

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

DISSERTATION

Primäre Immundefekte in von Toll-like-, Interleukin-1- und Tumor-Nekrose-Faktor- α -
Rezeptor kontrollierten Signalwegen bei invasiven Staphylokokken- und
Pneumokokkeninfektionen im Kindesalter

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Karoline van de Loo

(geb. Strehl)

aus Essen

Datum der Promotion: 09.12.2016

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
Abbildungsverzeichnis	11
Tabellenverzeichnis.....	12
1. Zusammenfassung und Abstract.....	13
1.1. Zusammenfassung	13
1.2. Abstract	15
2. Einleitung	17
2.1. <i>Streptococcus pneumoniae</i> und <i>Staphylococcus aureus</i>	17
2.1.1. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	17
2.1.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	18
2.1.3. Infektionen durch <i>S. pneumoniae</i> und <i>S. aureus</i>	19
2.1.4. Abwehr von <i>S. aureus</i> und <i>S. pneumoniae</i>	20
2.2. Signalwege und Schlüsselmoleküle der „innate immunity“ bei der Abwehr von <i>S. aureus</i> und <i>S. pneumoniae</i>	21
2.2.1. TL- und IL-1-Rezeptor-abhängige Signalwege	21
2.2.2. TNF- α -Rezeptor-abhängige Signalwege.....	23
2.2.3. NF κ B-abhängige Signalwege.....	24
2.2.4. NEMO.....	25
2.2.5. MAP Kinasen.....	26
2.3. Primäre Immundefekte mit Prädisposition zu invasiven Staphylokokken- und Pneumokokkeninfektionen	27
2.3.1. Überblick: Primäre Immundefekte mit Prädisposition zu invasiven Staphylokokken- und Pneumokokkeninfektionen.....	27
2.3.2. Diagnostik auf Immundefekte bei invasiven Infektionen durch <i>S. pneumoniae</i> und <i>S. aureus</i>	28
2.3.2.1. Diagnostik auf Immundefekte bei invasiven Infektionen durch <i>S. aureus</i>	28
2.3.2.2. Diagnostik auf Immundefekte bei invasiven Infektionen durch <i>S. pneumoniae</i>	28

2.3.2.1. Primäre Immundefekte in den TL-, IL-1- und TNF- α -Rezeptor-abhängigen Signalwegen.....	30
2.3.2.1.1. Autosomal rezessiv vererbte MyD88- und IRAK4-Defekte	31
2.3.2.1.2. X-chromosomal rezessiv vererbter NEMO- und autosomal dominant vererbter I κ B α -Defekt	32
3. Hypothese und Fragestellung der Arbeit	34
4. Patienten, Material und Methoden	36
4.1. Patientenkohorte	36
4.2. Material.....	36
4.2.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien	36
4.2.2. Chemikalien.....	37
4.2.3. Lösungen.....	38
4.2.4. Kits	38
4.2.5. Zytokine	39
4.2.6. Antikörper	39
4.3. Methoden.....	40
4.3.1. Voruntersuchungen auf primäre Immundefekte in Toll-like-, IL-1- und TNF- α -Rezeptor-abhängigen Signalwegen und verminderte Stimulierbarkeit durch Pneumokokken in Vollblut	40
4.3.1.1. Stimulation des Vollbluts mit IL-1 β , LPS, Pam ₂ CSK ₄ , TNF- α , Pneumokokken und PMA/Ionomycin.....	40
4.3.1.2. ELISA zum Nachweis von IL-10 und IL-6 aus dem Überstand des zuvor stimulierten Vollbluts.....	41
4.3.1.3. Messung des CD62L-Sheddings auf Granulozyten nach Stimulation mit IL-1 β und TNF- α in der Durchflusszytometrie	42
4.3.2. Untersuchungen bei Patienten mit vermindertem Ansprechen auf die Stimulation der TL-, IL-1- und TNF- α -Rezeptor-abhängigen Signalwege	43
4.3.2.1. Zellkultur mit Simian Virus (SV)40-immortalisierten Fibroblasten und LCLs	43
4.3.2.2. ELISA zum Nachweis von IL-6 im Überstand von SV40-immortalisierten Fibroblasten nach Stimulation mit IL-1 β und TNF- α	44
4.3.2.3. Western Blotting zur Detektion von IRAK1, I κ B α und MAP Kinasen nach der Stimulation mit IL-1 β und TNF- α	45

4.3.2.4. Messung der NFκB-Translokation in den Zellkern in SV40-immortalisierten Fibroblasten nach Stimulation mit TNF-α mittels EMSA.....	47
4.3.2.5. PCR einzelner Exone auf Grundlage genomischer DNA.....	49
4.3.2.6. Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR).....	50
5. Ergebnisse	51
5.1. Patientenkohorte	51
5.2. Voruntersuchungen auf Primäre Immundefekte in Toll-like-, IL-1- und TNF-α-Rezeptor-abhängigen Signalwegen und verminderte Stimulierbarkeit durch Pneumokokken in Vollblut	53
5.2.1. Verminderte Stimulierbarkeit durch Pneumokokken in Vollblut.....	53
5.2.2. Verminderte Stimulierbarkeit durch TNF-α in Vollblut.....	54
5.3. Untersuchungen bei Patienten mit vermindertem Ansprechen auf die Stimulation der TNF-α-Rezeptor-abhängigen Signalwege.....	56
5.3.1. NEMO-Defekt bei einem Patienten (P 21) mit invasiven Infektionen durch <i>S. pneumoniae</i>	56
5.3.2. Patienten mit vermindertem Ansprechen auf die TNF-α Stimulation ohne eindeutigen immunologisch-klinischen Phänotyp.....	58
5.4. Untersuchungen bei Patienten mit vermindertem Ansprechen auf die Stimulation der Toll-like- und IL-1-Rezeptor-abhängigen Signalwege	65
5.4.1. IRAK4-Defekt bei einem Patienten (P 16) mit Meningitis und Sepsis durch <i>S. pneumoniae</i>	67
5.4.2. IRAK4-Defekt bei einer Patientin (P 17) mit rezidivierenden Abszessen durch <i>S. aureus</i>	70
5.4.3. MyD88-Defekt bei einem Patienten (P 18) mit Sepsis durch <i>S. aureus</i> und <i>P. aeruginosa</i>	71
5.4.4. Vermindertes Ansprechen auf die Stimulation mit PAM ₂ CSK ₄ und LPS bei einem Patienten (P 4) mit zweimaliger Meningitis durch <i>S. pneumoniae</i> ..	73
5.4.5. Vermindertes Ansprechen auf die Stimulation mit PAM ₂ CSK ₄ bei einem Patienten (P 38) mit rezidivierenden Abszessen durch <i>S. aureus</i>	75
6. Diskussion.....	77
6.1. Untersuchungen auf Defekte in TNF-α-Rezeptor-abhängigen Signalwegen	77
6.1.1. NEMO-Defekt bei einem Patienten mit invasiven Infektionen durch <i>S. pneumoniae</i> – deutlich verminderte IL-10 Produktion nach Stimulation mit TNF-α.....	77

6.1.2. Vermindertes Ansprechen auf die Stimulation mit TNF- α bei Patienten ohne eindeutigen immunologischen Phänotyp.....	78
6.1.3. Überlegungen zum Stellenwert von <i>ex vivo</i> Diagnostik TNF- α -Rezeptor-abhängiger Signalwege zur Identifizierung von Defekten in NEMO-kontrollierten Signalwegen.....	80
6.2. Untersuchungen auf Defekte in TL- und IL-1-Rezeptor-abhängigen Signalwegen	81
6.2.1. Fehlende Zytokinproduktion nach Stimulation mit TL-Agonisten und IL-1 β bei Patienten mit vollständigem MyD88- und IRAK4-Defekt – Bedeutung der Akut-Phase Reaktion für die Abwehr von Pneumokokken, Staphylokokken und anderen Erregern	81
6.2.1.1. Fehlende Zytokinproduktion nach Stimulation mit TL-Agonisten und IL-1 β bei Patienten mit vollständigem MyD88- und IRAK4-Defekt.....	81
6.2.1.2. Fehlende Zytokinproduktion nach Stimulation mit Toll-like-Agonisten und IL-1 β bei Patienten mit vollständigem MyD88- und IRAK4-Defekt – Bedeutung der Akut-Phase Reaktion für die Abwehr von Pneumokokken.....	82
6.2.1.3. Fehlende Zytokinproduktion nach Stimulation mit TL-Agonisten und IL-1 β bei Patienten mit vollständigem MyD88- und IRAK4-Defekt – Bedeutung der Akut-Phase Reaktion für die Abwehr von Staphylokokken	83
6.2.2. IRAK4-Defekt bei einem Patienten (P 16) mit Meningitis und Sepsis durch <i>S. pneumoniae</i>	84
6.2.3. Vermindertes Ansprechen auf die Stimulation mit PAM ₂ CSK ₄ und LPS bei einem Patienten (P 4) mit zweimaliger Meningitis durch <i>S. pneumoniae</i>	84
6.2.4. Vermindertes Ansprechen auf die Stimulation mit PAM ₂ CSK ₄ bei einem Patienten mit rezidivierenden Abszessen durch <i>S. aureus</i>	85
6.2.5. Voruntersuchungen auf Defekte in Toll-like- und IL-1-Rezeptor-abhängigen Signalwegen	86
6.3. Schlussfolgerung und Ausblick.....	87
7. Literaturverzeichnis.....	90
8. Eidesstattliche Versicherung	105
9. Anteilserklärung an erfolgten Publikationen	106

10. Lebenslauf..... 107
11. Danksagung 108

Abkürzungsverzeichnis

AD-EDA-ID	Autosomal dominant vererbte Ektodermale Dysplasie mit Immundefekt
AP-1	Activator Protein 1
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
CD	Cluster of differentiation
CD62L	CD62 Ligand
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DHR	Dihydrorhodamin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECL	Enhanced Chemiluminescent
EDA	Ektodermale Dysplasie mit Anhidrose
EDA-ID	Ektodermale Dysplasie mit Anhidrose und Immundefekt
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMSA	Elektro Mobility Shift Assay
ERK	Extracellular Signal-regulierte Kinase
ESPED	Erhebungseinheit für seltene pädiatrische Erkrankungen
FACS	Fluorescence activated cell sorting

FCS	Fetales Kälber Serum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GRP94	Glukose reguliertes Protein 94
HRP	Horseradish Peroxidase
HSV	Herpes Simplex Virus
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IKK	Inhibitor von nuclear factor kappa-B Kinase
IL	Interleukin
IP	Incontinentia Pigmenti
IRAK	Interleukin-1 Rezeptor assoziierte Kinase
IRF	Interferon regulierender Faktor
I κ B α	Inhibitor von NF κ B- α
JNK	c-Jun amino (N)-terminale Kinase
LAD	Leukozyten-Adhäsions-Defekt
LCL	Lymphoblastic cell lines
LPS	Lipopolysaccharid
MAL	MyD88 adaptor-like
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MyD88	Myeloischer Differenzierungsfaktor 88

NEMO	NF-kappa-B essential modulator
NFκB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NIK	NFκB induzierende Kinase
NLR	Nod-like Rezeptoren
NOD-R	Nucleotide-binding oligomerization domain receptors
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Pam ₂ CSK ₄	Diacyliertes Lipopeptid, TLR2 Ligand
PAMP	Pathogen Assoziierte Molekül Pattern
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PCV	Pneumokokken Konjugat Vakzin
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PPV	Pneumokokken Polysaccharid Vakzin
PRATA4	Protein assoziiert mit TLR4
PRR	Pathogen Recognition Rezeptor
PVL	Panton Valentine Leukocidin
RANK	Rezeptor Aktivator von NFκB
RelB	Related B
RLR	RIG-I-like Rezeptoren

RPMI	Roswell Park Memorial Institute
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
SARM	Sterile alpha- and armadillo-motif-containing protein
SDS-Page	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
STIKO	Ständige Impfkommission
SV40	Simian-Virus 40
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBST	Tris-buffered saline mit Tween
TIR	Toll-like und Interleukin-1 Rezeptoren
TIRAP	Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein
TLR	Toll-like Rezeptor
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRAM	TRIF-related adaptor molecule
TRIF	TIR-domain-containing adaptor-inducing interferon- β
TyK2	Tyrosine kinase 2
VEGF	Vaskulärer Endothelialer Growth Faktor
XR-EDA-ID	X-chromosomal vererbte Ektodermale Dysplasie mit Immundefekt

