nicht gänzlich aufgehoben ist, wird darauf zurückgeführt, dass das strukturverwandte IRAK2 das Fehlen von IRAK1 kompensieren kann (99). Die Untersuchung von SV40-transfizierten Fibroblasten des bisher einzigen Individuums mit einer angeborenen IRAK1-Defizienz ergab, dass diese nach Stimulation mit TLR2/6-Agonisten (PAM<sub>2</sub>CSK<sub>4</sub>, LTA, FSL-1) und TLR4-Agonisten (LPS, MPLA) kein Interleukin-8 produzierten. Die Stimulation mit Interleukin-1β führte hingegen zur Produktion von Interleukin-8, jedoch in geringerem Ausmaß als bei SV-40-transfizierten Fibroblasten von gesunden Kontrollpersonen. In peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) dieses Patienten konnte auf die Stimulation mit TLR1/2-, TLR2/6-, TLR4-, TLR7-, TLR8-Agonisten und Interleukin-1β im Vergleich mit PBMCs von gesunden Kontrollpersonen eine normale Produktion von Interleukin-6 und Interleukin-8 festgestellt werden.

In IRAK1-defizienten Mäusen konnte im Vergleich zu Wild-Typ-Mäusen eine verminderte Produktion von Interleukin-6 im Blut festgestellt werden, wenn den Mäusen Interleukin-1 per injektionem verabreicht wurde (104). In einer weiteren Studie wurde in IRAK1-

defizienten Makrophagen von Mäusen eine verminderte Produktion von TNF $\alpha$  nach TLR2 oder TLR4-Aktivierung beobachtet (118). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass sich IRAK1-defiziente Mäuse trotz der geschilderten verminderten Zytokin-Produktion im Überleben nach einer experimentell induzierten Infektion mit *Listeria monocytogenes* in subletaler Dosis von Wild-Typ-Mäusen nicht unterscheiden (104).

### **1.5. Bekannte Defekte im TLR-/IL1R-Signalweg**

IRAK1 ist wie weiter oben skizziert ein Adapterprotein im MYD88/IRAK4-abhängigen Toll-like-Rezeptor/Interleukin-1-Rezeptor-Signalweg. In diesem Signalweg sind bislang sieben Defekte bekannt: Der MYD88-Defekt (119), der IRAK-4-Defekt (120), der NEMO-Defekt (121-123), der I $\kappa$ B $\alpha$ -Defekt (124), der LUBAC(HOIL1)-Defekt (125), der IKK2-Defekt (126) und die IRAK1-Defizienz (127). Der infektiologische Phänotyp von Patienten mit den ersten sechs genannten Defekten umfasst invasive Infektionen und Infektionen des Weichteilgewebes durch extrazelluläre Bakterien, vor allem durch *S. pneumoniae* und *S. aureus* (79,125,126,128). Hingegen ist bei der IRAK1-Defizienz momentan noch kein infektiologischer Phänotyp bekannt, da bisher erst ein Patient mit IRAK1-Defizienz beschrieben ist, der bereits im Alter von 7 Lebensmonaten verstorben ist (127). MYD88- und IRAK4-Defekte gehen mit einer isolierten Störung der TIR-Signaltransduktion einher, weshalb sich bei der Stimulation von Blut dieser Patienten mit Toll-like-Rezeptor-Agonisten oder Interleukin-1 eine deutlich verminderte Produktion von Interleukin-6 und anderen Zytokinen feststellen lässt (119,120). Hingegen können Patienten mit NEMO-Defekt nach Stimulation mit TLR-Agonisten und Interleukin-1 eine normale Zytokinproduktion aufweisen, da abhängig von der zugrundeliegenden Mutation Proteine mit residualer Funktion gebildet werden können (129). Allgemein führen Störungen im Toll-like-Rezeptor-Signalweg dazu, dass bakterielle Infektionen ohne raschen Temperaturanstieg und ohne adäquate Akut-Phase-Reaktion verlaufen können (79,130,131).

Die Auswirkung einer Duplikation von IRAK1 auf den menschlichen Organismus ist bisher unklar. In Transfektions-Studien konnten jedoch bereits Erkenntnisse über die Auswirkungen einer Überexpression von IRAK1 auf den TLR-Signalweg gewonnen werden. Knop et al. überexprimierten IRAK1 in der Maus-Zelllinie EL4, indem sie diese mit humanem Wildtyp-IRAK1 transfizierten. Dabei konnten sie feststellen, dass die

Überexpression von IRAK1 zu einer verstärkten Interleukin-2-Produktion nach Stimulation mit Interleukin-1 führte. Diesen Effekt beschrieben sie sowohl bei transient, als auch bei stabil transfizierten EL4-Zellen (132,133). Die Maus-Zelllinie 3T3 wurde von Maschera et al. mit Wildtyp-*IRAK1* und einem NFκB Reporter-Gen transient transfiziert. Die Überexpression von IRAK1 führte zu einer verstärkten Reporter-Gen-Aktivierung im Sinne einer verstärkten NFκB-Aktivierung (134). Wesche et al. führten eine transiente Transfektion von menschlichen HEK 293- Zellen mit Wild-Typ-*IRAK1* durch. Über einen NFκB reporter assay konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von IRAK1 in diesen Zellen zu einer verstärkten NFκB-Aktivierung führt (135). Reddy et. al überexprimierten IRAK1 transient in der menschlichen HepG2-Zelllinie und konnten auch hier über einen NFκB reporter assay eine verstärkte NFκB-Aktivierung feststellen (136).

Dies wirft die Frage auf, ob die Duplikation des *IRAK1*-Gens auch in Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom die vom TLR/IL1R-Signalweg kontrollierte Zytokinproduktion in ähnlicher Weise verstärkt und in diesem Sinne eine starke Akut-Phase-Reaktion und damit eine Aggravierung der Infektionen bewirkt.

## **1.6. Bisherige Erkenntnisse zum immunologischen Phänotyp von Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom**

### **1.6.1. Humorale Immunität**

Frietz et al. berichteten anhand einer Fallserie, dass 4 von 10 getesteten Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom einen IgA-Mangel aufweisen (6). Bei einem dieser Patienten konnte ebenfalls ein erniedrigtes IgM festgestellt werden. Ein weiterer Patient wies einen alleinigen IgM-Mangel auf. Bei einem der Patienten mit IgA-Mangel wurden ebenfalls Immunglobulin-Subklassen gemessen, welche sich als normal herausstellten. Zudem berichteten die Autoren von diesem Patienten, dass er Booster-Impfungen benötigte, um als protektiv angesehene Pneumokokken-Antikörper aufzubauen. Zwei Brüder dieses Patienten, welche auch das *MECP2* Duplikations Syndrom aufweisen, benötigten ebenfalls Booster-Pneumokokken-Impfungen, wobei die Messung der Immunglobulin-Isotypen bei diesen Patienten normal ausfiel (6).

Prescott et al. beschrieben zwei Brüder mit *MECP2* Duplikations Syndrom und rezidivierenden Infektionen, welche niedrige Antikörper-Spiegel gegenüber Pneumokokken im Serum aufwiesen (16). In der Publikation ist jedoch nicht angegeben, ob und welche Impfungen die Brüder erhalten hatten. Zudem wies einer der Brüder niedrige Tetanus- und Diphtherie-Antikörper nach Impfung auf. Sowohl die Immunglobulin-Isotypen, als auch die Immunglobulin-Subklassen waren bei diesen beiden Patienten normal.

Yang et al. untersuchten die Immunglobulin-Isotypen bei 6 Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom und fanden IgA bei 2 der 6 Patienten erniedrigt (44). IgG und IgM waren bei diesen 6 Patienten normwertig. Von 5 Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom wurden Impfantikörper gegenüber Tetanus, *H. influenzae* und Diphtherie jeweils vor und nach Impfung bestimmt. Ein vierfacher Anstieg der Antikörper wurde als normal beurteilt. Bei einem der 5 Patienten ließ sich eine abgeschwächte Impfantwort auf die Tetanus-, *H. influenzae*- und Diphtherie-Impfung feststellen. Ein weiterer Patient reagierte unzureichend auf die Tetanus- und auf die *H. influenzae*- Impfung. Ein Patient reagierte nur auf die Tetanus-Impfung mit einer nicht-adäquaten Antikörperbildung und ein weiterer Patient nur auf die *H. influenzae*-Impfung.

### **1.6.2. Zelluläre Immunität**

Yang et al. untersuchten in ihrer Patientenkohorte die Lymphozytenoberflächenmarker und stellten erhöhte Anteile von CD4+CD45RA+ naiven-T-Zellen und erniedrigte Anteile von CD4+CD45RO+ Gedächtnis-T-Zellen vor allem bei jüngeren Patienten fest. Darüber hinaus berichten sie bei ihren Patienten von erniedrigten CD19+CD27+ memory B-Zellen und erniedrigten natural killer (NK)- Zellen. Die Autoren zeigten, dass CD4+T-Zellen der Patienten eine gestörte TH1-Differenzierung aufweisen. Sowohl bei Mäusen als auch bei Menschen mit *MECP2* Duplikation konnten sie *in vitro* eine verminderte IFN $\gamma$ -Sekretion durch T-Zellen feststellen (44).

## 2. Zielsetzung und Hypothese

Die vorliegende Arbeit ist in zwei Teile gegliedert.

Im ersten Teil sollte der infektiologisch-immunologische Phänotyp der Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom erstmalig systematisch beschrieben werden. Hierdurch sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Wie hoch ist der Anteil der Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom, die neben dem neurologischen Phänotyp an rezidivierenden Infektionen leiden?
2. An welchem Ort manifestieren sich die rezidivierenden Infektionen und welche Erreger sind verantwortlich?
3. Leiden die Patienten an einer Immundefizienz, durch die sie anfällig für Infektionen sind?
4. Sind die rezidivierenden Infektionen durch eine starke Akut-Phase-Antwort gekennzeichnet?

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die Akut-Phase-Reaktion von Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom *in vitro* untersucht werden. Es sollte die folgende Hypothese getestet werden:

Die Patienten weisen aufgrund der Duplikation von *IRAK1* eine verstärkte proinflammatorische Signaltransduktion über den TLR-/IL1R-Signalweg auf.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1. Votum der Ethikkommission**

Die vorliegende Studie wurde nach den ethischen Grundsätzen für die medizinische Forschung am Menschen der Helsinki Deklaration geplant und durchgeführt. Eine schriftliche Einverständniserklärung zur Teilnahme an der Studie wurde von dem gesetzlichen Vertreter eines jeden für die Studie rekrutierten Patienten eingeholt. Biologische Proben der Patienten wurden mit Zustimmung der Ethikkommission der Charité Universitätsmedizin Berlin (approval # EA2/063/12) verwendet. Die Abnahme von peripherem Venenblut geschah parallel zu Routine-Blutabnahmen.

#### **3.2. Patientenrekrutierung**

Einschlusskriterium für die Teilnahme an der Studie war das Vorliegen eines genetisch gesicherten *MECP2* Duplikations Syndroms. Die hierfür geforderte molekulargenetische Untersuchung wurde unabhängig und im Vorfeld dieser Studie durchgeführt und dem Verfasser dieser Arbeit schriftlich von den jeweiligen hierfür verantwortlichen Genetikern mitgeteilt. Es wurden keinerlei Ausschlusskriterien angewendet.

Die Rekrutierung der Patienten für die vorliegende Studie erfolgte über 7 Säulen:

1. Rekrutierung von Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom, die sich in der Klinik für Pädiatrie m.S. Pneumologie und Immunologie oder in der Klinik für Pädiatrie m.S. Neurologie der Charité vorstellten
2. Rekrutierung von Patienten, deren *MECP2*-Duplikation im Institut für Medizinische Genetik und Humangenetik der Charité genetisch diagnostiziert wurde
3. Anschreiben an die Autoren von wissenschaftlichen Publikationen, in denen Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom beschrieben wurden und Vermittlung eines Kontakts zu den Patienten bzw. deren Eltern
4. Anschreiben an die Abteilungen für Pädiatrische Neurologie aller deutschen Universitätskliniken und Vermittlung eines Kontakts zu den Patienten bzw. deren Eltern

5. Anschreiben an diejenigen Medizinisch-Genetischen Zentren, welche die Array-Cgh-Methode zur Suche nach genetischen Duplikationen anwenden und Vermittlung eines Kontakts zu den Patienten bzw. deren Eltern
6. Hinweis auf die Studie auf Webseiten von Selbsthilfeorganisationen/-gruppen
7. Vorstellung der Studie auf wissenschaftlichen Konferenzen, wie etwa der „3rd European Rett Syndrome Conference“ (Maastricht, Holland) und auf Treffen von Patienten und deren Angehörigen, wie etwa dem „MECP2 Meeting“ (Manchester, Großbritannien)

### 3.3. Material

#### 3.3.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller	Katalognummer
6 well Platte	NUNC, Wiesbaden	140675
96 well ELISA Platte	NUNC, Wiesbaden	475094
β-Counter 1450 Microbeta Trilux Scintillation Counter	Perkin Elmer	1450-021
Biofuge pico	Heraeus Thermo Scientific, Ulm	75003235
Brutschrank	Thermo Electron Scientific, Ulm	Hera Cell 150
Cell Harvester + Sealer Tomtek	Perkin Elmer	-
Cobas 6000	Roche, Schweiz	-
Durchflusszytometer NAVIOS	Beckman Coulter	B47903
ELISA Reader Fluostar	BMG Labtech, Ortenberg	-
Eppendorf-Röhrchen 1,5mL	Eppendorf, Hamburg	30 125.150
Falcon Röhrchen 15 ml	Becton Dickinson, Heidelberg	352096
Falcon Röhrchen 50 ml	Becton Dickinson, Heidelberg	352070
Gel Elektrophoresekammer	PeqLab, Erlangen	40-1515
Immulite 1000	Siemens, Deutschland	-
Isopropanoleinfrierbehälter	Nalgene SIGMA Aldrich, Deisenhofen	5100-0001
Kryoröhrchen	NUNC, Wiesbaden	377267
Küvette	Eppendorf, Hamburg	4307-000-623
Maxi Gel Kammer	Biometra, Göttingen	10-400
Meltilex TmA/ Melt-on Scintillator Sheet	Perkin Elmer	# 1450-441
Mikrotiterplattenwaschgerät Wellwash 4MK2	Thermo Scientific	5160770
Multiporator	Eppendorf, Hamburg	4308000015
Nitrocellulose Membran 0,45µm	GE Healthcare Whatman, Dassel	10401196
Nylon Membran	GE Healthcare, Dassel	RPN303B
Printet Filtermat A/1450 Micro Beta Tm	Perkin Elmer	# 1450-421
Sample Bag	Perkin Elmer	# 1450-432
Semi Dry Blotkammer	BioRad, München	170-3940
Serologische Pipette 5 ml	Becton Dickinson, Heidelberg	357453
Serologische Pipette 10 ml	Becton Dickinson, Heidelberg	357551

Sicherheitswerkbank	NuAire Integra Bioscience, Fernwald	NU-437
Sysmex XN-9000	Sysmex, Deutschland	-
T25 Zellkulturflasche	NUNC, Wiesbaden	156367
T75 Zellkulturflasche	Becton Dickinson, Heidelberg	353133
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg	5.355.000.011
UV-Lampe	Kisker, Steinfurt	L020-C
Versadoc Imaging System	BioRad, München	1708010
Versamax Mikrotiterplatten-Photometer	Molecular Devices, Sunnyvale, USA	VERSAMAX
Wasserbad	GFL, Burgwedel	340-1005
Whatman Paper	Roth, Karlsruhe	10426994
Zentrifuge	Thermo Scientific, Ulm	Heraeus Megafuge
Zentrifuge	Thermo Scientific, Ulm	Sigma 3K15
Zellkultur Schalen 10 cm	Becton Dickinson, Heidelberg	353003
Zellschaber	Becton Dickinson, Heidelberg	353085

**Tabelle 1:** Geräte und Verbrauchsmaterialien

### 3.3.2. Chemikalien

Name	Hersteller	Katalognummer
Acrylamid	BioRad, München	161-0156
Agarose	Biozym, Oldendorf	840004
Amphotericin B	PAN Biotech	P06-01005
Aqua dest, Ampuwa	Fresenius	1088813
APS	Merck, Darmstadt	101.201
$\beta$ -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe	4227.2
Boric Acid	SIGMA, Deisenhofen	B6768
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt	1081220005
DMSO	SIGMA, Deisenhofen	D2650
DTT	SIGMA, Deisenhofen	D9779
DTT 0.1M	Invitrogen, Darmstadt	P/N y00147
EDTA	Roth, Karlsruhe	8043.2
Essigsäure	Merck, Darmstadt	807
Ethanol	Herbeta Arzneimittel	12933
Glycerol	Roth, Karlsruhe	3783.1
Glycin	AppliChem, Karlsruhe	A1067.1000
Hepes	AppliChem, Karlsruhe	A3724.0100
Isopropanol	Dr. K Hollborn und Söhne, Leipzig	100
KCL	Merck, Darmstadt	1.049.360.500
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Roth, Karlsruhe	6878.1
Methanol	Roth, Karlsruhe	46275
$\text{MgCl}_2$	Invitrogen, Darmstadt	P/N y02028
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	Merck, Darmstadt	1.063.460.500
NaCL	Merck, Darmstadt	1.064.041.000
Proteinmarker Precision Plus	BioRad, München	162-0374
SDS	AppliChem, Karlsruhe	A2263.0500



Skim Milk Powder	Fluka-SIGMA, Deisenhofen	70166-500G
Temed	BioRad, München	161-0801
TrisBase	SIGMA, Deisenhofen	T1503-1KG
TrisHCL	Roth, Karlsruhe	9090.2
Triton X 100	Fluka-SIGMA, Deisenhofen	93426
Tween 20	Roth, Karlsruhe	9127.1

**Tabelle 2:** Chemikalien

### 3.3.3. Lösungen

Name	Hersteller	Katalognummer
AIM-V	Thermo Fisher Scientific	12055083
DMEM Medium	Invitrogen, Darmstadt	31966-021
FCS Medium	Biochrome AG, Berlin	S0115
HPE Puffer	Sanquin Peli Pair, Amsterdam	1940
HRP	Sanquin Peli Pair, Amsterdam	M2032
IOTest (10x) Fixative Solution	Beckman Coulter, Krefeld	#A07800
PBS	Invitrogen, Darmstadt	H21-002
RPMI Medium	Invitrogen, Darmstadt	61870
Stripping Buffer	Thermo Fischer, Ulm	46430
TMB Lösung A	Thermo Fischer, Ulm	50-76-01
TMB Lösung B	Thermo Fischer, Ulm	50-65-00
Versa-Lyse-Lösung	Beckman Coulter, Krefeld	#A09777
Trypsin	Biochrome AG, Berlin	L2163

**Tabelle 3:** Lösungen

### 3.3.4. Zytokine, TLR-Agonisten, Antigene, Mitogene

Name	Hersteller	Katalognummer
aCD3 clone HIT3a, IgG2	Becton Dickinson	555337
Candida albicans Antigen	Biologo, Kronshagen, Deutschland	CAN001-P
ConA	Sigma-Aldrich	#7246
Diphtherie-Toxoid	Chiron-Behring	-
IL-1 $\beta$	R&D Systems, Wiesbaden	201-LB/CF
IL-2	Peprtech, Rocky Hill/ NJ, USA	#200-02
LPS	SIGMA Aldrich, Deisenhofen	9764
PAM <sub>2</sub> CSK <sub>4</sub>	Invitrogen, Toulouse	tIrl-pm2
PHA, Phytohämagglutinin	Sigma-Aldrich	L1668
Pokeweed-Mitogen (PWM)	Sigma-Aldrich	L-9379
SAC/ Pansorbin cells	Calbiochem	507858
TNF $\alpha$	Miltney Biotec, Bergisch Gladbach	130094015
Tetanus-Toxoid	Staten Serum Inst., Kopenhagen	-

**Tabelle 4:** Zytokine, TLR-Agonisten, Antigene, Mitogene

### 3.3.5. Kits

Name	Hersteller	Katalognummer
Anti-PCP-IgG ELISA Kit	The Binding Site	MK012
Anti-PCP-IgG2 ELISA Kit	The Binding Site	MK013
Anti-Tetanus-Toxoid-ELISA Kit	The Binding Site	MK010
Chemiluminiscent Nucleic Acid Detection Module	Thermo Scientific	89880
Cobas c501/502 IgA-2	Roche Diagnostics GmbH	-
Cobas c701/702 IgA-2	Roche Diagnostics GmbH	-
Cobas c501/502 IgG-2	Roche Diagnostics GmbH	-
Cobas c701/702 IgG-2	Roche Diagnostics GmbH	-
Cobas c501/502 IgM-2	Roche Diagnostics GmbH	-
Cobas c701/702 IgM-2	Roche Diagnostics GmbH	-
C.f.a.s. Proteins	Roche Diagnostics GmbH	-
ELISA Kit IL-6	Sanquin Peli Pair, Amsterdam	M9316
Enhanced Chemiluminiscent Kit	Promega, Mannheim	W1015
Kit Human IgG1 Subklassen	Binding Site	NK006.H
Kit Human IgG2 Subklassen	Binding Site	NK007.H
Kit Human IgG3 Subklassen Latex	Binding Site	LK 008.H
Kit Human IgG4 Subklassen Latex	Binding Site	LK009.H
Light Shift EMSA Kit	Thermo Fischer, Ulm	20148X
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fischer, Ulm	23225
PreciControl ClinChem Multi1	Roche Diagnostics GmbH	05947626 190
PreciControl ClinChem Multi2	Roche Diagnostics GmbH	05947774 190
Th1/Th2 cytokine detection kit	Becton Dickinson	#550749

Tabelle 5: Kits

### 3.3.6. Antikörper für die Durchflusszytometrie (FACS)

Antikörper	Fluorochrom	Hersteller	Katalognummer
CD14	FITC	Beckman Coulter, Krefeld	BC IM0645U
CD56	PE	Beckman Coulter, Krefeld	BC A07788
CD16	PE	Beckman Coulter, Krefeld	BC A07766
CD4	ECD	Beckman Coulter, Krefeld	BC 6604727
CD19	PC5.5/PC5	Beckman Coulter, Krefeld	BC A66328
CD8	APC	Beckman Coulter, Krefeld	BC M2469
CD3	APC-A750	Beckman Coulter, Krefeld	BC A94680
CD45	PacBlue	Beckman Coulter, Krefeld	BC A74763
CD45R0	FITC	Beckman Coulter, Krefeld	BC IM1247U
TCR $\alpha/\beta$	PE	Beckman Coulter, Krefeld	BC A39499
TCR $\gamma/\delta$	PC5	Beckman Coulter, Krefeld	BC IM2662
CD45RA	PacBlue	Beckman Coulter, Krefeld	BC A82946

Tabelle 6: FACS-Antikörper

### 3.3.7. Western-Blot-Antikörper

Antigen	Clone	Isotyp	Hersteller	Kat No.	Lot No.	Verdünnung
IRAK1	sc7883	polyclonal rabbit IgG	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	H273	D2310	1/500
GAPDH	sc25778	polyclonal rabbit IgG	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	FL 335	L0710	1/1000
Anti Rabbit		Goat Anti Rabbit IgG	Dianova, Hamburg	111-035-045	88618	1/100000
Anti Mouse		Goat Anti Mouse IgG	Dianova, Hamburg	115-035-062	88909	1/100000

**Tabelle 7:** Western-Blot-Antikörper

## 3.4. Methoden

### 3.4.1. Fragebogendesign

Ein detaillierter standardisierter Fragebogen zum klinischen Verlauf der Patienten wurde erstellt und an die behandelnden Pädiater der an der Studie teilnehmenden Patienten verschickt. Der Fragebogen enthielt Fragen zu Alter, Geschlecht, Duplikationsgröße auf Chromosom Xq28, neurologischem Phänotyp, die Frage nach der bisherigen Anzahl schwerer i.v.-Antibiotika-pflichtiger Infektionen, die Bitte um Auflistung aller bisherigen invasiven und nicht-invasiven Infektionen und die Bitte um Auflistung der bisher nachgewiesenen Pathogene inklusive des Ortes der Erregerisolierung. Darüber hinaus wurde nach Laborparametern während nicht-invasiven Infektionen gefragt (maximales CRP, maximale Temperatur, maximale Leukozytenanzahl, maximale Neutrophilenanzahl).

### 3.4.2. Blutbild

Die Blutbilder wurden vollautomatisch aus Heparinblut an einem Sysmex XN-9000-Automaten gemessen.

### 3.4.3. Lymphozytenoberflächenmarker

FACS-Puffer	Versa-Lyse-Gebrauchslösung
PBS (Phosphate Buffered Saline)	25 µl IOTest Fixative Solution (10x)
+ 2% Fetales Kälberserum (hitzeinaktiviert)	+ 1000 µl Versa-Lyse-Lösung
+ 0,1 % Natrium-Azid	

**Tabelle 8:** Herstellung von FACS-Puffer und Versa-Lyse-Gebrauchslösung

Für die Bestimmung der Lymphozytenoberflächenmarker wurde EDTA-Blut der Patienten mit Fluoreszenz-markierten monoklonalen Antikörpern gefärbt. Es wurden pro Patient 2 Ansätze hergestellt. In einem Ansatz wurde EDTA-Blut mit CD14, CD56, CD16, CD4, CD19, CD8, CD3 und CD45-Antikörpern gefärbt. In einem zweiten Ansatz wurde EDTA-Blut mit CD3, CD4, CD8, CD45R0, CD45RA, TCR  $\alpha/\beta$  und TCR  $\gamma/\delta$ -Antikörpern gefärbt. Hierfür wurde zunächst ein Mix aus den zu verwendenden Antikörpern und FACS-Puffer angesetzt. Von diesem Antikörpergemisch wurden 20µl in ein Micronic-Röhrchen vorgelegt und jeweils 50 µl EDTA-Blut dazu pipettiert. Nach Vortexen folgte eine 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nach erneutem Vortexen erfolgte die Zugabe von 500µl Versa-Lyse-Gebrauchslösung pro Micronic-Röhrchen. Es erfolgte eine erneute 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln. Anschließend wurden die Micronic-Röhrchen bei 200 g und Raumtemperatur für 5 Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden abgesaugt und die Röhrchen erneut gevortext. Nach Zugabe von 1 ml FACS-Puffer wurden die Röhrchen erneut bei 200 g und Raumtemperatur für 5 Minuten zentrifugiert. Nach erneutem Absaugen der Überstände erfolgte die durchflusszytometrische Messung und Analyse an einem NAVIOS-FACS (Beckman Coulter, USA).

#### **3.4.4. Lymphozytentransformationstest**

Im Lymphozytentransformationstest wird die Proliferation von Lymphozyten bestimmt, indem einer Zellkultur mit diesen Zellen während der Stimulation mit Antigenen und Mitogenen  $^3\text{H}$ -Thymidin - ein  $\beta$ -Strahler - zugegeben wird.  $^3\text{H}$ -Thymidin wird von sich teilenden Zellen in die DNA eingebaut. Die Messung der  $\beta$ -Strahlung erlaubt somit einen Rückschluss auf die induzierte Proliferation. Aus Vollblut von Patienten und jeweiliger gesunder Reisekontrolle wurden mittels Ficoll-Separation PBMC's gewonnen. Hiervon wurden auf eine 96-well-Platte je  $2 \times 10^5$  Zellen pro Well aufgetragen und mit PHA in einer Konzentration von 2, 6 und 20  $\mu\text{g/ml}$ , plate bound anti-CD3 in einer Konzentration von 3, 10 und 30  $\mu\text{g/ml}$ , Pokeweed-Mitogen (PWM) in einer Konzentration von 1, 5 und 15  $\mu\text{g/ml}$ , IL-2 in einer Konzentration von 20  $\text{ng/ml}$  und Staphylococcus aureus Cowan-1 strain (SAC) in einer Konzentration von 1:1000 und 1:10000 für 72 Stunden und mit Tetanus-Toxoid RT50 in einer Konzentration von 10, 20 und 40 LF/ml, Candida albicans antigen in einer Konzentration von 0,025, 0,25 und 2.5  $\mu\text{g/ml}$  und Diphtheria-Toxoid in einer Konzentration von 20 LF/ml für 120 Stunden inkubiert. Während der letzten 24 Stunden wurde 0,0185 mBq  $^3\text{H}$ -Thymidin pro Well zugegeben. An einem  $\beta$ -scintillation counter wurde das inkorporierte [ $^3\text{H}$ ]-Thymidin anschließend in counts per minute gemessen. Die Ergebnisdarstellung erfolgte als Stimulationsindex (SI) – ein Quotient aus der  $\beta$ -scintillation der stimulierten Probe und der  $\beta$ -scintillation einer unstimulierten Probe. Für die Stimulation mit Tetanus-Toxoid, Candida albicans antigen und Diphtheria-Toxoid gilt ein Stimulationsindex  $> 3$  als normale Antwort auf die Stimulation. Bei der Stimulation mit Mitogenen gelten folgende Bereiche als normal: PHA: SI  $> 50$ , Anti-CD3: SI  $> 30$ , IL-2: SI  $> 30$ , PWM: SI  $> 20$ , SAC: SI  $> 10$ . Der Lymphozytentransformationstest wurde von der medizinisch-technischen Assistentin Margret Oberreit durchgeführt.

#### **3.4.5. IFN $\gamma$ -Produktion nach ConA-Stimulation**

Für die Messung der IFN $\gamma$ -Produktion nach Concanavalin (ConA)-Stimulation wurde Heparin-Blut 1:5 mit RPMI verdünnt und anschließend für 24 Stunden mit ConA in einer Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  stimuliert. Die Bestimmung von IFN $\gamma$  erfolgte mittels des Th1/Th2- cytokine detection kit entsprechend den Herstellerangaben an einem FACS-Navios. Zur Auswertung wurde die FCAP-Array-Software (Soft Flow Hungary) eingesetzt.

Der Referenzbereich für Blutproben, die direkt nach der Blutabnahme mit ConA stimuliert wurden, basiert auf der Messung von Blutproben von 50 gesunden Kontrollpersonen (25 männlich, 25 weiblich). Der Referenzbereich für versandte Blutproben, welche erst nach 24 Stunden mit ConA stimuliert wurden, basiert auf der Messung von Blutproben von 10 gesunden männlichen Kontrollpersonen. Die Messung der IFNy-Produktion nach ConA-Stimulation wurde von Herrn Dr. Uwe Kölsch durchgeführt.

#### **3.4.6. Messung der Immunglobulin-Isotypen und -Subklassen**

Die Immunglobulin-Isotypen IgA, IgG und IgM wurden vollautomatisch turbidimetrisch an einem COBAS 6000-Automaten gemessen. Die Immunglobulin-Subklassen IgG1 und IgG2 wurden ebenfalls als vollautomatisierter turbidimetrischer Immunoassay am COBAS-6000- Automaten gemessen. Die Messung der Immunglobulin-Subklassen IgG3 und IgG4 erfolgte als vollautomatisierter turbidimetrischer latexverstärkter Immunoassay am gleichen Gerät. Die Messungen wurden von Mitarbeitern der Labor Berlin GmbH durchgeführt.

#### **3.4.7. Impfantikörper**

Die Bestimmung von Anti-Pneumokokken-Polysaccharid-IgG erfolgte mithilfe einer in einem ELISA-Kit enthaltenen 96-well-PCP-Antigen-beschichteten Mikrotiterplatte. Zunächst wurden 10 µl Patientenserum mit 1000 µl Probenverdünnungsreagenz gemischt. Es wurden je 100 µl der im Kit enthaltenen Kalibratoren, high- und low-Kontrollen und 100 µl der verdünnten Proben in die entsprechenden Wells pipettiert. Es folgte eine 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Platte mithilfe eines Mikrotiterplattenwaschgeräts dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Nach Zugabe von 100 µl des im Kit enthaltenen Konjugats folgte eine erneute 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Die Platte wurde erneut dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Es wurden je 100 µl TMB-Substrat in jedes Well pipettiert und nach 30 Minuten Inkubation wurde 100 µl Stopplösung in jedes Well pipettiert. Die Messung erfolgte an einem Mikrotiterplattenreader bei einer Wellenlänge von 450 nm. Die Bestimmung der Anti-Pneumokokken-Polysaccharid-IgG2 und der Anti-Tetanus-Toxoid-

IgG erfolgte analog der oben angegebenen Vorgehensweise mit einem jeweils dafür vorgesehenen Kit. Die Messungen wurden von Mitarbeitern der Labor Berlin GmbH durchgeführt.

#### **3.4.8. Zellkultur mit SV-40-immortalisierten Fibroblasten**

Von 2 Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom (P1 und P13) konnten mit Einverständnis der Eltern Fibroblasten mittels einer Hautstanze gewonnen werden. Die weitere Arbeit mit diesen Zellen in der Zellkultur erfolgte unter sterilen Bedingungen. Ein Kennzeichen von Fibroblasten ist es, dass sie in der Zellkultur adhärent wachsen. Die gewonnene Hautprobe wurde in eine Petrischale überführt und mit einem sterilen Skalpell möglichst fein zerkleinert, bevor sie in einem 10 ml-Falcon-Tube in 2 ml Collagenase Typ CLS III (765 U/ml) aufgenommen wurde. Das Falcon-Tube wurde in ein 37°C warmes Wasserbad überführt und intermittierend manuell geschüttelt, bis makroskopisch fast keine Gewebeteilchen mehr sichtbar waren. Dieser Vorgang dauerte zwischen 30 und 90 Minuten. Die Probe wurde anschließend zweimal mit RPMI gewaschen und bei 1000 U für 10 Minuten zentrifugiert, bevor sie mit 5 ml Amniomax in eine T25-Flasche überführt wurde. Nach ca. 1-2 Wochen Lagerung im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> hatten die primären Fibroblasten auf dem Boden der T25-Flasche einen dichten Zellrasen gebildet, woraufhin das Medium abgenommen, 10 Tropfen EDTA- Trypsin 0,5% zugegeben wurde und die somit gelösten Zellen als Passage 1 mit 5 ml Amniomax in eine neue T25-Flasche überführt wurden. Nach erneutem Entstehen eines dichten Zellrasens wurden die primären Fibroblasten nach oben bereits geschildertem Vorgehen auf zwei T75-Flaschen aufgeteilt (Passage 2). Nach erneutem Entstehen eines Zellrasens wurden die Fibroblasten in Kryoröhrchen überführt (drei Kryoröhrchen pro T75-Flasche), mit Medium und DMSO versetzt (9 Teile Amniomax, 1 Teil DMSO) und schließlich für die spätere Verwendung eingefroren. Hierzu wurden die Kryoröhrchen in einen Isopropanolbehälter überführt und zunächst für 24 Stunden im -20°C-Gefrierschrank gelagert. Anschließend wurden sie für 24 Stunden im -80°C-Gefrierschrank aufbewahrt, bevor sie zur dauerhaften Lagerung in einen Flüssigstickstoff-Tank überführt werden konnten.

Zur Immortalisierung der primären Fibroblasten mittels eines Simian Virus (SV)-40-Vektors und späteren Verwendung in Versuchen wurde ein Kryoröhrchen mit primären

Fibroblasten zunächst in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und der Inhalt des Kryoröhrchens anschließend in ein Falcon-Röhrchen mit 40 ml DMEM 15% FCS überführt. Zur Entfernung des DMSO-Gefrierschutzes wurde das Falcon-Röhrchen bei 270 g für 5 Minuten zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurde das Zellpellet erneut in 5 ml DMEM 15 % FCS gelöst und schließlich in ein T25-Fläschchen überführt und im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Sobald die Zellen einen dichten Zellrasen am Boden des T25-Fläschchens gebildet hatten, wurden sie mit 5 ml PBS (Phosphate buffered saline) gewaschen und mittels Trypsin von der Oberfläche des T25-Fläschchens gelöst, bevor sie mit 15 ml DMEM 15% FCS in eine T75-Flasche überführt wurden. Sobald die Zellen auch in der T75-Flasche einen dichten Zellrasen gebildet hatten, wurden sie nach oben geschildertem Vorgehen aus der T75-Flasche entfernt und schließlich in einem Eppendorf-Röhrchen in 400 µl DMEM 15% FCS gelöst. In dieses Eppendorf-Röhrchen wurde der SV40 Vektor (SV40 Large T Antigen Eukaryotic Expression Vector 7.4 kB Promoter) in einer Endkonzentration von c=10 µg/ml zugegeben. Um Luftblasen zu vermeiden, wurde der Inhalt des Eppendorf-Röhrchens anschließend mit einer spitzen Pipette in eine Küvette zur Durchführung einer Elektroporation überführt. Mittels eines Multiporators wurde die Zellsuspension bei einer Spannung von 250 V für den Zeitraum von 40 µs elektroporiert. Im Anschluss daran wurde die Zellsuspension wieder in eine T25 Zellkulturflasche transferiert, welche mit 5 ml DMEM 15 % FCS befüllt war und im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> gelagert. Die dargestellte Methode führt nicht zur SV40-Immortalisierung aller primären Fibroblasten. Allerdings vermehren sich SV-40 transfizierte Fibroblasten wesentlich schneller als primäre Fibroblasten, weshalb sie diese in der Zellkulturflasche zunehmend verdrängen. Da sich SV-40-transfizierte Zellen morphologisch von primären Fibroblasten unterscheiden, konnte mittels Lichtmikroskop regelmäßig überprüft werden, ob noch primäre Fibroblasten vorliegen, oder der Zellrasen bereits aus SV40-transformierten Zellen besteht. Nach ca. zwei Monaten konnten nur noch SV40-immortalisierte Zellen identifiziert werden, welche ab diesem Zeitpunkt entweder mit DMEM 10% FCS in Kultur gehalten werden konnten oder tiefgefroren und für weitere Experimente genutzt werden konnten. Das Tieffrieren der SV40-transfizierten Fibroblasten erfolgte in FCS 10% DMSO analog der weiter oben für primäre Fibroblasten beschriebenen Vorgehensweise.

Die SV-40-transfizierten Fibroblasten-Zelllinien C3, C5, C8 und C12 wurden freundlicherweise von Dr. Anne Puel (Laboratory of Human Genetics of Infectious



Diseases, Necker Branch, Paris, France und Paris Descartes University, Imagine Institute, Paris, France) und Prof. Jean Laurent Casanova (Laboratory of Human Genetics of Infectious Diseases, Necker Branch, Paris, France / Paris Descartes University, Imagine Institute, Paris, France / Necker Hospital for Sick Children, Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, Paris, France / St. Giles Laboratory of Human Genetics of Infectious Diseases, Rockefeller Branch and Howard Hughes Medical Institute, The Rockefeller University, New York) zur Verfügung gestellt. Sie stammen von gesunden Spendern und wurden analog der oben angeführten Verfahrensweise hergestellt.

### 3.4.9. Detektion von IRAK1-Expression und IRAK1-Abbau mittels Western-Blot

<b>Lysispuffer</b>	<b>Probenpuffer</b>
50 mM Tris Base	1 M Tris pH 6,8
150 mM NaCl	100 mM EDTA pH 6,8
2 mM EDTA	10 % SDS
0,5 % Triton X	10 % $\beta$ -Mercaptoethanol
4 % Proteaseinhibitor	0.05 % Bromphenolblau in H <sub>2</sub> O
<b>Laufpuffer</b>	<b>Transferpuffer</b>
6.06 g TrisBase	5.82 g Tris Base
28.8 g Glycin	2.93 g Glycin
20ml 10 % SDS	3,75 ml 10 % SDS
ad 2000 ml H <sub>2</sub> O	200 ml Methanol ad 1000 ml Bidest
<b>PBS 10x</b>	<b>TBS 10x</b>
80 g NaCl	80 g NaCl
2 g KCL	2 g KCL
14,4 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	30 g Tris Base
2,4 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	ad 1 L H <sub>2</sub> O
ad 1 L H <sub>2</sub> O	pH 7,4
pH 7,4	

Tabelle 9: Western-Blot- Reagenzien

Für die Detektion der IRAK1-Expression und des IRAK1-Abbaus wurden pro Patient bzw. positiv- und negativ-Kontrolle die SV40-transfizierten Fibroblasten aus zwei dicht bewachsenen T75-Flaschen verwendet. Nachdem die Zellen aus den beiden T75-Flaschen gelöst waren, wurden sie gleichmäßig auf je sieben 10 cm große Zellkulturschalen aufgeteilt und anschließend für mindestens 12 Stunden bei 37°C im

Brutschrank inkubiert bis sie maximal konfluent waren. In diesen Zellkulturschalen wurden die Zellen mit Interleukin-1 $\beta$  in einer Konzentration von 10 ng/ml für 0, 30, 60, 120, 240, 360 und 480 Minuten stimuliert. Nach Ablauf des jeweiligen Stimulationszeitraumes wurden die Schälchen auf einer Wanne mit Eis ausgelegt und das Medium mit dem darin vorhandenen Interleukin-1 $\beta$  abgegossen. Es wurde anschließend pro Schälchen 2 ml PBS zugegeben, welches nach kurzem Schwenken des Schälchens wieder abgegossen wurde. Nach erneutem Zugeben von 2 ml PBS pro Schälchen wurden die Zellen mithilfe eines Zellschabers von der Oberfläche der Schälchen gelöst. Die nunmehr in PBS gelösten Zellen wurden in ein Falcon-Röhrchen überführt, welches mit PBS auf 15 ml Volumen aufgefüllt wurde. Die Falcon-Röhrchen wurden bei 300 g für 5 Minuten zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurde das Zellpellet erneut in 3 ml PBS resuspendiert und bei 300 g für 5 Minuten zentrifugiert. Erneut wurde das Falcon-Röhrchen dekantiert, allerdings wurde nun zusätzlich mit einer Pipette die Restflüssigkeit vorsichtig abgenommen. Anschließend wurde das Zellpellet zur Zelllyse in 50  $\mu$ l Lysispuffer gelöst. Die Zellsuspension wurde in ein Eppendorf-Röhrchen überführt und auf Eis für 20 Minuten gelagert, bevor das Eppendorf-Röhrchen für 5 Minuten bei 20.000 g zentrifugiert wurde. Im Anschluss wurde der Überstand abgenommen und in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt. Mittels des Pierce-BCA-Protein-Assay-Kit wurde die Proteinkonzentration in diesem Überstand dann nach Angaben des Herstellers an einem ELISA-Reader bei 550 nm bestimmt.

Mithilfe einer SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) sollten die durch die weiter oben dargestellte Zelllyse gewonnenen Proteine aufgetrennt werden. Trenngel und Sammelgel für die SDS-PAGE wurden nach den Angaben in **Tabelle 10** zubereitet.

	<b>Trenngel (10%ig)</b>	<b>Sammelgel</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	12,2 ml	6 ml
<b>Acrylamid</b> (Stock:30,8 %)	9,8 ml	1,3 ml
<b>Tris/HCl Puffer</b> (1,5M ph 8,8)	7,5 ml	2,5 ml
<b>SDS</b> (10% Stock)	300 $\mu$ l	100 $\mu$ l
<b>APS</b> (10% Ammonium persulfat)	250 $\mu$ l	100 $\mu$ l
<b>TEMED</b>	25 $\mu$ l	10 $\mu$ l

**Tabelle 10:** Zubereitung von Trenngel und Sammelgel

Das Trenngel wurde zwischen die Glasplatten einer vorbereiteten Gelkammer gegossen, mit 1 ml Isopropanol beschichtet und für 45 Minuten stehen gelassen, um zu polymerisieren. Nach Entfernen der Isopropanol-Schicht mit destilliertem Wasser wurde über das Trenngel das Sammelgel in die Gelkammer gegossen, welches in ca. 30 Minuten polymerisierte.

Anschließend wurden die im Gel aufzutragenden Proben vorbereitet. Es wurden jeweils 75 µg Protein mittels eines Lysispuffers auf ein Volumen von 40 µl verdünnt und dann 10 µl Probenpuffer zugegeben. Die Proben wurden für fünf Minuten auf eine Temperatur von 95°C erhitzt. Mit einer spitzen Pipette wurden anschließend je 50 µl der Proben in die Taschen des Gels gefüllt. An der rechten äußeren und an der linken äußeren Seite des Gels wurden Marker aufgetragen (jeweils 12 µl Marker plus 38 µl Lysispuffer). Bei 50 mA und einer Spannung von maximal 400 V lief im Anschluss das Gel, bis das Bromphenolblau am unteren Ende des Gels angelangt war. Nach Ausbau des Gels erfolgte eine Equilibrierung für 20 Minuten in Transferpuffer. Zugleich wurden die Nitrocellulosemembran und vier Whatman-Paper für 15 Minuten in Transferpuffer equilibriert. In einer Semi-Dry-Western-Blot-Kammer wurden nun 2 Whatman-Paper, darüber die Nitrocellulosemembran und darauf das Gel und 2 Whatman-Paper übereinandergeschichtet. Beim Übereinanderlegen von Whatman-Papern wurden durch Glattstreichen mit einem Rührfisch etwaige vorhandene Luftblasen entfernt. Das Blotting erfolgte bei 25 V und maximal 400 mA für 90 min. Anschließend wurde die Membran in ein Schälchen mit 5 % Milch TBST (Tris-buffered saline mit 0,05 % Tween) gelegt und auf einer Wippe damit für 1 Stunde geblockt.

Die Membran wurde nun mit einem Antikörper gegen IRAK1 inkubiert. Hierzu wurde der IRAK1-Antikörper 1:500 in 17 ml Blockingpuffer verdünnt. Die Membran wurde in der Antikörperlösung auf einer Wippe in einem Kühlraum über Nacht belassen, bevor die Membran am nächsten Morgen zunächst für einmal 30 Sekunden und anschließend zweimal für zehn Minuten mit TBS Tween gewaschen wurde. Die Membran wurde mit einem zweiten Antikörper (anti-rabbit), welcher 1:10.000 in 17 ml TBST (0,05 % Tween) verdünnt war, für eine Stunde auf einer Wippe im Dunkeln inkubiert. Es erfolgte ein weiterer Waschschrift mit TBST für einmal 30 Sekunden und zweimal 10 Minuten. Für die Entwicklung der Membran wurde das Enhanced Chemiluminiscent Kit verwendet. Die Membran wurde mit 4 ml der 1:1 gemischten ECL-Substrate befeuchtet und inkubiert mit Alufolie bedeckt für 1 Minute, bevor sie in einem Versadoc Imaging System mittels

der Quantity One Software analysiert wurde. Für die anschließende Detektion von GAPDH wurde die Membran zunächst dreimal für 10 Minuten in TBS gewaschen. Anschließend inkubierte die Membran für 5 Minuten in 8 ml Stripping-Puffer auf einer Wippe. Es folgten drei erneute Waschschrte mit TBS für jeweils 10 Minuten. Die weiteren Schritte zur Detektion von GAPDH erfolgten analog dem oben dargestellten Vorgehen für die Detektion von IRAK1. Die Verdünnung des GAPDH-Antikörpers erfolgte 1:1000 in 17 ml Blockingpuffer. Der zweite Antikörper war ebenfalls vom anti-rabbit-Typ.

#### **3.4.10. Densitometrische Auswertung**

Für die densitometrische Auswertung der Western-Blot-Banden wurde die Software ImageJ Version 1.45s verwendet. Dazu wurden Blots in Belichtungsstufen verwendet, deren maximale Dunkelheit bei einem Grauwert von 254, also unterhalb des maximalen Grauwerts von 255 lag.

#### **3.4.11. Messung der NFkB-Translokation in den Zellkern von SV-40-immortalisierten Fibroblasten nach Stimulation mit IL-1 $\beta$**

Mithilfe eines Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA) sollte die Bindung zwischen dem Transkriptionsfaktor NFkB und der DNA nach Stimulation mit Interleukin-1 $\beta$  untersucht werden. Für die Stimulation mit Interleukin-1 $\beta$  wurden pro Patient bzw. Kontrolle SV-40-transfizierte Fibroblasten aus zwei dicht bewachsenen T75-Flaschen gleichmäßig auf elf 10 cm große Zellkulturschalen aufgeteilt und für mindestens 12 Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert, bis sich in den Schälchen ein dichter Zellrasen gebildet hatte. Die SV40-transfizierten Fibroblasten wurden in diesen Schälchen mit Interleukin-1 $\beta$  in einer Konzentration von 10 ng/ml für 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 75 und 90 Minuten in einem Brutschrank bei 37°C stimuliert. Die Stimulation wurde nach Ablauf des jeweiligen Zeitpunktes unterbrochen, indem die Schälchen auf Eis gestellt wurden, das Medium abgegossen wurde und die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen wurden. Die Zellen wurden entsprechend dem weiter oben beschriebenen Vorgehen für die Detektion der IRAK-1-Expression mittels Western-Blot mithilfe eines Zellschabers von der Oberfläche der Schälchen gelöst und gewaschen. In diesem

Experiment sollte jedoch das Nuklearextrakt und nicht das zytosolische Extrakt analysiert werden, insofern unterschied sich die weitere Aufarbeitung der Proben. Das sorgfältig von Restflüssigkeit befreite Zellpellet wurde in 50 µl Puffer A gelöst, zehn Minuten auf Eis inkubiert und dann mittels Vortexer für 3 Sekunden gemischt. Anschließend wurde die Lösung für drei Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand, welcher das zytosolische Extrakt enthielt, wurde abgenommen und das verbliebene Pellet in 50 µl PBS resuspendiert. Es folgte ein erneutes Zentrifugieren für 3 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit. Nach Abnehmen des Überstandes wurde das Zellpellet in 40 µl des Puffers C gelöst und inkubierte darin für 25 Minuten auf Eis. Anschließend erfolgte ein erneutes Zentrifugieren bei maximaler Geschwindigkeit für 5 Minuten. Im Überstand, welcher nun das Nuklearextrakt enthielt, wurde mittels des Pierce-BCA-Protein-Assay-Kits die Proteinkonzentration nach Angaben des Herstellers an einem ELISA-Reader bei 550 nm bestimmt.

<b>Puffer A</b>	<b>Puffer C</b>	<b>10 x TBE-Puffer</b>
10 mM Hepes pH 7,8	20 mM Hepes pH 7,8	890 mM TrisBase
10 mM KCL	1.5 mM MgCL2	890 mM Boric Acid
1.5 mM MgCL2	420 mM NaCL	20 mM EDTA pH 8
0,5 mM DTT	0,2 mM EDTA	
4 % Proteaseinhibitor	25 % Glycerol	
	0,5 mM DTT	
	4 % Proteaseinhibitor	

**Tabelle 11:** Reagenzien zur Herstellung der benötigten Puffer

Die EMSA-Bindungsreaktion jeder einzelnen Probe erfolgte in je einem Eppendorf-Röhrchen, in dem die unter **Tabelle 12** angegebenen Reagenzien des verwendeten Light-Shift-EMSA-Kits enthalten waren.

<b>Reagenzien für die EMSA-Bindungsreaktion</b>	
H <sub>2</sub> O	5,2 µl
Binding Buffer (10 x) Kit	2 µl
50 mM DTT	1 µl
Poly DI:dC (1 µg/µl) Kit	1 µl
1 % NP-40 Kit	0,8 µl

**Tabelle 12:** Reagenzien für die EMSA-Bindungsreaktion

Nach einem zuvor erstellten Pipettierschema wurden je 7,6 µg Nuklearextrakt der entsprechenden Probe zugefügt und die durch unterschiedliche Volumenmengen der

Proben entstandene Volumendifferenz durch Zugabe von Puffer C ausgeglichen. Zuletzt wurde jeweils 2 µl einer Biotin-Sonde (15 fmol/µl) an die obere Wand der Eppendorf-Röhrchen pipettiert. Mit diesem Vorgehen konnte erreicht werden, dass der Tropfen Biotin-Sonde erst nach kurzem Ausschlagen der Eppendorf-Röhrchen aus dem Handgelenk mit der Lösung in Kontakt kam und somit die Bindungsreaktionen aller Proben zum gleichen Zeitpunkt starteten. Alle Eppendorf-Röhrchen wurden daraufhin in einer Tischzentrifuge kurz zentrifugiert. Nach 30 Minuten wurden die Bindungsreaktionen gestoppt, indem jeweils 5 µl eines Laufpuffers in die Eppendorf-Röhrchen zugegeben wurde.

Ein 7%iges Polyacrylamid-Gel, welches nach den Angaben in **Tabelle 13** zubereitet und zunächst leer für 30 Minuten bei 130 V gelaufen war, wurde anschließend mit jeweils 25 µl der Proben beladen. Das Polyacrylamid-Gel lief anschließend bei 130 V bis das Bromphenol-Blau bei ca. 3/4 der Gellänge angelangt war.

<b>Polyacrylamid-Gel</b>
35,3 ml H <sub>2</sub> O
2,5 ml TBE (10 x)
11,7 ml 30 % Polyacrylamid
500 µl APS (10 %)
50 µl TEMED

**Tabelle 13:** Herstellung des Polyacrylamid-Gels

Im Anschluss erfolgte ein Blotting der Proben auf eine Nylon-Membran. Hierfür wurde die Nylon-Membran zunächst in 0,5x TBE Puffer für 10 Minuten equilibriert. Es wurden 3 Whatman-Paper, darüber die Nylonmembran und darauf das Gel und 3 Whatman-Paper übereinandergeschichtet. Das Blotting erfolgte bei 100 mA für 60 Minuten. Für die Crosslink-Reaktion wurde die Membran anschließend unter eine Ultraviolett-Lampe (254 nm) gelegt und verblieb dort für 8 Minuten. Für die folgenden Schritte wurde das Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Module-Kit benutzt. Die Membran inkubierte in einem Schälchen zunächst in 15 ml Blocking-Puffer und anschließend in 10 ml conjugate/blocking Puffer für jeweils 15 Minuten bei Raumtemperatur auf einer Wippe. Nach Transfer der Membran in ein neues Schälchen wurde diese 4 x für jeweils 5 Minuten mit wash solution gewaschen. Anschließend inkubierte die Membran in 15 ml substrate equilibration Puffer für 5 Minuten. Nach Entfernen dieses Puffers wurde die Membran mit

12 ml der substrate working solution befeuchtet und inkubiert für 1 Minute, bevor sie in einem Versadoc Imaging System mithilfe der Quantity One Software analysiert wurde.

#### **3.4.12. Interleukin-6-Produktion in Fibroblasten**

Für die Aktivierung der SV40-transformierten Fibroblasten wurden diese in 6-well-Platten in einer Konzentration von  $2 \times 10^5$  Zellen pro Well in je 2 ml DMEM + 10% FCS ausgesät. Die 6-well-Platten wurden anschließend für 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C gelagert, um sicherzustellen, dass die Zellen an den Platten adhärirt hatten. Zu Beginn der Stimulation wurde das Medium aus den 6-well-Platten abgenommen und mit 2 ml eines zuvor zubereiteten Medium-Stimulanz-Gemisches befüllt. Pro Patient bzw. Kontrolle wurden jeweils 2 Wells verwendet – ein Well, in der keine Stimulation stattfand und ein Well für die Stimulation mit Interleukin-1 $\beta$ . Für die Stimulation mit Interleukin-1 $\beta$  wurde eine Endkonzentration von 10 ng/ml eingesetzt. Die 6-well-Platten wurden für die Stimulationszeit von 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C gelagert, bevor die Überstände aus den Wells abgenommen wurden und für die spätere Messung der Interleukin-6-Konzentration bei -20°C eingefroren wurden.

Für die Messung von Interleukin-6 in den Überständen der Stimulation wurde das ELISA Kit IL-6 (Sanquin Peli Pair, Amsterdam) verwendet. Der Coating-Antikörper wurde in Coating-Puffer 1:100 verdünnt und 100  $\mu$ l hiervon wurden in jedes Well einer 96-well-ELISA-Platte eingefüllt. Für das Coating des Antikörpers wurde die ELISA-Platte anschließend im Kühlschrank bei 4°C über Nacht gelagert. Am Folgetag wurde die Platte 5 x mit Waschpuffer gewaschen. Es wurden pro Well 200  $\mu$ l Blocking-Puffer (PBS, 2,5% Milch) eingefüllt und bei Raumtemperatur für 1 Stunde auf einem Schüttler belassen, bevor die Platte wiederum 5 x mit Waschpuffer gewaschen wurde. Anschließend wurden sowohl die Interleukin-6-Standards zur Ermittlung der Standardkurve als auch die in HPE-Puffer verdünnten Proben auf die ELISA-Platte aufgetragen. Der Interleukin-6-Standard wurde in den folgenden Konzentrationen aufgetragen: 600 pg/ml, 300 pg/ml, 150 pg/ml, 75 pg/ml, 37,5 pg/ml, 18,75 pg/ml, 9,375 pg/ml und 4,69 pg/ml. Für die Proben wurden folgende Verdünnungen gewählt: Für die mit Interleukin-1 $\beta$  stimulierten Proben wurden die Verdünnungen 1:100, 1:1000 und 1:10000 gewählt. Die nicht-stimulierten Kontroll-Proben wurden in den Verdünnungen 1:10 und 1:100 auf die ELISA-Platte aufgetragen.

Die ELISA-Platte mit den aufgetragenen Standards und Proben wurde für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Nach erneutem 5-maligen Waschen erfolgte das Auftragen des zweiten Antikörpers in einer Verdünnung von 1:100 in HPE-Puffer. Der zweite Antikörper wurde 1 Stunde bei Raumtemperatur auf der ELISA-Platte belassen und anschließend mittels 5-maligem Waschen von der Platte entfernt, bevor die Platte mit HRP (1:7500 verdünnt in HPE-Puffer) 30 Minuten bei Raumtemperatur abgedunkelt auf dem Schüttler inkubiert wurde. Nach erneutem 5-maligen Waschen wurde pro Well 100 µl der TMB-Entwicklungslösung aufgetragen und bei Dunkelheit maximal 10 Minuten inkubiert bzw. solange bis beim niedrigsten verdünnten Standard eine Farbdiskrimination zum nächst höher verdünnten Standard zu beobachten war. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl Stopp-Lösung (1,8 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) gestoppt. Die ELISA-Platte wurde anschließend an dem ELISA Reader Fluostar (BMG Labtech, Ortenberg) bei einer Wellenlänge von 450/620 nm gemessen. Die Ermittlung der Interleukin-6-Werte der Proben erfolgte anhand der Standardkurve mittels der Software Optima.

#### **3.4.13. Interleukin-6-Produktion in Vollblut**

Die Interleukin-6 Produktion im Vollblut nach Stimulation mit Interleukin-1/Toll-like-Rezeptor-Liganden wurde jeweils in einem eigenen Versuch für einen Patienten und eine zugehörige gesunde Reisekontrolle untersucht.

Heparinisiertes Vollblut von Patient und Reisekontrolle wurde 1:2 mit RPMI verdünnt. Die Stimulation wurde in einer 48-well-Platte durchgeführt. Pro Well wurden 450 µl verdünntes Heparin-Blut und 50 µl einer vorverdünnten Stimulanz bzw. 50 µl reines RPMI für einen Ansatz ohne Stimulation aufgetragen. Als Stimulantien wurden PAM<sub>2</sub>CSK<sub>4</sub> (Endkonzentration 100 ng/ml), LPS (Endkonzentration 1 ng/ml) und Interleukin-1β (Endkonzentration 20 ng/ml) eingesetzt. Die 48-well-Platte wurde anschließend im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> gelagert. Nach 48 Stunden Stimulationszeit bei 37°C wurden die Überstände aus den Wells abgenommen und für die spätere Zytokin-Messung bei -20°C tiefgekühlt gelagert.

Die Messung von Interleukin-6 in den Überständen erfolgte für die Patienten P1, P10, P11, P31 vollautomatisch an einem Immulite 1000- Automaten, welcher auch in der



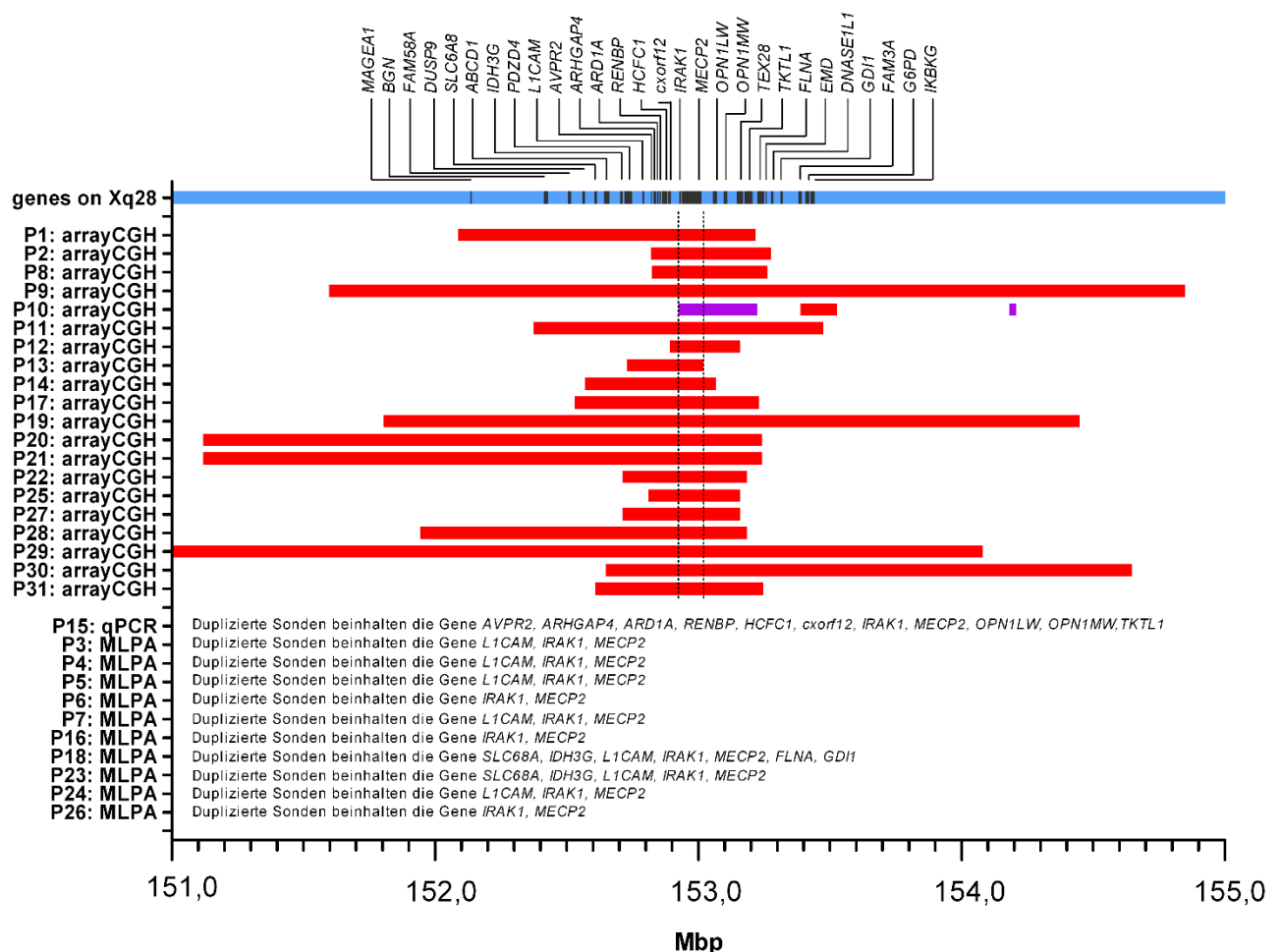
Routine-Diagnostik zur Interleukin-6-Messung eingesetzt wird. Da sehr unterschiedliche Zytokinkonzentrationen nach den unterschiedlichen Stimulationen erwartet wurden, mussten die Proben aus den unterschiedlichen Stimulationsansätzen für die Messung unterschiedlich verdünnt werden: Medium -> 1:5 Verdünnung, PAM<sub>2</sub>CSK<sub>4</sub> -> 1:10 Verdünnung, LPS -> 1:100 Verdünnung, IL-1 -> 1:20 Verdünnung. Die Messung von Interleukin-6 erfolgte bei Patient P8 mittels eines Platten-ELISAS nach dem unter Abschnitt 3.4.12. beschriebenen Vorgehen. Um die unterschiedliche Zellularität der Blutproben zu berücksichtigen, wurden die ermittelten Interleukin-6-Werte mit der Leukozytenanzahl der jeweiligen Patienten bzw. Reisekontrollen relativiert.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Infektiologisch-immunologische Phänotypisierung

#### 4.1.1. Charakterisierung der Studienkohorte

Die für diese Studie rekrutierte Kohorte besteht aus 31 Patienten mit genetisch gesichertem *MECP2* Duplikations Syndrom, 29 männlichen Patienten und 2 weiblichen Patienten. Das Alter der Patienten reicht von 3 Jahren bis 48 Jahren. Die Patienten stammen aus Deutschland, Frankreich, Niederlande, Belgien, Polen, Rumänien, Spanien, USA und China. Bei allen Patienten der Studie schließt die Duplikation auf Chromosom Xq28 mindestens *MECP2* und das benachbarte *IRAK1* ein (**Abbildung 3**).