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: TL-Rezeptorsignalwege.....	21
Abbildung 2: TNF-Rezeptorsignalwege	24
Abbildung 3: Immundefekte in den TL-, IL-1- und TNF- α -Rezeptor- abhängigen Signalwegen	30
Abbildung 4: Invasive Pneumokokken- und Staphylokokkeninfektionen.....	51
Abbildung 5: Erreger der Infektionen (n = 290).....	52
Abbildung 6: Art der Infektion (n = 290).....	52
Abbildung 7: IL-6 ELISA nach Pneumokokkenstimulation.....	53
Abbildung 8: Messung der IL-10 Produktion mittels ELISA in Vollblut	57
Abbildung 9: Schematische Darstellung des <i>NEMO</i> -Gens mit bisher identifizierten Mutationen	57
Abbildung 10: NEMO-Expression in LCLs von dem Patienten (P 21).....	58
Abbildung 11-17: IL-6 Produktion in SV40-transformierten Fibroblasten	61
Abbildung 18: NEMO-Expression in SV40-transformierten Fibroblasten	62
Abbildung 19: IRAK1-Abbau nach Stimulation mit IL-1 β	62
Abbildung 20: I κ B α -Abbau nach Stimulation mit TNF- α	63
Abbildung 21: Phosphorylierung von JNK nach Aktivierung mit TNF- α	64
Abbildung 22: Phosphorylierung von p38 nach Aktivierung mit TNF- α	64
Abbildung 23: NF κ B EMSA nach Stimulation mit TNF- α	65
Abbildung 24: FACS-Analyse des CD62L-Sheddings auf Granulozyten.....	68
Abbildung 25: Schematische Darstellung des <i>IRAK4</i> -Gens mit bis dato identifizierten Mutationen.....	68
Abbildung 26: IRAK4-Expression in SV40-transformierten Fibroblasten von (P 16).....	69
Abbildung 27: IRAK1-Abbau in SV40-transformierten Fibroblasten des Patienten (P 16).....	69
Abbildung 28: <i>IRAK4</i> full-length Transkripte in SV40-transformierten Fibroblasten des Patienten (P 16)	69
Abbildung 29: Messung der IL-6 Produktion mittels ELISA in SV40- transformierten Fibroblasten des Patienten (P 16).....	70
Abbildung 30: Schematische Darstellung des <i>MyD88</i> -Gens mit allen bis dato identifizierten Mutationen.....	73

Abbildung 31: Messung der IL-6 Produktion mittels ELISA in Vollblut des Patienten (P 4).....	74
Abbildung 32: Genomische PCR von <i>MAL/TIRAP</i> des Patienten (P 4)	75
Abbildung 33: Messung der IL-6 Produktion mittels ELISA in Vollblut bei dem Patienten (P 38).....	76

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte und Verbrauchsmaterialien	36
Tabelle 2: Chemikalien	37
Tabelle 3: Lösungen	38
Tabelle 4: Kits	38
Tabelle 5: Zytokine, TLR-Agonisten, Ionomycin und Phorbol ester.....	39
Tabelle 6: Western Blot Antikörper	39
Tabelle 7: FACS Antikörper	40
Tabelle 8: Perzentilen der mittels ELISA gemessenen IL-10 Produktion auf die TNF- α Stimulation der Tages- und Reisekontrollen in Vollblut (n = 52).....	54
Tabelle 9: Charakterisierung der Patienten mit zweimalig vermindertem Ansprechen auf die TNF- α Stimulation, IL-10 Produktion unter < 20pg/ml	55
Tabelle 10: Perzentilen der mittels ELISA gemessenen IL-6 Produktion auf die IL-1 β , LPS und PAM ₂ CSK ₄ Stimulation der Tages- und Reisekontrollen in Vollblut (n = 52)	66
Tabelle 11: Charakterisierung der Patienten mit zweimalig erniedrigter IL-6 Produktion im Vollblut ELISA nach Stimulation mit PAM ₂ CSK ₄ , LPS und IL-1.....	66

1. Zusammenfassung und Abstract

1.1. Zusammenfassung

Einleitung: Weltweit stellen invasive Pneumokokkeninfektionen eine der Haupttodesursachen im Kindesalter dar. Bisher werden diese Infektionen meistens als idiopathisch betrachtet, obwohl nach aktuellen Daten bei 10 % der Kinder ein primärer Immundefekt diagnostiziert werden kann. In den letzten Jahren konnten einige Immundefekte im Bereich der Signaltransduktion der Toll-like- (TL), Interleukin (IL)-1- und Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)- α -Rezeptoren beschrieben werden, die selektiv zu invasiven Staphylokokken- und Pneumokokkeninfektionen prädisponieren. Die Hypothese, dass invasive Staphylokokken- und Pneumokokkeninfektionen keine idiopathischen Infektionen darstellen sollte durch die Identifikation neuer angeborener Immundefekte mit besonderer Anfälligkeit für invasive Pneumokokken- und Staphylokokkeninfektionen und die Verbesserung der Diagnostik von bereits bekannten Immundefekten geprüft werden.

Methoden: Die Untersuchungen auf Immundefekte im Bereich der Signaltransduktion der TL, IL-1- und TNF- α -Rezeptoren erfolgten durch die Messung der Zytokine IL-6 und IL-10 mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) aus dem Überstand des zuvor mit IL-1 β , Lipopolysaccharid (LPS), Diacyliertes Lipopeptid (Pam₂CSK₄) und TNF- α stimulierten Vollbluts von Kindern mit invasiven Pneumokokken- und Staphylokokkeninfektionen. In Akutsituationen wurde die Diagnostik durch die Messung des Sheddings von CD62 Ligand (CD62L) auf Granulozyten ergänzt. Bei Auffälligkeiten wurden in Fibroblasten der Patienten die IL-1- und TNF- α -Rezeptor-abhängigen Signalwege durch die Messung des Interleukin-1-Rezeptor-assozierte Kinase (IRAK)1- und Inhibitor von Nuklear Faktor κ B (I κ B)-Abbaus mittels Western Blot und durch die Messung der Translokation von Nuklear Faktor kappa B (NF κ B) in den Zellkern mittels Elektro Mobility Shift Assay (EMSA) gezielter untersucht.

Ergebnisse: Im Rahmen dieser Arbeit wurden 290 Patienten mit invasiven Pneumokokken- und Staphylokokkeninfektionen auf oben beschriebene Immundefekte untersucht. Bei einem Patienten konnte die molekulargenetische Diagnose eines NF κ B

essentiellen Modulator (NEMO)-Defekt gestellt werden. Bei zwei Patienten konnte ein IRAK4-Defekt und bei einem Patienten ein Myeloischer Differenzierungsfaktor 88 (MyD88)-Defekt diagnostiziert werden. Außerdem wurde erstmals gezeigt, dass das CD62L-Shedding auch während einer Sepsis einen zuverlässigen Test für die Diagnose eines IRAK4-Defekts darstellt.

Schlussfolgerung: Bei den in dieser Kohorte diagnostizierten Immundefekten handelte es sich teilweise um bereits bekannte Defekte. Es ist nicht gelungen neue Immundefekte zu identifizieren. Dies könnte einerseits an der Redundanz der untersuchten Signalwege liegen und andererseits daran, dass die hier angewandten Untersuchungsmethoden, beispielsweise für Mutationen mit hypomorpher Proteinexpression, nicht sensitiv genug gewesen sind. Eine wichtige Ergänzung der Untersuchungen stellen neue Sequenzierungsmethoden dar. Das CD62L-Shedding stellt aufgrund der schnelleren Durchführbarkeit eine wichtige Ergänzung zu der Zytokinmessung aus Vollblutüberstand dar. Die allgemeine Verlässlichkeit zur Diagnose eines IRAK4- oder MyD88-Defekts durch das CD62L-Shedding auf Granulozyten während einer Sepsis müsste jedoch in einer größeren Kohorte geprüft werden.

1.2. Abstract

Introduction: Worldwide, invasive pneumococcal infections are one of the leading causes for mortality throughout years of childhood. Until now, these infections were mostly considered as idiopathic. Current research shows that primary immunodeficiency can be identified among 10 % of these children. During the last years, some new immunodeficiencies associated with impaired signaling via the Toll-like, IL-1 and TNF- α -receptor pathways were reported. This study aims to show that invasive pneumococcal and staphylococcal infections are not always idiopathic, but underlying immunodeficiencies can lead to these infections. This hypothesis should be investigated by identifying novel primary immunodeficiencies with a selective predisposition to these infections. Furthermore, methods and algorithms for the diagnostic of already known immunodeficiencies within these pathways shall be improved.

Methods: Wholeblood from children with invasive pneumococcal and staphylococcal infections was stimulated with IL-1 β , LPS, Pam₂CSK₄ and TNF- α . 48 hours later, the production of the cytokines IL-6 and IL-10 was measured by ELISA. When a fast diagnostic procedure was vital, the diagnostic approach was complemented by measuring CD62L shedding on granulocytes. When the cytokine production in wholeblood and/or the CD62L shedding on granulocytes were reduced, the signaling pathways of the IL-1- and TNF- α -receptor were further investigated by measuring the degradation of IRAK1 and I κ B α by Western Blotting analysis and the NF κ B translocation into the nucleus by EMSA analysis in patients fibroblasts.

Results: Within this thesis, 290 patients with invasive pneumococcal and staphylococcal infections were examined for the above described immunodeficiencies. In one patient with diminished response upon stimulation with TNF- α , a NEMO-deficiency could be identified. In five patients a diminished response to the stimulation of TL- and IL-1-receptors could be revealed. Two of these five patients showed a mutation in *IRAK4* and one in *MyD88*. Furthermore, it could be shown that the CD62L shedding is also reliable during sepsis for the diagnosis of an IRAK4-deficiency.

Conclusion: The diagnosed immunodeficiencies have partly been described previously. We did not succeed in identifying a new immunodeficiency. This could either be due to the redundancy of the investigated signaling pathways or to a lack of

sensitivity of the methods for detecting hypomorphic immunodeficiencies with residual proteinexpression. The use of whole exome sequencing could be an important complementation of the investigations. The CD62L shedding assay can be regarded as an important tool in addition to the conventional ELISA due to fast feasibility, but needs to be tested in a larger cohort.

2. Einleitung

2.1. *Streptococcus pneumoniae* und *Staphylococcus aureus*

2.1.1. *Streptococcus pneumoniae*

Pneumokokken wurden 1881 von Georg Miller Sternberg und Luis Pasteur unabhängig voneinander entdeckt. 1885 konnte der Erreger erstmals von Albert Fränkel isoliert werden (1). *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) sind grampositive Bakterien aus der Gruppe der α -hämolyisierenden Streptokokken. Pneumokokken weisen die mikroskopische Form von ovalen bis lanzettförmigen Diplokokken auf. Die Unterteilung der Pneumokokken in über 90 Serotypen erfolgt anhand der Antigenstrukturen der sie umgebenden Polysaccharidkapsel (1). Die serologische Einteilung wurde erstmals 1933 durch Rebecca C. Lancefield definiert (2). Neben der Antiphagozytosekapsel stellen das Pneumolysin, die Hyaluronidase, die Immunglobulin(Ig)-Ase und die Lipoteichonsäure weitere Pathogenitätsfaktoren dar (1). *S. pneumoniae* ist der klassische Erreger der Lobär- und der bakteriellen Bronchopneumonie. Die durch Pneumokokken verursachte Bronchopneumonie, Otitis media und Konjunktivitis sind lokale, nicht invasive Infektionen (1). Die häufigsten invasiven Pneumokokkeninfektionen sind Sepsis, Meningitis, septische Arthritis sowie die primäre Peritonitis (3). Im Gegensatz zur nicht-invasiven Infektion, die per continuitatem zugängliche Kompartimente des Körpers infiziert, sind bei der invasiven Infektion sterile Kompartimente des Körpers infiziert. Die intravenöse antibiotische Therapie der Pneumokokken erfolgt, wenn keine Resistenzen vorliegen, mit Penicillin G (4). Seit 2006 empfiehlt die Ständige Impfkommission (STIKO) die Impfung mit einem Pneumokokken-Konjugat-Impfstoff für Kinder unter zwei Jahren, zunächst heptavalentes Pneumokokken-Konjugat-Vakzin (PCV7), später decavalent (PCV10) (4). Seit 2009 wird in Deutschland der 13-valente Pneumokokken-Konjugat-Impfstoff (PCV13) eingesetzt (5). Bei Erwachsenen erfolgt die Impfung mit einem 23-valenten Pneumokokken Polysaccharid Vakzin (PPV23) (4). Dieser ist bei Kindern unter zwei Jahren nicht zugelassen, da die T-Zell-unabhängige Immunantwort, welche zur Bildung von Antikörpern durch den Polysaccharidimpfstoff notwendig ist, noch nicht ausreichend ausgebildet ist (6).