**Abbildung 3:** Größe der Duplikationen in Mbp auf Chromosom Xq28. Die X-Achse stellt Positionen auf Chromosom Xq28 zwischen 151 und 153 Mbp dar. Rote Balken zeigen duplizierte Segmente, lila Balken zeigen triplizierte Segmente. Die Positionen auf dem X-Chromosom basieren auf dem UCSC genome browser build hg 18. Die Duplikation von Patient P29 reicht auf der linken Seite über den markierten Bereich bis zur Position 147.384.720 bp hinaus.

Im Falle der Patienten P1, P2, P8, P9, P10, P11, P12, P13, P14, P17, P19, P20, P21, P25, P27, P28, P29, P30 und P31 wurde die Duplikation mittels Array-CGH detektiert. Diese Methode erlaubt die Bestimmung der Duplikationsgröße mit einer Genauigkeit im Kilo-Basenpaar (kbp)-Bereich. Für die angegebenen Patienten liegt die Duplikationsgröße zwischen 265 kBp und 6,694 Mbp. Bei Patient P15 wurde eine quantitative PCR zur Suche nach Duplikationen auf Chromosom Xq28 angewendet, und bei den Patienten P3, P4, P5, P6, P7, P18, P23, P24 und P26 kam die Multiplex-ligation probe amplification (MLPA)- Methode zum Einsatz. Da mit diesen Methoden nur nach Duplikationen von ausgewählten Genen gesucht wird, ist bei diesen Patienten keine Angabe über die genauen Grenzen der Duplikation möglich.

#### **4.1.2. Infektiologischer Phänotyp**

Eine detaillierte Erhebung des infektiologischen Phänotyps war bei 27 der 31 Patienten möglich - mit einer Gesamtzahl von 343 beobachteten Patientenjahren (**Tabelle 14**). Bei 9 der 27 Patienten - einschließlich der 2 Mädchen in der Kohorte - war es bisher zu keinen schweren Infektionen gekommen. Hingegen hatten 18 der 27 Patienten bisher zumindest eine schwere i.v.-Antibiotika-pflichtige Infektion durchgemacht. Die betroffenen Patienten leiden hauptsächlich an Pneumonien (17/27 Patienten). Bezüglich der Frage, ob es sich bei den Pneumonien um Bronchopneumonien oder Lobärpneumonien handelt, konnte bei Patient P14 eine komplette Evaluierung aller Pneumonien durchgeführt werden. Bei diesem Patienten handelte es sich bei allen durchgemachten Pneumonien um radiologisch nachgewiesene Bronchopneumonien. Insgesamt 5 der 27 Patienten hatten mindestens eine Sepsis erlitten. Harnwegsinfektionen wurden bei 6 der 27 Patienten berichtet. Rezidivierendes „fever of unknown origin (FUO)“ trat bei 3 der 27 Patienten auf. Keiner der Patienten litt bisher an einer Infektion des zentralen Nervensystems (Enzephalitis, Meningitis).

	P1	P14	P9	P29	P15	P23	P17	P16	P2	P24	P27	P18	P13	P22	P26	P28	
Alter(Jahre)	16	15	15	7	15	8	9	3	6	15	12	9	8	18	10	4	
Geschlecht	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	
Outcome		+			+												
Anzahl an schweren (i.v.- Antibiotika-pflichtigen) Infektionen	27	18	13	10	8 <small>(zwischen 8-15.J)</small>	7	3	3	3	3	3	2	2	2	2	2	
<b>Invasive Infektionen</b>																	
Sepsis	2	0	3	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Meningitis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Andere	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1x Peritonitis	-	-	
<b>Nicht-invasive Infektionen</b>																	
Pneumonie	48	14	43	8	50	7	2	3	2	3	3	3	2	1	2	2	
Eitrige Otitis	3	2	n.v.	4	3	1	0	n.v.	1	n.v.	1	>8	>4	n.v.	n.v.	n.v.	
Andere	>1 Harnwegsinfektion 1 x ARDS 1 x streptococcal toxic shock syndrome	5x Harnwegsinfektion 2x Pyelonephritis	1x Lungentuberkulose 3x Zystitis Rez. Fieberepisoden (Dauer ~1 Tag)	3 x Pyelonephritis	1 x Tonsillitis	1 x Zystitis 1 x Salmonellegastroenteritis		1 x Pyelonephritis >2 Harnwegsinfektion				Rezidivierende Bronchitiden 1 x schwere Gastroenteritis					
<b>Andere</b>																	
Fieber unklarer Genese	0	0	>4	0	3	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	

	P19	P11	P12	P10	P3	P4	P5	P6	P7	P20	P21	P8	P25	P30	P31
Alter(Jahre)	22	20	9	11	9	28	23	5	17	19	10	10	48	18	14
Geschlecht	m	m	w	w	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m
Outcome															
Anzahl an schweren (i.v.- Antibiotika-pflichtigen) Infektionen	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
<b>Invasive Infektionen</b>															
Sepsis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
Meningitis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
Andere	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Nicht-invasive Infektionen</b>															
Pneumonie	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
Eitrige Otitis	5	0	n.v.	0	0	0	0	0	0	0	0	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
Andere	3 x Harnwegsinfektion	1x adenophlegmon laterocervical 2 x Pharyngotonsillitis mit hohem Fieber	>4x Tonsillitis												
<b>Andere</b>															
Fieber unklarer Genese	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.

**Tabelle 14:** Infektiologischer Phänotyp von Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom. Alter, Geschlecht, Anzahl an schweren i.v.-Antibiotika-pflichtigen Infektionen. Auftreten von invasiven und nicht-invasiven Infektionen.

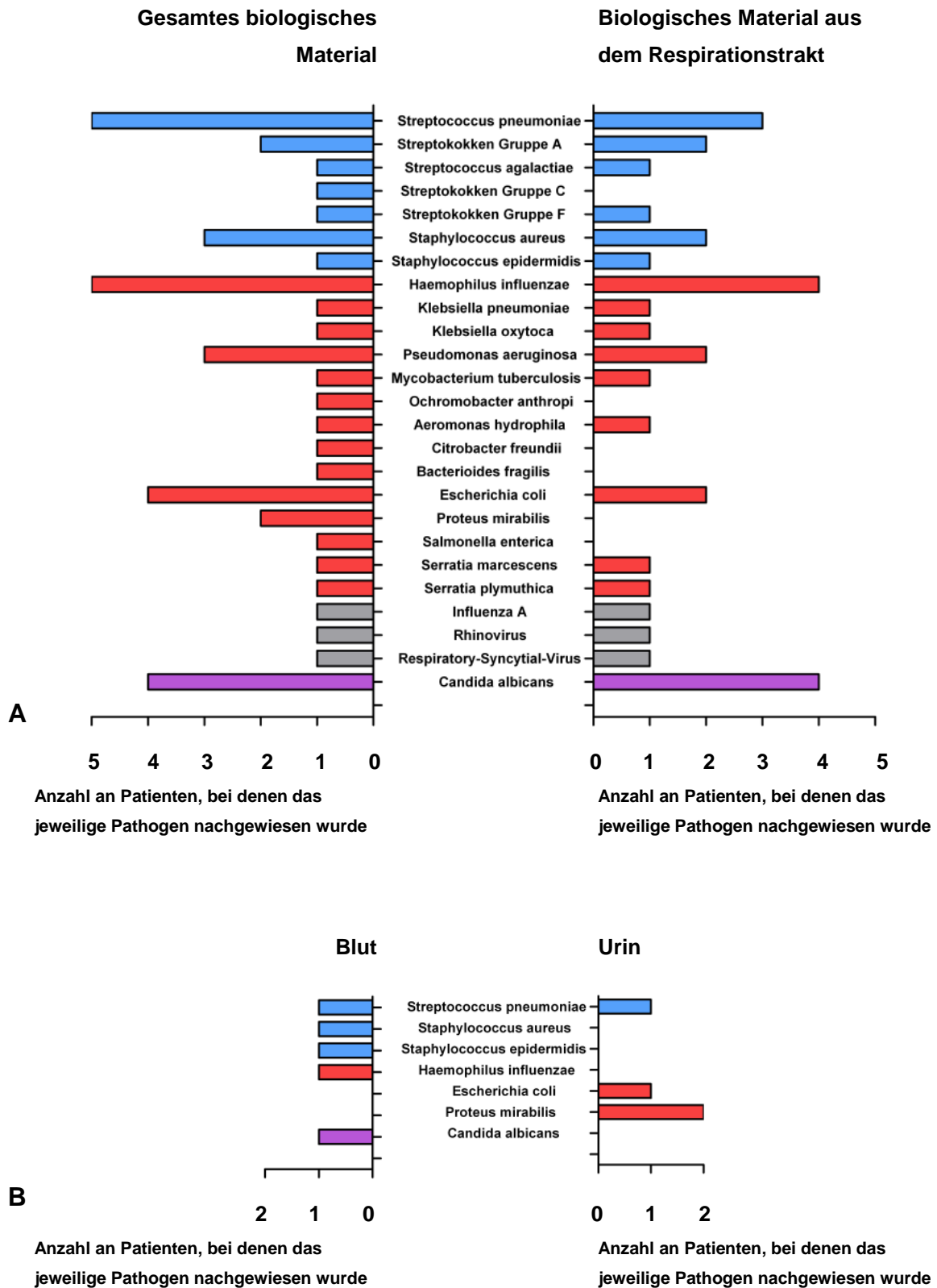
Innerhalb der Gruppe von Patienten, die an schweren, i.v.-Antibiotika-pflichtigen Infektionen litten, herrschte eine große Heterogenität hinsichtlich der Häufigkeit dieser Infektionen mit einem Maximum von 27 i.v.- Antibiotika pflichtigen Infektionen seit Geburt bei einem 16-jährigen Jungen (P1). Zwei Patienten der Kohorte starben im Verlauf der vorliegenden Studie an einer Pneumonie.

Patient	Nachgewiesene Pathogene	Ort des Nachweises	Patient	Nachgewiesene Pathogene	Ort des Nachweises	
P1	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Rachenabstrich Sputum Bronchoalveoläre Lavage Bronchialsekret	P15	<i>Staphylococcus aureus</i>	Rachenabstrich Bronchoalveoläre Lavage	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Rachenabstrich	P16	<i>Staphylococcus aureus</i>	Blut	
	<i>Haemophilus influenzae</i>	Rachenabstrich Bronchoalveoläre Lavage Blut		<i>RSV</i>	Rachenabstrich	
	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	Blut	P17	<i>Haemophilus influenzae</i>	Rachenabstrich	
	<i>Streptococcus Gruppe A</i>	Trachealsekret		<i>Salmonella enterica</i>	Stuhl	
	P2	<i>Proteus mirabilis</i>	Urin	P19	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Rachenabstrich
		<i>Escherichia coli</i>	Urin		<i>Staphylococcus (unbekannte Spezies)</i>	Rachenabstrich
P9	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Rachenabstrich Blut	<i>Proteus mirabilis</i>		Urin	
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Sputum	P22	<i>Bacterioides</i>	Peritonealflüssigkeit	
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Bronchoalveoläre Lavage		<i>Escherichia coli</i>	Peritonealflüssigkeit	
	<i>Candida albicans</i>	Rachenabstrich Bronchoalveoläre Lavage		<i>Streptococcus Gruppe C</i>	Peritonealflüssigkeit	
P13	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Blut	P23	<i>Escherichia coli</i>	Bronchialaspirat	
	<i>Haemophilus influenzae</i>	Ohrenabstrich		<i>Serratia plymuthica</i>	Bronchialaspirat	
	<i>Citrobacter freundii</i>	Ohrenabstrich		<i>Streptococcus pyogenes</i>	Rachenabstrich, Bronchialaspirat	
P14	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Rachenabstrich		<i>Aeromonas hydrophila</i>	Bronchialaspirat	
	<i>Haemophilus influenzae</i>	Rachenabstrich Bronchialsekret		<i>Streptococcus Gruppe F</i>	Bronchialaspirat	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Rachenabstrich		<i>Candida albicans</i>	Bronchialaspirat, Rachenabstrich, Blut	
	<i>Escherichia coli (ESBL)</i>	Rachenabstrich		P24	<i>Haemophilus influenzae</i>	Sputum
	<i>Serratia marcescens (ESBL)</i>	Trachealsekret	<i>Streptococcus agalactiae</i>		Sputum	
	<i>Influenza A</i>	Rachenabstrich	<i>Staphylococcus aureus</i>		Sputum	
	<i>Rhinovirus</i>	Rachenabstrich	<i>Klebsiella oxytoca</i>		Sputum	
	<i>Candida albicans</i>	Rachenabstrich Trachealsekret	P27	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ohrenabstrich	
		<i>Streptococcus pneumoniae</i>		Urin		

**Tabelle 15:** Infektiologischer Phänotyp von Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom: Nachgewiesene Pathogene und Ort des Nachweises bei jeweiligen Patienten.

Von den 25 verschiedenen isolierten Pathogenen, welche bei den Patienten nachgewiesen wurden, waren die Mehrzahl Bakterien (84%). Nur 3 unterschiedliche Viren (12%) und 1 Pilz (4%) waren unter den 25 identifizierten Pathogenen. Von den 21 Bakterien waren 7 Bakterien Gram-positiv (33%) und 14 Bakterien Gram-negativ (66%). 13 der 21 isolierten Bakterien sind in der Lage, eine Kapsel zu bilden: *A. hydrophila* (137), *B. fragilis* (138-140), *E.coli* (141), *H. influenzae* (141), *K. oxytoca* (142), *K. pneumoniae* (143), *P. mirabilis* (144), *P. aeruginosa* (143,145), *S. aureus* (146-149), *S. epidermidis* (150,151), *S. agalactiae* (141), Streptokokken der Gruppe A (152-154), *S. pneumoniae* (141,148).

Die Pathogene wurden im Rachenabstrich, im Sputum, im Trachealsekret, im Bronchialsekret, in der bronchoalveolären Lavage, im Ohrabstrich, im Urin, im Stuhl, in der Peritonealflüssigkeit und im Blut nachgewiesen (**Tabelle 15**). Betrachtet man die Isolation der Erreger in all diesen Materialien zusammen, waren die Erreger, welche in den meisten Patienten nachgewiesen wurden: *S. pneumoniae* (in 5 der 27 Patienten nachgewiesen) und *H. influenzae* (in 5 der 27 Patienten) (**Abbildung 4**). Sowohl *S. pneumoniae*, als auch *H. influenzae* gelten als „klassische“ bekapselte Bakterien (148). Bei 4/27 Patienten wurde *E. coli* nachgewiesen, bei 4/27 Patienten *C.albicans*, bei 3/27 Patienten *S. aureus*, bei 3/27 Patienten *P.aeruginosa*, bei 2/27 Patienten *P.mirabilis* und bei 2/27 Patienten Streptokokken der Gruppe A. Jeweils nur in 1 Patienten identifiziert wurden die Erreger *S. agalactiae*, Streptokokken der Gruppe C, Streptokokken der Gruppe F, *S. epidermidis*, *K. pneumoniae*, *K. okytoca*, *M. tuberculosis*, *O. anthropi*, *A. hydrophila*, *C. freundii*, *B. fragilis*, *S. enteritidis*, *S. marcescens* und *S. plymuthica*. Hinsichtlich der viralen Erreger wurde *Influenza A*, das *RS-Virus* und das *Rhinovirus* jeweils nur in einem Patienten nachgewiesen.



**Abbildung 4:** Infektiologischer Phänotyp von Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom: Nachgewiesene Pathogene und Anzahl an Patienten, bei denen das jeweilige Pathogen nachgewiesen wurde in **A**. Gesamten biologischem Material und biologischem Material des Respirationstraktes **B**. Blut und Urin.

Betrachtet man nur die Pathogene, welche in den Atemwegen isoliert wurden, waren die Erreger, welche in den meisten Patienten nachgewiesen wurden: *H. influenzae* (bei 4 der 27 Patienten nachgewiesen) und *C. albicans* (bei 4 der 27 Patienten nachgewiesen), gefolgt von *S. pneumoniae* (bei 3 der 27 Patienten nachgewiesen).

Das Spektrum der Erreger im Blut umfasste *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *S. aureus*, *S. epidermidis* und *C. albicans*, welche jeweils nur im Blut eines Patienten nachgewiesen wurden. Die im Urin nachgewiesenen Erreger waren *P. mirabilis* (bei 2 der 27 Patienten), *E. coli* (bei 1 der 27 Patienten) und *S. pneumoniae* (bei 1 der 27 Patienten). Es traten bei den Patienten weder Infektionen durch *Pneumocystis jirovecii*, noch invasive Infektionen durch Mykobakterien oder *S. enteritidis* auf.

Zusammenfassend zeigen Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom eine erhöhte Anfälligkeit für Pneumonien und Sepsen durch Bakterien, welche in der Lage sind, eine Kapsel zu bilden.

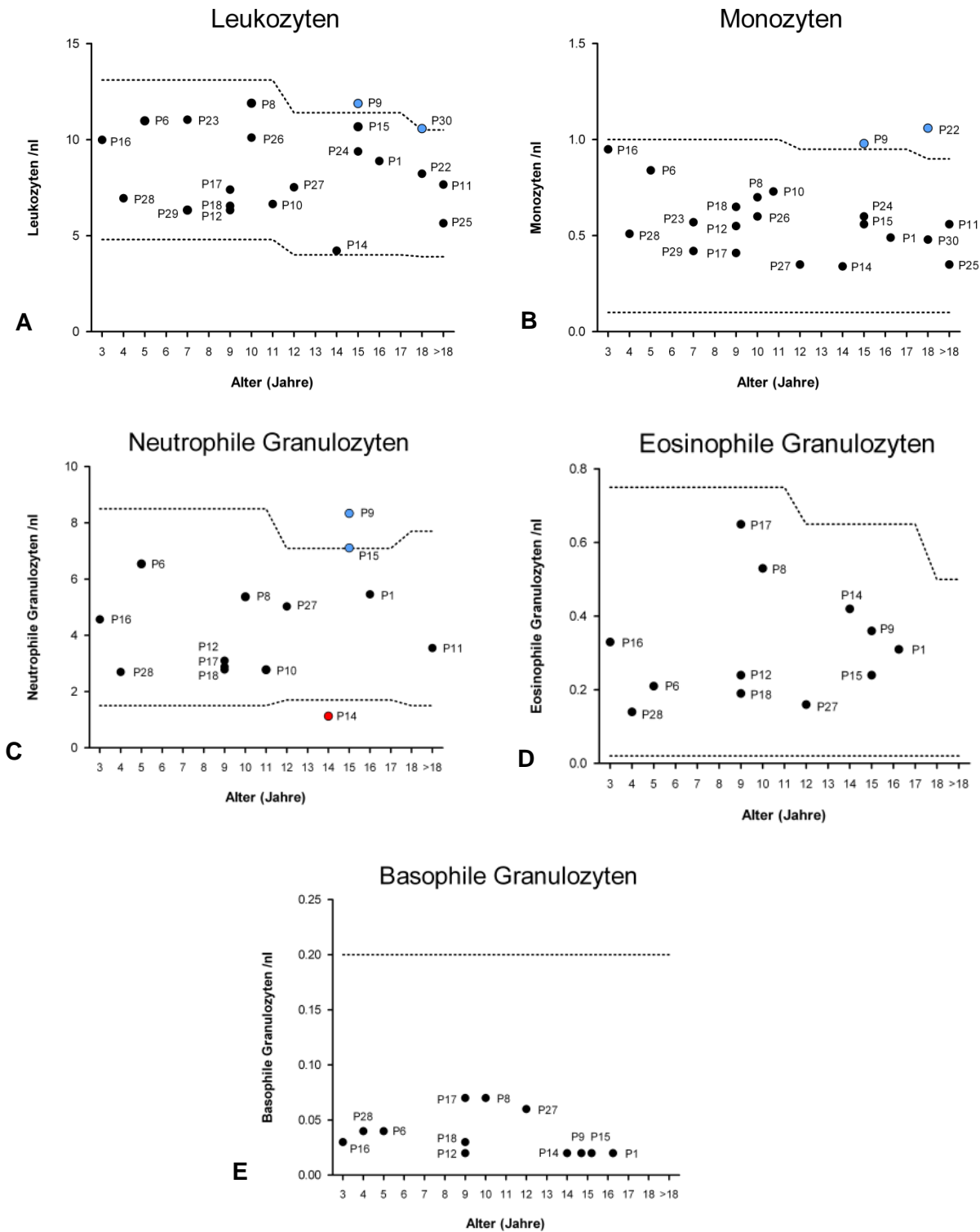
### **4.1.3. Immunologischer Phänotyp**

#### **4.1.3.1. Zelluläre Immunität**

##### **4.1.3.1.1. Blutbild**

Von 21 Patienten wurde ein Blutbild angefertigt (**Abbildung 5**). Bei zwei Patienten zeigten sich erhöhte Leukozytenwerte (P9, P30). Die Monozyten waren bei den Patienten P9 und P22 erhöht, bei den anderen Patienten im Normbereich. Die neutrophilen Granulozyten waren bei den Patienten P9 und P15 erhöht und beim Patienten P14 erniedrigt. Die eosinophilen Granulozyten und die basophilen Granulozyten lagen bei allen Patienten innerhalb der altersentsprechenden Normalwerte.





**Abbildung 5:** Zellulärer immunologischer Phänotyp von Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom. **A.** Leukozyten. **B.** Monozyten. **C.** Neutrophile Granulozyten. **D.** Eosinophile Granulozyten. **F.** Basophile Granulozyten.

### 4.1.3.1.2. Lymphozytenoberflächenmarker

Die Lymphozytenoberflächenmarker konnten bei 14 Patienten untersucht werden (Tabelle 16). Die absolute Anzahl an CD3+ T-Zellen war bei einem Patienten erhöht, bei den restlichen Patienten normwertig. Bei einem weiteren Patienten waren die CD4+ T-Zellen erhöht und bei noch einem weiteren Patienten war die absolute Anzahl an CD8+ T-Zellen über dem altersabhängigen Normbereich. Bei fünf der 14 Patienten waren die naiven CD4+T-Zellen (CD4+CD45RA+) erhöht und die Gedächtnis CD4+T-Zellen (CD4+CD45RO+) erniedrigt. Bei zwei der 14 Patienten zeigte sich der relative Anteil von  $\gamma/\delta$ -TZR+T-Zellen erhöht. Die B-Zellen (CD19+) waren bei 3 der getesteten 14 Patienten unterhalb der altersabhängigen Normwerte. Die NK-Zellen (CD16+CD56+CD3-) waren bei 1 der 14 Patienten erniedrigt.

Altersgruppe	Alter < 6 Jahre									
	P16		P28		P17	P18	P23		P26	P29
	Normalwerte		Normalwerte		Normalwerte	Normalwerte	Normalwerte		Normalwerte	Normalwerte
Lymphozyten rel.	%	37 (25-50)	52 (25-50)	44 (25-50)	47 (25-50)	34,1 (25-50)	50 (25-50)	35 (25-50)		
Lymphozyten abs.	/nl	3,67 (2,0-8,0)	4,27 (1,5-7,0)	3,27 (1,5-6,5)	3,05 (1,5-6,5)	3,77 (1,5-6,5)	5,04 (1,5-6,50)	2,24 (1,5-6,8)		
CD3+ abs.	/nl	2,51 (0,9-4,5)	3,21 (0,9-4,5)	2,12 (0,7-4,2)	2,19 (0,7-4,2)	2,31 (0,7-4,2)	4,10 (0,8-3,50)	2,05 (0,7-4,2)		
CD3+ (% der Lymph.)	%	68 (43-76)	75 (43-76)	65 (55-78)	72 (55-78)	80,43 (55-78)	81 (52-78)	91 (55-78)		
CD4+ (% der T-Zellen)	%	66,50	67,21	53,47	68,71		70,27	53,26		
CD4+ abs.	/nl	1,67 (0,5-2,4)	2,15 (0,5-2,40)	1,13 (0,3-2,0)	1,50 (0,3-2,0)	1,134 (0,3-2,0)	2,88 (0,4-2,10)	1,09 (0,3-2,0)		
CD4+ (% der Lymph.)	%	46 (23-48)	51 (27-53)	35 (27-53)	49 (27-53)	49,16 (27-53)	57 (25-48)	49 (27-53)		
CD8+ (% der T-Zellen)	%	25,78	23,76	37,99	22,60		23,41	40,71		
CD8+ abs.	/nl	0,65 (0,3-1,6)	0,76 (0,3-1,6)	0,81 (0,3-1,8)	0,49 (0,3-1,8)	0,836 (0,3-1,8)	0,96 (0,20-1,20)	0,83 (0,3-1,8)		
CD8+ (% der Lymph.)	%	18 (14-33)	18 (19-34)	25 (19-34)	16 (19-34)	36,24 (19-34)	19 (9-35)	37 (19-34)		
CD8+CD4+ (% der T-Zellen)	%	0,80 (<10)	0,60 (<10)	1,58 (<10)	0,45 (<10)	0,89 (<10)	0,89 (<10)	1,19 (<10)		
CD8-CD4- (% der T-Zellen)	%	6,92 (<15)	8,43 (<15)	6,96 (<15)	8,24 (<15)	5,43 (<15)	5,43 (<15)	4,83 (<15)		
CD4/CD8 Ratio		2,58 (0,9-2,9)	2,8 (0,9-2,9)	1,41 (0,9-2,6)	3,04 (0,9-2,6)	1,36 (0,9-2,6)	3,0 (0,9-3,4)	1,3 (0,9-2,6)		
CD19+ abs.	/nl	0,60 (0,2-2,1)	0,82 (0,2-2,1)	0,68 (0,2-1,6)	0,54 (0,2-1,6)	0,357 (0,2-1,6)	0,53 (0,20-0,60)	0,05 (0,2-1,6)		
CD19+ (% der Lymph.)	%	16 (14-44)	19 (14-44)	21 (10-31)	18 (10-31)	12,45 (10-31)	10 (8-24)	2 (10-31)		
NK-Zellen abs.	/nl	0,54 (0,1-1,0)	0,19 (0,1-1,00)	0,42 (0,09-0,9)	0,31 (0,09-0,9)	0,182 (0,09-0,9)	0,31 (0,07-1,20)	0,14 (0,09-0,9)		
NK-Zellen (% der Lymph.)	%	15 (4-23)	4 (4-23)	13 (4-26)	10 (4-26)	6,33 (4-26)	6 (6-27)	6 (4-26)		
Naive CD45RA+ (% der CD4+)	%	77	79	55	74	57,57	71	73		
Memory CD45RO+ (% der CD4+)	%	16	19	40	15	37,33	21	25		
Naive CD45RA+ (% der CD8+)	%	89	87	75	82		79	67		
Memory CD45RO+ (% der CD8+)	%	6	11	18	13		16	29		
g/d TZR+ T-Zellen rel.	%	7 (<10)	7 (<10)	7 (<10)	8 (<10)	14,1 (<10)	6 (<10)	6 (<10)		
a/b TZR+ T-Zellen rel.	%	93	92	93	91	85,82	94	93		
g/d TZR+ T-Zellen abs.	/nl	0,17	0,24	0,14	0,18		0,23	0,13		
a/b TZR+ T-Zellen abs.	/nl	2,33	2,95	1,98	2,00		3,85	1,91		
TZRab+ CD4-CD8 (% der TZRab+ T-Zellen)	%	1,07 <2	2,70 (<2)	1,60 (<2)	1,78 (<2)		0,97 <2	0,95 (<2)		

Altersgruppe	Alter 10 – 18 Jahre								Alter > 18 Jahre	
	P1	P15	P22	P24	P27	P30	P25			
	Normalwerte	Normalwerte	Normalwerte	Normalwerte	Normalwerte	Normalwerte	Normalwerte	Normalwerte	Normalwerte	
Lymphozyten rel.	%	36 (20-40)	13 (20-40)	36,2 (20-40)	13 (20-40)	22 (25-50)	25 (20-40)	27 (20-40)		
Lymphozyten abs.	/nl	2,5 (1,2-5,2)	1,41 (1,2-5,2)	2,98 (1,2-5,2)	1,23 (1,5-5,20)	1,71 (1,20-5,80)	2,63 (1,5-3,0)	1,55 (1,5-3,0)		
CD3+ abs.	/nl	1,85 (0,8-3,5)	1,24 (0,8-3,5)	1,85 (0,8-3,5)	0,89 (0,8-3,5)	1,23 (0,80-3,50)	2,13 (0,9-2,20)	1,24 (0,9-2,20)		
CD3+ (% der Lymph.)	%	74 (52-78)	88 (52-78)	66,96 (52-78)	73 (52-78)	72 (52-78)	81 (60-85)	80 (60-85)		
CD4+ (% der T-Zellen)	%		67,28		64,37	53,05	48,71	55,86		
CD4+ abs.	/nl	1,05 (0,4-2,1)	0,84 (0,4-2,1)	1,32 (0,4-2,1)	0,57 (0,4-2,1)	0,85 (0,4-2,10)	1,04 (0,5-1,2)	0,69 (0,5-1,20)		
CD4+ (% der Lymph.)	%	42 (25-48)	59 (25-48)	71,33 (25-48)	47 (25-48)	38 (25-48)	39 (30-60)	45 (30-60)		
CD8+ (% der T-Zellen)	%		27,32		28,70	36,23	44,68	36,88		
CD8+ abs.	/nl	0,65 (0,2-1,2)	0,34 (0,2-1,2)	0,45 (0,2-1,2)	0,26 (0,2-1,2)	0,44 (0,2-1,20)	0,95 (0,3-0,8)	0,46 (0,3-0,80)		
CD8+ (% der Lymph.)	%	26 (9-35)	24 (9-35)	24,5 (9-35)	21 (9-35)	26 (9-35)	36 (20-40)	30 (20-40)		
CD8+CD4+ (% der T-Zellen)	%		0,78 (<10)		0,79 (<10)	1,07 (<10)	2,76 (<10)	1,34 (<10)		
CD8-CD4- (% der T-Zellen)	%	6 (<15)	4,62 (<15)	<15	6,14 (<15)	9,65 (<15)	3,85 (<15)	5,92 (<15)		
CD4/CD8 Ratio		1,62 (0,9-3,4)	2,46 (0,9-3,4)	0,91 (0,9-3,4)	2,2 (0,9-3,4)	1,5 (0,9-3,4)	1,1 (1,1-3,0)	1,5 (1,1-3,0)		
CD19+ abs.	/nl	0,33 (0,2-0,6)	0,11 (0,2-0,6)	0,155 (0,2-0,6)	0,23 (0,2-0,6)	0,32 (0,2-0,6)	0,23 (0,1-0,4)	0,12 (0,10-0,40)		
CD19+ (% der Lymph.)	%	13 (8-24)	8 (8-24)	15,17 (8-24)	18 (8-24)	19 (8-24)	9 (5-25)	8 (5-25)		
NK-Zellen abs.	/nl	0,25 (0,07-1,2)	0,06 (0,07-1,2)	0,186 (0,07-1,2)	0,10 (0,07-1,2)	0,14 (0,07-1,20)	0,25 (0,1-0,4)	0,16 (0,10-0,40)		
NK-Zellen (% der Lymph.)	%	10 (6-27)	4 (6-27)	18,21 (6-27)	8 (6-27)	8 (6-27)	10 (5-25)	10 (5-25)		
Naive CD45RA+ (% der CD4+)	%	46	53	48,73	60	64	23	38		
Memory CD45RO+ (% der CD4+)	%	45	23	48,95	29	35	77	52		
Naive CD45RA+ (% der CD8+)	%		68		75	74	37	59		
Memory CD45RO+ (% der CD8+)	%		20		19	25	60	35		
g/d TZR+ T-Zellen rel.	%	9 (<10)	7 (<10)	3,52 (<10)	8 (<10)	10 (<10)	5 (<10)	13 (<10)		
a/b TZR+ T-Zellen rel.	%	90	93	96,25	92	90	95	87		
g/d TZR+ T-Zellen abs.	/nl	0,09	0,15	0,15	0,07	0,1	0,1	0,16		
a/b TZR+ T-Zellen abs.	/nl	1,15	1,15	1,15	0,82	1,10	2,02	1,07		
TZRab+ CD4-CD8 (% der TZRab+ T-Zellen)	%		0,51 (<2)		1,00 (<2)	2,21 (<2)	0,63 (<2)	0,72 (<2)		

Tabelle 16: Zellulärer immunologischer Phänotyp von Patienten mit MECP2 Duplikations Syndrom: Lymphozytensubpopulationen in Absolutzahlen und prozentualen Anteilen unter Angabe der altersspezifischen Normalwerte.

Zusammenfassend zeigten sich bis auf einen Patienten mit deutlich erniedrigten CD19+B-Zellen nur sehr geringe Abweichungen von den Normwerten der Lymphozytenoberflächenmarker und keine konsistenten Muster an Abweichungen.

#### 4.1.3.1.3. Lymphozytentransformationstest

Bei 13 Patienten wurde ein Lymphozytentransformationstest durchgeführt (**Tabelle 17**). Die Lymphozytenproliferation nach Stimulation mit PHA und PWM war bei allen Patienten normal. Die Stimulation mit IL-2 zeigte ein geringgradig vermindertes Ansprechen bei 2/13 Patienten und die Stimulation mit Anti-CD3 offenbarte eine verminderte Proliferation bei 1/13 Patienten. Bei der Stimulation mit SAC zeigten 3/13 Patienten eine abgeschwächte Reaktion.

Altersgruppe		Alter < 6 Jahre		Alter 6 – 10 Jahre				
		P16	P28	P17	P18	P23	P26	P29
<b>Mitogen induzierte Proliferation (Stimulationsindex)</b>	Normalwerte							
PHA	>50,0	1063,4	1599,8	925,7	974,2	191,4	511,0	2461,5
IL-2	>30,0	49,2	89,5	136,3	110,5	<b>26,8</b>	<b>26,9</b>	114,3
Anti-CD3	>30,0	312,3	300,8	145,3	196,7	48,3	95,2	492,6
PWM	>20,0	265,8	413,5	232,2	465,2	40,8	134,8	1129,1
SAC	>10,0	88,1	96,4	27,0	23,9	<b>5,8</b>	11,6	<b>4,2</b>
<b>Antigen induzierte Proliferation (Stimulationsindex)</b>								
Tetanus	>3,0	55,0	15,2	211,3	<b>2,1</b>	128,8	16,3	<b>2,9</b>
Candida	>3,0	<b>2,4</b>	4,8	206,5	<b>1,4</b>	16,8	4,1	<b>1,4</b>
Diphtherie	>3,0	3,3	9,8	132,8	<b>1,6</b>	86,6	8,9	3,0

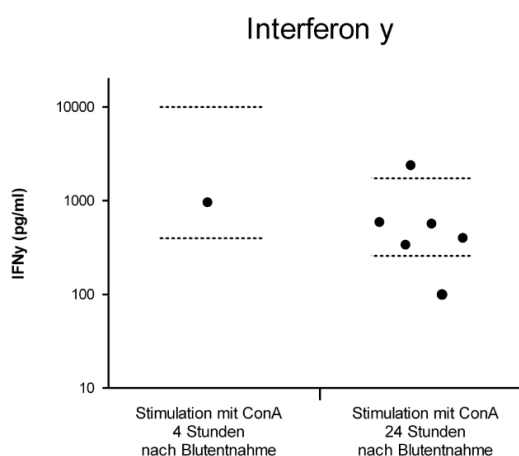
Altersgruppe		Alter 10 – 18 Jahre					Alter > 18 Jahre
		P1	P16	P22	P24	P27	P25
<b>Mitogen induzierte Proliferation (Stimulationsindex)</b>	Normalwerte						
PHA	>50,0	2154,6	2705,1	860,4	905,0	1634,6	464,3
IL-2	>30,0	273,7	111,9	149,1	29,4	97,0	46,4
Anti-CD3	>30,0	<b>10,6</b>	52,2	314,9	73,7	641,3	97,0
PWM	>20,0	622,5	801,6	336,2	195,7	344,6	84,6
SAC	>10,0	46,4	19	31,3	<b>9,7</b>	55,8	11,3
<b>Antigen induzierte Proliferation (Stimulationsindex)</b>							
Tetanus	>3,0	425,3	4,4	142,6	15,1	3,6	29,4
Candida	>3,0	183,1	5,6	63,7	5,9	3,7	13,6
Diphtherie	>3,0	59,1	<b>1,5</b>	73,1	<b>1,7</b>	<b>1,5</b>	<b>1,1</b>

**Tabelle 17:** Lymphozytentransformationstest von Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom. Die Proliferation ist als Stimulationsindex angegeben.

Bei der Stimulation mit *Candida albicans*-Antigen zeigte sich bei 3 der 13 Patienten eine verminderte Lymphozytenproliferation, bei der Stimulation mit Diphtheria-Toxoid eine Abschwächung bei 5 Patienten und bei der Stimulation mit Tetanus-Toxoid eine Abschwächung bei 2 Patienten. Zusammenfassend zeigte sich auch im Lymphozytentransformationstest kein konsistentes Muster an Abweichungen, welches die untersuchten Patienten charakterisieren würde.

#### 4.1.3.1.4. IFN $\gamma$ - Produktion nach ConA-Stimulation

Die Fähigkeit der Patienten, IFN $\gamma$  nach Stimulation mit ConA zu produzieren, wurde im Vollblut von 7 Patienten getestet (**Abbildung 6**). Bei einem Patienten wurde das Vollblut direkt nach der Blutabnahme stimuliert. Es zeigte sich hier eine normale IFN $\gamma$ -Produktion. Bei 6 Patienten wurde das Blut aufgrund des Versandes der Proben erst 24 Stunden nach der Blutabnahme stimuliert. Hier zeigte sich bei 4 Patienten nach der Stimulation eine Menge von IFN $\gamma$ , die innerhalb der Referenzwerte von gesunden Kontrollprobanden lag. Bei einem Patienten lag IFN $\gamma$  nach Stimulation oberhalb des Normbereiches und bei einem Patienten unterhalb des Normbereiches. Insgesamt war damit bei 6 von 7 Patienten keine eingeschränkte IFN $\gamma$ -Produktion nach Stimulation mit ConA festzustellen.



**Abbildung 6:** Interferon- $\gamma$  Sekretion in Vollblut nach Stimulation mit ConA. Die Normalbereiche sind als unterbrochene Linien angegeben.

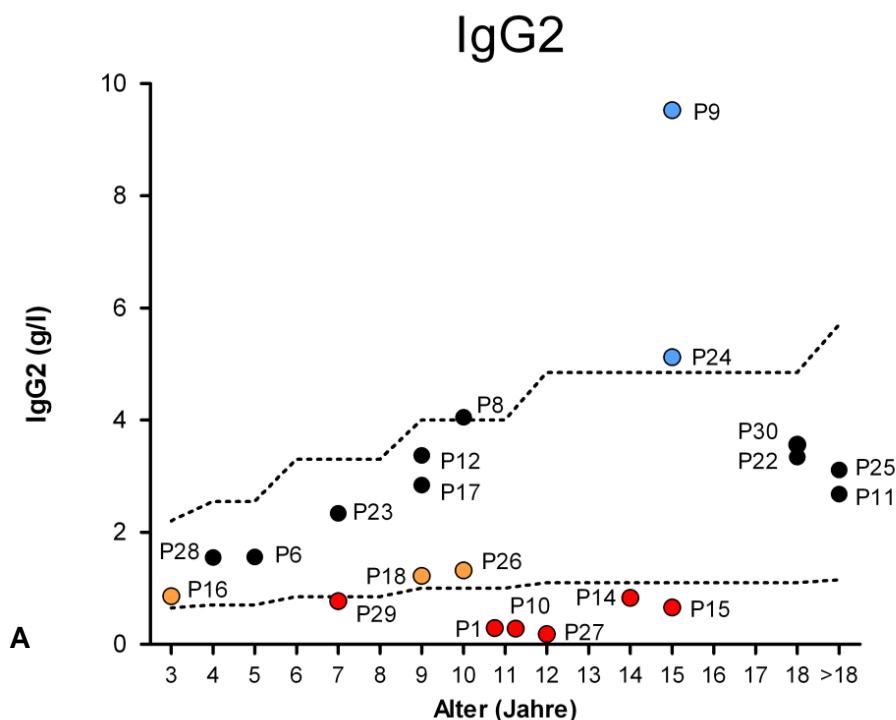
Zusammenfassend zeigen die Lymphozytenoberflächenmarker und der Lymphozytentransformationstest bei den Patienten keine starken Auffälligkeiten und die

IFN $\gamma$ - Produktion nach ConA-Stimulation scheint normal zu sein. Es ergab sich somit mit den in dieser Arbeit verwendeten Methoden kein Hinweis auf eine Störung der zellulären Immunität bei Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom.

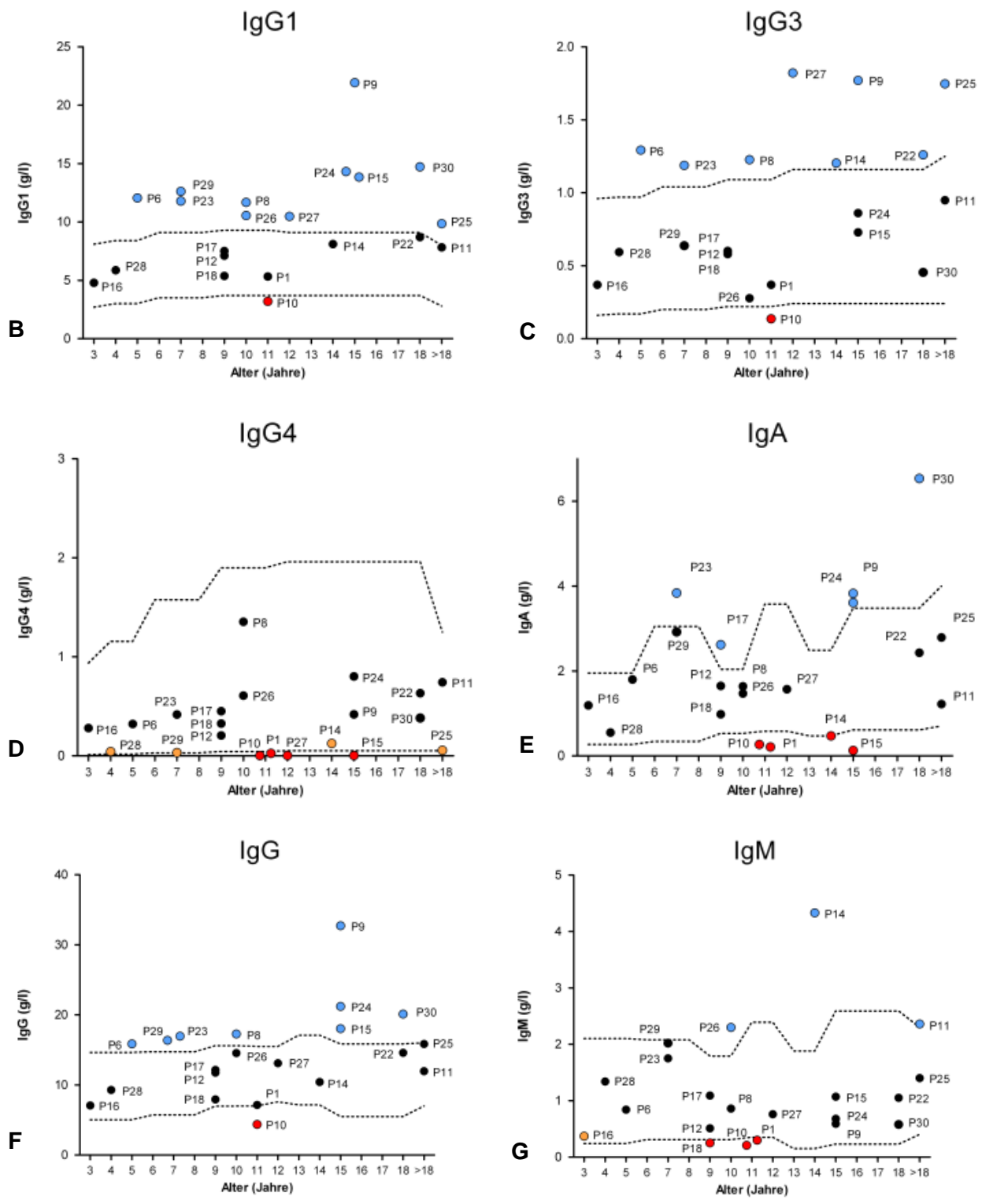
#### 4.1.3.2. Humorale Immunität

##### 4.1.3.2.1. Immunglobulin-Isotypen/-Subklassen

Bei 21 Patienten konnten die Immunglobulin-Isotypen und Subklassen gemessen werden (**Abbildung 7a und 7b**). Bei 6 der 21 Patienten zeigte sich ein IgG<sub>2</sub>-Mangel – bei vier der sechs Patienten kombiniert mit einem zusätzlichen IgA-Mangel. Einer der vier Patienten mit IgA/IgG<sub>2</sub>-Mangel wies eine globale Erniedrigung der Immunglobuline auf, also einschließlich IgG, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub> und IgM. Zusätzlich zu den sechs Patienten mit IgG<sub>2</sub>-Mangel, war das IgG<sub>2</sub> bei drei weiteren Patienten im niedrig-normalen Bereich. Das IgG<sub>4</sub> war bei vier Patienten unterhalb der altersabhängigen Normwerte. Diese vier Patienten wiesen auch eine Erniedrigung von IgG<sub>2</sub> auf. IgG<sub>1</sub> lag bei 11/21 Patienten oberhalb des altersabhängigen Normbereichs und IgG<sub>3</sub> war bei 8/21 oberhalb des Normbereichs. Eine gemeinsame Erhöhung von IgG<sub>1</sub> und IgG<sub>3</sub> konnte bei 6/21 Patienten festgestellt werden.



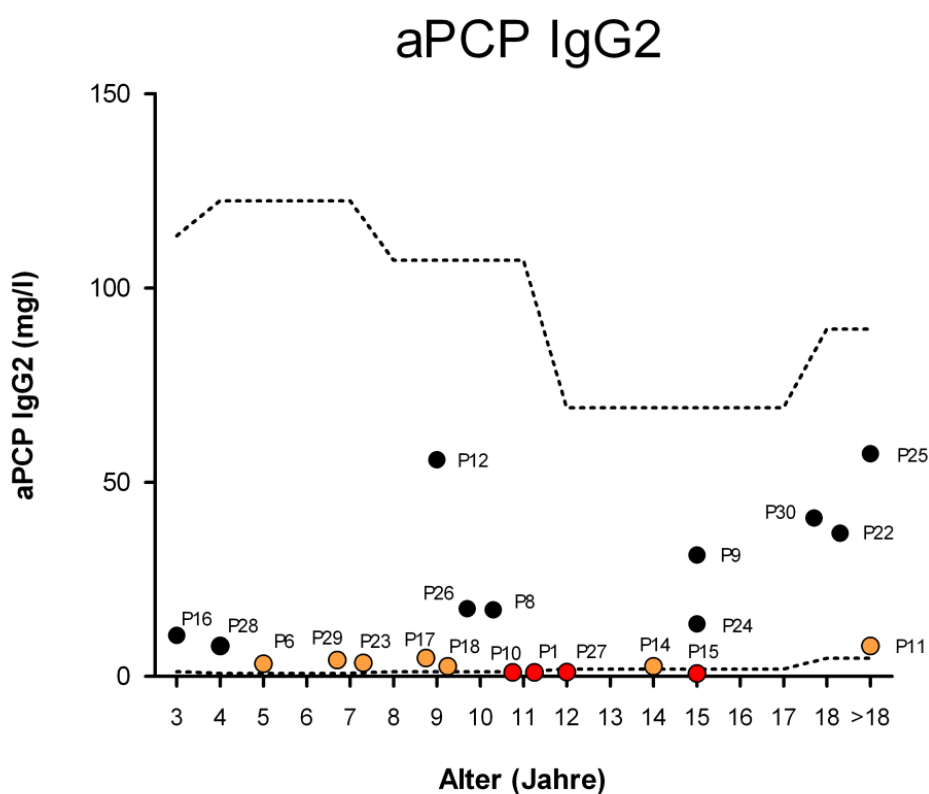
**Abbildung 7a:** Humoraler immunologischer Phänotyp von Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom. **A.** IgG<sub>2</sub> (Normalbereiche sind als unterbochene Linien angegeben).



**Abbildung 7b:** Humoraler immunologischer Phänotyp von Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom. **B.** IgG1. **C.** IgG3. **D.** IgG4. **E.** IgA. **F.** IgG. **G.** IgM (Normalbereiche sind als unterbochene Linien angegeben).

#### 4.1.3.2.2. Impfantikörper

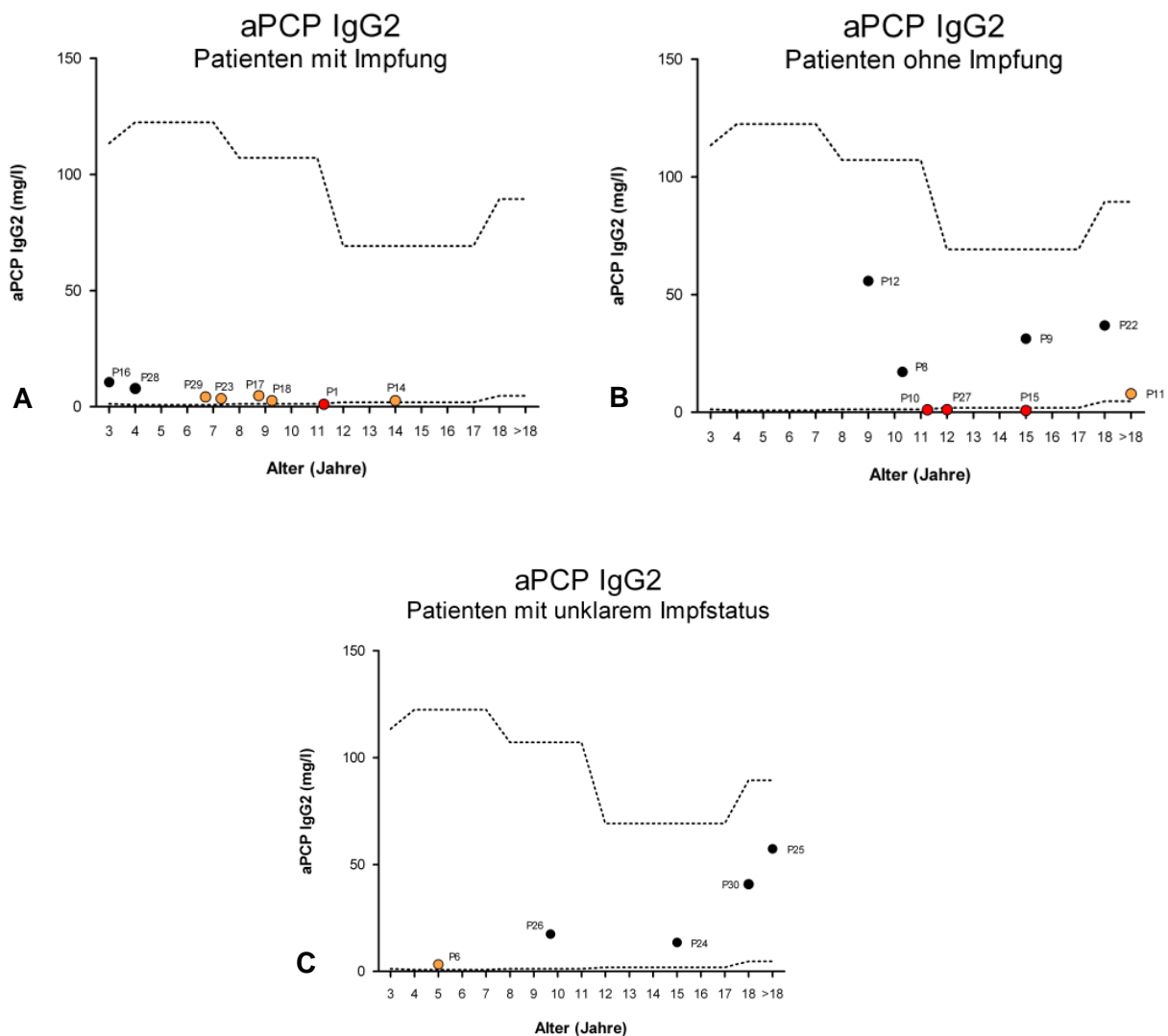
Die Pneumokokken- und Tetanus-Impfantikörper wurden bei 21 Patienten gemessen (**Abbildung 8**). Die IgG<sub>2</sub>-Antikörper gegen Pneumokokken waren bei 4/21 Patienten (P1, P10, P15, P27) unterhalb des altersabhängigen Normbereichs. Bei diesen 4 Patienten waren die IgG<sub>2</sub>-Spiegel auch insgesamt erniedrigt. Bei 6 weiteren Patienten waren die IgG<sub>2</sub>-Antikörper gegen Pneumokokken knapp im niedrig-normalen Bereich. Insgesamt zeigten damit 10/21 Patienten niedrige Impfantikörper gegen Pneumokokken.



**Abbildung 8:** Humoraler immunologischer Phänotyp von Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom: Anti-Pneumokokken-IgG<sub>2</sub> bei allen getesteten Patienten. (Normalbereiche sind als unterbrochene Linien angegeben)

Von den 21 Patienten, bei denen die Pneumokokken-Impfantikörper gemessen wurden, hatten 8 Patienten mindestens eine Pneumokokken-Impfung erhalten, wohingegen 8 Patienten keine Impfung erhalten hatten. Bei 5 Patienten war der Impfstatus anamnestisch nicht sicher zu eruieren. Interessanterweise waren die IgG<sub>2</sub>-

Pneumokokken-Antikörper sogar bei den Patienten mit Pneumokokken-Impfungen niedrig (**Abbildung 9**).



**Abbildung 9:** Humoraler immunologischer Phänotyp von Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom. **A.** anti-Pneumokokken-IgG2 bei Patienten mit Pneumokokken-Impfung. **B.** anti-Pneumokokken-IgG2 bei Patienten ohne Impfung. **C.** anti-Pneumokokken-IgG2 bei Patienten mit unklarem Impfstatus. (Normalbereiche sind als unterbrochene Linien angegeben)

Sowohl Pneumokokken-Polysaccharid-Impfstoffe, als auch Pneumokokken-Konjugat-Impfstoffe waren bei den 8 Patienten mit Pneumokokken-Impfung verwendet worden (**Tabelle 18**). 7 der 8 Patienten mit Pneumokokken-Impfung hatten mehrere Impfungen erhalten. Die Zeitspanne zwischen der letzten Impfung und der Bestimmung der Pneumokokken-Impfantikörper betrug bei den Patienten zwischen 1 Monat und 7 6/12 Jahren. Es ist bemerkenswert, dass sogar der Patient mit dem kurzen Intervall von 1 Monat zwischen Pneumokokken-Booster-Impfung und Bestimmung der Pneumokokken-

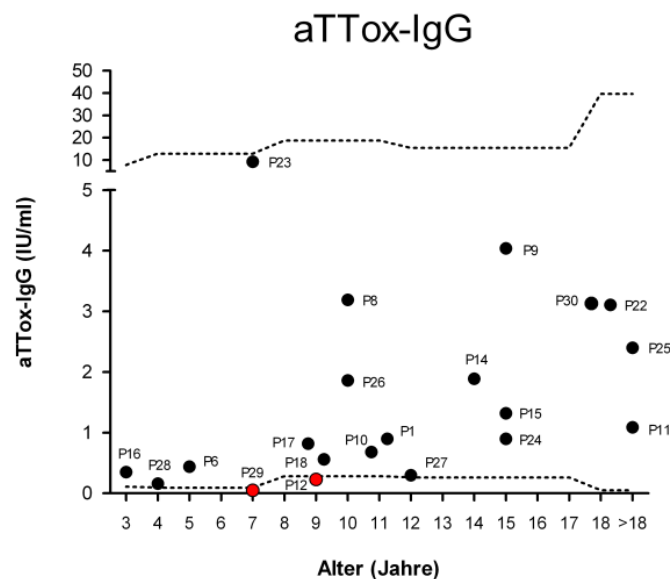


Antikörper keine angemessene Antikörper-Produktion gegen Pneumokokken aufwies, zumal er zuvor bereits 3 Impfungen erhalten hatte.

Patient	Impfstoff	Anzahl der Impfungen	Dauer zwischen letzter Impfung und Bestimmung von aPCP IgG2	Alter bei letzter Impfung
P16	PCV	5	3 Monate	3 Jahre, 4 Monate
P17	PCV	2	7 Jahre, 7 Monate	1 Jahr, 8 Monate
P23	PCV	3	6 Jahre, 10 Monate	10 Monate
P28	PCV	4	3 Jahre, 4 Monate	1 Jahr, 1 Monat
P29	PCV	4	5 Jahre, 9 Monate	2 Jahre
P1	PPV23	3	1 Monat	11 Jahre, 1 Monat
P14	PPV23	2	1 Jahr, 7 Monate	12 Jahre, 11 Monate
P18	PPV23	1	7 Jahre, 6 Monate	2 Jahre, 3 Monate

**Tabelle 18:** Patienten mit Pneumokken-Impfung. Impfstoff, Anzahl der Impfungen, Dauer zwischen letzter Impfung und Bestimmung von aPCP IgG2, Alter bei letzter Impfung. (PCV=polysaccharide conjugated vaccine; PPV23 = 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine).

Die IgG-Antikörper gegen Tetanus Toxoid waren bei 2 von 21 Patienten unterhalb des altersabhängigen Normbereiches und im niedrigen Normbereich bei 2 weiteren Patienten (**Abbildung 10**).



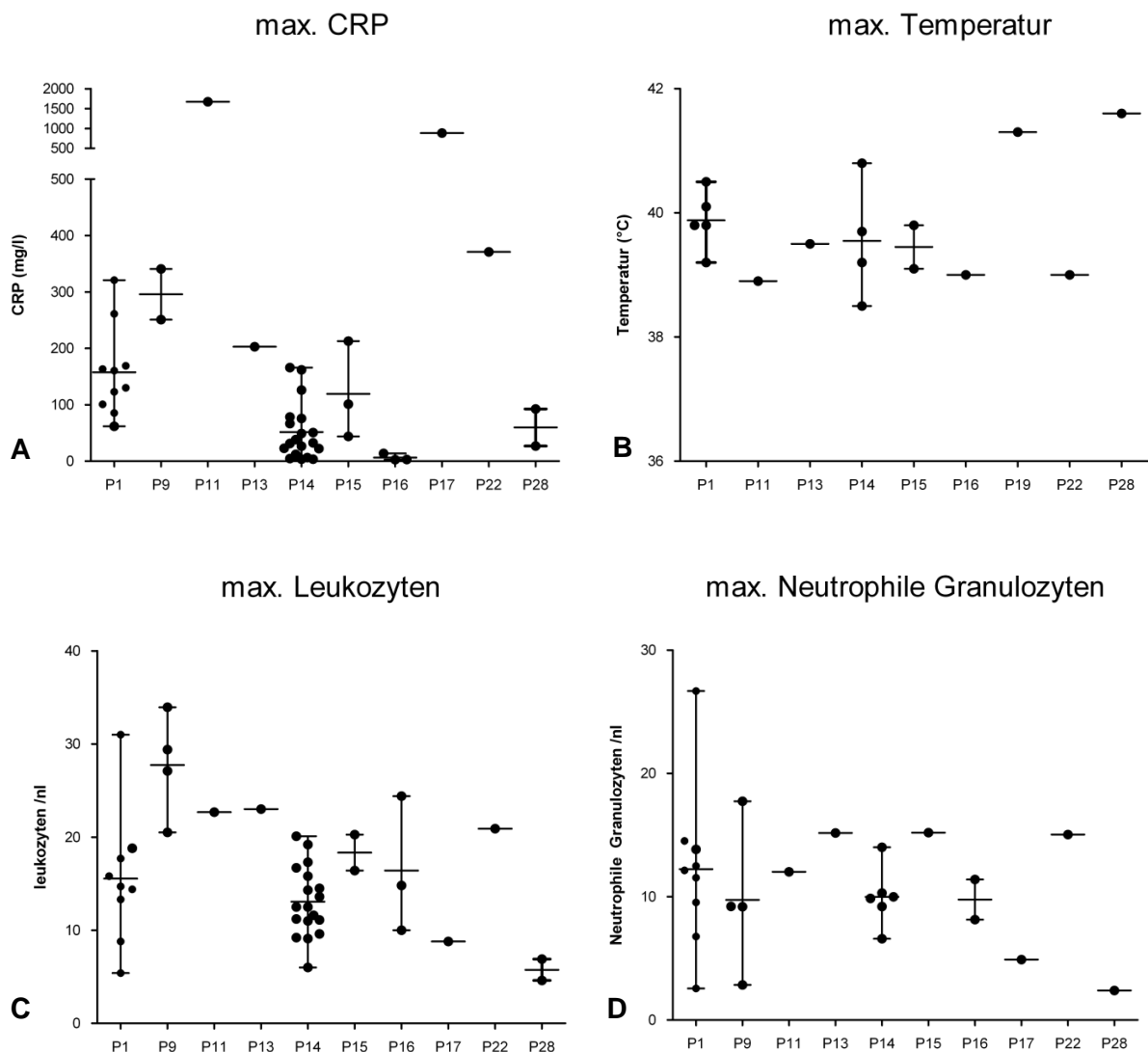
**Abbildung 10:** Humoraler immunologischer Phänotyp von Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom: IgG-Antikörper gegen Tetanus Toxoid.

Zusammenfassend zeigten 6/21 Patienten einen IgG<sub>2</sub>-Mangel – bei 4 dieser Patienten kombiniert mit einem IgA-Mangel. Die Hälfte der untersuchten Patienten (10/21) wiesen

Pneumokokken-Antikörper unterhalb des Normbereichs oder im unteren Normbereich auf.

#### 4.1.4. Inflammatorischer Phänotyp

Bei 10 Patienten waren Daten zum Verlauf der Akut-Phase-Reaktion (maximales CRP, Fieber, Leukozyten, neutrophile Granulozyten) während Infektionen verfügbar (**Abbildung 11**).



**Abbildung 11:** Akut-Phase-Reaktion bei Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom. **A.** Maximales CRP während nicht-invasiver Infektionen. Der obere Normbereich beträgt 5 mg/l. **B.** Maximale Temperatur während nicht-invasiver Infektionen. **C.** Maximale Leukozytenanzahl während nicht-invasiver Infektionen. **D.** Maximale Anzahl an neutrophilen Granulozyten während nicht-invasiver Infektionen.

7 von 10 Patienten hatten nicht-invasive Infektionen mit maximalen CRP-Werten über 200 mg/l (Normbereich < 5 mg/l) durchgemacht. Bei 4 von 10 Patienten wurden während nicht-invasiver Infektionen maximale CRP-Werte von über 300 mg/l gemessen. Nur ein Patient (P16) zeigte keine erhöhten CRP-Werte während nicht-invasiven Infektionen. Der Mittelwert aller gemessenen maximalen CRP-Werte während nicht-invasiver Infektionen liegt bei 157,58 mg/l.

Die maximale Körpertemperatur, welche bei den Patienten während einer nicht-invasiven Infektion gemessen wurde, betrug zwischen 38,5 °C und 41,6 °C mit einem Mittelwert von 39,75 °C.

2 von 10 Patienten hatten nicht-invasive Infektionen mit einer maximalen absoluten Leukozytenzahl von über 30/nl durchgemacht und bei 8 von 10 Patienten zeigten sich maximale Leukozyten-Werte von über 20/nl während einzelner infektiöser Episoden. Der Mittelwert aller gemessenen maximalen Leukozyten-Werte liegt bei 15,69 /nl.

Hinsichtlich der maximalen absoluten Neutrophilenzahl zeigten 5 von 10 Patienten Werte über 15/nl während nicht-invasiver Infektionen. Der Mittelwert aller gemessenen maximalen Neutrophilen-Werte liegt bei 10,51 /nl.