2.1.2. *Staphylococcus aureus*

Nach der mikroskopischen Darstellung rundlicher Organismen in Eiterproben aus dem Jahr 1874 durch Theodor Billroth gelang Robert Koch 1878 erstmalig der Nachweis der Staphylokokken. Louis Pasteur glückte 1880 die Anzucht, während Alexander Ogston im gleichen Jahr die klinische Bedeutung und den Gattungsnamen der Staphylokokken definierte (7, 8). *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) sind grampositive, koagulasepositive Kokken, die sich in Traubenform (*altgriechisch: staphylé* = Weintraube) anlagern. Diese Bakterien verfügen über die Virulenzfaktoren Lipoprotein und Lipoteichonsäure, die ihnen eine permanente Kolonisation von Haut und Schleimhäuten ermöglichen (9). Eine Kolonisation ist in der Regel asymptomatisch, es kann jedoch zu lokalen Infektionen kommen, erreger-spezifische Virulenzfaktoren, wie z.B. die Staphylokinase und die Hyaluronidase, führen zur Ausbreitung im Gewebe (9). Es können tiefere Weichteilinfektionen oder auch invasive Infektionen auftreten. Wundinfektionen werden häufig durch Staphylokokken hervorgerufen. Invasive, durch Staphylokokken verursachte Infektionen sind die Sepsis, die septische Arthritis/Osteomyelitis und Organabszesse (8). Die toxischen Krankheitsbilder werden durch stammspezifische hochpathogene Toxine ausgelöst. Im Jahr 1932 beschrieben Pantan und Valentin, dass Infektionen mit Pantan Valentine Leukocidin (PVL) Toxin tragenden Staphylokokken besonders schwer verlaufen (10). Eine Metaanalyse konnte zeigen, dass Infektionen mit PVL positiven Staphylokokken zwar mit einem schwereren Verlauf von Haut- und Weichteilinfektionen assoziiert sind, die Prognose invasiver Infektionen durch das Vorhandensein des Toxins jedoch nicht beeinflusst wird (11). Die Übertragung von Staphylokokken erfolgt über Schmierinfektionen sowie häufig vom Krankenhauspersonal auf die Patienten. *S. aureus* stellt den häufigsten Erreger nosokomialer Infektionen dar. Bei vielen nosokomial erworbenen Erregern handelt es sich um Methicillin resistente *S. aureus* (MRSA) Stämme, welche nur noch mit Reserveantibiotika behandelt werden können (8). Entgegen großer Bemühungen ist es bisher noch nicht gelungen, einen wirksamen Staphylokokkenimpfstoff herzustellen (12).

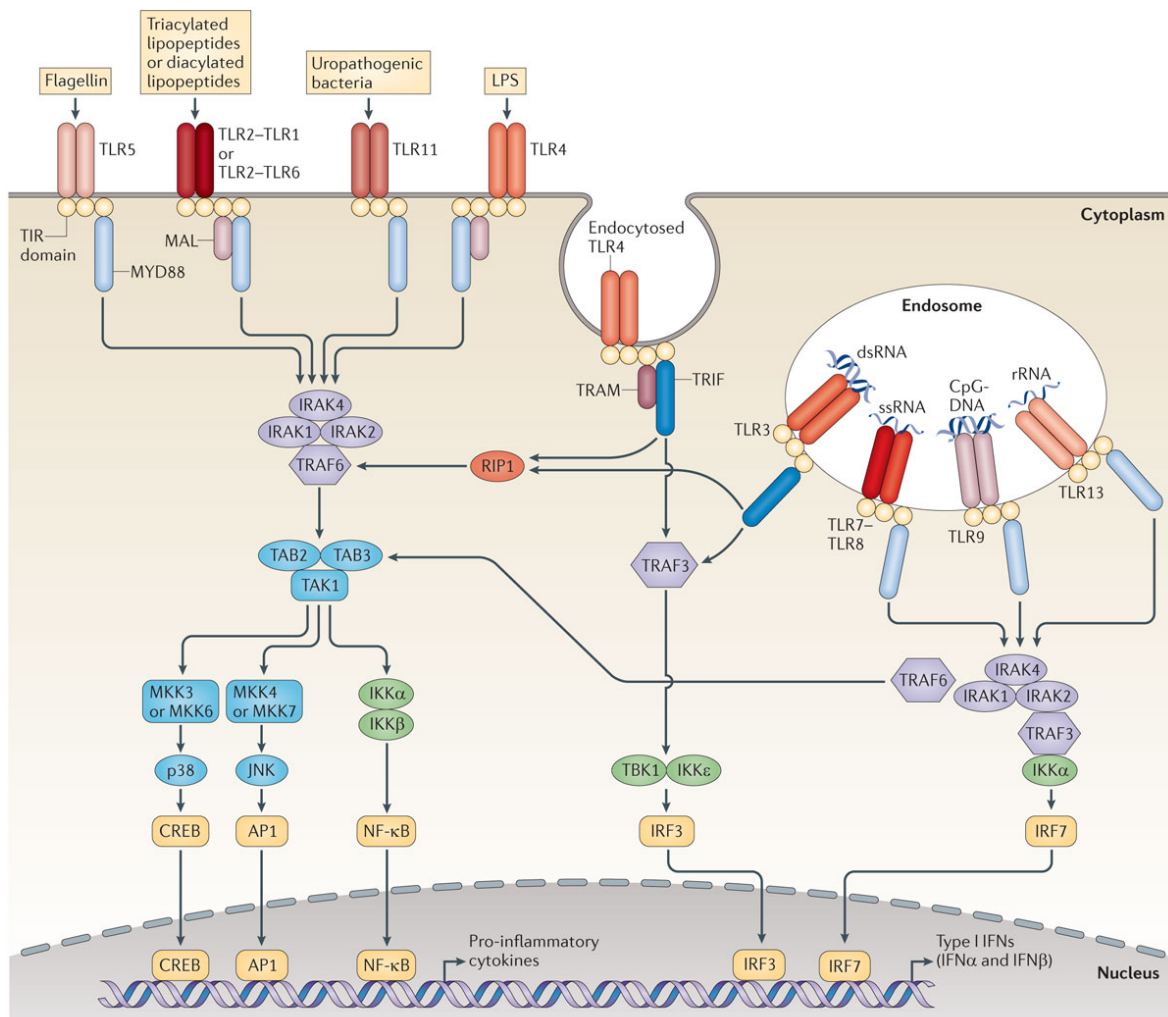
2.1.3. Infektionen durch *S. pneumoniae* und *S. aureus*

Über die Hälfte aller Kinder und Jugendlichen ist im oberen Respirationstrakt mit Staphylokokken und/oder Pneumokokken besiedelt. Die Besiedelung gesunder Kinder in den Niederlanden mit *S. pneumoniae* im Oropharynx lag 2004 vor Einführung der Impfung, bei ca. 19 % und mit *S. aureus* bei 36 %. Bei 6 % der Kinder konnten beide Erreger nachgewiesen werden (13). In einer Studie aus Atlanta fand sich bislang durch die heptavalente Impfung kein signifikanter Rückgang der Kolonisation mit *S. pneumoniae* (14). Trotz der weiten Verbreitung dieser Bakterien erkrankten jedoch nur wenige Kinder an invasiven Infektionen, verursacht durch *S. aureus* oder *S. pneumoniae*. In Deutschland werden diese Infektionen bei der Erhebungseinheit für seltene pädiatrische Erkrankungen in Deutschland (ESPED) erfasst. 2012 wurden der ESPED in dem Beobachtungszeitraum von einem Jahr 126 invasive Pneumokokkeninfektionen mitgeteilt (5). Es wird davon ausgegangen, dass nur ca. ein Drittel der invasiven Pneumokokkeninfektionen gemeldet werden (4). Durch die im Jahr 2006 erfolgte Einführung des heptavalenten proteinkonjugierten Impfstoffes konnte in Deutschland ein Rückgang der Inzidenz der invasiven Pneumokokkeninfektionen bei den unter Zweijährigen um ca. 50 % erreicht werden (15). Die Einführung des 10- und des 13-valenten Impfstoffes konnte zu keiner weiteren Reduktion der invasiven Pneumokokkeninfektionen führen. Es fand sich jedoch ein Wechsel zu invasiven Infektionen mit Serotypen, die nicht in der 13-valenten Impfung enthalten sind (16). Im europäischen Vergleich ist die Inzidenz von invasiven Pneumokokkeninfektionen in Deutschland eher gering. Weltweit gesehen stellen diese jedoch eine der Hauptursachen für Morbidität und Mortalität im Kindesalter dar (17). Die Letalität liegt auch in Deutschland immer noch bei ca. 10 % (3). Im Jahr 2011 verzeichnete die ESPED 145 Meldungen von invasiven Staphylokokkeninfektionen (18). In der Literatur finden sich kaum epidemiologische Daten zu invasiven Staphylokokkeninfektionen bei Kindern in Europa. 2011 wurde der ESPED kein Todesfall aufgrund einer invasiven Staphylokokkeninfektion gemeldet. In 17 % der Fälle blieben jedoch Residuen zurück (18). Aktuell werden invasive Staphylokokkeninfektionen von der ESPED nicht mehr erfasst.

2.1.4. Abwehr von *S. aureus* und *S. pneumoniae*

Pneumokokken und Staphylokokken gehören zu den extrazellulären Erregern und werden durch Phagozytose abgetötet. Die Phagozytose wird durch ein Zusammenwirken von Antikörpern und Komplementfaktoren gefördert (1, 8). Nach dem Überwinden der Haut- oder der Schleimhautbarriere werden die Phagozyten über so genannte Pattern Recognition Rezeptoren (PRR) aktiviert. Zu diesen Rezeptoren zählen unter anderem TLRs, Nod like Rezeptoren (NLRs) und RIG-I-like Rezeptoren (RLRs). Diese Rezeptoren erkennen sogenannte Pathogen associated molecular patterns (PAMPs), bakterielle Virulenzfaktoren und endogene Moleküle, die bei der Gewebeschädigung freigesetzt werden (19, 20). Die Stimulation der Rezeptoren führt über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, wie NFκB, zur Synthese von den proinflammatorischen Zytokinen IL-1β, IL-6, IL-8, IL-12 und TNF-α. Diese proinflammatorische Antwort induziert eine Aktivierung des Endothels, erhöht die vaskuläre Permeabilität und fördert die Chemotaxis. Hierdurch werden weitere Phagozyten aktiviert, die dann in das Gewebe eindringen können. Dort können die Phagozyten die Bakterien, die zuvor durch Antikörper und Komplementfaktoren opsonisiert wurden, in das Zellinnere aufnehmen und durch die Sauerstoffburstreaktion abtöten (19-21). Aus der Analyse der primären Immundefekte, die eine Suszeptibilität für invasive Staphylokokkeninfektionen aufweisen, kann man schließen, dass für die Staphylokokkenabwehr besonders die Phagozytenaktivierung mit Eindringen in das Gewebe sowie die Sauerstoffburstreaktion relevant sind (21). Die Analyse von Patienten mit primären Immundefekten und Prädisposition zu invasiven Pneumokokkeninfektionen hat ergeben, dass es bei der Pneumokokkenabwehr besonders auf die Opsonisierung durch IgG2, einem Antikörper gegen die Polysaccharidkapsel und Komplementfaktoren ankommt (22). Bei der Abwehr von Pneumokokken spielt außerdem die Milz eine große Rolle für die Beseitigung von durch Komplementfaktoren opsonisierter Pneumokokken und als Ort für die T-Zell-unabhängige Antikörperantwort auf Pneumokokken (22).

2.2. Signalwege und Schlüsselmoleküle der „innate immunity“ bei der Abwehr von *S. aureus* und *S. pneumoniae*



Nature Reviews | Immunology

Abbildung 1: TL-Rezeptorsignalwege

Darstellung der Signaltransduktion nach Aktivierung der TLRs (23).