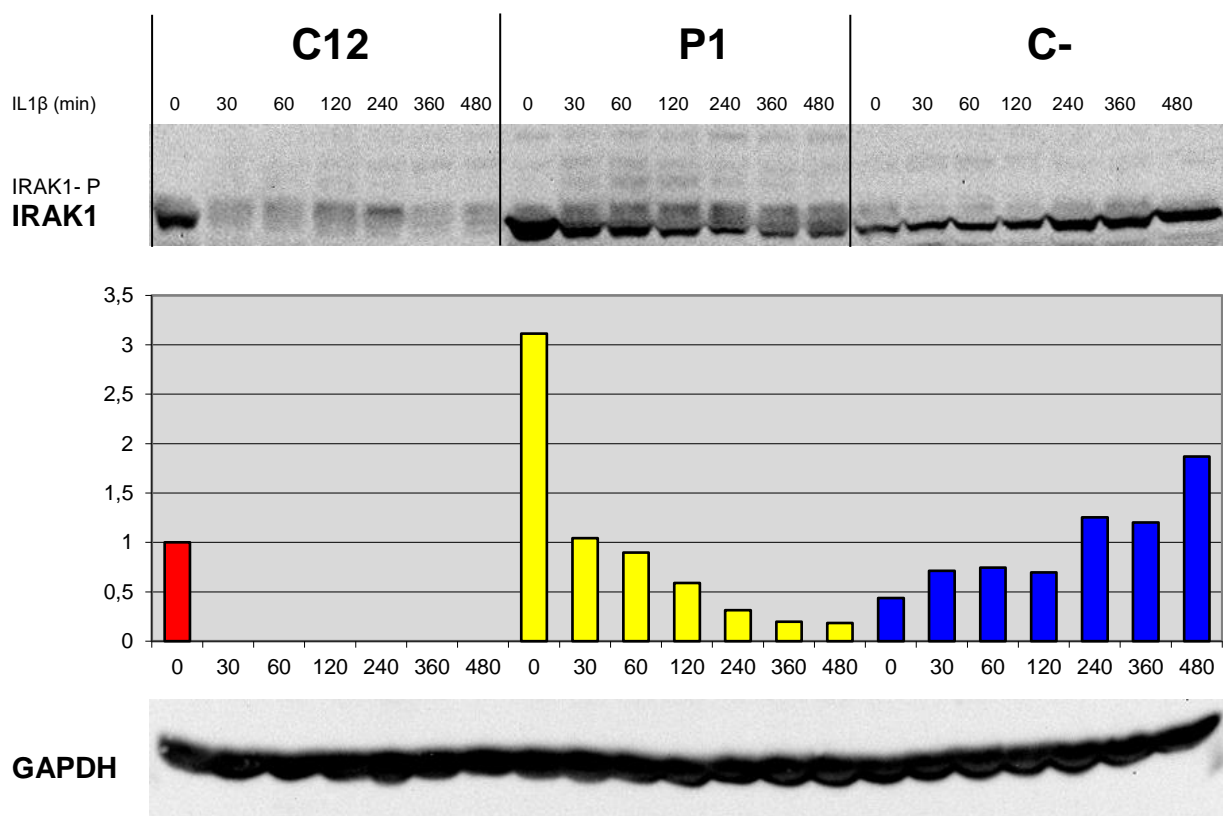
Zusammenfassend weisen diese klinischen Daten auf eine starke Akut-Phase-Reaktion bei Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom hin.

#### **4.2. *In vitro* Untersuchung der Akut-Phase-Reaktion**

Es konnte gezeigt werden, dass die Infektionen der Patienten von einer starken Akut-Phase-Reaktion im Sinne von hohen CRP-Werten und hohem Fieber begleitet sind. Aufgrund der Tatsache, dass alle Patienten in dieser Arbeit eine Duplikation von *IRAK1* aufweisen und bis vor kurzem *MECP2* und *IRAK1* als die „minimal critical region“ des *MECP2* Duplikations Syndroms galten, wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Patienten durch die Duplikation und Überexpression von *IRAK1* an einer hyperinflammatorischen Entzündungsreaktion leiden. Hierfür sollte im zweiten Teil der Arbeit *in vitro* untersucht werden, ob der von *IRAK1* kontrollierte Toll-like-Rezeptor-/Interleukin-1-Rezeptor-Signalweg bei Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom eine vermehrte Aktivierung zeigt.

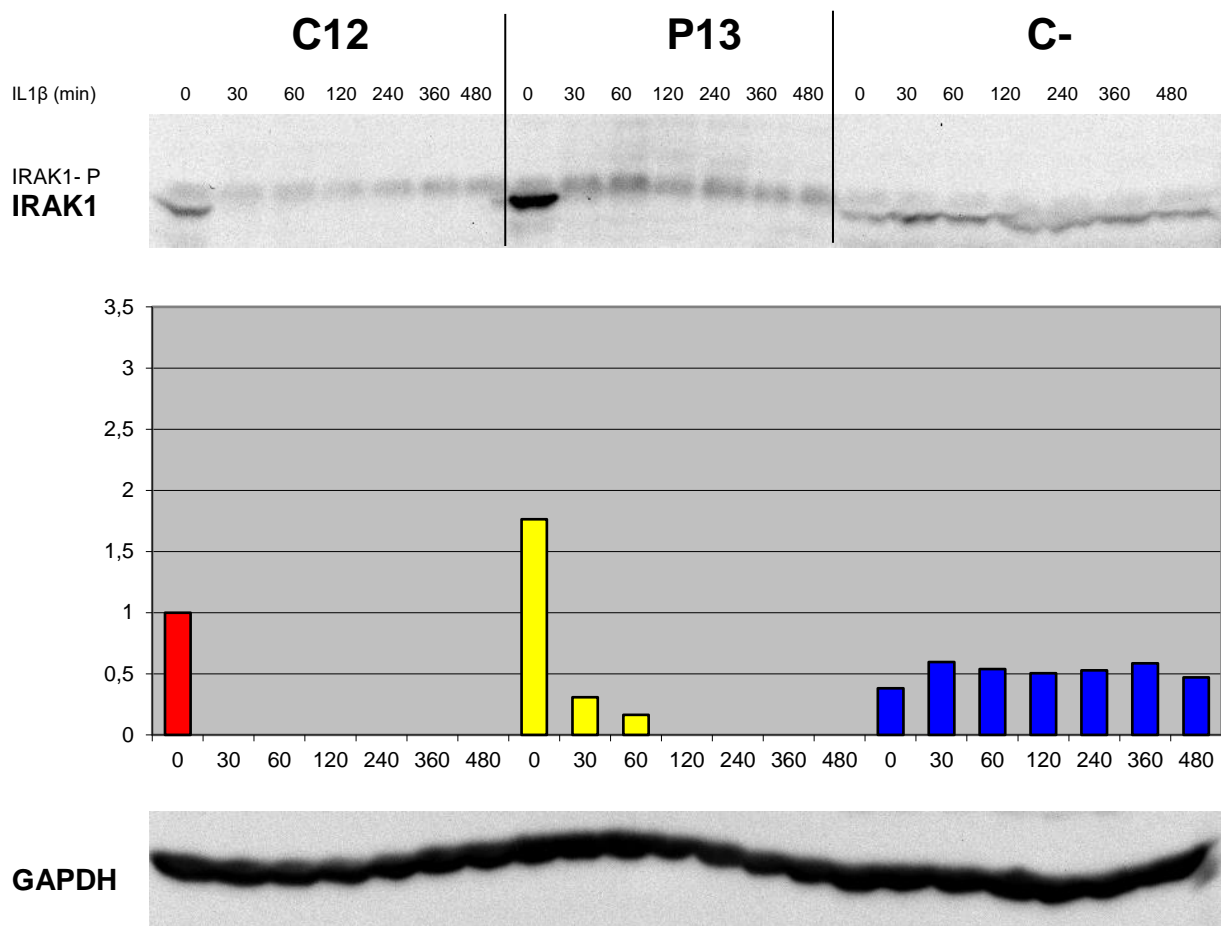
#### 4.2.1. IRAK1-Expression und Abbau

Um die Aktivität im Toll-like-Rezeptor-/ Interleukin-1-Rezeptor-Signalweg zu testen, bietet es sich an, den Abbau von IRAK-1 zu untersuchen. So kommt es etwa bei Defekten im Signalweg oberhalb von IRAK1, also bei Defekten von IRAK4 oder MYD88 zu keinem Abbau von IRAK1. Es wurden SV-40-transformierte Fibroblasten von 2 Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom (P1 und P13) jeweils parallel zu SV-40-Fibroblasten einer gesunden Kontrollperson (Positivkontrolle) und SV40-Fibroblasten einer MYD88-defizienten Person (Negativkontrolle) mit Interleukin-1 $\beta$  stimuliert (**Abbildung 12**, **Abbildung 13**). Es wurden folgende Stimulationszeiten gewählt: 0 – 30 – 60 – 120 – 240 – 360 und 480 Minuten. Mittels Western-Blot-Technik wurde durch Inkubation mit einem IRAK-1 Antikörper die zum jeweiligen Zeitpunkt der Stimulation vorhandene Menge an IRAK1-Protein detektiert. Phosphoryliertes – also im Abbau befindliches - IRAK1 ist im Blot an einer weniger weit gelaufenen Bande oberhalb der IRAK1-Bande zu erkennen. Die IRAK1-Bande in den Western-Blots wurde densitometrisch ausgewertet und mit der GAPDH-Bande normalisiert.



**Abbildung 12:** IRAK1- Expression und Abbau nach Stimulation mit Interleukin-1 $\beta$  in Fibroblasten einer gesunden Kontrollperson (C12), des Patienten P1 und einer MYD88-defizienten Person als Negativkontrolle (C-) mittels Western-Blot. Die farbigen Balken zeigen die IRAK1-Expression nach densitometrischer Auswertung der jeweiligen IRAK1-Bande und Normalisierung mit der entsprechenden, ebenfalls densitometrisch ausgewerteten GAPDH-Bande an.

Bei der Stimulation der Fibroblasten von P1 zeigte sich, dass bei der Positivkontrolle nach 30 Minuten Stimulation mit Interleukin-1 $\beta$  IRAK1 bereits vollständig abgebaut war (**Abbildung 12**). Im Gegensatz hierzu zeigte sich bei den Fibroblasten von P1, dass nach 30 Minuten noch unphosphoryliertes IRAK1 vorhanden war und im Zeitverlauf der Stimulation über 480 Minuten weiter abgebaut wurde. Die densitometrische Auswertung der zum Zeitpunkt 0 vorhandenen IRAK1-Protein-Menge ergab, dass bei dem Patienten P1 mit *IRAK1*-Duplikation eine 3,1-fache Menge von IRAK1-Protein gemessen wurde. Dadurch, dass die bei dem Patienten erhöhte Menge an IRAK1-Protein bei der Stimulation abgebaut wird, lässt sich vermuten, dass IRAK1 an der Signaltransduktion teilnimmt und somit funktionell aktiv ist.



**Abbildung 13:** IRAK1- Expression und Abbau nach Stimulation mit Interleukin-1 $\beta$  in Fibroblasten einer gesunden Kontrollperson (C12), des Patienten P13 und einer MYD88-defizienten Person als Negativkontrolle (C-) mittels Western-Blot. Die farbigen Balken zeigen die IRAK1-Expression nach densitometrischer Auswertung der jeweiligen IRAK1-Bande und Normalisierung mit der entsprechenden, ebenfalls densitometrisch ausgewerteten GAPDH-Bande an.

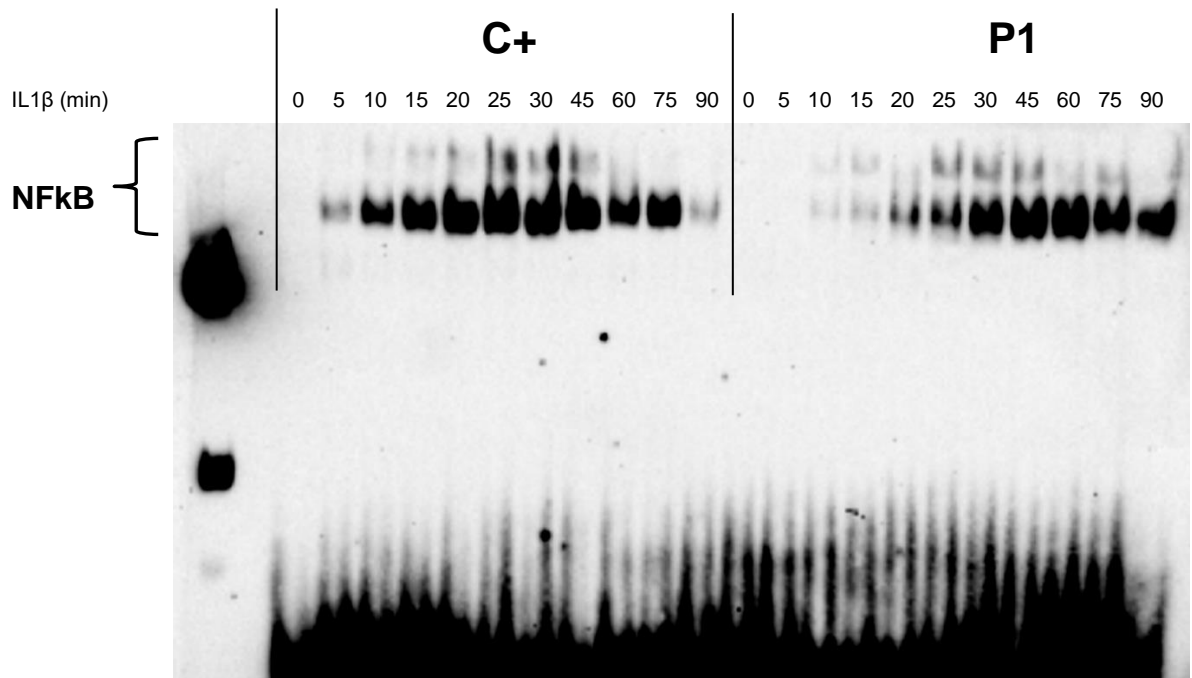
Bei der densitometrischen Auswertung der Stimulation der Fibroblasten von P13 fiel auf, dass zum Zeitpunkt 0 nur eine 1,7-fache Menge an IRAK1-Protein im Vergleich zu den Fibroblasten der gesunden Kontrollperson vorhanden war (**Abbildung 13**). Auch in diesem Versuch war bei der Positivkontrolle nach 30 Minuten IRAK1 vollständig abgebaut. Analog zu den Fibroblasten von P1 war bei P13 nach 30 Minuten Stimulation noch unphosphoryliertes IRAK1 vorhanden. Dieses war erst nach 120 Minuten vollständig abgebaut. Auch für P13 lässt sich feststellen, dass die erhöhte Menge an IRAK1-Protein an der Signaltransduktion teilnimmt. Aufgrund der geringeren Ausgangsmenge zum Zeitpunkt 0 ist dieses im Vergleich zu P1 zu einem früheren Zeitpunkt abgebaut.

#### **4.2.2. NFκB-Translokation mittels Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)**

NFκB zeigt nach Aktivierung durch den Toll-like-receptor-/Interleukin-1-receptor-Signalweg ein oszillierendes Verhalten, indem es periodisch zwischen Zytosol und Zellkern transloziert (112). Dabei folgt die NFκB-Aktivität einem Stimulus-spezifischen zeitlichen Profil (113). Es wurde darüber hinaus vorgeschlagen, dass im oszillierenden Verhalten von NFκB Informationen im Sinne einer analogen Signalverarbeitung codiert werden und die Transkription von Ziel-Genen damit von der Frequenz und der Amplitude der NFκB-Oszillationen abhängen könnten (155).

Eine verstärkte Aktivierung des Toll-like-receptor-/Interleukin-1-receptor-Signalweges könnte dementsprechend zu einer erhöhten Frequenz an Oszillationen, das heißt einem schnelleren Translozieren von NFκB oder zu einer höheren Amplitude, das heißt zu einer erhöhten Menge an transloziertem NFκB führen.

Es sollte untersucht werden, ob bei Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom ein derartiges stärkeres und/oder schnelleres Translozieren von NFκB stattfindet. Hierzu wurden Fibroblasten eines Patienten (P1) mit *MECP2* Duplikations Syndrom und Fibroblasten einer gesunden Kontrollperson mit Interleukin-1β stimuliert und mittels EMSA-Technik die Menge an transloziertem NFκB im Zellkern zu den Zeitpunkten 0 -5 - 10 – 15 – 20 - 25 - 30 – 45 – 60 – 75 und 90 Minuten nach Beginn der Stimulation mit Interleukin-1β visualisiert (**Abbildung 14**).

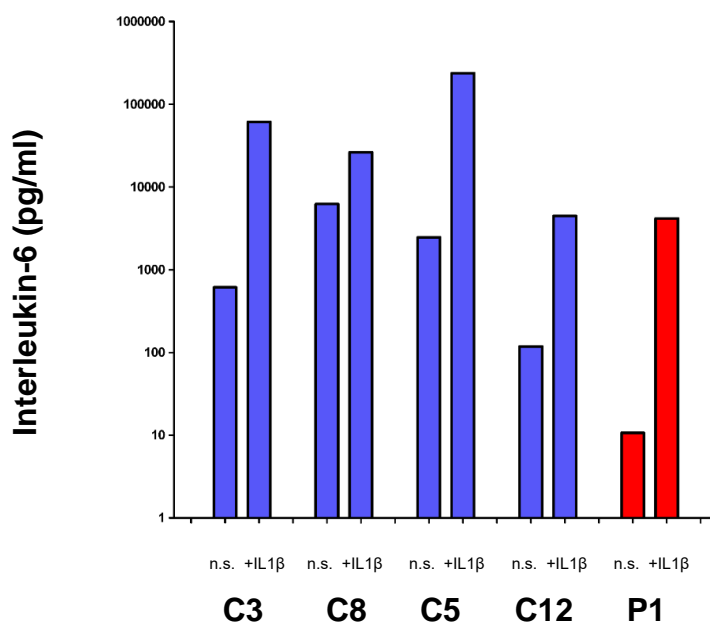


**Abbildung 14:** NFκB-EMSA nach Stimulation von Fibroblasten einer gesunden Kontrollperson (C+) und eines Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndroms (P1) mit Interleukin-1β für 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 75 und 90 Minuten.

Sowohl bei dem Patienten, als auch bei der gesunden Kontrollperson zeigte sich im Zeitverlauf eine stetige Zunahme der Menge an NFκB im Zellkern, welche nach Erreichen eines Maximums nach 25 bis 45 Minuten wieder abnahm. Es konnte zwischen den Fibroblasten des Patienten und den Fibroblasten der gesunden Kontrollperson im gewählten Stimulationszeitraum von 90 Minuten kein Unterschied hinsichtlich der Anzahl an Oszillationen festgestellt werden. Es zeigte sich auch kein Unterschied hinsichtlich der Menge an maximal translozierten NFκB zwischen dem Patienten und der gesunden Kontrollperson. Insofern fiel die Amplitude der Oszillation in beiden Fibroblastenpopulationen gleich stark aus. Die Fibroblasten des Patienten zeigten kein schnelleres Translozieren von NFκB in den Zellkern – im Gegenteil konnte eine verzögerte Translokation von NFκB festgestellt werden: In den Fibroblasten der gesunden Kontrollperson war bereits nach 5 Minuten Stimulation mit Interleukin-1β eine deutliche NFκB- Translokation in den Zellkern festzustellen, wohingegen in den Fibroblasten des Patienten eine vergleichbare Menge an NFκB erst nach 15-20 Minuten in den Zellkern transloziert worden war.

#### 4.2.3. Interleukin-6-Produktion in Fibroblasten nach Aktivierung mit Interleukin-1 $\beta$

Aufgrund des bisher erstmaligen Nachweises einer funktionell aktiven, erhöhten Menge an IRAK-1 in Fibroblasten von Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom, sollte in einem nächsten Schritt getestet werden, ob sich dies bei Aktivierung des Toll-like-receptor-/Interleukin-1-Signalweges in einer erhöhten Produktion von Zytokinen äußert. Wie weiter oben dargestellt, hatte sich gezeigt, dass Patient P1 im Vergleich zur gesunden Kontrollperson C12 eine 3,1-fache Expression von IRAK1 aufweist. Zur Überprüfung, ob sich diese vermehrte Expression von IRAK1 in einer vermehrten Zytokinausschüttung äußert, sollte die Interleukin-6-Produktion nach Stimulation des TLR-/IL1R-Signalweges gemessen werden. Hierfür wurden SV-40-transfizierte Fibroblasten des Patienten P1 und SV40-transfizierte Fibroblasten von 4 gesunden Kontrollpersonen mit Interleukin-1 $\beta$  für 24 Stunden stimuliert. Mittels ELISA wurde als readout Interleukin-6 gemessen (**Abbildung 15**).



**Abbildung 15:** Interleukin-6-Produktion in SV40-transformierten Fibroblasten von 4 gesunden Kontrollpersonen (C3, C8, C5 und C12) und einem Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom (P1) nach 24 Stunden Stimulation mit Interleukin-1 $\beta$  und ohne Stimulation (n.s.).

Bei der Durchführung dieses Versuches zeigte sich, dass sich das Wachstumsverhalten der verwendeten SV40-Fibroblasten stark unterschied, so dass zum Ende der 24 Stunden dauernden Stimulation mit Interleukin-1 $\beta$  unterschiedlich hohe Zellkonzentrationen in den Wells vorhanden waren. Bei der Auswertung der ELISA-Ergebnisse wurde diesem Umstand Rechnung getragen, indem die Interleukin-6-Werte

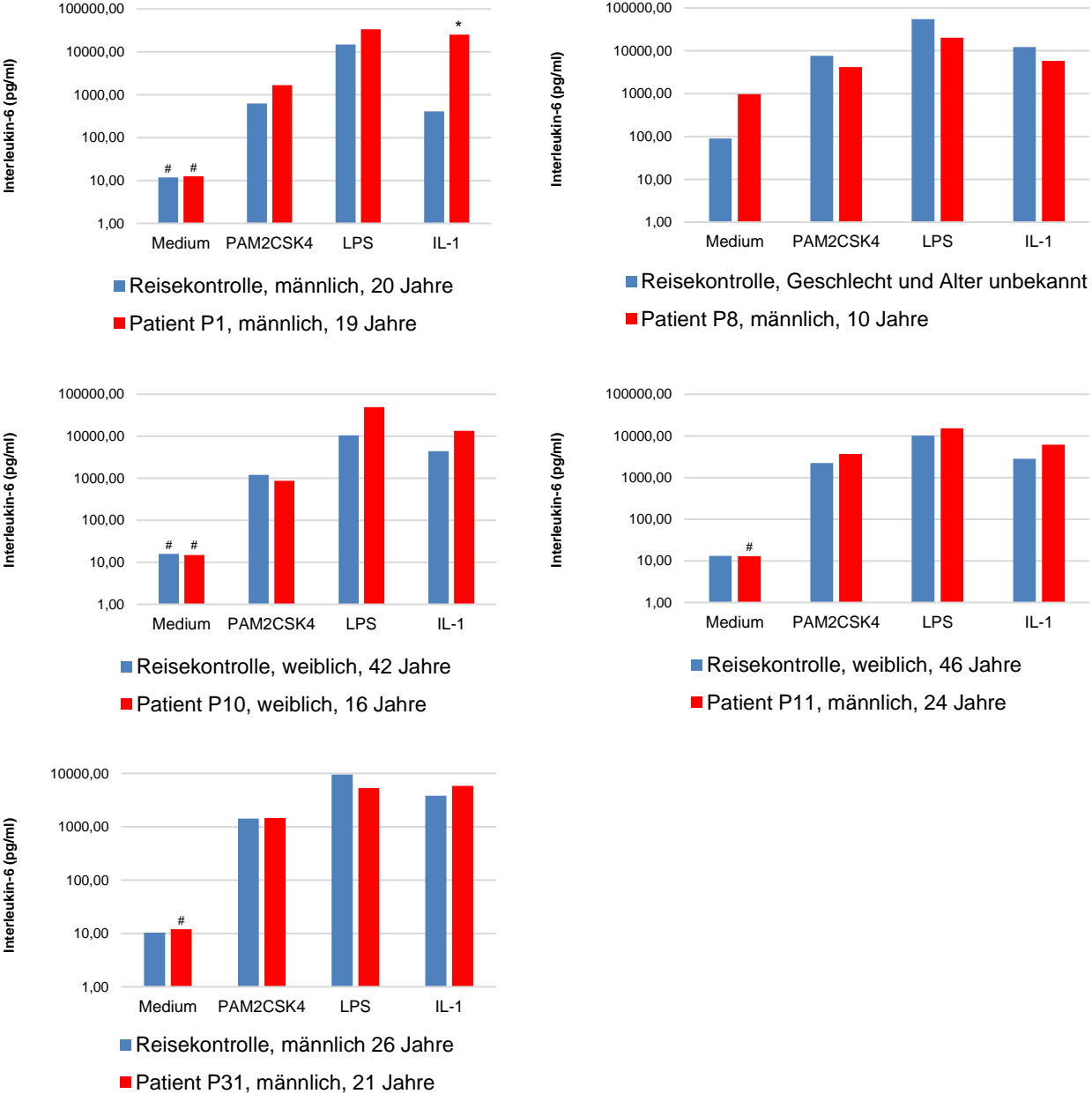


mit der jeweiligen bei Ende der Stimulation vorhandenen Zellkonzentration rechnerisch relativiert wurden. Im Vergleich mit den SV40-transfizierten Fibroblasten der 4 gesunden Kontrollpersonen konnte in den SV40-transfizierten Fibroblasten des Patienten P1 nach der Stimulation mit Interleukin-1 $\beta$  keine erhöhte Interleukin-6-Produktion festgestellt werden. Es zeigten sich allerdings starke Unterschiede in der Interleukin-6-Produktion innerhalb der Gruppe der Kontroll-Fibroblasten. Darüber hinaus ist einschränkend hinzuzufügen, dass die verwendeten SV40-transfizierten Fibroblasten einen unterschiedlichen Grad der Voraktivierung aufwiesen, insofern auch bei den nicht-stimulierten SV40-transfizierten Fibroblasten nach 24 Stunden teils hohe Interleukin-6-Werte gemessen wurden. Diesen beiden Umständen, welche die Verwendung von SV-40-Fibroblasten für die quantitative Messung der Interleukin-6-Produktion einschränken, wird in der Diskussion ausführlich erläutert werden.

#### **4.2.4. Interleukin-6-Produktion in Vollblut**

Auch in Vollblut wurde *ex vivo* die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine untersucht. Von 5 Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom und jeweils einer gesunden Reisekontrolle wurde Vollblut mit PAM<sub>2</sub>CSK<sub>4</sub>, LPS und Interleukin-1 $\beta$  für 48 Stunden stimuliert und anschließend Interleukin-6 mittels Immulite bzw. Platten-ELISA gemessen (**Abbildung 16**). Um die Zellularität der Blutproben zu berücksichtigen, wurden die erhobenen Werte mit der jeweiligen Leukozytenanzahl normalisiert. Im Fall der Stimulation mit PAM<sub>2</sub>CSK<sub>4</sub> ließ sich bei 2 der 5 Patienten im Vergleich mit der jeweiligen Reisekontrolle eine höhere Interleukin-6-Sekretion feststellen, bei 1 Patienten war diese als gleichwertig anzusehen und bei 2 von 5 Patienten erniedrigt. Die Stimulation mit LPS führte bei 3 von 5 Patienten zu einer höheren Produktion von Interleukin-6 als bei der jeweiligen Reisekontrolle und bei 2 von 5 Patienten zu einer niedrigeren Produktion. Wurde das Vollblut hingegen mit Interleukin-1 $\beta$  stimuliert, zeigte sich bei 4 von 5 Patienten eine höhere Interleukin-6-Produktion als bei der jeweiligen Reisekontrolle. Es ist anzumerken, dass die Stimulation mit Interleukin-1 $\beta$  bei einem Patienten zur Messung von Interleukin-6-Werten führte, die außerhalb des erwarteten Messbereichs der auch in der Routine-Diagnostik eingesetzten Interleukin-6-Messung mittels Immulite lagen. Aus diesem Grund erlaubte die Messung der Interleukin-6-Produktion nach Interleukin-1 $\beta$ -Stimulation bei diesem Patienten nur die Angabe „>20000 pg/ml“. Somit handelt es sich bei den hier dargestellten Ergebnissen der Interleukin-6-

Messung in Vollblut teilweise nur um semi-quantitative Daten. Aus diesem Grund und weil zur Messung der Interleukin-6-Produktion in Vollblut zwei unterschiedliche Messmethoden (Immulite und Platten-ELISA) zum Einsatz kamen, ist eine weiterführende quantitative, inferenzielle Statistik mit den in Vollblut erhobenen Interleukin-6-Werten nicht möglich.



**Abbildung 16:** Interleukin-6-Produktion in Vollblut von 5 Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom im Vergleich mit der jeweiligen Reisekontrolle nach Stimulation mit PAM<sub>2</sub>CSK<sub>4</sub>, LPS, Interleukin-1β und ohne Stimulation (nur Medium). Der mit \* markierte Balken gibt einen Minimalwert an, da die Messung hier einen Wert ergab, der außerhalb des erwarteten Messbereichs der auch in der Routine-Diagnostik eingesetzten Interleukin-6-Messung mittels Immulite lag, so dass nur eine qualitative Angabe „>“ möglich war. Die mit # markierten Balken geben einen Maximalwert an, da die Konzentration von Interleukin-6 in diesen unstimulierten Proben sehr niedrig ist und die Messung mittels Immulite hier nur die qualitative Angabe „<“ ermöglichte.

## 5. Diskussion

Die Duplikation des *MECP2* (methyl CpG binding protein 2) - Gens auf Chromosom Xq28 führt zu einer schweren, syndromalen Form von Intelligenzminderung. In mehreren Kasuistiken und Fallserien wird darüberhinaus von Patienten berichtet, die neben dem schweren neurologischen Phänotyp an rezidivierenden Infektionen leiden. In dieser Arbeit wurde erstmals der infektiologisch-immunologische Phänotyp von Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom auf Basis einer Kohorte von 31 Patienten systematisch mittels eines standardisierten Fragebogens erhoben. Darüber hinaus sollte die Hypothese getestet werden, ob Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom aufgrund der Duplikation von *IRAK1* eine verstärkte proinflammatorische Signaltransduktion über den TLR-/IL1R-Signalweg aufweisen.

### 5.1. Infektiologisch-immunologische Phänotypisierung

#### 5.1.1. Infektiologischer Phänotyp

Die Auswertung der Daten zum infektiologischen Phänotyp zeigte, dass Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom eine erhöhte Anfälligkeit für Infektionen durch Bakterien aufweisen, welche in der Lage sind, eine Kapsel zu bilden – insbesondere durch *S. pneumoniae* und *H. influenzae*. Es konnte keine erhöhte Anfälligkeit für Infektionen durch Mykobakterien, *Pneumocystis* spp, Pilze und Viren festgestellt werden. Das hauptsächliche Auftreten von Atemwegsinfektionen und schweren invasiven Infektionen durch Bakterien, welche in der Lage sind, eine Kapsel zu bilden, legt eine Störung der humoralen Immunität nahe (156). Neben den bei humoralen Immundefekten häufig vorkommenden bekapselten Erregern *S. pneumoniae* und *H. influenzae* wurde bei den Patienten eine Vielzahl von Erregern isoliert, für die in der Literatur die prinzipielle Fähigkeit zur Bildung einer Kapsel beschrieben ist (137-154). Ob es sich bei diesen isolierten Erregern tatsächlich um bekapselte Stämme dieser fakultativ-bekapselten Erregern handelte, bleibt jedoch unklar, da ein solcher Nachweis in der mikrobiologischen Routine-Diagnostik nicht erbracht wird.

## 5.1.2. Immunologischer Phänotyp

### 5.1.2.1. Zelluläre Immunität

Hinsichtlich der Lymphozytenoberflächenmarker zeigten die in dieser Arbeit untersuchten Patienten keine konsistenten und/oder gravierenden Abweichungen der absoluten Anzahl oder des relativen Anteils von CD3+, CD4+, CD8+ oder  $\gamma/\delta$ -TZR+ T-Zellen. Bei 5 von 14 Patienten konnten erhöhte Anteile von CD4+CD45RA+ naiven-T-Zellen und erniedrigte Anteile von CD4+CD45R0+ Gedächtnis-T-Zellen festgestellt werden. Das Verhältnis zwischen CD4+CD45RA+ naiven T-Zellen und CD4+CD45R0+ Gedächtnis-T-Zellen war bei 11/14 Patienten  $>1$  und bei 3/14 Patienten  $<1$ . Auch im Lymphozytentransformationstest und bei der Untersuchung der IFN $\gamma$ -Sekretion ergaben sich keine konsistenten und/oder gravierenden Abweichungen von Normalwerten bzw. deutliche Muster an Abweichungen.

Yang et al. beschrieben, dass die Duplikation von *MECP2* einen Mangel an TH1-Differenzierung und eine verminderte IFN $\gamma$ -Sekretion durch T-Zellen bei Mäusen und Menschen mit *MECP2* Duplikation verursacht (44). Sie schlossen daraus, dass dieser Mangel an TH1-Differenzierung und IFN $\gamma$ -Sekretion der Hauptgrund für die erhöhte Infektions-Anfälligkeit bei Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom wäre und folgerten, dass Patienten mit *MECP* Duplikations Syndrom an einem T-zellulären Immundefekt leiden. Laut Felgentreff et. al. sind 4 diagnostische Parameter hinweisend für eine gestörte T-zelluläre Immunität: 1. Verminderte Anzahl von CD3+, CD4+ oder CD8+ T-Zellen 2. Verminderte Anzahl von CD4+CD45RA+ naiven T-Zellen 3. Erhöhte Anzahl von  $\gamma/\delta$ -TZR+ T-Zellen 4. Verminderte Proliferation im Lymphozytentransformationstest (157). Da sich im immunologischen Phänotyp der in dieser Arbeit untersuchten Patientenkohorte kein Hinweis auf Vorliegen eines dieser vier Kriterien fand, sprechen die Daten der vorliegenden Arbeit dafür, dass Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom nicht an einem T-zellulären Immundefekt leiden. Darüberhinaus weist auch der infektiologische Phänotyp der vorliegenden Patientenkohorte nicht in Richtung einer Störung der T-zellulären Immunität, insofern keiner der Patienten an einer Infektion durch Cytomegalie-Virus, Ebstein-Barr-Virus oder durch *Pneumocystis jiroveci* litt.