2.2.1. TL- und IL-1-Rezeptor-abhängige Signalwege

TLRs sind für die frühe Immunantwort, besonders gegen bestimmte Erreger, überlebensnotwendig. Sie werden auf einer Vielzahl von Zellen exprimiert und erkennen viele verschiedene mikrobielle Bestandteile (24). Das Toll Gen wurde ursprünglich in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entdeckt. 1991 konnte gezeigt werden, dass die menschliche zytoplasmatische Domäne der IL-1-Rezeptoren eine große Übereinstimmung mit der zytoplasmatischen Domäne der Toll-Rezeptoren von

Drosophila aufweist. Daher stammt die Bezeichnung Toll-like-Interleukin-1-Rezeptor (TIR)-Domäne (25). Dies führte zur Entdeckung und funktionellen Beschreibung der menschlichen TLRs (26). Bisher sind zehn verschiedene menschliche TLRs und zehn unterschiedliche IL-1-Rezeptoren bekannt (24, 27). TLR1, 2, 4, 5, 6 und 10 befinden sich auf der Zelloberfläche, während TLR3, 7, 8 und 9 im Endosom lokalisiert sind. TLR1/2 und TLR2/6 bilden funktionelle Heterodimere, während TLR4 und TLR5 als Homodimere aktiv sind. TLR2 in Verbindung mit TLR1 oder TLR6 sind für die Erkennung von bakteriellen Lipoproteinen und Lipopeptiden (u.a. Pam₂CSK₄) verantwortlich. Der Agonist für TLR4 ist das bakterielle LPS, TLR5 erkennt bakterielles Flagellin. Bekannte Agonisten für die endosomal lokalisierten TLRs sind für TLR3 Doppelstrang DNA und Einzelstrang RNA für TLR7 und TLR8 sowie CpG für TLR9 (24, 27). Die agonistische Stimulation der IL-1-Rezeptoren erfolgt durch die Zytokine IL-1 α , IL-1 β , IL-18, IL-33, IL-36 α , IL-36 β und IL-36 γ (28). Beide Signalwege dienen der Immunabwehr im frühen Entzündungsgeschehen (24). Die zytosolische TIR Domäne der TLRs und IL-1-Rs kann an die TIR-Domäne von fünf verschiedenen Adaptormolekülen, MyD88, TIR-domain-containing adaptor-inducing interferon- β (TRIF), TIR domain containing adaptor (TIRAP), TRIF-related adaptor molecule (TRAM) und Sterile alpha- and armadillo-motif-containing protein (SARM), binden, wobei die Bindung verschiedener Adaptormoleküle an bestimmte TLRs und IL-1Rs zur Spezifität des übertragenen Signals beiträgt (29, 30). Es wird zwischen den MyD88-abhängigen und den TRIF-abhängigen Signalwegen unterschieden (29). MyD88 dient als Adaptorprotein für alle TLRs (außer für TLR3) und für die IL-1-, IL-18- IL-33- und IL-36-Rezeptoren. TIRAP rekrutiert MyD88 zu TLR2 und TLR4. Der alternative Signalweg führt über TLR3 und teilweise auch über TLR4. Hier wird TRIF als Adaptorprotein verwendet. TRAM dient hier als Koadaptor. SARM ist ein Negativregulator für TRIF (29, 30). Die Adaptoren rekrutieren anschließend zytosolische Kinasen. Die TIR spezifischen Kinasen gehören zum IRAK-Komplex (31). Der IRAK-Komplex besteht aus vier Untereinheiten, den katalytisch aktiven Untereinheiten IRAK1 und IRAK4 sowie den zwei Untereinheiten IRAK2 und IRAK3 ohne katalytische Aktivität (31). Der klassische Signalweg führt zunächst zur Bildung eines MyDDosomes bestehend aus MyD88, IRAK2 und IRAK4 und letztlich zur Aktivierung von NF κ B über den IKK-Komplex oder über die Mitogen aktivierte Proteinkinase (MAPK) (31). Der alternative Weg aktiviert Transkriptionsfaktoren aus der IRF-Gruppe, durch diese wird die Synthese von IFN- α / β gesteigert (24). Die Aktivierung des MyD88-und IRAK4-abhängigen Signalweges führt

über NF κ B zur Synthese von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF- α (24, 32).

2.2.2. TNF- α -Rezeptor-abhängige Signalwege

Ein weiterer wichtiger Signalweg für die initiale Abwehr von bestimmten Erregern wird durch TNF- α -Rezeptoren kontrolliert (33). TNF- α gehört zur TNF-Superfamilie. Bisher konnten der Superfamilie 19 Liganden und 29 Rezeptoren zugeordnet werden. Die Gruppe der Liganden und Rezeptoren ist jedoch sehr heterogen, ihre Funktion variiert sehr stark (33). Die TNF-Superfamilie hat Einfluss auf Apoptose, Zellproliferation, Entzündungsgeschehen, Angiogenese, Metastasierung und Invasion der Zellen in das Gewebe (33). TNF- α ist das bekannteste Mitglied dieser Superfamilie und wurde als erstes entdeckt. Carswell et al. konnten 1975 zeigen, dass durch Endotoxine, z.B. bei einer mit *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) infizierten Maus, ein Faktor ins Serum ausgeschüttet wird, der eine Tumornekrose hervorruft. Hier wurde der Name Tumornekrose-Faktor- α geprägt (34). 1985 gelang es Aggarwal et al. TNF- α zu isolieren und zu charakterisieren. Sie konnten zeigen, dass TNF- α hauptsächlich von Makrophagen produziert wird (35). TNF- α weist eine hohe Affinität zu den an der Zellmembran befindlichen Tumornekrose-Faktor-Rezeptoren 1 und 2 (TNFR1 u. 2) auf. TNFR1 ist ubiquitär exprimiert. TNFR2 befindet sich auf immunologischen und endothelialen Zellen sowie auf Nervenzellen (33). Über die Rezeptoren werden zwei gegensätzliche Signale vermittelt. Die Signalkaskade, die der Aktivierung von TNFR1 folgt, kann durch die Aktivierung der Caspase 3 zur Apoptose führen. Alternativ können aber auch NF κ B und Aktivator Protein 1 (AP1) aktiviert werden. Diese Transkriptionsfaktoren regulieren die Proteinexpression und damit das Überleben der Zellen und deren Proliferation. In Zellen des Immunsystems, aber auch in Fibroblasten kontrollieren TNFR1-abhängige Signalwege die Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-8, IL-18 und TNF- α , aber auch von IL-10 (33).

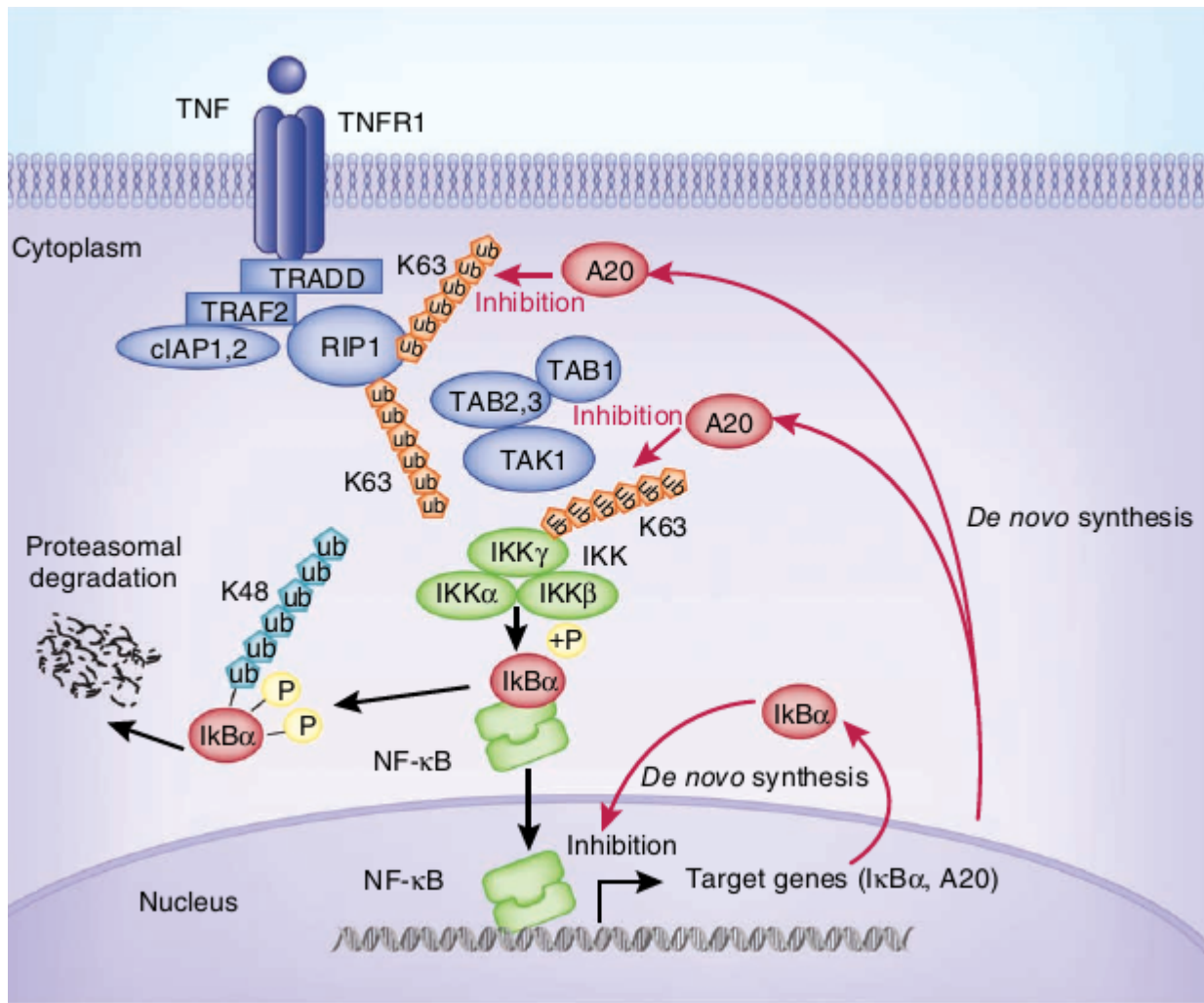


Abbildung 2: TNF-Rezeptorsignale

Darstellung der Signaltransduktion nach der Aktivierung eines TNF-Rezeptors (36).

2.2.3. NFκB-abhängige Signalwege

Die wichtigsten Signale der Toll-like-, IL-1- und TNF- α -Rezeptoren werden über den Transkriptionsfaktor NFκB vermittelt (24, 33). NFκB wurde 1986 von Ranjan Sen aus der Arbeitsgruppe von David Baltimore entdeckt (37). Der Transkriptionsfaktor spielt in vielen immunologischen Signalwegen eine wichtige Rolle. Hierzu zählen neben den oben genannten Signalwegen auch der B-Zell- und der T-Zell-Rezeptor-Signalweg. NFκB ist ebenfalls für die normale Entwicklung von Ektoderm, Knochen und dem lymphatischen Gewebe essentiell. Diese Signale werden über die Ektodermale Dysplasie mit Anhidrose (EDA)-, Rezeptor Aktivator von NFκB (RANK)- und Vaskulärer Endothelialer Growth Faktor (VEGF)3-Rezeptoren vermittelt (38). NFκB besteht aus den fünf verschiedenen Molekülen p65 (RelA), c-Rel, RelB, p50/p105 (NFκB1) und

p52/p100 (NF κ B2), die stets in Homo- oder Heterodimeren vorliegen. Das klassische NF κ B Heterodimer (p65/p50) dominiert und spielt eine entscheidende Rolle für die Spezifität der Signalübertragung über die Toll-like Rezeptoren (38). Sankar Ghosh konnte 1990 erstmals beschreiben, dass NF κ B in der ruhenden Zelle von I κ B Proteinen im Zytoplasma gebunden wird (39). Die klassischen I κ Bs sind I κ B α , I κ B β und I κ B ϵ (39). Die Stimulation der Zelle, beispielsweise mit LPS, führt zur Aktivierung des Inhibitors von NF κ B Kinase(IKK)-Komplexes. Die Phosphorylierung und der Abbau von I κ B α führt dann zur Translokation von NF κ B in den Zellkern (40). Dort bindet NF κ B an die DNA und initiiert die Transkription von Zytokinen, wie z.B. TNF- α , IL-1, IL-6, IL-10 und IL-12 (38). I κ B α wird schnell wieder aufgebaut und ist dann in der Lage, in den Zellkern zu gelangen, dort wiederum an NF κ B zu binden und die Dissoziation von NF κ B von der DNA hervorzurufen. I κ B α stellt somit den wichtigsten negativen Feedbackmechanismus für NF κ B dar (40). Die hier aufgezeigte Signalkaskade wird als kanonischer NF κ B Signalweg beschrieben. Der nicht kanonische NF κ B Signalweg ist nicht von I κ B Proteinen abhängig. Stattdessen führt die durch einen Komplex aus NF κ B induzierende Kinase (NIK) und IKK α induzierte Prozessierung von p100 zu einer Aktivierung des Related B (RelB/p52) NF κ B-Komplexes. Der nicht kanonische NF κ B Signalweg spielt eine wichtige Rolle bei der lymphatischen Organogenese, der Aktivierung von dendritischen Zellen, der Reifung und dem Überleben von B-Zellen sowie dem Knochenmetabolismus (41).

2.2.4. NEMO

1997 wurde erstmals von DiDonato et al. beschrieben, dass I κ Bs durch den IKK Komplex phosphoryliert werden (42). Der IKK Komplex besteht aus drei Untereinheiten: IKK1 (IKK α), IKK2 (IKK β) und NEMO (IKK γ) (43). Die häufigste Form des IKK-Komplexes bildet sich aus zwei Dimeren, einem Heterodimer aus IKK α und IKK β sowie einem Homodimer aus zwei NEMO Molekülen (43). IKK α und IKK β besitzen eine Kinasedomäne, welche durch Phosphorylierung aktiviert wird. NEMO bildet die regulatorische Untereinheit dieses Komplexes, indem es als Gerüstprotein ohne katalytische Funktion („Scaffoldprotein“) den Proteinen mit katalytischer Funktion eine Plattform bietet, sich zu gruppieren. Ohne NEMO ist keine Aktivierung von NF κ B möglich (43-45). Das *NEMO*-Gen befindet sich auf dem Chromosom Xq28. Es besteht aus neun kodierenden und vier nicht kodierenden, exklusiv und alternativ gesplizten

Exonen (1A, 1B, 1C und 1D) (46-48). Die nicht kodierenden Exone befinden sich am 5' Ende und werden zellspezifisch alternativ exprimiert. 1B wird ubiquitär exprimiert, während 1A nur in Lymphozyten und der Milz gefunden werden kann. Die Expression von 1C ist sehr schwach in Hoden und Lymphozyten nachweisbar. 1D kommt ausschließlich in Leberzellen vor. Diese nicht translatierten Exone liegen in einer der Promoterregionen (47, 48). Bisher ist jedoch nicht klar, welche Funktion diese Exone und ihre exklusiv alternativ gespligte RNA erfüllen.

2.2.5. MAP Kinasen

MAP Kinasen stellen weitere wichtige Proteine im Signalweg der Toll-like-, IL-1- und TNF- α -Rezeptoren dar (49). Ihre Aufgaben sind neben der Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen die Regulation der Genexpression, der Mitose, des Zellmetabolismus, des Zellüberlebens, der Apoptose und der Differenzierung (49). Die drei wichtigsten und am besten erforschten klassischen MAP Kinasen sind die p38 Isoformen (α , β , γ und δ), die c-Jun amino (N)-terminal Kinasen 1/2/3 (JNK 1/2/3) und die extrazellulär signal-regulierten Kinasen 1/2 (ERK1/2) (50-53). Jede Gruppe der MAP Kinasen besteht aus drei Kinasen, die einander sequentiell aktivieren. Die erste Kinase wird hauptsächlich durch TRAF Proteine rekrutiert, ERK 1/2 vermittelt Wachstumsprozesse, die durch Wachstumsfaktoren stimuliert werden. Dies geschieht durch Beeinflussung des Zellzyklus. P38 α und JNK1/2 werden durch Stress und inflammatorische Zytokine wie LPS, TNF- α und IL-1 β aktiviert. Die Mechanismen, die nach der Stimulation zu einer proinflammatorischen Antwort führen, sind dabei vielfältig. MAP Kinasen phosphorylieren viele zytosolische und nukleäre Substrate. Die proinflammatorischen Effekte von p38 α werden teilweise über NF κ B vermittelt. Diese Mechanismen führen dann zu einer Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α (49).

2.3. Primäre Immundefekte mit Prädisposition zu invasiven Staphylokokken- und Pneumokokkeninfektionen

2.3.1. Überblick: Primäre Immundefekte mit Prädisposition zu invasiven Staphylokokken- und Pneumokokkeninfektionen

Invasive Pneumokokkeninfektionen werden bisher meistens als idiopathisch betrachtet (54). Aktuelle Daten zeigen jedoch, dass bei 10 % der Kinder mit invasiven Pneumokokkeninfektionen ein zugrunde liegender Immundefekt gefunden werden kann (55). Die häufigsten Immundefekte, die zu Staphylokokkeninfektionen führen, sind Störungen der Granulozyten (21). Es kann zwischen quantitativen und qualitativen Granulozytendefekten unterschieden werden. Beispiele für quantitative Granulozytendefekte sind angeborene permanente und zyklische schwere Neutropenien (56-60). Qualitative Granulozytenfunktionsstörungen betreffen die verschiedenen funktionellen Schritte der Staphylokokkenabwehr durch Granulozyten. Bei Leukozytenadhäsionsdefekten (LAD) I-III sind die Zellen nicht in der Lage, in das befallene Gewebe einzudringen (61, 62). Störungen der Sauerstoffburstreaktion bei septischer Granulomatose, eingeschränkte Proteasenfunktion bei dem Papillon-Lefèvre-Syndrom, Störungen der Degranulation antibakterieller Peptide bei dem Chediak-Higashi-Syndrom und die Defizienz der spezifischen Granula verhindern das intrazelluläre Abtöten der Bakterien (21, 63-65). Bei dem autosomal dominanten Hyper IgE Syndrom sowie bei Immundefekten der Signaltransduktion der TL-, IL-1- und TNF- α -Rezeptoren ist die Phagozytenaktivierung eingeschränkt (21, 24, 66-69). Zwei autosomal rezessive Hyper IgE Syndrome zeichnen sich neben der Anfälligkeit für Staphylokokkeninfektionen auch durch eine erhöhte Anfälligkeit für Virusinfektionen, insbesondere für Warzen der Haut aus (69-73).

Immundefekte, die mit einer erhöhten Suszeptibilität für Pneumokokkeninfektionen einhergehen, betreffen verschiedene Elemente des Immunsystems. Hier stehen besonders Opsonierungsdefekte oder Defekte mit verminderter Clearance opsonisierter Bakterien aus dem Blut im Vordergrund. Diese können durch Komplementdefekte, Antikörpermangelsyndrome oder eine Asplenie verursacht sein (55). Analog zu den Staphylokokken können die Defekte der TL-, IL-1- und TNF- α -Rezeptorsignalwege auch zu invasiven Pneumokokkeninfektionen prädisponieren (32, 54, 55). Die fehlende oder verminderte Produktion der proinflammatorischen Zytokine

führt zu einer eingeschränkten Chemotaxis der zur weiteren Abwehr benötigten Phagozyten an dem Ort der Entzündung (62).

2.3.2. Diagnostik auf Immundefekte bei invasiven Infektionen durch *S. pneumoniae* und *S. aureus*

2.3.2.1. Diagnostik auf Immundefekte bei invasiven Infektionen durch *S. aureus*

Bei Staphylokokkeninfektionen sollte zuerst eine Granulozytopenie, bei Pneumokokkeninfektionen ein Mangel an IgG oder IgM ausgeschlossen werden (74). Anschließend folgt bei Staphylokokkeninfektionen die funktionelle Untersuchung der Granulozyten (21, 74). Die septische Granulomatose kann durch eine durchflusszytometrische Messung von H₂O₂ in Leukozyten nach der Stimulation mit PMA, den sog. Dihydrorhodamin (DHR)-Test, diagnostiziert werden (75). Die Diagnose eines Papillon-Lefèvre-Syndroms wird mithilfe der klinischen Konstellation und der genetischen Analyse gestellt (21). Bei dem am häufigsten vorkommenden Leukozytenadhäsionsdefekt LAD I zeigt sich meist eine Leukozytose. Die Diagnose des LAD I kann durch die fehlende, durchflusszytometrisch gemessene Expression von CD11 und CD18 bestätigt werden (21, 62). Die Verdachtsdiagnose eines autosomal dominanten Hyper IgE Syndroms wird mithilfe eines aus klinischen und laborchemischen Parametern bestehenden Scores gestellt, eine Verminderung von TH17-Zellen kann als weiterer Hinweis dienen. Die Diagnose sollte durch den Nachweis einer Mutation in *STAT3* molekulargenetisch bestätigt werden (76). Durch sorgfältige mikroskopische Inspektion der neutrophilen Granulozyten kann ein Defekt der Neutrophilengranula, wie beim Chediak-Higashi-Syndrom oder beim Defekt der spezifischen Granula erkannt werden (77).

2.3.2.2. Diagnostik auf Immundefekte bei invasiven Infektionen durch *S. pneumoniae*

Bei invasiven Pneumokokkeninfektionen sollten neben der Basisdiagnostik besonders die Impfantikörper gegen recall-Antigene und Polysaccharidantigene geprüft werden. Ein humoraler Immundefekt ist bei normalen IgM-, IgG-Spiegeln und normalen

Antikörpertitern gegen recall-Antigene und gegen Polysacharidantigene unwahrscheinlich (74). Die funktionelle Untersuchung des klassischen Komplementsignalweges erfolgt durch den CH50-Test. Die Aktivität des alternativen Komplementsignalweges kann mithilfe des AP50-Tests untersucht werden (78). Eine Asplenie wird sonographisch und/oder durch das Vorliegen von Howel-Jolly bodies in Erythrozyten nachgewiesen (54, 55). Bleiben diese Tests ohne pathologischen Befund und existieren weitere Hinweise für einen Immundefekt, wie z.B. ein verspäteter Nabelschnurabfall oder eine abgeschwächte Akut-Phase-Reaktion, sollte ein Defekt der „innate immunity“ in Betracht gezogen werden. Wie oben beschrieben, prädisponieren Defekte in der Signaltransduktion der Toll-like-, IL-1- und TNF- α -Rezeptoren zu invasiven Infektionen mit diesen Erregern. Zur Diagnostik wird eine *in vitro*-Stimulation von Vollblut mit den Agonisten der Toll-like-Rezeptoren, IL-1 β und TNF- α durchgeführt (32, 79). Bei einer Untersuchung von 163 Kindern mit invasiven Pneumokokkeninfektionen in Frankreich konnte mit der hier beschriebenen Diagnostik bei 10 % der Kinder ein zugrunde liegender Immundefekt identifiziert werden (55).