Wie bereits dargestellt, beschrieben Yang et al. eine verminderte IFN $\gamma$ -Sekretion sowohl bei Mäusen als auch bei Menschen mit *MECP2* Duplikations Syndrom. Obwohl in der vorliegenden Arbeit keine generelle, verminderte IFN $\gamma$ -Sekretion festgestellt werden konnte, wird die Beobachtung von Yang et. al durch die Daten dieser Arbeit zum humoralen immunologischen Phänotyp unterstützt. Denn interessanterweise zeigten 13 von 21 der Patienten in der vorliegenden Studie entweder supra-normale Werte von IgG1, oder IgG3 oder IgG1 und IgG3. Dies legt einen direkten oder indirekten Effekt der *MECP2*-Duplikation auf die Expression von IgG3 und IgG1 am  $\gamma 3/\gamma 1$ -Lokus und von IgA, IgG2 und IgG4 am  $\alpha 1/\gamma 2/\gamma 4$ -Lokus nahe. Es konnte gezeigt werden, dass IFN $\gamma$  die Expression des IgG2a-Isotyps in Mäusen stimuliert und die Produktion von IgG3, IgG1, IgG2b und IgE inhibiert (158). Eine Störung der IFN $\gamma$ -Sekretion – wie von Yang et al. beschrieben - könnte also zu den beobachteten Veränderungen der Immunglobulin-Isotypen und Immunglobulin-Subklassen bei Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom führen, obwohl die Rolle von IFN $\gamma$  in der Regulation von IgG3 kontrovers diskutiert wird (159,160).

Allerdings widersprechen die in dieser Arbeit gewonnenen Daten der von Yang et al. aufgestellten Hypothese einer verminderten IFN $\gamma$ -Sekretion als ausreichende Erklärung für die erhöhte Infektionsanfälligkeit aufgrund der folgenden 4 Punkte: 1. Bei 5 von 7 Patienten der dieser Arbeit zugrundeliegenden Kohorte konnte eine normale IFN $\gamma$ -Produktion nach Stimulation mit ConA festgestellt werden. Bei einem Patienten fiel eine sogar erhöhte IFN $\gamma$ -Produktion auf und nur ein Patient zeigte eine leicht abgeschwächte IFN $\gamma$ -Produktion im Vergleich zu gesunden Kontroll-Probanden. 2. Falls eine abgeschwächte IFN $\gamma$ -Sekretion bei Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom ursächlich für schwere Infektionen wäre, würde man disseminierte und/oder invasive Infektionen mit atypischen Mykobakterien und *S. enteritidis* erwarten, wie sie für partielle und komplette Defekte in mindestens 9 Genen, welche zu Störungen im IFN $\gamma$ -Rezeptor-Signalweg oder im IFN $\gamma$ -Signalweg führen, beschrieben sind (81-83,161). 3. In der vorliegenden Kohorte mit einer Gesamtzahl an 343 Patientenjahren entwickelte nur ein Patient (P9) eine einzelne nicht-komplizierte Infektion mit *M. tuberculosis*, welche auf die Lunge beschränkt blieb und mittels Standardtherapie erfolgreich behandelt wurde. Bei einem Patienten mit einer relevanten Verminderung der IFN $\gamma$ -Sekretion hätte diese

Infektion mit *M. tuberculosis* mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit einen wesentlich schwereren Verlauf genommen (81-83,161).

Zusammenfassend widerlegen die Daten dieser Arbeit die von Yang et. al aufgestellte Hypothese eines zellulären Immundefektes und eines für die Infektionen verantwortlichen IFN $\gamma$ -Sekretions-Defektes, da die in dieser Arbeit untersuchten Patienten weder die für einen T-zellulären- oder IFN $\gamma$ -Sekretions-Defekt typischen Infektionen entwickelten, noch einen für einen T-zellulären Immundefekt typischen immunologischen Phänotyp zeigen, noch eine verminderte IFN $\gamma$ -Sekretion aufweisen.

#### **5.1.2.2. Humorale Immunität**

Ein IgG2-Mangel konnte bei 6 von 21 analysierten Patienten festgestellt werden – bei 4 der 6 Patienten mit einem zusätzlichen IgA-Mangel, während 15 der 21 analysierten Patienten keinen IgG2- oder IgA-Mangel aufwiesen. Der IgG2-Mangel bei 6/21 Patienten und die erniedrigten bzw. niedrig-normalen Antikörper gegen Pneumokokken bei 10/21 Patienten sprechen dafür, dass eine Störung der humoralen Immunität bei Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom häufiger ist als in der Normalbevölkerung, in der eine Prävalenz von primären Immundefekten von 1 : 1200 angenommen wird (162,163), wobei knapp die Hälfte der primären Immundefekte durch eine Störung der humoralen Immunität gekennzeichnet ist (164).

5 von 6 Patienten mit IgG2-Mangel entwickelten auch schwere Infektionen. Da 3 der 4 Patienten mit kombiniertem IgA-/IgG2-Mangel zusätzlich eine sehr hohe Anzahl an Infektionen aufwiesen und den schwersten infektiologischen Phänotyp in der Kohorte zeigten, scheint zumindest eine Assoziation zwischen IgA-/IgG2-Mangel und schweren Infektionen bei Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom zu bestehen. Nur 2 der 15 Patienten ohne IgA- oder IgG2-Mangel entwickelten schwere rezidivierende Infektionen – vergleichbar mit dem Phänotyp, welcher bei den Patienten mit IgA-/IgG2-Mangel auftrat. Einer dieser beiden Patienten mit schwerem infektiologischem Phänotyp zeigte trotz dreimaliger Pneumokokken-Impfung niedrige IgG2- Antikörper gegen Pneumokokken, was darauf hindeutet, dass dieser Patient nicht in der Lage ist, eine angemessene spezifische Antikörper-Produktion einzuleiten – obwohl seine globalen

Immunglobulin-Spiegel normal sind. Der andere Patient (P9) mit einem schweren infektiologischen Phänotyp und ohne IgA-/IgG2-Mangel zeigte ein stark erhöhtes Gesamt-IgG. Dieser Patient hatte seit Geburt eine persistierend erhöhte Leukozyten-Zahl im Blut, weshalb es plausibel erscheint, dass er zusätzlich an einem unbekanntem, chronischen, inflammatorischen Prozess leidet. 7 der 15 Patienten ohne IgA-/IgG2-Mangel entwickelten wenige Infektionen und 2 der 15 Patienten ohne IgA-/IgG2-Mangel entwickelten keine Infektionen. Bei 4 der 15 Patienten ohne IgA-/IgG2-Mangel konnte die Schwere des infektiologischen Phänotyps nicht adäquat beurteilt werden, weil der Patient entweder sehr jung war oder weil die Daten zum infektiologischen Krankheitsverlauf nicht verfügbar waren. Das einzige Individuum, das trotz Vorliegen eines IgA-/IgG2-Mangels bisher an keinen Infektionen erkrankte, ist weiblich.

Knapp die Hälfte der Patienten in dieser Studie wiesen Pneumokokken-Impfantikörper unterhalb des Normbereichs oder im unteren Normbereich auf. Dieser Sachverhalt entspricht den Beobachtungen von Friez et al. und Prescott et al., dass einige der Patienten nach der Pneumokokken-Impfung Booster benötigen, um adäquate Impfantikörper aufzubauen (6,16). Friez et al. berichteten, dass 4 von 10 getesteten Patienten in ihrer Patientenkohorte einen IgA-Mangel aufweisen (6), wohingegen in der vorliegenden Studie ein IgA-Mangel bei 4 von 21 Patienten festgestellt wurde. Der Anteil von Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom, welche einen IgA-Mangel aufweisen, ist also in der Publikation von Friez et al. höher. Allerdings ist anzumerken, dass es sich bei Friez et al. in ihrer Fallserie um eine retrospektive Datenerhebung handelt und aus diesem Grund anzunehmen ist, dass die Immunglobulin-Isotypen nur bei den Patienten gemessen wurden, welche auch an rezidivierenden Infektionen litten.

Zusammenfassend weisen Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom eine Störung der humoralen Immunität auf und schwere Infektionen mit potentiell bekapselten Bakterien sind stark mit einem Mangel an IgA und IgG2 assoziiert.

## **5.2. *In vitro* Untersuchung der Akut-Phase-Reaktion**

### **5.2.1. IRAK1-Expression und Abbau**

Es konnte gezeigt werden, dass die Duplikation des *IRAK1*-Gens bei Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom zu einer erhöhten Expression an IRAK1-Protein führt. Im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen ohne IRAK1-Duplikation konnte bei den in

dieser Arbeit untersuchten Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom eine 1,7 – 3,1-fach erhöhte Menge an IRAK1-Protein nachgewiesen werden. Diese Variabilität entspricht den Beobachtungen von Ramocki et al., welche bei Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom eine 2 – 7 fach erhöhte Menge an *IRAK1*-mRNA feststellen konnten (20).

Da bei den Patienten IRAK1 nach Stimulation mit Interleukin-1 $\beta$  phosphoryliert und abgebaut wird, lässt sich annehmen, dass dieses zusätzliche IRAK1 an der Signalübertragung teilnimmt und somit funktionell aktiv ist. Bei den Fibroblasten der gesunden Kontrollpersonen ist bereits nach 30 Minuten kein unphosphoryliertes IRAK1 mehr vorhanden. Im Zusammenhang mit der publizierten Beobachtung, dass IRAK1-defiziente menschliche Fibroblasten signifikant erniedrigte Mengen an Interleukin-6 produzieren, wenn sie mit Interleukin-1 $\beta$  stimuliert werden (117), ist davon auszugehen, dass die Aktivität im TLR/IL1-Signalweg stark eingeschränkt ist, wenn kein unphosphoryliertes IRAK1 mehr vorhanden ist. Demgegenüber ist in den Fibroblasten der Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom auch über den Stimulationszeitpunkt von 30 Minuten hinaus noch unphosphoryliertes IRAK1 vorhanden. Es erscheint insofern möglich, dass es durch die Duplikation von *IRAK1* und damit der vermehrten Expression des IRAK1-Proteins zu einer prolongierten Aktivierung des TLR/IL1R-Signalweges kommt. In der Summe über die Zeit könnte diese prolongierte Signaltransduktion damit eine erhöhte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen nach Aktivierung mit Interleukin-1 $\beta$  zur Folge haben.

### **5.2.2. NF $\kappa$ B-Translokation mittels Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)**

Bei der Untersuchung des oszillatorischen Verhaltens von NF $\kappa$ B fiel auf, dass es in Fibroblasten eines Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom zu einer verzögerten Translokation von NF $\kappa$ B in den Zellkern kam. Dies steht im Widerspruch zu der zunächst formulierten Vermutung, dass es durch eine verstärkte Toll-like/Interleukin-1-receptor-Signaltransduktion zu einer erhöhten Frequenz und damit einem schnelleren Translozieren von NF $\kappa$ B kommen könnte.

Einen möglichen Erklärungsansatz für die Beobachtung einer verzögerten nukleären Translokation von NF $\kappa$ B liefert eine Arbeit von Nelson et al.: Hier wurde in HeLA-Zellen mittels fluorenzmarkierten Proteinen und konfokaler Mikroskopie gezeigt, dass eine



Überexpression von I $\kappa$ B $\alpha$  zu einer verzögerten nukleären Translokation von p65, einer Untereinheit von NF $\kappa$ B führt (165). I $\kappa$ B $\alpha$  ist, wie bereits dargestellt, Ziel-Gen des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B. Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass IRAK1 nach nukleärer Translokation an den Promotor von I $\kappa$ B $\alpha$  bindet. Dies konnte in MCF-7-Zellen nach Stimulation mit Interleukin-1 und in RAW264.7-Zellen nach Stimulation mit LPS nachgewiesen werden (166). In diesem Sinne führte eine transiente Expression von IRAK1 in vormals IRAK-1-defizienten HEK-293-I1A-Zellen zu einer erhöhten Expression von I $\kappa$ B $\alpha$  auf RNA-Ebene. Insofern erscheint es denkbar, dass die verzögerte Translokation von NF $\kappa$ B in den Fibroblasten des Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom eine Folge der Duplikation von *IRAK1* und einer dadurch verursachten Überexprimierung von I $\kappa$ B $\alpha$  ist.

Im untersuchten Stimulationszeitraum von 90 Minuten zeigte sich sowohl in den Fibroblasten des Patienten als auch in den Fibroblasten der gesunden Kontrollperson eine Oszillation, deren Amplitude sich in den beiden Zellpopulationen nicht unterschied. Wie bereits weiter oben dargestellt, konnte in den Fibroblasten des Patienten P1 ein IRAK1-Abbau über einen Zeitraum von 480 Minuten festgestellt werden, was als prolongierte aktive Signaltransduktion im TLR-/IL1R-Signalweg aufgefasst werden kann. Insofern wäre in zukünftigen Untersuchungen der Frage nachzugehen, ob sich Fibroblasten von Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom bei langen Stimulationszeiten von bis zu 480 Minuten in der Anzahl und Dauer der NF $\kappa$ B-Oszillationen von Fibroblasten gesunder Kontrollpersonen unterscheiden.

### **5.2.3. Interleukin-6-Produktion in Fibroblasten nach Aktivierung mit Interleukin-1 $\beta$**

Die Produktion proinflammatorischer Zytokine nach Aktivierung mit Interleukin-1 $\beta$  bei Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom wurde zunächst in SV40-transfizierten Fibroblasten untersucht. In SV40-transfizierten Fibroblasten des Patienten P1 zeigte sich im Vergleich mit SV40-transfizierten Fibroblasten von vier gesunden Kontrollpersonen nach Stimulation mit Interleukin-1 $\beta$  keine erhöhte Interleukin-6-Produktion.

Aufgrund von starken Unterschieden in der Interleukin-6-Produktion innerhalb der Gruppe der Kontroll-Fibroblasten, muss jedoch einschränkend angemerkt werden, dass sich SV-40-Fibroblasten für die quantitative Messung der Interleukin-6-Produktion

womöglich nicht eignen: Die SV40-Transformation ist ein gängiges Instrument, um Fibroblasten für die Verwendung in der Zellkultur zu immortalisieren. Im Gegensatz zu primären Fibroblasten können SV40-transformierte Fibroblasten nicht nur über wenige Passagen kultiviert werden. Darüber hinaus wachsen SV40-transformierte Fibroblasten in der Zellkultur wesentlich schneller. Jedoch ist das genaue Wachstumsverhalten der SV40-transfizierten Fibroblasten nicht vorherzusagen, so dass manche SV-40-transfizierten-Fibroblasten-Zelllinien schneller proliferieren als andere.

Die in dieser Arbeit durchgeführte Stimulation der Fibroblasten erfolgte in einem quasi dynamischen System, insofern die Fibroblasten während der Stimulation weiter proliferierten bis die zur Adhärenz verfügbare Fläche in den 6-well-Platten ausgeschöpft war. Die Fibroblasten wurden vor Beginn der 24 Stunden andauernden Stimulation in fester Konzentration in 6-well-Platten ausgesät. Nach Ende der Stimulation wurde die nun erhöhte Konzentration der Fibroblasten in den 6-well-Platten erneut bestimmt und die gemessenen Interleukin-6-Werte mit den ermittelten Endkonzentrationen der Fibroblasten normalisiert. In die Relativierung der gemessenen Interleukin-6-Werte ging also zwar die Endkonzentration der proliferierenden Fibroblasten ein, nicht jedoch der Zeitraum, wie lange diese Endkonzentration in den 6-well-Platten innerhalb der 24 Stunden schon bestand.

Da die Interleukin-6-Produktion pro Zeiteinheit von der absoluten Menge an Fibroblasten in der 6-well-Platte abhängt, ist davon auszugehen, dass ein frühes schnelles Wachstum – welches je nach SV40-transformierter Fibroblasten-Zelllinie variiert – im Vergleich zu langsamer proliferierenden SV40-transformierten Fibroblasten zu erheblich gesteigerten Interleukin-6-Werten am Ende des Stimulationszeitraumes führt (**Abbildung 17**). Dieser Effekt wird noch dadurch verstärkt, dass durch die Stimulation mit Interleukin-1 $\beta$  über den NF $\kappa$ B-Signalweg neben Interleukin-6 noch weitere Zytokine produziert werden, welche den NF $\kappa$ B-Signalweg in den Fibroblasten autokrin stimulieren und so ebenfalls zur Produktion von Interleukin-6 führen. Die Proliferationsgeschwindigkeit der SV40-transformierten Fibroblasten nimmt somit einen erheblichen Einfluss auf die gemessenen Interleukin-6-Werte, kann jedoch im Rahmen des verwendeten experimentellen Settings nicht kontrolliert werden.

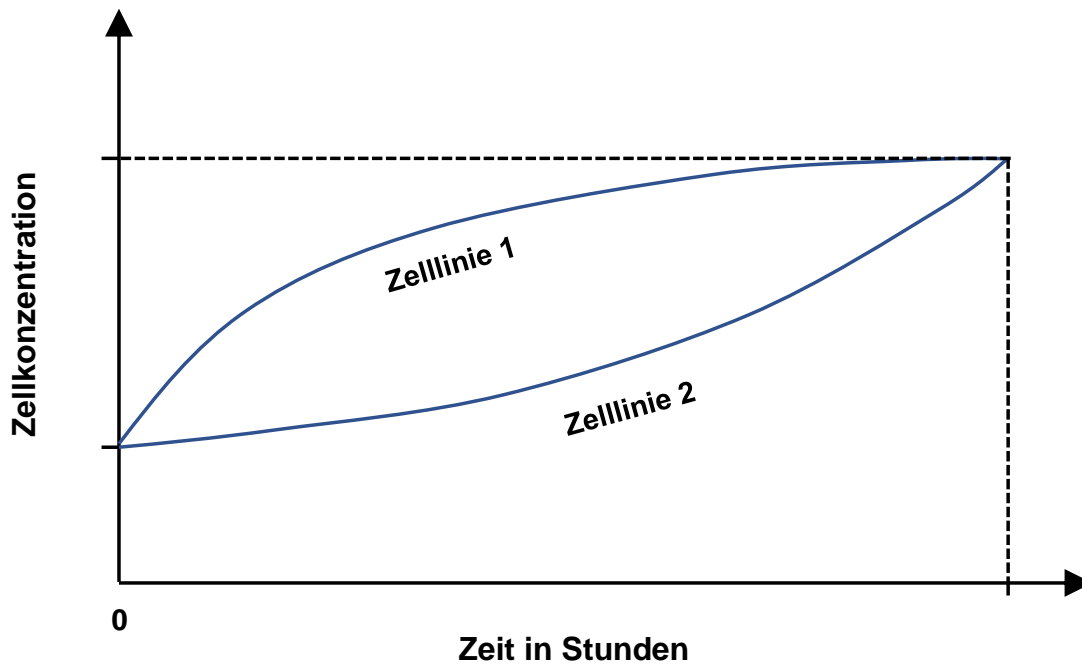


Abbildung 17: Darstellung des unterschiedlichen Wachstumsverhaltens zweier fiktiver Zelllinien.

Für zukünftige weitere Untersuchungen zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine in ortsständigen Zellen von Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom erscheinen vor diesem Hintergrund primäre Fibroblasten aufgrund des langsameren Wachstums geeigneter, da hiermit das Ausmaß der unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeit der einzelnen Zelllinien und folglich die damit verbundenen und weiter oben geschilderten Probleme verringert werden können.

#### 5.2.4. Interleukin-6-Produktion in Vollblut

Für die weitere Untersuchung der Produktion proinflammatorischer Zytokine wurde Vollblut verwendet. Hierdurch war eine experimentelle Situation vorhanden, in der die Zellen während der Stimulation nicht proliferieren.

Bei der Stimulation von Vollblut mittels Interleukin-1 $\beta$  zeigte sich bei 4 von 5 Patienten im Vergleich mit der jeweiligen Reisekontrolle eine höhere Interleukin-6-Produktion als bei der jeweiligen Reisekontrolle. Bei einem der Patienten zeigte sich darüber hinaus eine besonders ausgeprägte Interleukin-6-Produktion nach Interleukin-1 $\beta$ -Stimulation, die außerhalb des erwarteten Messbereichs lag. Diesem leichten Trend einer erhöhten

Interleukin-6-Produktion nach Interleukin-1 $\beta$ -Stimulation im Vollblut von einigen, aber nicht allen Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom ist einschränkend hinzuzufügen, dass die Patienten und die jeweiligen Reisekontrollen nicht nach Alter „gematcht“ sind und die Kontrollpersonen tendenziell älter als die Patienten sind. Ein möglicher Einfluss des Alters auf die Höhe der Zytokinproduktion kann nicht ausgeschlossen werden, zumal in einer Arbeit von Boehmer et al. gezeigt wurde, dass Makrophagen von älteren Mäusen weniger Interleukin-6 nach LPS-Stimulation produzieren als jüngere Mäuse (167).

Der in der vorliegenden Arbeit gezeigte Trend einer verstärkten Interleukin-6-Ausschüttung auf die Stimulation mit Interleukin-1 $\beta$  wurde in einer Arbeit von Yang et al. nicht gesehen (44). Yang et al. wählten zur Untersuchung des TLR-Signalwegs bei Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom nicht Vollblut, sondern „peripheral blood mononuclear cells“ (PBMCs) als Untersuchungsmaterial (44). Somit wurde vornehmlich die Zytokinproduktion von Monozyten und Lymphozyten gemessen. Die Autoren stimulierten PBMCs von Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom und PBMCs von gesunden Kontrollpersonen mit PAM<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>, Zymosan, Poly (I:C), LPS, Flagellin und CL097 und bestimmten als readout Interleukin-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und Interleukin-6. Sie konnten keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen feststellen und folgerten, dass die TLR-Signaltransduktion bei Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom normal sei.

Ein möglicher Grund für dieses unterschiedliche Ergebnis in der vorliegenden Arbeit und der Arbeit von Yang et al. könnte methodische Gründe haben: In der vorliegenden Studie wurde Vollblut verwendet, welches Granulozyten enthält, die in den von Yang et al. verwendeten PBMCs nicht enthalten sind. Darüber hinaus berichten Yang et al. in ihrer Arbeit nicht, dass sie für die LPS-Stimulation der PBMCs Serum eingesetzt haben. Der Einsatz von Serum ist für die Aktivierung von PBMCs mit LPS jedoch unerlässlich, da es das LPS-binding-protein (LBP) enthält, welches für eine adäquate Aktivierung des TLR-/IL1R-Signalwegs benötigt wird (168).

Einen möglichen Erklärungsansatz dafür, dass die Interleukin-1 $\beta$ -Stimulation von Vollblut nur bei manchen, aber nicht bei allen Patienten zu einer höheren Interleukin-6-Produktion im Vergleich mit der jeweiligen Reisekontrolle führte, liefert die Studie von Knop et al. (132). Die Autoren überexprimierten IRAK1 in der Maus-Zelllinie EL4, indem sie diese mit humanem Wildtyp-*IRAK1* transfizierten. Sie konnten somit mehrere Klone mit unterschiedlich starker IRAK1-Überexpression herstellen. Interessanterweise zeigten

sie, dass es erst ab einer bestimmten Stärke von IRAK1-Überexpression zu einer verstärkten Aktivität eines NFkB-abhängigen Reporter-Gens kam. Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Duplikation des IRAK1-Gens nicht zu einer definiert erhöhten Menge an IRAK1-Protein führt, sondern sich die Patienten hinsichtlich der Menge an exprimiertem IRAK1-Protein zu unterscheiden scheinen. Insofern erscheint es möglich, dass einige der Patienten mit besonders starker IRAK1-Überexpression eine verstärkte Interleukin-6-Produktion nach Stimulation mit Interleukin-1 $\beta$  aufweisen, wohingegen einige Patienten mit moderater IRAK1-Überexpression dies nicht zeigen. Da in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass die IRAK1-Duplikation nicht zu einer definiert erhöhten Menge an exprimiertem IRAK1 führt, erscheint es darüber hinaus möglich, dass auch bei gesunden Kontrollpersonen die IRAK1-Expression interindividuell schwankt und somit manche Kontrollpersonen sogar mehr IRAK1 exprimieren als die Patienten mit IRAK1-Duplikation und moderater IRAK1-Überexpression.

Für zukünftige Untersuchungen bietet es sich dementsprechend an, die Stärke der IRAK1-Überexpression in allen Patienten und den entsprechenden Kontrollpersonen zu messen, bei denen die Interleukin-6-Produktion in Vollblut überprüft wird, damit die gemessenen Interleukin-6-Werte mit der entsprechenden IRAK1-Expression rechnerisch relativiert werden können bzw. eine Gruppierung der Patienten in Patienten mit starker bzw. moderater IRAK1-Überexpression erfolgen kann.

### **5.3. Beantwortung der Forschungsfragen**

Wie hoch ist der Anteil der Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom, die neben dem neurologischen Phänotyp an rezidivierenden Infektionen leiden?

Knapp 70 % der Patienten in der vorliegenden Studie hatten zumindest eine schwere i.v.-Antibiotika-pflichtige Infektion durchgemacht. Diese Prozentzahl bestätigt erstmalig systematisch die bisher publizierten Daten zur Häufigkeit der Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom, welche neben dem neurologischen Phänotyp an rezidivierenden Infektionen leiden (71,72).

An welchem Ort manifestieren sich die rezidivierenden Infektionen und welche Erreger sind verantwortlich?

Die Infektionen von Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom manifestieren sich hauptsächlich im Respirationstrakt: Es sind vor allem Pneumonien, an denen die Patienten leiden. Zusätzlich war bei knapp 20% der Patienten in der vorliegenden Studie bereits mindestens eine Sepsis diagnostiziert worden. Keiner der Patienten litt bisher an einer Infektion des zentralen Nervensystems. Die bei den Patienten nachgewiesenen Erreger sind in der Mehrheit Bakterien, welche in der Lage sind, eine Kapsel zu bilden. In der vorliegenden Kohorte mit einer Gesamtzahl an 343 Patientenjahren entwickelte nur ein Patient eine einzelne nicht-komplizierte und auf die Lunge beschränkte Infektion mit *M. tuberculosis*. Keiner der Patienten entwickelte eine Infektion durch Cytomegalie-Virus oder durch *Pneumocystis jiroveci*.

Leiden die Patienten an einer Immundefizienz, durch die sie anfällig für Infektionen sind?

Patienten mit schweren neurologischen Erkrankungen wie dem *MECP2* Duplikations Syndrom sind aufgrund der dadurch verursachten Schluckstörung einem erhöhten Risiko von Aspirationspneumonien ausgesetzt. Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten legen nahe, dass einige Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom jedoch auch an einer Immundefizienz leiden, durch die sie zusätzlich anfällig für Infektionen sind. Bereits der infektiologische Phänotyp der Patienten - die erhöhte Anfälligkeit für Pneumonien und Sepsen durch Bakterien, welche in der Lage sind, eine Kapsel zu bilden – weist auf eine Störung der humoralen Immunität hin. In der Tat zeigte sich auch im immunologischen Phänotyp der Patienten eine Störung der humoralen Immunität bei knapp der Hälfte der Patienten im Sinne von niedrigen Pneumokokken-Impfantikörpern und bei 6 von 21 Patienten im Sinne einer IgG2-Defizienz.

Sind die rezidivierenden Infektionen durch eine starke Akut-Phase-Antwort gekennzeichnet?

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten legen nahe, dass Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom eine ausgeprägte Akut-Phase-Antwort im Sinne von hohem Fieber und starkem CRP-Anstieg während infektiöser Episoden entwickeln.

#### **5.4. Beantwortung der Forschungshypothese**

Hypothese: Die Patienten weisen aufgrund der Duplikation von *IRAK1* eine verstärkte proinflammatorische Signaltransduktion über den TLR-/IL1R-Signalweg auf.

Die Untersuchungen in dieser Arbeit legen nahe, dass Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom eine erhöhte Menge IRAK1 auf Protein-Ebene exprimieren, wobei der Grad der erhöhten Expression von Patient zu Patient unterschiedlich zu sein scheint. Es konnte auch nachgewiesen werden, dass dieses zusätzliche IRAK1 funktionell aktiv ist, indem es bei Stimulation des Toll-like-receptor/Interleukin-1-receptor-Signalweges phosphoryliert und abgebaut wird. Für die Testung der Hypothese, dass Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom an einer hyperinflammatorischen Immunreaktion leiden, wurde untersucht, ob Patienten bei Stimulation des Interleukin-1-receptor-Signalwegs eine erhöhte Produktion proinflammatorischer Zytokine aufweisen. Dies konnte in Fibroblasten nicht bestätigt werden. Die Hypothese kann daher zum momentanen Zeitpunkt nicht bestätigt werden. Allerdings zeigten 4 von 5 Patienten bei der Stimulation von Vollblut mit Interleukin-1 $\beta$  höhere Interleukin-6-Werte im Vergleich mit den jeweiligen Reisekontrollen. Es erscheint lohnenswert, diesen hier aufgezeigten leichten Trend einer erhöhten Interleukin-6-Produktion nach Interleukin-1 $\beta$ -Stimulation in Vollblut von manchen Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom mittels Untersuchungen in größeren Kohorten weiter zu untersuchen.

#### **5.5. Fazit und Ausblick**

In Zusammenschau der in dieser Arbeit gewonnen Daten erscheint eine multifaktorielle Genese der erhöhten Anfälligkeit für schwere Infektionen bei Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom wahrscheinlich: Das erhöhte Aspirationsrisiko der Patienten prädisponiert zu häufigen Atemwegsinfektionen, welche bei einigen Patienten durch eine Störung der spezifischen humoralen Immunität zusätzlich begünstigt werden. Eine durch die Duplikation von IRAK1 hervorgerufene hyperinflammatorische Immunreaktion könnte durch eine verstärkte Produktion proinflammatorischer Zytokine zu der beobachteten starken Akut-Phase-Reaktion führen und somit die Infektionen der Patienten aggravieren.

Von Zhang et al. wurde in einem mathematischen Modell die Hypothese aufgestellt, dass Hyperaktivität im „IRAK/TRAF6 module“ eine herabgesetzte Erkennung von Erregern zur

Folge haben könnte (169). Insofern könnte eine durch die Duplikation von *IRAK1* ausgelöste verstärkte Signaltransduktion nicht nur „disease modifying“ sein, sondern auch bereits zum Auftreten von Infektionen beitragen.

In der vorliegenden Arbeit zeigten sich Hinweise auf eine verstärkte proinflammatorische Signaltransduktion im Vollblut von manchen, aber nicht allen Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom. Zukünftige Studien zur Untersuchung der Akut-Phase-Reaktion bei den Patienten würden in Anbetracht der in dieser Arbeit gewonnenen vorläufigen Erkenntnisse folgende Experimente beinhalten: 1. Untersuchung der Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine in primären Fibroblasten von Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom und gesunden Kontrollpersonen. 2. Untersuchung der Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine in Vollblut von Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom und „alters-gematchten“ gesunden Kontrollpersonen bei gleichzeitiger Messung der individuellen *IRAK1*-Expression. 3. Untersuchung des oszillatorischen Verhaltens von NFkB in Fibroblasten von Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom bei langen Stimulationszeiten von bis zu 480 Minuten. 4. Untersuchung der NFkB-Aktivität in Fibroblasten von Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom und gesunden Kontrollpersonen nach Stimulation mit Interleukin-1 $\beta$  mittels transienter Transfektion von Fibroblasten mit einem NFkB-abhängigen Luciferase-Vektor (127).

In Anbetracht der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zum infektiologischen und immunologischen Phänotyp erscheint es sinnvoll, Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom gegen Pneumokokken zu impfen und den Impferfolg zu überprüfen. Bei unzureichenden Titern nach der Impfung sollten Boosterimpfungen erfolgen. Bei Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom, welche eine IgG2-Defizienz und/oder niedrige Pneumokokken-Antikörper trotz Boosterung aufweisen und an rezidivierenden Infektionen leiden, erscheint die Immunglobulin-Substitution eine sinnvolle Strategie, um Infektionen zu vermeiden – eventuell in Kombination mit der prophylaktischen Gabe von Antibiotika (170).