2.3.2.1. Primäre Immundefekte in den TL-, IL-1- und TNF- α -Rezeptor-abhängigen Signalwegen.

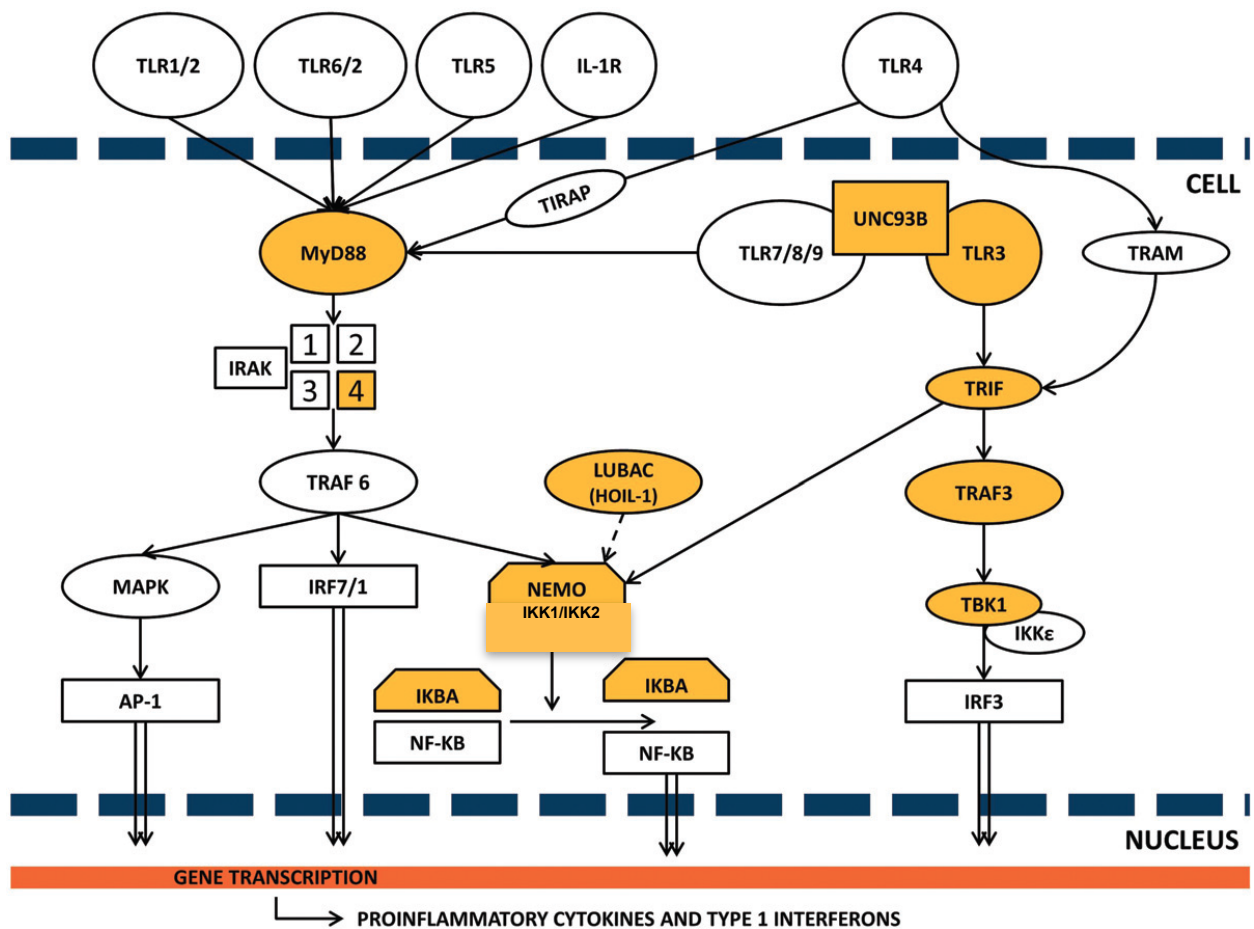


Abbildung 3: Immundefekte in den TL-, IL-1- und TNF- α -Rezeptor-abhängigen Signalwegen

Darstellung der Signalwege der Toll-like- und IL-1-Rezeptoren. Für die gelb markierten Proteine konnten bereits Immundefekte beschrieben werden (79).

Bisher konnten elf Immundefekte molekulargenetisch beschrieben werden, welche die Signalübertragung über den kanonischen NF κ B-Signalweg, über die Toll-like-, IL-1- und TNF- α -Rezeptoren beeinträchtigen (79, **Abb. 3**). Immundefekte in Genen, die für die Signalkaskade des intrazellulär gelegenen TLR3 kodieren, führen über eine eingeschränkte Signalübertragung des TRIF-abhängigen Signalweges zu dem klinischen Phänotyp der invasiven Herpes Simplex Infektionen. Hier konnten bisher Mutationen in den Genen *TLR3*, *UNC93B*, *TRIF*, *TRAF3* und *TBK1* beschrieben werden (80-84). Die autosomal rezessiv vererbten IRAK4- und MyD88-Defekte führen zu einer eingeschränkten Signaltransduktion über den MyD88-abhängigen Signalweg aller TLRs, bis auf TLR3 (85-87). Der klinische Phänotyp dieser Immundefekte besteht in invasiven

bakteriellen Infektionen (87). Der x-chromosomal rezessiv vererbte NEMO- und der autosomal dominant vererbte I κ B α -Defekt betreffen hingegen die Signalübertragung über den MyD88-abhängigen Signalweg und über TLR3. Sie bedingen daher eine breite Anfälligkeit gegenüber bakteriellen und viralen Infektionen (88, 89). Kürzlich wurden außerdem der LUBAC(HOIL1)-Defekt sowie der IKK2-Defekt beschrieben, die einen sehr breiten klinischen Phänotyp aufweisen, bei denen es aber ebenfalls zu invasiven bakteriellen Infektionen kommt (90, 91). Im Folgenden werden ausschließlich die Immundefekte näher beschrieben, welche zu invasiven bakteriellen Infektionen führen.

2.3.2.1.1. Autosomal rezessiv vererbte MyD88- und IRAK4-Defekte

Der autosomal rezessiv vererbte IRAK4-Defekt wurde 2003 von Picard et al. erstbeschrieben (85). Seitdem konnten über 50 Patienten aus mehr als 30 Familien in 14 Ländern identifiziert werden (32, 55, 85, 87, 92-117). Die Identifikation des autosomal rezessiv vererbten MyD88-Defekts erfolgte 2008 durch von Bernuth et al. (86). Bisher sind 25 Patienten aus sieben Familien, aus sechs Ländern mit einem MyD88-Defekt beschrieben worden (32, 55, 86, 87, 108, 118). Vollständige MyD88- und IRAK4-Defekte unterbrechen die Signaltransduktion fast aller TLRs und IL-1Rs. Lediglich die Signaltransduktion über TLR3 und teilweise die über TLR4 kann unabhängig vom Komplex aus MyD88 und IRAK4 erfolgen. Leukozyten von MyD88- oder IRAK4-defizienten Patienten reagieren nur mit einer sehr eingeschränkten IL-6 Produktion auf die Stimulation der Zellen mit Agonisten der Toll-like-Rezeptoren und IL-1 β (32, 87). Interessanterweise leiden die Patienten nur an einer selektiven Anfälligkeit für bakterielle invasive Infektionen (vor allem *P. aeruginosa*, *S. aureus* und *S. pneumoniae*) und bakterielle Hautinfektionen (*S. aureus*) (32, 55, 85-87, 92-118). Dies könnte an der eingeschränkten T-Zell unabhängigen IgM Produktion, welche unter anderem für die Abwehr von bakteriellen Antigenen verantwortlich ist, liegen (113). Die invasive Pneumokokkeninfektion wurde als die häufigste Infektion bei 68 % der Patienten beschrieben (87). Sowohl der immunologische als auch der infektiologisch-klinische Phänotyp dieser beiden Immundefekte ist identisch. Es konnten bisher keine schweren Infektionen mit Viren, Parasiten oder Pilzen festgestellt werden (32, 87). Die fehlenden Virusinfektionen lassen sich durch die vorhandene TLR3 vermittelte Immunantwort erklären (119). Die Patienten sind besonders im Säuglingsalter und in der frühen Kindheit durch fulminant verlaufende invasive bakterielle Infektion bei

abgeschwächten oder verzögerten Akut-Phase Antworten gefährdet. Picard et al. beschreiben, dass in ihrer Kohorte 18 von 46 IRAK4-defizienten Patienten und sechs von zwölf MyD88-defizienten Patienten an invasiven bakteriellen Infektionen verstorben sind. Die Patienten sind alle bis zu einem Alter von acht Jahren verstorben. Die führende Todesursache stellte bei 16 von 24 Patienten eine invasive Pneumokokkeninfektionen dar (32, 87). Für diese Patienten werden daher ab der Diagnosestellung eine antibiotische Prophylaxetherapie sowie die Substitution von Immunglobulinen empfohlen (32, 112). Die Prognose der Patienten verbessert sich mit dem Alter deutlich; invasive bakterielle Infektionen jenseits des achten Lebensjahres und Todesfälle jenseits des 14. Lebensjahres sind bisher nicht beschrieben worden (87).

2.3.2.1.2. X-chromosomal rezessiv vererbter NEMO- und autosomal dominant vererbter I κ B α -Defekt

Der erste Patient mit NEMO-Defekt wurde 2000 von Smahi et al. beschrieben (46). Dieser x-chromosomal dominant vererbte NEMO-Defekt ist die Ursache für das Krankheitsbild der Incontinentia pigmenti. Bei Jungen ist diese Erkrankung schon in utero lethal, da eine vollständig fehlende NEMO Expression mit dem Leben nicht vereinbar ist. Bei Mädchen ist die Ausprägung der Erkrankung vom Maß der X-Inaktivierung abhängig und betrifft Haut, Haare, Nägel, Zähne, Augen und das zentrale Nervensystem (46). Derselben Arbeitsgruppe gelang 2001 die Erstbeschreibung des Syndroms der Ektodermalen Dysplasie mit Anhidrose und Immundefekt (EDA-ID) (88). Diese Erkrankung kann entweder durch eine x-chromosomal rezessive Mutation im *NEMO*-Gen (XR-EDA-ID) oder durch eine autosomal dominante Mutation im *IKBA*-Gen (AD-EDA-ID) verursacht sein (89, 120, 121). Diese Mutationen führen nach Stimulation der Toll-like-, IL-1- und TNF- α -Rezeptoren zu einer verminderten Translokation von NF κ B in den Zellkern. Die proinflammatorische Antwort der Zelle wird abgeschwächt. Bisher konnten weltweit über 100 männliche Patienten mit hypomorphen *NEMO*-Mutationen identifiziert werden (32, 54, 55, 88, 99, 120-122). Bei einigen Mutationen kommt es auch zur Entwicklung von Osteopetrosis und Lymphödemen (OL-EDA-ID) (32, 88, 121, 122). 2004 wurde erstmalig ein NEMO-defizienter Patient beschrieben, der isoliert an einem Immundefekt litt und bei dem keine ektodermale Dysplasie vorlag (120). 2003 konnte der autosomal dominant vererbte *IKBA*-Defekt beschrieben werden

(89). Das hierbei hypermorph exprimierte I κ B α kann nicht phosphoryliert und abgebaut werden. NF κ B wird somit teilweise im Zytosol gehalten und kann nicht in den Zellkern translozieren (89). Bisher sind acht Patienten identifiziert worden (32, 89, 125, 126). Wie oben beschrieben, spielt NF κ B in vielen Signalwegen eine wichtige Rolle als Transkriptionsfaktor. NEMO- und I κ B α -defiziente Patienten weisen daher eine sehr viel breitere Infektanfälligkeit auf. Neben den Signalwegen der Toll-like-, IL-1- und TNF- α -Rezeptoren ist auch die Signalübertragung der adaptiven Immunantwort über T-Zell- und B-Zell-Rezeptoren beeinträchtigt. Die Patienten leiden hauptsächlich an invasiven bakteriellen Infektionen, aber auch Infektionen mit opportunistischen Erregern können auftreten. Einige Patienten beklagen Diarrhö und Kolitis (32). Die prädominierenden Erreger sind *S. pneumoniae*, *S. aureus* und *H. influenzae*, es kommen jedoch bei NEMO-defizienten Patienten auch Infektionen mit Mykobakterien oder Herpes Simplex Virus (HSV)1 vor (32). Für diese beiden Immundefekte wird eine prophylaktische antibiotische Therapie mit Cotrimoxazol und Penicillin V empfohlen. Bei erniedrigten Immunglobulinspiegeln kann es hilfreich sein, diese zu substituieren. Neben der erhöhten Anfälligkeit für schwere Infektionen weisen viele Patienten mit NEMO-Defekt auch autoinflammatorische und autoimmunologische Symptome auf (32, 127). Der einzige kurative Therapieansatz besteht in der allogenen Stammzelltransplantation (32). Die Ergebnisse der Transplantation sind jedoch sehr variabel, insbesondere da die Autoinflammation und Autoimmunität häufig nicht positiv beeinflusst werden können (32, 127, 128).

3. Hypothese und Fragestellung der Arbeit

Der in der Einleitung dargestellte Wissensstand zu invasiven Pneumokokken- und Staphylokokkeninfektionen im Kindesalter legt nahe, dass diese keine idiopathischen Infektionen sein müssen, sondern vielmehr Anzeichen eines angeborenen Immundefekts sein können (99). Für diese Hypothese sprechen, dass bis zu 50 % aller Kinder und Jugendlichen im oberen Respirationstrakt mit Staphylokokken und/oder Pneumokokken besiedelt sind, jedoch nur sehr wenige an invasiven Pneumokokken- oder Staphylokokkeninfektionen erkranken (4, 5, 13). Die Überprüfung dieser Hypothese ist von großer Bedeutung, da diese invasiven Infektionen besonders im Säuglings- und frühen Kindesalter lebensbedrohliche Erkrankungen darstellen (17). In Frankreich konnte bei 10 % der Kinder mit invasiven Pneumokokkeninfektionen, die zuvor als idiopathisch angesehen worden sind, ein primärer Immundefekt diagnostiziert werden (55). Um diese Hypothese in der hier vorgestellten Arbeit zu untersuchen, wurden Kinder mit invasiven Pneumokokken- und Staphylokokkeninfektionen aus Deutschland und teilweise aus dem Ausland rekrutiert. Die Kohorte wurde nach dem Ausschluss von bis dato bekannten Immundefekten im Besonderen auf Immundefekte im Bereich der Signaltransduktion der TL- IL-1- und TNF- α -Rezeptoren untersucht. Neben der Untersuchung mit den bereits gut bekannten Methoden der Messung der Zytokinproduktion mittels ELISA bestand ein weiteres Ziel dieser Arbeit darin, die Diagnostik von bereits bekannten Immundefekten in den oben beschriebenen Signalwegen zu verbessern.

Die bisher identifizierten Immundefekte im Bereich der Signaltransduktion der TL- IL-1- und TNF- α -Rezeptoren lassen vermuten, dass es weitere Immundefekte in den TIR-MyD88-IRAK4-NEMO-IKBA- und den TNFR-NEMO-IKBA-kontrollierten Signalwegen geben kann, die den klinischen Phänotyp der invasiven Pneumokokken- oder Staphylokokkeninfektionen hervorrufen (32, 85, 86, 88, 89). Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand darin zu zeigen, dass dem klinischen Phänotyp der invasiven Pneumokokken- und Staphylokokkeninfektionen auch bisher unbekannte Immundefekte, beispielsweise Mutationen der Gene *IRAK1*, *MALTIRAP* oder der einzelnen *TLRs*, zugrunde liegen können. Daraus leitet sich das Ziel der Erstbeschreibung eines neuen Immundefekts in den oben beschriebenen Signalwegen ab.

Die Hypothese, dass invasiven Pneumokokken- und Staphylokokkeninfektionen ein primärer Immundefekt zu Grunde liegen kann, wurde im Rahmen dieser Arbeit an einer Kohorte von 292 Kindern mit invasiven Staphylokokken- oder Pneumokokkeninfektionen untersucht. Im Vorfeld wurden bei allen Kindern die in der Einleitung erwähnten bekannten Immundefekte mit Prädisposition zu invasiven Pneumokokken- und Staphylokokkeninfektionen ausgeschlossen. Im zweiten Schritt erfolgte im Vollblut eine Untersuchung auf Immundefekte im Bereich der Signaltransduktion der Toll-like-, IL-1- und TNF- α -Rezeptoren durch Messung der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-10 mittels ELISA aus dem Überstand des zuvor mit IL-1 β , LPS, Pam₂CSK₄ und TNF- α stimulierten Blutes. Bei verminderter Zytokinproduktion im Vollblut erfolgte in Fibroblasten der Patienten die Untersuchung der TIR- und TNF- α -Rezeptor-abhängigen Signalwege durch IRAK1- und I κ B α -Abbau mittels Western Blots und durch EMSA für NF κ B. Nach der funktionellen Eingrenzung des Defekts in den Signalwegen erfolgte die Sequenzierung der entsprechenden Kandidatengene. Um die Diagnostik in Akutsituationen zu verbessern, erfolgte die Messung des Sheddings von CD62L auf Granulozyten nach Stimulation mit IL-1 β , LPS, Pam₂CSK₄ und TNF- α (110, 129) .

4. Patienten, Material und Methoden

4.1. Patientenkohorte

Im Rahmen des von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) und dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderten Projektes „Neue angeborene Immundefekte als Ursache für invasive Infektionen durch *S. pneumoniae* und *S. aureus* im Kindesalter“ werden seit 2008 an der Charité Berlin Kinder auf einen Immundefekt in den Signalwegen der Toll-like-, IL-1- und TNF- α -Rezeptoren untersucht. Die Einschlusskriterien sind das Alter von 0-18 Jahren und eine invasive Infektion mit dem Nachweis von Pneumokokken oder Staphylokokken. Des Weiteren werden andere Ursachen, die zu einer invasiven Infektion mit diesen Erregern führen können, ausgeschlossen. Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurden die Daten der Patienten, die in dem Zeitraum vom 01. März 2008 bis zum 31. Dezember 2012 an der Studie teilgenommen haben, analysiert. Die Auswertung der klinischen Daten erfolgte anhand von mitgesandten Epikrisen und klinischen Angaben durch den betreuenden Kinderarzt.

4.2. Material

4.2.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 1: Geräte und Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller	Katalognummer
Alphaimager	Biozym, Oldendorf	4912
Biofuge pico	Heraeus Thermo Scientific, Ulm	75003235
Brutschrank	Thermo Electron Scientific, Ulm	Hera Cell 150
ELISA Reader Fluostar	BMG Labtech, Ortenberg	
FACS Canto II	Becton Dickinson, Heidelberg	
Gel Elektrophoresekammer	PeqLab, Erlangen	40-1515
Isopropanoleinfrierbehälter	Nalgene SIGMA Aldrich, Deisenhofen	5100-0001
Maxi Gel Kammer	Biometra, Göttingen	10-400
Mini Gel Kammer	BioRad, München	165-8004
Multiporator	Eppendorf, Hamburg	4308000015
Nano Drop ND-1000	PeqLab, Erlangen	91-ND-1000
Semi Dry Blotkammer	BioRad, München	170-3940
Sicherheitswerkbank	NuAire Integra Bioscience, Fernwald	NU-437
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg	5.355.000.011

UV Lampe	Kisker, Steinfurt	L020-C
Versadoc Imaging System	BioRad, München	1708010
Wasserbad	GFL, Burgwedel	340-1005
Zentrifuge	Thermo Scientific, Ulm	Heraeus Megafuge
Zentrifuge	Thermo Scientific, Ulm	Sigma 3K15
10 ml Serologische Pipette	Becton Dickinson, Heidelberg	357551
10cm Zellkultur Schalen	Becton Dickinson, Heidelberg	353003
15 ml Falcon Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg	352096
5 ml Serologische Pipette	Becton Dickinson, Heidelberg	357453
50 ml Falcon Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg	352070
6 well Platte	NUNC, Wiesbaden	140675
96 well ELISA Platte	NUNC, Wiesbaden	475094
Eppis 1,5mL	Eppendorf, Hamburg	30 125.150
Kryoröhrchen	NUNC, Wiesbaden	377267
Küvette	Eppendorf, Hamburg	4307-000-623
Nitrocellulose Membran 0,45µm	GE Healthcare Whatman, Dassel	10401196
Nylon Membran EMSA	GE Healthcare, Dassel	RPN303B
T25 Zellekulturflasche	NUNC, Wiesbaden	156367
T75 Zellkulturflasche	Becton Dickinson, Heidelberg	353133
Whatman Paper	Roth, Karlsruhe	10426994
Zellschaber	Becton Dickinson, Heidelberg	353085

4.2.2. Chemikalien

Tabelle 2: Chemikalien

Name	Hersteller	Katalognummer
Acrylmaid	BioRad, München	161-0156
Agarose	Biozym, Oldendorf	840004
APS	Merck, Darmstadt	101.201
Boric Acid	SIGMA, Deisenhofen	B6768
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt	1081220005
DNA Marker	Fermentas, Mannheim	SM0313
DMSO	SIGMA, Deisenhofen	D2650
dNTP Mix	Invitrogen, Darmstadt	18427-013
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
Ethidiumbromid	SIGMA, Deisenhofen	E1515-10mL
First Strand Buffer	Invitrogen, Darmstadt	P/N y02321
Glycerol	Roth, Karlsruhe	3783.1
Glycin	AppliChem, Karlsruhe	A1067.1000
Go Taq Polymerase+ Buffer	Promega, Mannheim	M8301
Hepes	AppliChem, Karlsruhe	A3724.0100
Isopropanol	Dr. K Hollborn und Söhne, Leipzig	100

KCL	Merck, Darmstadt	1.049.360.500
KH ₂ PO ₄	Roth, Karlsruhe	6878.1
M-MLV Reverse Transkriptase	Invitrogen, Darmstadt	28025-013
Methanol	Roth, Karlsruhe	46275
MgCl ₂	Invitrogen, Darmstadt	P/N y02028
Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt	1.063.460.500
NaCl	Merck, Darmstadt	1.064.041.000
Oligo(dT)15 Primer	Promega, Mannheim	C110A
Phusion Polymerase+ Buffer	Biozym, Oldendorf	F-530L
Proteinmarker Precision Plus	BioRad, München	162-0374
RNAse H	Invitrogen, Darmstadt	18021-014
RNAsin	Promega, Mannheim	1002428
RT PCR Grade Water	Ambion Invitrogen, Darmstadt	AM9935
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
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe	4227.2

4.2.3. Lösungen

Tabelle 3: Lösungen

Name	Hersteller	Katalognummer
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
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
Trypsin	Biochrome AG, Berlin	L2163

4.2.4. Kits

Tabelle 4: Kits

Name	Hersteller	Katalognummer
Chemiluminiscent Nucelic Acid	Thermo Scientific	89880
ELISA Kit IL-6	Sanquin Peli Pair, Amsterdam	M9316
ELISA Kit IL-10	Sanquin Peli Pair, Amsterdam	M9310
Enhanced Chemiluminiscent Kit	Promega, Mannheim	W1015

Fixation/Permeabilization Kit	Becton Dickinson, Heidelberg	554714
Light Shift EMSA Kit	Thermo Fischer, Ulm	20148X
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fischer, Ulm	23225
Rneasy Mini Kit	Qiagen, Hilden	74106
Wizard Genomic DNA	Promega, Mannheim	A1120

4.2.5. Zytokine

Tabelle 5: Zytokine, TLR-Agonisten, Ionomycin und Phorbol ester

Name	Hersteller	Katalognummer
IL-1 β	R&D Systems, Wiesbaden	201-LB/CF
Ionomycin	SIGMA Aldrich, Deisenhofen	0634-5MG
LPS	SIGMA Aldrich, Deisenhofen	9764
PAM2CSK4	InvivoGen, Toulouse	tlr-pm2s
PMA	SIGMA Aldrich, Deisenhofen	P8139-1MG
TNF- α	Miltney Biotec, Bergisch Gladbach	130094015
Resiquimod (R848)	Bio Vision, Milpitas, California	1699-5

4.2.6. Antikörper

Tabelle 6: Western Blot Antikörper

Antigen	Clone	Isotyp	Hersteller	Kat No.	Lot No.	Verdünnung
Primärantikörper						
IKBa	sc 371	polyclonal rabbit IgG	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	C21	A2510	1/250
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
pJNK		polyclonal rabbit IgG	Cell Signaling, Beverly (USA)	9251S	17	1/1000
JNK		polyclonal rabbit IgG	Cell Signaling, Beverly (USA)	9252S	11	1/1000
pp38		polyclonal rabbit IgG	Cell Signaling, Beverly (USA)	9211S	21	1/1000
p38		polyclonal rabbit IgG	Cell Signaling, Beverly (USA)	9212S	17	1/1000
IRAK4		polyclonal rabbit IgG	ENZO Life Science, Lörrach	ADI-KAP-ST206		1/250
NEMO/IKKy	54/IKKY	Mouse IgG1	Becton Dickinson, Heidelberg	611306	23280	1/1000
Sekundärantikörper						
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: FACS Antikörper

Antikörper	Fluorochrom	Isotyp	Hersteller	Katalognummer	Verdünnung
mIgG1	FITC	IgG _{1kappa}	Becton Dickinson, Heidelberg	BD 555748	1/25
CD 16	PE	IgG _{1kappa}	Beckmann Coulter, Krefeld	BC A07766	1/25
CD 19	PC5.5/PC5	IgG ₁	Beckmann Coulter, Krefeld	BC A66328	1/50
CD 45	Pac Blue	IgG _{1kappa}	Beckmann Coulter, Krefeld	BC A74763	1/25
CD62L	FITC	IgG _{1kappa}	Becton Dickinson, Heidelberg	BD 555543	1/25

4.3. Methoden

4.3.1. Voruntersuchungen auf primäre Immundefekte in Toll-like-, IL-1- und TNF- α -Rezeptor-abhängigen Signalwegen und verminderte Stimulierbarkeit durch Pneumokokken in Vollblut

Die Voruntersuchungen auf Immundefekte im Bereich der Signaltransduktion der Toll-like-, IL-1- und TNF- α -Rezeptoren erfolgten durch Messung der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-10 mittels ELISA aus dem Überstand des zuvor mit IL-1 β , LPS, Pam₂CSK₄ und TNF- α stimulierten Vollblutes. Dies ist im Nachfolgenden ausführlich beschrieben.