## Literaturverzeichnis

1. Lubs, H., Abidi, F., Bier, J. A., Abuelo, D., Ouzts, L., Voeller, K., Fennell, E., Stevenson, R. E., Schwartz, C. E., and Arena, F. (1999) XLMR syndrome characterized by multiple respiratory infections, hypertelorism, severe CNS deterioration and early death localizes to distal Xq28. *Am J Med Genet* 85, 243-248
2. Meins, M., Lehmann, J., Gerresheim, F., Herchenbach, J., Hagedorn, M., Hameister, K., and Epplen, J. T. (2005) 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* 42, e12
3. Van Esch, H., Bauters, M., Ignatius, J., Jansen, M., Raynaud, M., Hollanders, K., Lugtenberg, D., Bienvenu, T., Jensen, L. R., Gecz, J., Moraine, C., Marynen, P., Fryns, J. P., and Froyen, G. (2005) Duplication of the MECP2 region is a frequent cause of severe mental retardation and progressive neurological symptoms in males. *Am J Hum Genet* 77, 442-453
4. Ariani, F., Mari, F., Pescucci, C., Longo, I., Bruttini, M., Meloni, I., Hayek, G., Rocchi, R., Zappella, M., and Renieri, A. (2004) 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. *Hum Mutat* 24, 172-177
5. Lugtenberg, D., de Brouwer, A. P., Kleefstra, T., Oudakker, A. R., Frints, S. G., Schrandt-Stumpel, C. T., Fryns, J. P., Jensen, L. R., Chelly, J., Moraine, C., Turner, G., Veltman, J. A., Hamel, B. C., de Vries, B. B., van Bokhoven, H., and Yntema, H. G. (2006) Chromosomal copy number changes in patients with non-syndromic X linked mental retardation detected by array CGH. *J Med Genet* 43, 362-370
6. Friez, M. J., Jones, J. R., Clarkson, K., Lubs, H., Abuelo, D., Bier, J. A., Pai, S., Simensen, R., Williams, C., Giampietro, P. F., Schwartz, C. E., and Stevenson, R. E. (2006) Recurrent infections, hypotonia, and mental retardation caused by duplication of MECP2 and adjacent region in Xq28. *Pediatrics* 118, e1687-1695
7. del Gaudio, D., Fang, P., Scaglia, F., Ward, P. A., Craigen, W. J., Glaze, D. G., Neul, J. L., Patel, A., Lee, J. A., Irons, M., Berry, S. A., Pursley, A. A., Grebe, T. A., Freedenberg, D., Martin, R. A., Hsich, G. E., Khera, J. R., Friedman, N. R., Zoghbi, H. Y., Eng, C. M., Lupski, J. R., Beaudet, A. L., Cheung, S. W., and Roa, B. B. (2006) Increased MECP2 gene copy number as the result of genomic duplication in neurodevelopmentally delayed males. *Genet Med* 8, 784-792
8. Madrigal, I., Rodríguez-Revenga, L., Armengol, L., González, E., Rodríguez, B., Badenas, C., Sánchez, A., Martínez, F., Guitart, M., Fernández, I., Arranz, J. A., Tejada, M., Pérez-Jurado, L. A., Estivill, X., and Milà, M. (2007) X-chromosome tiling path array detection of copy number variants in patients with chromosome X-linked mental retardation. *BMC Genomics* 8, 443
9. Bauters, M., Van Esch, H., Friez, M. J., Boespflug-Tanguy, O., Zenker, M., Vianna-Morgante, A. M., Rosenberg, C., Ignatius, J., Raynaud, M., Hollanders, K., Govaerts, K., Vandenreijt, K., Niel, F., Blanc, P., Stevenson, R. E., Fryns, J. P., Marynen, P., Schwartz, C. E., and Froyen, G. (2008) Nonrecurrent MECP2 duplications mediated by genomic architecture-driven DNA breaks and break-induced replication repair. *Genome Res* 18, 847-858

10. Smyk, M., Obersztyn, E., Nowakowska, B., Nawara, M., Cheung, S. W., Mazurczak, T., Stankiewicz, P., and Bocian, E. (2008) 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* 147B, 799-806
11. Velinov, M., Novelli, A., Gu, H., Fenko, M., Dolzhanskaya, N., Bernardini, L., Capalbo, A., Dallapiccola, B., Jenkins, E. C., and Brown, W. T. (2009) De-novo 2.15 Mb terminal Xq duplication involving MECP2 but not L1CAM gene in a male patient with mental retardation. *Clin Dysmorphol* 18, 9-12
12. Sanlaville, D., Schluth-Bolard, C., and Turleau, C. (2009) Distal Xq duplication and functional Xq disomy. *Orphanet J Rare Dis* 4, 4
13. Kirk, E. P., Malaty-Brevaud, V., Martini, N., Lacoste, C., Levy, N., Maclean, K., Davies, L., Philip, N., and Badens, C. (2009) The clinical variability of the MECP2 duplication syndrome: description of two families with duplications excluding L1CAM and FLNA. *Clin Genet* 75, 301-303
14. 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., and Donnai, D. (2009) Xq28 duplication presenting with intestinal and bladder dysfunction and a distinctive facial appearance. *Eur J Hum Genet* 17, 434-443
15. Lugtenberg, D., Kleefstra, T., Oudakker, A. R., Nillesen, W. M., Yntema, H. G., Tzschach, A., Raynaud, M., Rating, D., Journal, H., Chelly, J., Goizet, C., Lacombe, D., Pedespan, J. M., Echenne, B., Tariverdian, G., O'Rourke, D., King, M. D., Green, A., van Kogelenberg, M., Van Esch, H., Gecz, J., Hamel, B. C., van Bokhoven, H., and de Brouwer, A. P. (2009) 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* 17, 444-453
16. Prescott, T. E., Rødningen, O. K., Bjørnstad, A., and Stray-Pedersen, A. (2009) Two brothers with a microduplication including the MECP2 gene: rapid head growth in infancy and resolution of susceptibility to infection. *Clin Dysmorphol* 18, 78-82
17. Carvalho, C. M., Zhang, F., Liu, P., Patel, A., Sahoo, T., Bacino, C. A., Shaw, C., Peacock, S., Pursley, A., Tavyev, Y. J., Ramocki, M. B., Nawara, M., Obersztyn, E., Vianna-Morgante, A. M., Stankiewicz, P., Zoghbi, H. Y., Cheung, S. W., and Lupski, J. R. (2009) Complex rearrangements in patients with duplications of MECP2 can occur by fork stalling and template switching. *Hum Mol Genet* 18, 2188-2203
18. Echenne, B., Roubertie, A., Lugtenberg, D., Kleefstra, T., Hamel, B. C., Van Bokhoven, H., Lacombe, D., Philippe, C., Jonveaux, P., and de Brouwer, A. P. (2009) Neurologic aspects of MECP2 gene duplication in male patients. *Pediatr Neurol* 41, 187-191
19. Vandewalle, J., Van Esch, H., Govaerts, K., Verbeeck, J., Zweier, C., Madrigal, I., Mila, M., Pijkels, E., Fernandez, I., Kohlhase, J., Spaich, C., Rauch, A., Fryns, J. P., Marynen, P., and Froyen, G. (2009) Dosage-dependent severity of the phenotype in patients with mental retardation due to a recurrent copy-number gain at Xq28 mediated by an unusual recombination. *Am J Hum Genet* 85, 809-822
20. Ramocki, M. B., Peters, S. U., Tavyev, Y. J., Zhang, F., Carvalho, C. M., Schaaf, C. P., Richman, R., Fang, P., Glaze, D. G., Lupski, J. R., and Zoghbi, H. Y. (2009) Autism and other neuropsychiatric symptoms are prevalent in individuals with MeCP2 duplication syndrome. *Ann Neurol* 66, 771-782

21. Bartsch, O., Gebauer, K., Lechno, S., van Esch, H., Froyen, G., Bonin, M., Seidel, J., Thamm-Mücke, B., Horn, D., Klopocki, E., Hertzberg, C., Zechner, U., and Haaf, T. (2010) Four unrelated patients with Lubs X-linked mental retardation syndrome and different Xq28 duplications. *Am J Med Genet A* 152A, 305-312
22. Campos, M., Churchman, S. M., Santos-Rebouças, C. B., Ponchel, F., and Pimentel, M. M. (2010) High frequency of nonrecurrent MECP2 duplications among Brazilian males with mental retardation. *J Mol Neurosci* 41, 105-109
23. Belligni, E. F., Palmer, R. W., and Hennekam, R. C. (2010) MECP2 duplication in a patient with congenital central hypoventilation. *Am J Med Genet A* 152A, 1591-1593
24. Reardon, W., Donoghue, V., Murphy, A. M., King, M. D., Mayne, P. D., Horn, N., and Birk Møller, L. (2010) Progressive cerebellar degenerative changes in the severe mental retardation syndrome caused by duplication of MECP2 and adjacent loci on Xq28. *Eur J Pediatr* 169, 941-949
25. Makrythanasis, P., Moix, I., Gimelli, S., Fluss, J., Aliferis, K., Antonarakis, S. E., Morris, M. A., Béna, F., and Bottani, A. (2010) De novo duplication of MECP2 in a girl with mental retardation and no obvious dysmorphic features. *Clin Genet* 78, 175-180
26. Honda, S., Hayashi, S., Imoto, I., Toyama, J., Okazawa, H., Nakagawa, E., Goto, Y., and Inazawa, J. (2010) Copy-number variations on the X chromosome in Japanese patients with mental retardation detected by array-based comparative genomic hybridization analysis. *J Hum Genet* 55, 590-599
27. Fernández, R. M., Núñez-Torres, R., González-Meneses, A., Antiñolo, G., and Borrego, S. (2010) Novel association of severe neonatal encephalopathy and Hirschsprung disease in a male with a duplication at the Xq28 region. *BMC Med Genet* 11, 137
28. Jezela-Stanek, A., Ciara, E., Juszczak, M., Pelc, M., Materna-Kiryluk, A., and Krajewska-Walasek, M. (2011) Cryptic x; autosome translocation in a boy--delineation of the phenotype. *Pediatr Neurol* 44, 221-224
29. Breman, A. M., Ramocki, M. B., Kang, S. H., Williams, M., Freedenberg, D., Patel, A., Bader, P. I., and Cheung, S. W. (2011) MECP2 duplications in six patients with complex sex chromosome rearrangements. *Eur J Hum Genet* 19, 409-415
30. 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., and Wiczorek, D. (2011) De novo MECP2 duplication in two females with random X-inactivation and moderate mental retardation. *Eur J Hum Genet* 19, 507-512
31. Budisteanu, M., Papuc, S. M., Tutulan-Cunita, A., Budisteanu, B., and Arghir, A. (2011) Novel clinical finding in MECP2 duplication syndrome. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 20, 373-375
32. Mayo, S., Monfort, S., Roselló, M., Orellana, C., Oltra, S., Armstrong, J., Català, V., and Martínez, F. (2011) De novo interstitial triplication of MECP2 in a girl with neurodevelopmental disorder and random X chromosome inactivation. *Cytogenet Genome Res* 135, 93-101
33. Carvalho, C. M., Ramocki, M. B., Pehlivan, D., Franco, L. M., Gonzaga-Jauregui, C., Fang, P., McCall, A., Pivnick, E. K., Hines-Dowell, S., Seaver, L. H., Friebling, L., Lee, S., Smith, R., Del Gaudio, D., Withers, M., Liu, P., Cheung, S. W., Belmont, J. W., Zoghbi, H. Y.,

- Hastings, P. J., and Lupski, J. R. (2011) Inverted genomic segments and complex triplication rearrangements are mediated by inverted repeats in the human genome. *Nat Genet* 43, 1074-1081
34. Tang, S. S., Fernandez, D., Lazarou, L. P., Singh, R., and Fallon, P. (2012) MECP2 triplication in 3 brothers - a rarely described cause of familial neurological regression in boys. *Eur J Paediatr Neurol* 16, 209-212
  35. Honda, S., Satomura, S., Hayashi, S., Imoto, I., Nakagawa, E., Goto, Y., Inazawa, J., and Consortium, J. M. R. (2012) Concomitant microduplications of MECP2 and ATRX in male patients with severe mental retardation. *J Hum Genet* 57, 73-77
  36. Utine, G. E., Kiper, P. O., Alanay, Y., Haliloğlu, G., Aktaş, D., Boduroğlu, K., Tunçbilek, E., and Alikasıfoğlu, M. (2012) Searching for Copy Number Changes in Nonsyndromic X-Linked Intellectual Disability. *Mol Syndromol* 2, 64-71
  37. Bijlsma, E. K., Collins, A., Papa, F. T., Tejada, M. I., Wheeler, P., Peeters, E. A., Gijsbers, A. C., van de Kamp, J. M., Kriek, M., Losekoot, M., Broekma, A. J., Crolla, J. A., Pollazzon, M., Mucciolo, M., Katzaki, E., Disciglio, V., Ferreri, M. I., Marozza, A., Mencarelli, M. A., Castagnini, C., Dosa, L., Ariani, F., Mari, F., Canitano, R., Hayek, G., Botella, M. P., Gener, B., Mínguez, M., Renieri, A., and Ruivenkamp, C. A. (2012) Xq28 duplications including MECP2 in five females: Expanding the phenotype to severe mental retardation. *Eur J Med Genet* 55, 404-413
  38. Honda, S., Hayashi, S., Nakane, T., Imoto, I., Kurosawa, K., Mizuno, S., Okamoto, N., Kato, M., Yoshihashi, H., Kubota, T., Nakagawa, E., Goto, Y., and Inazawa, J. (2012) 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* 158A, 1292-1303
  39. Sanmann, J. N., Bishay, D. L., Starr, L. J., Bell, C. A., Pickering, D. L., Stevens, J. M., Kahler, S. G., Olney, A. H., Schaefer, G. B., and Sanger, W. G. (2012) Characterization of six novel patients with MECP2 duplications due to unbalanced rearrangements of the X chromosome. *Am J Med Genet A* 158A, 1285-1291
  40. Vignoli, A., Borgatti, R., Peron, A., Zucca, C., Ballarati, L., Bonaglia, C., Bellini, M., Giordano, L., Romaniello, R., Bedeschi, M. F., Epifanio, R., Russo, S., Caselli, R., Giardino, D., Darra, F., La Briola, F., Banderali, G., and Canevini, M. P. (2012) Electroclinical pattern in MECP2 duplication syndrome: eight new reported cases and review of literature. *Epilepsia* 53, 1146-1155
  41. Shimada, S., Okamoto, N., Ito, M., Arai, Y., Momosaki, K., Togawa, M., Maegaki, Y., Sugawara, M., Shimojima, K., Osawa, M., and Yamamoto, T. (2013) MECP2 duplication syndrome in both genders. *Brain Dev* 35, 411-419
  42. Hanchard, N. A., Carvalho, C. M., Bader, P., Thome, A., Omo-Griffith, L., del Gaudio, D., Pehlivan, D., Fang, P., Schaaf, C. P., Ramocki, M. B., Lupski, J. R., and Cheung, S. W. (2012) 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* 13, 71
  43. Xu, X., Xu, Q., Zhang, Y., Zhang, X., Cheng, T., Wu, B., Ding, Y., Lu, P., Zheng, J., Zhang, M., Qiu, Z., and Yu, X. (2012) A case report of Chinese brothers with inherited MECP2-containing duplication: autism and intellectual disability, but not seizures or respiratory infections. *BMC Med Genet* 13, 75

44. Yang, T., Ramocki, M. B., Neul, J. L., Lu, W., Roberts, L., Knight, J., Ward, C. S., Zoghbi, H. Y., Kheradmand, F., and Corry, D. B. (2012) Overexpression of methyl-CpG binding protein 2 impairs T(H)1 responses. *Sci Transl Med* 4, 163ra158
45. de Palma, L., Boniver, C., Cassina, M., Toldo, I., Nosadini, M., Clementi, M., and Sartori, S. (2012) Eating-induced epileptic spasms in a boy with MECP2 duplication syndrome: insights into pathogenesis of genetic epilepsies. *Epileptic Disord* 14, 414-417
46. Shimada, S., Okamoto, N., Hirasawa, K., Yoshii, K., Tani, Y., Sugawara, M., Shimojima, K., Osawa, M., and Yamamoto, T. (2013) Clinical manifestations of Xq28 functional disomy involving MECP2 in one female and two male patients. *Am J Med Genet A* 161A, 1779-1785
47. Wax, J. R., Pinette, M. G., Smith, R., Chard, R., and Cartin, A. (2013) Second-trimester prenatal and prefrontal skin thickening - association with MECP2 triplication syndrome. *J Clin Ultrasound* 41, 434-437
48. Peters, S. U., Hundley, R. J., Wilson, A. K., Carvalho, C. M., Lupski, J. R., and Ramocki, M. B. (2013) Brief report: regression timing and associated features in MECP2 duplication syndrome. *J Autism Dev Disord* 43, 2484-2490
49. Peters, S. U., Hundley, R. J., Wilson, A. K., Warren, Z., Vehorn, A., Carvalho, C. M., Lupski, J. R., and Ramocki, M. B. (2013) The behavioral phenotype in MECP2 duplication syndrome: a comparison with idiopathic autism. *Autism Res* 6, 42-50
50. Novara, F., Simonati, A., Sicca, F., Battini, R., Fiori, S., Contaldo, A., Criscuolo, L., Zuffardi, O., and Ciccone, R. (2014) MECP2 duplication phenotype in symptomatic females: report of three further cases. *Mol Cytogenet* 7, 10
51. Scott Schwoerer, J., Laffin, J., Haun, J., Raca, G., Friez, M. J., and Giampietro, P. F. (2014) MECP2 duplication: possible cause of severe phenotype in females. *Am J Med Genet A* 164A, 1029-1034
52. Fukushi, D., Yamada, K., Nomura, N., Naiki, M., Kimura, R., Yamada, Y., Kumagai, T., Yamaguchi, K., Miyake, Y., and Wakamatsu, N. (2014) Clinical characterization and identification of duplication breakpoints in a Japanese family with Xq28 duplication syndrome including MECP2. *Am J Med Genet A* 164A, 924-933
53. Fieremans, N., Bauters, M., Belet, S., Verbeeck, J., Jansen, A. C., Seneca, S., Roelens, F., De Baere, E., Marynen, P., and Froyen, G. (2014) De novo MECP2 duplications in two females with intellectual disability and unfavorable complete skewed X-inactivation. *Hum Genet* 133, 1359-1367
54. Caumes, R., Boespflug-Tanguy, O., Villeneuve, N., Lambert, L., Delanoe, C., Leheup, B., Bahi-Buisson, N., and Auvin, S. (2014) 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* 18, 475-481
55. Nascimento, F. A., Faghfoury, H., Krings, T., Ali, A., Fridhandler, J. D., Lozano, A., Wennberg, R., and Andrade, D. M. (2014) Deep brain stimulation for the management of seizures in MECP2 duplication syndrome. *Seizure* 23, 405-407
56. 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., and Li, L. H. (2014) De novo MECP2 duplication

- derived from paternal germ line result in dysmorphism and developmental delay. *Gene* 533, 78-85
57. Yi, Z., Wang, S., Li, L., Wu, H., Ma, Y., Qi, Y., and Pan, H. (2014) [Diagnosis of MECP2 duplication syndrome with molecular genetic techniques]. *Zhonghua Er Ke Za Zhi* 52, 937-941
  58. Fu, F., Liu, H. L., Li, R., Han, J., Yang, X., Min, P., Zhen, L., Zhang, Y. L., Xie, G. E., Lei, T. Y., Li, Y., Li, J., Li, D. Z., and Liao, C. (2014) Prenatal diagnosis of foetuses with congenital abnormalities and duplication of the MECP2 region. *Gene* 546, 222-225
  59. Zhang, Q., Zhao, Y., Yang, Y., and Bao, X. (2015) MECP2 duplication syndrome in a Chinese family. *BMC Med Genet* 16, 112
  60. Peters, S. U., Gordon, R. L., and Key, A. P. (2015) Induced gamma oscillations differentiate familiar and novel voices in children with MECP2 duplication and Rett syndromes. *J Child Neurol* 30, 145-152
  61. Miyatake, S., Koshimizu, E., Fujita, A., Fukai, R., Imagawa, E., Ohba, C., Kuki, I., Nukui, M., Araki, A., Makita, Y., Ogata, T., Nakashima, M., Tsurusaki, Y., Miyake, N., Saitsu, H., and Matsumoto, N. (2015) Detecting copy-number variations in whole-exome sequencing data using the eXome Hidden Markov Model: an 'exome-first' approach. *J Hum Genet* 60, 175-182
  62. Lim, Z., Downs, J., Wong, K., Ellaway, C., and Leonard, H. (2016) Expanding the clinical picture of the MECP2 Duplication syndrome. *Clin Genet*
  63. 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., Miguet, M., Devys, D., Saugier-veber, P., Drunat, S., Aral, B., Kremer, V., Rondeau, S., Tabet, A. C., Thevenon, J., Thauvin-Robinet, C., Perreton, N., Des Portes, V., and Faivre, L. (2016) Xq28 duplication including MECP2 in six unreported affected females: what can we learn for diagnosis and genetic counselling? *Clin Genet*
  64. Yi, Z., Pan, H., Li, L., Wu, H., Wang, S., Ma, Y., and Qi, Y. (2016) Chromosome Xq28 duplication encompassing MECP2: Clinical and molecular analysis of 16 new patients from 10 families in China. *Eur J Med Genet* 59, 347-353
  65. Signorini, C., De Felice, C., Leoncini, S., Møller, R. S., Zollo, G., Buoni, S., Cortelazzo, A., Guerranti, R., Durand, T., Ciccoli, L., D'Esposito, M., Ravn, K., and Hayek, J. (2016) MECP2 Duplication Syndrome: Evidence of Enhanced Oxidative Stress. A Comparison with Rett Syndrome. *PLoS One* 11, e0150101
  66. El Chehadeh, S., Faivre, L., Mosca-Boidron, A. L., Malan, V., Amiel, J., Nizon, M., Touraine, R., Prieur, F., Pasquier, L., Callier, P., Lefebvre, M., Marle, N., Dubourg, C., Julia, S., Sarret, C., Francannet, C., Laffargue, F., Boespflug-Tanguy, O., David, A., Isidor, B., Le Caignec, C., Vigneron, J., Leheup, B., Lambert, L., Philippe, C., Cuisset, J. M., Andrieux, J., Plessis, G., Toutain, A., Goldenberg, A., Cormier-Daire, V., Rio, M., Bonnefont, J. P., Thevenon, J., Echenne, B., Journal, H., Afenjar, A., Burglen, L., Bienvenu, T., Addor, M. C., Lebon, S., Martinet, D., Baumann, C., Perrin, L., Drunat, S., Jouk, P. S., Devillard, F., Coutton, C., Lacombe, D., Delrue, M. A., Philip, N., Moncla, A., Badens, C., Perreton, N., Masurel, A., Thauvin-Robinet, C., Des Portes, V., and Guibaud,

- L. (2016) Large national series of patients with Xq28 duplication involving MECP2: Delineation of brain MRI abnormalities in 30 affected patients. *Am J Med Genet A* 170A, 116-129
67. Trobaugh-Lotrario, A., Martin, J., and López-Terrada, D. (2016) Hepatoblastoma in a male with MECP2 duplication syndrome. *Am J Med Genet A* 170, 790-791
  68. Peters, S. U., Byiers, B. J., and Symons, F. J. (2016) Diurnal Salivary Cortisol and Regression Status in MECP2 Duplication Syndrome. *J Child Neurol* 31, 159-163
  69. Ha, K., Shen, Y., Graves, T., Kim, C. H., and Kim, H. G. (2016) The presence of two rare genomic syndromes, 1q21 deletion and Xq28 duplication, segregating independently in a family with intellectual disability. *Mol Cytogenet* 9, 74
  70. Tsuji-Hosokawa, A., Matsuda, N., Kurosawa, K., Kashimada, K., and Morio, T. (2016) A Case of MECP2 Duplication Syndrome with Gonadotropin-Dependent Precocious Puberty. *Horm Res Paediatr*
  71. Ramocki, M. B., Tavyev, Y. J., and Peters, S. U. (2010) The MECP2 duplication syndrome. *Am J Med Genet A* 152A, 1079-1088
  72. Van Esch, H. (2012) MECP2 Duplication Syndrome. *Mol Syndromol* 2, 128-136
  73. Chapel, H., Prevot, J., Gaspar, H. B., Español, T., Bonilla, F. A., Solis, L., Drabwell, J., and IPOPI, E. B. f. W. P. o. P. o. C. a. (2014) Primary immune deficiencies - principles of care. *Front Immunol* 5, 627
  74. Al-Herz, W., Bousfiha, A., Casanova, J. L., Chatila, T., Conley, M. E., Cunningham-Rundles, C., Etzioni, A., Franco, J. L., Gaspar, H. B., Holland, S. M., Klein, C., Nonoyama, S., Ochs, H. D., Oksenhendler, E., Picard, C., Puck, J. M., Sullivan, K., and Tang, M. L. (2014) Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the international union of immunological societies expert committee for primary immunodeficiency. *Front Immunol* 5, 162
  75. Bousfiha, A., Jeddane, L., Al-Herz, W., Ailal, F., Casanova, J. L., Chatila, T., Conley, M. E., Cunningham-Rundles, C., Etzioni, A., Franco, J. L., Gaspar, H. B., Holland, S. M., Klein, C., Nonoyama, S., Ochs, H. D., Oksenhendler, E., Picard, C., Puck, J. M., Sullivan, K. E., and Tang, M. L. (2015) The 2015 IUIS Phenotypic Classification for Primary Immunodeficiencies. *J Clin Immunol* 35, 727-738
  76. Baumann, U., Belohradsky, B., von Bernuth, H., Friedrich, W., Linde, R., Niehues, T., Renner, E., Schöndorf, I., Schulze, I., Wahn, V., and Warnatz, K. (2010) Primäre Immundefekte - Warzeichen und Algorithmen zur Diagnosefindung. Uni-Med Verlag AG, Bremen
  77. Farmand, S., Baumann, U., von Bernuth, H., Borte, M., Foerster-Waldl, E., Franke, K., Habermehl, P., Kapaun, P., Klock, G., Liese, J., Marks, R., Müller, R., Nebe, T., Niehues, T., Schuster, V., Warnatz, K., Witte, T., Ehl, S., Schulze, I., and (AWMF), A. o. t. S. M. S. i. G. (2011) [Interdisciplinary AWMF guideline for the diagnostics of primary immunodeficiency]. *Klin Padiatr* 223, 378-385
  78. Freeman, A. F., and Holland, S. M. (2008) The hyper-IgE syndromes. *Immunol Allergy Clin North Am* 28, 277-291, viii
  79. Picard, C., Casanova, J. L., and Puel, A. (2011) Infectious diseases in patients with IRAK-4, MyD88, NEMO, or I $\kappa$ B $\alpha$  deficiency. *Clin Microbiol Rev* 24, 490-497

80. Jefferis, R., and Kumararatne, D. S. (1990) Selective IgG subclass deficiency: quantification and clinical relevance. *Clin Exp Immunol* 81, 357-367
81. de Beaucoudrey, L., Samarina, A., Bustamante, J., Cobat, A., Boisson-Dupuis, S., Feinberg, J., Al-Muhsen, S., Janni re, L., Rose, Y., de Suremain, M., Kong, X. F., Filipe-Santos, O., Chappier, A., Picard, C., Fischer, A., Dogu, F., Ikinciogullari, A., Tanir, G., Al-Hajjar, S., Al-Jumaah, S., Frayha, H. H., AlSum, Z., Al-Ajaji, S., Alangari, A., Al-Ghonaium, A., Adimi, P., Mansouri, D., Ben-Mustapha, I., Yancoski, J., Garty, B. Z., Rodriguez-Gallego, C., Caragol, I., Kutukculer, N., Kumararatne, D. S., Patel, S., Doffinger, R., Exley, A., Jeppsson, O., Reichenbach, J., Nadal, D., Boyko, Y., Pietrucha, B., Anderson, S., Levin, M., Schanden e, L., Schepers, K., Efir, A., Mascart, F., Matsuoka, M., Sakai, T., Siegrist, C. A., Frecerova, K., Bl uetters-Sawatzki, R., Bernh oft, J., Freihorst, J., Baumann, U., Richter, D., Haerynck, F., De Baets, F., Novelli, V., Lammas, D., Vermynen, C., Tuerlinckx, D., Nieuwhof, C., Pac, M., Haas, W. H., M uller-Fleckenstein, I., Fleckenstein, B., Levy, J., Raj, R., Cohen, A. C., Lewis, D. B., Holland, S. M., Yang, K. D., Wang, X., Jiang, L., Yang, X., Zhu, C., Xie, Y., Lee, P. P., Chan, K. W., Chen, T. X., Castro, G., Natera, I., Codoceo, A., King, A., Bezrodnik, L., Di Giovanni, D., Gaillard, M. I., de Moraes-Vasconcelos, D., Grumach, A. S., da Silva Duarte, A. J., Aldana, R., Espinosa-Rosales, F. J., Bejaoui, M., Bousfiha, A. A., Baghdadadi, J. E., Ozbek, N., Aksu, G., Keser, M., Somer, A., Hatipoglu, N., Aydogmus, C., Asilsoy, S., Camcioglu, Y., G ulle, S., Ozgur, T. T., Ozen, M., Oleastro, M., Bernasconi, A., Mamishi, S., Parvaneh, N., Rosenzweig, S., Barbouche, R., Pedraza, S., Lau, Y. L., Ehl ayel, M. S., Fieschi, C., Abel, L., Sanal, O., and Casanova, J. L. (2010) Revisiting human IL-12R 1 deficiency: a survey of 141 patients from 30 countries. *Medicine (Baltimore)* 89, 381-402
82. Bogunovic, D., Byun, M., Durfee, L. A., Abhyankar, A., Sanal, O., Mansouri, D., Salem, S., Radovanovic, I., Grant, A. V., Adimi, P., Mansouri, N., Okada, S., Bryant, V. L., Kong, X. F., Kreins, A., Velez, M. M., Boisson, B., Khalilzadeh, S., Ozcelik, U., Darazam, I. A., Schoggins, J. W., Rice, C. M., Al-Muhsen, S., Behr, M., Vogt, G., Puel, A., Bustamante, J., Gros, P., Huibregtse, J. M., Abel, L., Boisson-Dupuis, S., and Casanova, J. L. (2012) Mycobacterial disease and impaired IFN-  immunity in humans with inherited ISG15 deficiency. *Science* 337, 1684-1688
83. Parvaneh, N., Casanova, J. L., Notarangelo, L. D., and Conley, M. E. (2013) Primary immunodeficiencies: a rapidly evolving story. *J Allergy Clin Immunol* 131, 314-323
84. Notarangelo, L. D. (2010) Primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol* 125, S182-194
85. von Bernuth, H., Ku, C. L., Rodriguez-Gallego, C., Zhang, S., Garty, B. Z., Mar odi, L., Chapel, H., Chrabieh, M., Miller, R. L., Picard, C., Puel, A., and Casanova, J. L. (2006) A fast procedure for the detection of defects in Toll-like receptor signaling. *Pediatrics* 118, 2498-2503
86. Andres, O., Strehl, K., K olsch, U., Kunzmann, S., Lebrun, A. H., Stroh, T., Schwarz, K., Morbach, H., von Bernuth, H., Liese, J., and Liefse, J. (2013) Even in pneumococcal sepsis CD62L shedding on granulocytes proves to be a reliable functional test for the diagnosis of interleukin-1 receptor-associated kinase-4 deficiency. *Pediatr Infect Dis J* 32, 1017-1019
87. Chinen, J., Notarangelo, L. D., and Shearer, W. T. (2016) Advances in clinical immunology in 2015. *J Allergy Clin Immunol* 138, 1531-1540
88. Koenderman, L., Buurman, W., and Daha, M. R. (2014) The innate immune response. *Immunol Lett* 162, 95-102



89. Moshage, H. (1997) Cytokines and the hepatic acute phase response. *J Pathol* 181, 257-266
90. Suffredini, A. F., Fantuzzi, G., Badolato, R., Oppenheim, J. J., and O'Grady, N. P. (1999) New insights into the biology of the acute phase response. *J Clin Immunol* 19, 203-214
91. Ramadori, G., and Christ, B. (1999) Cytokines and the hepatic acute-phase response. *Semin Liver Dis* 19, 141-155
92. Koj, A. (1996) Initiation of acute phase response and synthesis of cytokines. *Biochim Biophys Acta* 1317, 84-94
93. Abernethy, T. J., and Avery, O. T. (1941) The occurrence during acute infections of a protein not normally present in the blood : I. Distribution of the reactive protein in patients' sera and the effect of calcium on the flocculation reaction with C Polysaccharide of pneumococcus. *J Exp Med* 73, 173-182
94. Heinrich, P. C., Castell, J. V., and Andus, T. (1990) Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J* 265, 621-636
95. Gabay, C., and Kushner, I. (1999) Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 340, 448-454
96. O'Neill, L. A., Golenbock, D., and Bowie, A. G. (2013) The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol* 13, 453-460
97. Kawasaki, T., and Kawai, T. (2014) Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol* 5, 461
98. Jura, J., and Koj, A. (2011) Regulatory Mechanisms Controlling Inflammation and Synthesis of Acute Phase Proteins. in *Acute Phase Proteins - Regulation and Functions of Acute Phase Proteins* (Veas, P. F. ed.). pp
99. Gottipati, S., Rao, N. L., and Fung-Leung, W. P. (2008) IRAK1: a critical signaling mediator of innate immunity. *Cell Signal* 20, 269-276
100. Gan, L., and Li, L. (2006) Regulations and roles of the interleukin-1 receptor associated kinases (IRAKs) in innate and adaptive immunity. *Immunol Res* 35, 295-302
101. Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783-801
102. Flannery, S., and Bowie, A. G. (2010) The interleukin-1 receptor-associated kinases: critical regulators of innate immune signalling. *Biochem Pharmacol* 80, 1981-1991
103. Cao, Z., Henzel, W. J., and Gao, X. (1996) IRAK: a kinase associated with the interleukin-1 receptor. *Science* 271, 1128-1131
104. Thomas, J. A., Allen, J. L., Tsen, M., Dubnicoff, T., Danao, J., Liao, X. C., Cao, Z., and Wasserman, S. A. (1999) Impaired cytokine signaling in mice lacking the IL-1 receptor-associated kinase. *J Immunol* 163, 978-984
105. Su, J., Richter, K., Zhang, C., Gu, Q., and Li, L. (2007) Differential regulation of interleukin-1 receptor associated kinase 1 (IRAK1) splice variants. *Mol Immunol* 44, 900-905

106. Burns, K., Clatworthy, J., Martin, L., Martinon, F., Plumpton, C., Maschera, B., Lewis, A., Ray, K., Tschopp, J., and Volpe, F. (2000) Tollip, a new component of the IL-1RI pathway, links IRAK to the IL-1 receptor. *Nat Cell Biol* 2, 346-351
107. Didierlaurent, A., Brissoni, B., Velin, D., Aebi, N., Tardivel, A., Käslin, E., Sirard, J. C., Angelov, G., Tschopp, J., and Burns, K. (2006) Tollip regulates proinflammatory responses to interleukin-1 and lipopolysaccharide. *Mol Cell Biol* 26, 735-742
108. Lin, S. C., Lo, Y. C., and Wu, H. (2010) Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. *Nature* 465, 885-890
109. Bhoj, V. G., and Chen, Z. J. (2009) Ubiquitylation in innate and adaptive immunity. *Nature* 458, 430-437
110. Oeckinghaus, A., and Ghosh, S. (2009) The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1, a000034
111. Baltimore, D. (2011) NF-κB is 25. *Nat Immunol* 12, 683-685
112. Hoffmann, A., Levchenko, A., Scott, M. L., and Baltimore, D. (2002) The IkappaB-NF-kappaB signaling module: temporal control and selective gene activation. *Science* 298, 1241-1245
113. Hoffmann, A., and Baltimore, D. (2006) Circuitry of nuclear factor kappaB signaling. *Immunol Rev* 210, 171-186
114. Klinke, D. J., Ustyugova, I. V., Brundage, K. M., and Barnett, J. B. (2008) Modulating temporal control of NF-kappaB activation: implications for therapeutic and assay selection. *Biophys J* 94, 4249-4259
115. Huang, Y., Li, T., Sane, D. C., and Li, L. (2004) IRAK1 serves as a novel regulator essential for lipopolysaccharide-induced interleukin-10 gene expression. *J Biol Chem* 279, 51697-51703
116. Uematsu, S., Sato, S., Yamamoto, M., Hirotsu, T., Kato, H., Takeshita, F., Matsuda, M., Coban, C., Ishii, K. J., Kawai, T., Takeuchi, O., and Akira, S. (2005) Interleukin-1 receptor-associated kinase-1 plays an essential role for Toll-like receptor (TLR)7- and TLR9-mediated interferon- $\alpha$  induction. *J Exp Med* 201, 915-923
117. Kanakaraj, P., Schafer, P. H., Cavender, D. E., Wu, Y., Ngo, K., Grealish, P. F., Wadsworth, S. A., Peterson, P. A., Siekierka, J. J., Harris, C. A., and Fung-Leung, W. P. (1998) Interleukin (IL)-1 receptor-associated kinase (IRAK) requirement for optimal induction of multiple IL-1 signaling pathways and IL-6 production. *J Exp Med* 187, 2073-2079
118. Swantek, J. L., Tsen, M. F., Cobb, M. H., and Thomas, J. A. (2000) IL-1 receptor-associated kinase modulates host responsiveness to endotoxin. *J Immunol* 164, 4301-4306
119. von Bernuth, H., Picard, C., Jin, Z., Pankla, R., Xiao, H., Ku, C. L., Chrabieh, M., Mustapha, I. B., Ghandil, P., Camcioglu, Y., Vasconcelos, J., Sirvent, N., Guedes, M., Vitor, A. B., Herrero-Mata, M. J., Aróstegui, J. I., 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., and Casanova, J. L. (2008) Pyogenic bacterial infections in humans with MyD88 deficiency. *Science* 321, 691-696

120. 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-Ghonaïum, A., Al-Rayes, H., Al-Jumaah, S., Al-Hajjar, S., Al-Mohsen, I. Z., Frayha, H. H., Rucker, R., Hawn, T. R., Aderem, A., Tufenkeji, H., Haraguchi, S., Day, N. K., Good, R. A., Gougerot-Pocidalò, M. A., Ozinsky, A., and Casanova, J. L. (2003) Pyogenic bacterial infections in humans with IRAK-4 deficiency. *Science* 299, 2076-2079
121. Zonana, J., Elder, M. E., Schneider, L. C., Orlov, S. J., Moss, C., Golabi, M., Shapira, S. K., Farndon, P. A., Wara, D. W., Emmal, S. A., and Ferguson, B. M. (2000) A novel X-linked disorder of immune deficiency and hypohidrotic ectodermal dysplasia is allelic to incontinentia pigmenti and due to mutations in IKK-gamma (NEMO). *Am J Hum Genet* 67, 1555-1562
122. Döffinger, R., Smahi, A., Bessia, C., Geissmann, F., Feinberg, J., Durandy, A., Bodemer, C., Kenwrick, S., Dupuis-Girod, S., Blanche, S., Wood, P., Rabia, S. H., Headon, D. J., Overbeek, P. A., Le Deist, F., Holland, S. M., Belani, K., Kumararatne, D. S., Fischer, A., Shapiro, R., Conley, M. E., Reimund, E., Kalhoff, H., Abinun, M., Munnich, A., Israël, A., Courtois, G., and Casanova, J. L. (2001) X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency is caused by impaired NF-kappaB signaling. *Nat Genet* 27, 277-285
123. Jain, A., Ma, C. A., Liu, S., Brown, M., Cohen, J., and Strober, W. (2001) Specific missense mutations in NEMO result in hyper-IgM syndrome with hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Nat Immunol* 2, 223-228
124. Courtois, G., Smahi, A., Reichenbach, J., Döffinger, R., Cancrini, C., Bonnet, M., Puel, A., Chable-Bessia, C., Yamaoka, S., Feinberg, J., Dupuis-Girod, S., Bodemer, C., Livadiotti, S., Novelli, F., Rossi, P., Fischer, A., Israël, A., Munnich, A., Le Deist, F., and Casanova, J. L. (2003) A hypermorphic IkappaBalpha mutation is associated with autosomal dominant anhidrotic ectodermal dysplasia and T cell immunodeficiency. *J Clin Invest* 112, 1108-1115
125. Boisson, B., Laplantine, E., Prando, C., Giliani, S., Israelsson, E., Xu, Z., Abhyankar, A., Israël, L., Trevejo-Nunez, G., Bogunovic, D., Cepika, A. M., MacDuff, D., Chrabieh, M., Hubeau, M., Bajolle, F., Debré, M., Mazzolari, E., Vairo, D., Agou, F., Virgin, H. W., Bossuyt, X., Rambaud, C., Facchetti, F., Bonnet, D., Quartier, P., Fournet, J. C., Pascual, V., Chaussabel, D., Notarangelo, L. D., Puel, A., Israël, A., Casanova, J. L., and Picard, C. (2012) Immunodeficiency, autoinflammation and amylopectinosis in humans with inherited HOIL-1 and LUBAC deficiency. *Nat Immunol* 13, 1178-1186
126. Pannicke, U., Baumann, B., Fuchs, S., Henneke, P., Rensing-Ehl, A., Rizzi, M., Janda, A., Hese, K., Schlesier, M., Holzmann, K., Borte, S., Laux, C., Rump, E. M., Rosenberg, A., Zelinski, T., Schrezenmeier, H., Wirth, T., Ehl, S., Schroeder, M. L., and Schwarz, K. (2013) Deficiency of innate and acquired immunity caused by an IKBKB mutation. *N Engl J Med* 369, 2504-2514
127. 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, R. M., Stronati, M., Picard, C., Zuffardi, O., Abel, L., Chaussabel, D., Marr, N., Li, X., Casanova, J. L., and Puel, A. (2017) Inherited human IRAK-1 deficiency selectively impairs TLR signaling in fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*
128. Picard, C., von Bernuth, H., Ghandil, P., Chrabieh, M., Levy, O., Arkwright, P. D., McDonald, D., Geha, R. S., Takada, H., Krause, J. C., Creech, C. B., Ku, C. L., Ehl, S., Maródi, L., Al-Muhsen, S., Al-Hajjar, S., Al-Ghonaïum, A., Day-Good, N. K., Holland, S.

- M., Gallin, J. I., Chapel, H., Speert, D. P., Rodriguez-Gallego, C., Colino, E., Garty, B. Z., Roifman, C., Hara, T., Yoshikawa, H., Nonoyama, S., Domachowske, J., Issekutz, A. C., Tang, M., Smart, J., Zitnik, S. E., Hoarau, C., Kumararatne, D. S., Thrasher, A. J., Davies, E. G., Bethune, C., Sirvent, N., de Ricaud, D., Camcioglu, Y., Vasconcelos, J., Guedes, M., Vitor, A. B., Rodrigo, C., Almazán, F., Méndez, M., Aróstegui, J. I., Alsina, L., Fortuny, C., Reichenbach, J., Verbsky, J. W., Bossuyt, X., Doffinger, R., Abel, L., Puel, A., and Casanova, J. L. (2010) Clinical features and outcome of patients with IRAK-4 and MyD88 deficiency. *Medicine (Baltimore)* 89, 403-425
129. Puel, A., Picard, C., Ku, C. L., Smahi, A., and Casanova, J. L. (2004) Inherited disorders of NF-kappaB-mediated immunity in man. *Curr Opin Immunol* 16, 34-41
  130. Enders, A., Pannicke, U., Berner, R., Henneke, P., Radlinger, K., Schwarz, K., and Ehl, S. (2004) Two siblings with lethal pneumococcal meningitis in a family with a mutation in Interleukin-1 receptor-associated kinase 4. *J Pediatr* 145, 698-700
  131. von Bernuth, H., Puel, A., Ku, C. L., Yang, K., Bustamante, J., Chang, H. H., Picard, C., and Casanova, J. L. (2005) Septicemia without sepsis: inherited disorders of nuclear factor-kappa B-mediated inflammation. *Clin Infect Dis* 41 Suppl 7, S436-439
  132. Knop, J., Wesche, H., Lang, D., and Martin, M. U. (1998) Effects of overexpression of IL-1 receptor-associated kinase on NFkappaB activation, IL-2 production and stress-activated protein kinases in the murine T cell line EL4. *Eur J Immunol* 28, 3100-3109
  133. Knop, J., and Martin, M. U. (1999) Effects of IL-1 receptor-associated kinase (IRAK) expression on IL-1 signaling are independent of its kinase activity. *FEBS Lett* 448, 81-85
  134. Maschera, B., Ray, K., Burns, K., and Volpe, F. (1999) Overexpression of an enzymically inactive interleukin-1-receptor-associated kinase activates nuclear factor-kappaB. *Biochem J* 339 ( Pt 2), 227-231
  135. Wesche, H., Henzel, W. J., Shillinglaw, W., Li, S., and Cao, Z. (1997) MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity* 7, 837-847
  136. Reddy, S. A., Huang, J. H., and Liao, W. S. (1997) Phosphatidylinositol 3-kinase in interleukin 1 signaling. Physical interaction with the interleukin 1 receptor and requirement in NFkappaB and AP-1 activation. *J Biol Chem* 272, 29167-29173
  137. Tomás, J. M. (2012) The main *Aeromonas* pathogenic factors. *ISRN Microbiol* 2012, 256261
  138. Gibson, F. C., Tzianabos, A. O., and Onderdonk, A. B. (1996) The capsular polysaccharide complex of *Bacteroides fragilis* induces cytokine production from human and murine phagocytic cells. *Infect Immun* 64, 1065-1069
  139. Kalka-Moll, W. M., Wang, Y., Comstock, L. E., Gonzalez, S. E., Tzianabos, A. O., and Kasper, D. L. (2001) Immunochemical and biological characterization of three capsular polysaccharides from a single *Bacteroides fragilis* strain. *Infect Immun* 69, 2339-2344
  140. Coyne, M. J., Tzianabos, A. O., Mallory, B. C., Carey, V. J., Kasper, D. L., and Comstock, L. E. (2001) Polysaccharide biosynthesis locus required for virulence of *Bacteroides fragilis*. *Infect Immun* 69, 4342-4350
  141. Buttery, J., and Moxon, E. R. (2002) Capsulate bacteria and the lung. *Br Med Bull* 61, 63-80

142. Bao, G., Zhang, Y., Du, C., Chen, Z., Li, Y., Cao, Z., and Ma, Y. (2013) Genome Sequence of *Klebsiella oxytoca* M5a1, a Promising Strain for Nitrogen Fixation and Chemical Production. *Genome Announc* 1
143. Llobet, E., Tomás, J. M., and Bengoechea, J. A. (2008) Capsule polysaccharide is a bacterial decoy for antimicrobial peptides. *Microbiology* 154, 3877-3886
144. Dumanski, A. J., Hedelin, H., Edin-Liljegren, A., Beauchemin, D., and McLean, R. J. (1994) Unique ability of the *Proteus mirabilis* capsule to enhance mineral growth in infectious urinary calculi. *Infect Immun* 62, 2998-3003
145. Deretic, V., Dikshit, R., Konyecsni, W. M., Chakrabarty, A. M., and Misra, T. K. (1989) The algR gene, which regulates mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*, belongs to a class of environmentally responsive genes. *J Bacteriol* 171, 1278-1283
146. O'Riordan, K., and Lee, J. C. (2004) *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *Clin Microbiol Rev* 17, 218-234
147. Coldren, F. M., Palavecino, E. L., Levi-Polyachenko, N. H., Wagner, W. D., Smith, T. L., Smith, B. P., Webb, L. X., and Carroll, D. L. (2009) Encapsulated *Staphylococcus aureus* strains vary in adhesiveness assessed by atomic force microscopy. *J Biomed Mater Res A* 89, 402-410
148. Spellberg, B., and Daum, R. (2012) Development of a vaccine against *Staphylococcus aureus*. *Semin Immunopathol* 34, 335-348
149. Nanra, J. S., Buitrago, S. M., Crawford, S., Ng, J., Fink, P. S., Hawkins, J., Scully, I. L., McNeil, L. K., Aste-Amézaga, J. M., Cooper, D., Jansen, K. U., and Anderson, A. S. (2013) Capsular polysaccharides are an important immune evasion mechanism for *Staphylococcus aureus*. *Hum Vaccin Immunother* 9, 480-487
150. Foster, T. J. (2005) Immune evasion by staphylococci. *Nat Rev Microbiol* 3, 948-958
151. McKenney, D., Hübner, J., Muller, E., Wang, Y., Goldmann, D. A., and Pier, G. B. (1998) The ica locus of *Staphylococcus epidermidis* encodes production of the capsular polysaccharide/adhesin. *Infect Immun* 66, 4711-4720
152. Dinkla, K., Sastalla, I., Godehardt, A. W., Janze, N., Chhatwal, G. S., Rohde, M., and Medina, E. (2007) Upregulation of capsule enables *Streptococcus pyogenes* to evade immune recognition by antigen-specific antibodies directed to the G-related alpha2-macroglobulin-binding protein GRAB located on the bacterial surface. *Microbes Infect* 9, 922-931
153. Stollerman, G. H., and Dale, J. B. (2008) The importance of the group a streptococcus capsule in the pathogenesis of human infections: a historical perspective. *Clin Infect Dis* 46, 1038-1045
154. Kang, S. O., Wright, J. O., Tesorero, R. A., Lee, H., Beall, B., and Cho, K. H. (2012) Thermoregulation of capsule production by *Streptococcus pyogenes*. *PLoS One* 7, e37367
155. Nelson, D. E., Ihekweba, A. E., Elliott, M., Johnson, J. R., Gibney, C. A., Foreman, B. E., Nelson, G., See, V., Horton, C. A., Spiller, D. G., Edwards, S. W., McDowell, H. P., Unitt, J. F., Sullivan, E., Grimley, R., Benson, N., Broomhead, D., Kell, D. B., and White, M. R. (2004) Oscillations in NF-kappaB signaling control the dynamics of gene expression. *Science* 306, 704-708

156. Ballow, M. (2002) Primary immunodeficiency disorders: antibody deficiency. *J Allergy Clin Immunol* 109, 581-591
157. Felgentreff, K., Perez-Becker, R., Speckmann, C., Schwarz, K., Kalwak, K., Markelj, G., Avcin, T., Qasim, W., Davies, E. G., Niehues, T., and Ehl, S. (2011) Clinical and immunological manifestations of patients with atypical severe combined immunodeficiency. *Clin Immunol* 141, 73-82
158. Snapper, C. M., and Paul, W. E. (1987) Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science* 236, 944-947
159. Snapper, C. M., McIntyre, T. M., Mandler, R., Pecanha, L. M., Finkelman, F. D., Lees, A., and Mond, J. J. (1992) Induction of IgG3 secretion by interferon gamma: a model for T cell-independent class switching in response to T cell-independent type 2 antigens. *J Exp Med* 175, 1367-1371
160. Gerth, A. J., Lin, L., and Peng, S. L. (2003) T-bet regulates T-independent IgG2a class switching. *Int Immunol* 15, 937-944
161. Zhang, S. Y., Boisson-Dupuis, S., Chapgier, A., Yang, K., Bustamante, J., Puel, A., Picard, C., Abel, L., Jouanguy, E., and Casanova, J. L. (2008) Inborn errors of interferon (IFN)-mediated immunity in humans: insights into the respective roles of IFN-alpha/beta, IFN-gamma, and IFN-lambda in host defense. *Immunol Rev* 226, 29-40
162. Boyle, J. M., and Buckley, R. H. (2007) Population prevalence of diagnosed primary immunodeficiency diseases in the United States. *J Clin Immunol* 27, 497-502
163. Bousfiha, A. A., Jeddane, L., Ailal, F., Benhsaien, I., Mahlaoui, N., Casanova, J. L., and Abel, L. (2013) Primary immunodeficiency diseases worldwide: more common than generally thought. *J Clin Immunol* 33, 1-7
164. Modell, V., Knaus, M., Modell, F., Roifman, C., Orange, J., and Notarangelo, L. D. (2014) Global overview of primary immunodeficiencies: a report from Jeffrey Modell Centers worldwide focused on diagnosis, treatment, and discovery. *Immunol Res* 60, 132-144
165. Nelson, G., Paraoan, L., Spiller, D. G., Wilde, G. J., Browne, M. A., Djali, P. K., Unitt, J. F., Sullivan, E., Floettmann, E., and White, M. R. (2002) Multi-parameter analysis of the kinetics of NF-kappaB signalling and transcription in single living cells. *J Cell Sci* 115, 1137-1148
166. Liu, G., Park, Y. J., and Abraham, E. (2008) Interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) -1-mediated NF-kappaB activation requires cytosolic and nuclear activity. *FASEB J* 22, 2285-2296
167. Boehmer, E. D., Goral, J., Faunce, D. E., and Kovacs, E. J. (2004) Age-dependent decrease in Toll-like receptor 4-mediated proinflammatory cytokine production and mitogen-activated protein kinase expression. *J Leukoc Biol* 75, 342-349
168. Schumann, R. R., Leong, S. R., Flagg, G. W., Gray, P. W., Wright, S. D., Mathison, J. C., Tobias, P. S., and Ulevitch, R. J. (1990) Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* 249, 1429-1431
169. Zhang, T., Song, K. W., Hekmat-Nejad, M., Morris, D. G., and Wong, B. R. (2009) A modeling-derived hypothesis on chronicity in respiratory diseases: desensitized pathogen recognition secondary to hyperactive IRAK/TRAF6 signaling. *PLoS One* 4, e5332

170. Bauer, M., Kölsch, U., Krüger, R., Unterwalder, N., Hameister, K., Kaiser, F. M., Vignoli, A., Rossi, R., Botella, M. P., Budisteanu, M., Rosello, M., Orellana, C., Tejada, M. I., Papuc, S. M., 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., Wieczorek, D., El-Chehadeh, S., Van Esch, H., and von Bernuth, H. (2015) Infectious and immunologic phenotype of MECP2 duplication syndrome. *J Clin Immunol* 35, 168-181

## Abkürzungsverzeichnis

CD	Cluster of differentiation
ConA	Concanavalin
CRP	C-reaktives Protein
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FUO	Fever of unknown origin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HRP	Horseradish peroxidase
I $\kappa$ B $\alpha$	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha
IKK- $\alpha$	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha
IKK- $\beta$	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta
IKK- $\gamma$	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit gamma (=NEMO)
IFN $\gamma$	Interferon gamma
IL1	Interleukin-1
IL2	Interleukin-2
IL6	Interleukin-6
IRAK1	Interleukin-1 receptor-associated kinase 1
IRAK2	Interleukin-1 receptor-associated kinase 2
IRAK4	Interleukin-1 receptor-associated kinase 4
IRF7	Interferon-regulatory factor 7
LBP	Lipopolysaccharid-binding-protein
LPS	Lipopolysaccharid
LTT	Lymphozytentransformationstest
MAP-Kinase	Mitogen-activated protein Kinase
MECP2	Methyl CpG binding protein 2
MLPA	Multiplex-ligation probe amplification



MyD88	Myeloid differentiation primary response gene 88
NEMO	NF- $\kappa$ B essential modulator
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PHA	Phytohaemagglutinin
PID	Primärer Immundefekt
PRRs	Pattern-recognition-receptors
SAC	Staphylococcus aureus Cowan-1 strain
SV40	Simian virus 40
TAK1	Transforming growth factor $\beta$ -activated kinase 1
TCR	T-cell receptor
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF $\alpha$	Tumor necrosis factor $\alpha$
TOLLIP	Toll interacting protein
TRAF6	TNF receptor associated factor 6
WES	Whole exome sequencing

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Michael Bauer, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Erhöhte Infektanfälligkeit bei Patienten mit *MECP2* Duplikations Syndrom: Infektiologisch-immunologische Phänotypisierung und *in vitro*-Untersuchung der Akut-Phase-Reaktion“ 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 beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE - [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

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 etwaigen erfolgten Publikationen

Herr Michael Bauer hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

**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, Wieczorek D, El-Chehadeh S, van Esch H, von Bernuth H. Infectious and immunologic phenotype of *MECP2* duplication syndrome. J Clin Immunol. 2015 Feb;35(2):168-81.

Beitrag im Einzelnen:

Herr Bauer und Herr Prof. Dr. med. Horst von Bernuth haben die vorliegende Studie gemeinsam konzipiert. Durch Herrn Bauer erfolgte die Datenerhebung und -auswertung. Bei den Laborarbeiten wurde Herr Bauer von Herrn Dr. Kölsch, Frau Dr. Unterwalder und Herrn Dr. Meisel unterstützt. Da es sich bei dem *MECP2* Duplikations Syndrom um eine sehr seltene Erkrankung mit ca. 300 publizierten Fällen weltweit handelt, mussten die in dieser Publikation untersuchten 31 Patienten nicht nur aus der Kinderklinik der Charité Berlin, sondern auch aus weiteren deutschen Kinderkliniken und aus dem europäischen und internationalen Ausland rekrutiert werden. Die weiteren Autoren der Studie sind die behandelnden Ärzte dieser Patienten, welche freundlicherweise biologisches Material der Patienten zur Verfügung stellten und einen Fragebogen zum klinischen Verlauf der Patienten ausfüllten. Das Manuskript wurde durch Herrn Bauer und Herrn Prof. Dr. med. Horst von Bernuth gemeinsam erstellt, die sich die Korrespondenzautorenschaft teilen.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden

Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

## **Lebenslauf**

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

## Publikationsliste

### Originalarbeiten

Infectious and immunologic phenotype of *MECP2* duplication syndrome

**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, Wieczorek D, El-Chehadeh S, Van Esch H, von Bernuth H

J Clin Immunol. 2015 Feb;35(2):168-81.

Antibiotic prophylaxis, immunoglobulin substitution and supportive measures prevent infections in *MECP2* Duplication Syndrome

**Bauer M**, Krüger R, Kölsch U, Unterwalder N, Meisel C, Wahn V, von Bernuth H

Accepted by J Ped Inf Dis.

Autoantibodies against IL-6 in patients with pyogenic bacterial infections

Kölsch U, Heller S, Tersch C, Knaus A, Rosen LB, Döffinger R, Farinacci M, Schaefer CC, Kirschfink M, van der Linden M, Bustamante J, Kühnen P, Seeliger S, Hüseman D, Thomalla HU, Bär G, Lionakis MS, zum Büschenfelde DM, Browne SK, **Bauer M**, Unterwalder N, Krude H, Krawitz P, Bühner C, Volk HD, Holland SM, Casanova JL, Puel A, Rose-John S, Reimer U, Meisel C, von Bernuth H

In preparation

### Vorträge

Humoral immune abnormalities, infections with encapsulated bacteria and strong acute phase responses are frequent in *MECP2* Duplication Syndrom

**Bauer M**, Kölsch U, Krüger R, Hameister K, Rossi R, Botella MP, Budisteanu M, Rosello M, Orellana C, Tejada MI, Papuc SM, Wenner K, Xu X, Wieczorek D, Jezela-Stanek A, Martinez F, Echenne B, Van Esch H, Wahn V, von Bernuth H,

3<sup>rd</sup> European Rett Syndrome Conference 2013. Maastricht.

Long-term treatment with mycophenolate and methylprednisolone pulse therapy in a patient with common-variable immunodeficiency (CVID) and lymphocytic interstitial pneumonitis

**Bauer M**, Kallinich T, Wahn V, von Bernuth H.

31th Annual Meeting of API (Arbeitsgemeinschaft Pädiatrische Immunologie) 2014. Ittingen.

## Poster

Humoral immune abnormalities, infections with encapsulated bacteria and strong acute phase responses are frequent in *MECP2* duplication syndrome

**Bauer M**, Kölsch U, Krüger R, Hameister K, Rossi R, Botella MP, Budisteanu M, Rosello M, Orellana C, Tejada MI, Papuc SM,, Wenner K, Xu X, Wieczorek D, Jezela-Stanek A, Martinez F, Echenne B, Van Esch H, Wahn V, von Bernuth H.

Joint 109th Annual Meeting of the German Society of Pediatrics and Adolescent Medicine and 30<sup>th</sup> Annual Meeting of API (Arbeitsgemeinschaft Pädiatrische Immunologie) 2013. Düsseldorf.

How can we avoid death by cerebral vasculitis in patients with XLP1?

**Bauer M**, Kallinich T, Seeger KH, von Bernuth H

32th Annual Meeting of API (Arbeitsgemeinschaft Pädiatrische Immunologie) 2015. Freiburg.

## Danksagung

Vor allem gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Horst von Bernuth für seine großzügige Bereitschaft, mich in seine Arbeitsgruppe als Doktorand aufzunehmen und mir die wissenschaftliche Mitarbeit an seinen Forschungsprojekten im Bereich der pädiatrischen Immunologie anzuvertrauen. Ich habe es als große Ehre empfunden, meine Doktorarbeit in einer Laborgruppe mit hohem wissenschaftlichen Anspruch sowie kollegialem Teamgeist durchführen zu dürfen.

Herr Prof. Dr. med. Horst von Bernuth hat mich in meiner Arbeit durch sein großes Verständnis, sein kontinuierliches Interesse an meinen Studien und Laborergebnissen und durch seine stete Bereitschaft zu Gesprächen und inhaltlicher Diskussion sehr gefördert und unterstützt. Auch die Teilnahme an Kongressen und die Möglichkeit gemeinsamer Publikationen verdanke ich seiner Anregung. Ich möchte Herrn Prof. Dr. med. Horst von Bernuth für seine stete Förderung und für seine wertvollen Ratschläge und Hinweise bei der Durchführung meiner Arbeit herzlich danken.

Bei den folgenden Personen möchte ich mich darüber hinaus bedanken:

### Patienten und deren Eltern

AG Prof. Dr. Horst von Bernuth,

Charité Universitätsmedizin Berlin:

Karoline Strehl

Christine Seib

Margret Oberreit

Petra Ellensohn

Dr. Uwe Kölsch

Dr. Nadine Unterwalder

Dr. Christian Meisel

Labor Berlin GmbH

Kristin Neuhaus

Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt

Pneumologie, Immunologie und

Intensivmedizin, Charité

Universitätsmedizin Berlin:

PD Dr. Renate Krüger

Prof. Dr. Volker Wahn

Immundefektambulanz der Charité:

Ina Hollaender

Christine Schubert

Odette Schuetze

Barbara Wolf

## Externe Kooperationspartner

### **Karin Hameister**

*Pediatric Neurology and Social Medicine  
Königsborn, Unna, Germany*

### **Fabian Marc Kaiser**

*Department of Stem Cell Transplantation and  
Immunology, Children's Hospital, Goethe  
University Hospital, Frankfurt am Main, Germany*

### **Aglaia Vignoli**

*Epilepsy Center, San Paolo Hospital, Department  
of Health Sciences, University of Milan, Milan, Italy*

### **Rainer Rossi**

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

### **Maria Pilar Botella**

*Pediatric Neurology, Txagorritxu Hospital, Vitoria-  
Gasteiz, Spain*

### **Monica Rosello**

*Department of Genetics and prenatal diagnostics,  
Hospital Universitario La Fe, València, Spain*

### **Carmen Orellana**

*Department of Genetics and prenatal diagnostics,  
Hospital Universitario La Fe, València, Spain*

### **Francisco Martinez**

*Department of Genetics and prenatal diagnostics,  
Hospital Universitario La Fe, València, Spain*

### **Maria Isabel Tejada**

*Molecular Genetics Laboratory, Genetics Service,  
BioCruces Health Research Institute, Cruces  
University Hospital, Barakaldo, Spain*

### **Sorina Mihaela Papuc**

*"Victor Babes" National Institute of Pathology,  
Bucharest, Romania*

### **Oliver Patat**

*Service de génétique médicale, CHU Toulouse -  
Hôpital Purpan, Toulouse, France*

### **Sophie Julia**

*Service de génétique médicale, CHU Toulouse -  
Hôpital Purpan, Toulouse, France*

### **Renaud Touraine**

*Service de génétique, CHU de Saint-Etienne,  
Saint-Etienne, France*

### **Thusari Gomes**

*Department of General Pediatrics and  
Neonatology, Faculty of Medicine, University  
Children's Hospital of the Saarland, Homburg/  
Saar, Germany*

### **Ludwig Gortner**

*Department of General Pediatrics and  
Neonatology, Faculty of Medicine, University  
Children's Hospital of the Saarland, Homburg/  
Saar, Germany*

### **Kirsten Wenner**

*Children's University Hospital and Outpatient  
Clinic, Hamburg Eppendorf, Germany*

### **Xiu Xu**

*Department of Child Healthcare, Children's  
Hospital of Fudan University, Shanghai, China*

### **Alexandra Afenjar**

*Département de génétique, CHU Paris-GH La  
Pitié Salpêtrière Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris,  
France*

### **Annick Toutain**

*Service de génétique, CHRU de Tours Hôpital  
Bretonneau, Tours, France*

### **Nicole Philip**

*Unité de génétique clinique, Département de  
génétique médicale, CHU de Marseille, Hôpital de  
la Timone, Marseille, France*



**Jezela-Stanek**

*Department of Medical Genetics, The Children's  
Memorial Health Institute, Warsaw, Poland*

**Bernard Echenne**

*Pediatric Neurology, CHU Montpellier, Montpellier,  
France*

**Dagmar Wieczorek**

*Institute of Human Genetics, University Hospital  
Essen, University of Duisburg-Essen, Essen,  
Germany*

**Salima El-Chehadeh**

*Centre de Genetique, Hopital d'Enfants, Dijon,  
France*

**Hilde Van Esch**

*Center for Human Genetics, University Hospital  
Leuven, KU Leuven, Leuven, Belgium*