4.3.1.1. Stimulation des Vollbluts mit IL-1 β , LPS, Pam₂CSK₄, TNF- α , Pneumokokken und PMA/Ionomycin

Für die Stimulation wurden 1,5 ml Heparinblut des Patienten, einer Tageskontrolle und gegebenenfalls einer Reisekontrolle benötigt. Aus dem restlichen Blut erfolgte durch Ficoll Dichtezentrifugation die Gewinnung von Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs), welche kryokonserviert wurden. Das Vollblut wurde für die Stimulation mit Roswell Park Memorial Institute (RPMI) Medium 1:1 verdünnt und mit folgenden Agonisten stimuliert: PAM₂CSK₄ (100 ng/ml), LPS (1 ng/ml), IL-1 β (5 μ g/ml), TNF- α (20 ng/ml), dem Pneumokokkenlysat D39 und PMA /Ionomycin (5×10^{-8} M/ 5×10^{-6} M). Die

Inkubation erfolgte für 48h im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂. Anschließend wurden die Überstände abgenommen und bei -20°C gelagert.

4.3.1.2. ELISA zum Nachweis von IL-10 und IL-6 aus dem Überstand des zuvor stimulierten Vollbluts

Das Ergebnis der Stimulation mit PAM₂CSK₄, LPS, IL-1β, dem Pneumokokkenlysat D39 und PMA/Ionomycin wurde mit einem ELISA zum Nachweis von IL-6 untersucht. Das Ergebnis der Stimulation mit TNF-α und PMA/Ionomycin mit einem ELISA zum Nachweis von IL-10. Die Durchführung des ELISA erfolgte mit dem jeweiligen ELISA-Kit. Dabei war das Procedere wie folgt: Eine 96-Well-ELISA-Platte wurde mit 100 µl Coating-Antikörper pro Well, der zuvor 1/100 in Coating-Puffer (0,029 M Na₂CO₃, 0,07 M NaHCO₃) verdünnt worden war, beschichtet. Die Platte inkubierte bei 4°C über Nacht. Anschließend wurde die Platte mit PBS Tween (0,05 %) fünfmal gewaschen, dann wurden 200 µl Blockingpuffer in jedes Well gegeben. Als Blockingpuffer wurde PBS mit 2,5 % Milch verwendet. Der Blockingpuffer blieb für eine Stunde auf einer mit niedriger Geschwindigkeit rüttelnden Platte. Dies galt für alle Inkubationszeiten. Die Überstände der Stimulationen wurden jeweils 1:10, 1:100 und 1:1000 mit HPE-Puffer verdünnt. Der Standard wurde ebenfalls entsprechend der Vorgaben des Herstellers mit HPE-Puffer verdünnt. Die Platte wurde fünfmal mit PBS-Tween-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Verdünnungen auf die Platte aufgetragen. Es folgte eine Stunde Inkubationszeit. Die Platte wurde dann erneut fünfmal gewaschen. Der zweite Antikörper wurde nun ebenfalls in der Verdünnung 1/100 zu je 100 µl pro Well aufgetragen und die Platte wurde erneut für eine Stunde auf den Rüttler gestellt. Nach einer Stunde wurde dann 1/7500 verdünntes HRP 100 µl pro Well hinzugegeben. Dies inkubierte für eine halbe Stunde. Es erfolgte die Zugabe von 1/2 gemischten Tetramethylbenzidin (TMB). Sobald ein Unterschied in der Farbintensität zwischen dem niedrigsten und zweitniedrigsten Standard gesehen wurde, wurde in alle Wells 100 µl der Stopplösung (1,8 M H₂SO₄) hinzugegeben. Dies diente dazu, die Farbreaktion zu stoppen. Die Farbintensität wurde dann innerhalb von einer halben Stunde photometrisch bei einer Wellenlänge von 450/630 nm mit der Software Optima quantitativ bestimmt. Für jede Stimulation wurde der Wert der Verdünnungen ausgewählt, der am besten auf der Standardkurve lag (32, 79).

4.3.1.3. Messung des CD62L-Sheddings auf Granulozyten nach Stimulation mit IL-1 β und TNF- α in der Durchflusszytometrie

Eine schnellere Methode zur Untersuchung auf Immundefekte im Bereich der Signaltransduktion der Toll-like- und TNF- α -Rezeptoren erfolgte durch Messung des CD62L-Sheddings auf Granulozyten des zuvor mit TNF- α , PAM₂CSK₄ und LPS stimulierten Vollblutes mittels Durchflusszytometrie. Dies ist im Nachfolgenden ausführlich beschrieben. Zuerst erfolgte die Stimulation in Vollblut des Patienten, einer Tageskontrolle und evtl. einer Reisekontrolle. Hierfür wurden pro Individuum 100 μ l Heparinblut in sechs Fluorescence activated Cell Sorting (FACS) Röhren vorgelegt. Die Stimulation erfolgte in einer Endkonzentration von PAM₂CSK₄ (200 ng/ml), LPS (20 ng/ml), TNF- α (200 ng/ml) und als Kontrolle R848 (100 μ g/ml). Anschließend erfolgte die Inkubation für eine Stunde bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank. Es erfolgte die Zugabe der folgenden FACS-Antikörper in den in Klammern aufgeführten Verdünnungen CD62L-FITC (1/25), CD16-PE (1/25), CD19-PC5.5/PC5 (1/50) und CD45-PacBlue (1/25). Für die Isotypkontrolle wurde der mIgG1 FITC Antikörper (1/25) anstelle des CD62L-Antikörpers eingesetzt. Nach der Antikörperzugabe wurden die Röhren gut gemischt, es erfolgte eine Inkubationszeit für 15 Minuten bei 4°C im Dunkeln. Zu jedem Röhren wurden 500 μ l Versa Lyse hinzugegeben. Es schloss sich eine 30-minütige Inkubationszeit bei Raumtemperatur im Dunkeln an. Anschließend wurden die Proben bei 200 g und Raumtemperatur für fünf Minuten zentrifugiert und die Überstände wurden abgesaugt. Die Proben wurden abschließend noch einmal mit 1 ml Waschpuffer gewaschen und konnten dann am Navios FACS gemessen werden. Zuerst wurden die Leukozyten über die Markierung mit CD45 ausgewählt und dann in B-Zellen mit CD19-Expression und in Neutrophile Granulozyten mit CD16-Expression unterteilt. In den einzelnen Zellpopulation erfolgte dann der Vergleich der CD62L-Expression zwischen den unstimulierten und den stimulierten Zellen. Ein Abfall der CD62L-Expression auf weniger als die Hälfte des Ausgangswertes wurde als positiv bewertet, d.h. infolge der Stimulation erfolgte ein Shedding von CD62L. Bei regelrechtem CD62L-Shedding wurde das Vorliegen eines Immundefekts in den jeweiligen Signalwegen als unwahrscheinlich gewertet (129).

4.3.2. Untersuchungen bei Patienten mit vermindertem Ansprechen auf die Stimulation der TL-, IL-1- und TNF- α -Rezeptor-abhängigen Signalwege

Bei zweimalig vermindertem Ansprechen auf die Stimulation mit TNF- α , wurde als nächster Schritt eine Fibroblasten- sowie eine Lymphoblastic Cell Line (LCL)-Zelllinie dieser Patienten angelegt.

4.3.2.1. Zellkultur mit Simian Virus (SV)40-immortalisierten Fibroblasten und LCLs

Die Arbeit mit der Zellkultur erfolgte steril an der Sicherheitswerkbank. Die Zellen inkubierten im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂. Die Zentrifugation erfolgte stets bei 270 g für fünf Minuten bei Raumtemperatur. Alle Medien wurden vor dem Gebrauch in 37°C warmen Wasser angewärmt.

Fibroblasten sind aus einer Hautstanze gewonnene mesodermale Zellen des subkutanen Bindegewebes. In der Zellkultur wachsen die Zellen adhärent. Primäre Fibroblasten wurden im Wasserbad zügig aufgetaut und in vorgewärmtes Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) gegeben. Die Zellen wurden abzentrifugiert und in eine mit 5 ml DMEM 15 % Fetales Kälber Serum (FCS) gefüllte T25 Zellkulturflasche überführt. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank. Die Zellen wurden bei 80 % Konfluenz 1:3 gesplittet. Zum Teilen wurden die Zellen mit 5 ml Phosphate buffered saline (PBS) gewaschen und mit Trypsin gelöst.

Primäre Fibroblasten wurden mit dem SV40 Vektor immortalisiert. Das Zellpellet aus einer T75 Flasche wurde in 400 μ l DMEM 15 % FCS resuspendiert. Es erfolgte die Zugabe des SV40 Vektors (Vektor SV40 Large T Antigen Eucaryotic Expression Vector 7.4kB Promoteur SV40 Ampicillin Resistenz low copy) mit einer Endkonzentration von c = 10 μ g/ml. Die Suspension wurde in eine Küvette überführt. Die Elektroporation erfolgte mit einem Multiporator mit einer Spannung von 250 V für 40 μ s. Die elektroporierte Zellsuspension konnte anschließend in eine mit 15 ml DMEM 15 % FCS gefüllte T75 Zellkulturflasche überführt werden. Die Zellen wurden anschließend erst bei 100 %iger Konfluenz geteilt. Transfizierte Zellen weisen keine Kontaktinhibition mehr auf und können sich so schneller vermehren. Mit der Zeit sind die primären Zellen abgestorben. Die Morphologie der Zellen wurde alle drei Tage lichtmikroskopisch untersucht. Transfizierte Zellen sind sternförmig und haben einen sichtbaren Kern.

Nach ungefähr zwei Monaten gab es nur noch immortalisierte Zellen. Die Zellen konnten dann für Experimente genutzt werden. Die Kultivierung der mit SV40 transfizierten Fibroblasten erfolgte mit DMEM 10 % FCS. Die Zellen wachsen erheblich schneller als primäre Fibroblasten und wurden daher jeden zweiten Tag 1:10 geteilt. Ansonsten erfolgte die Kultivierung analog zu der von primären Fibroblasten. Aus einer T75 Zellkulturflasche kann man 2 Kryoröhrchen in FCS 10 % DMSO einfrieren. Die Kryoröhrchen wurden in einem Isopropanoleinfrierbehälter erst bei -20°C im Gefrierschrank für 24 Stunden eingefroren, dann für weitere 24 Stunden in einen -80°C -Gefrierschrank überführt. Anschließend können die Kryoröhrchen im Flüssigstickstoff dauerhaft gelagert werden.

LCLs sind aus PBMCs gewonnene B-Zellen, die mit dem Epstein-Barr-Virus transfiziert worden sind. Es handelt sich um Suspensionszellen. Die Transfektion der Zellen wurde von der Technischen Assistentin Margret Oberreit durchgeführt. Das Auftauprocedere der LCLs entspricht dem der Fibroblasten. Die Kultivierung erfolgte mit RPMI 10 % FCS Medium. Die Kultivierung der LCLs erfolgte in einer T25 Zellkulturflasche in 10 ml DMEM 10 % FCS. Die Zellen konnten alle drei Tage 1:2 geteilt werden. Aus einer T25 Flasche konnte ein Kryoröhrchen eingefroren werden. Das Einfrierprocedere entspricht dem der Fibroblasten.

4.3.2.2. ELISA zum Nachweis von IL-6 im Überstand von SV40-immortalisierten Fibroblasten nach Stimulation mit IL-1 β und TNF- α

Fibroblasten tragen auf ihrer Oberfläche IL-1- und TNF- α -Rezeptoren. Um die IL-1- und TNF- α Signalwege in den SV40 transformierten Zellen zu überprüfen, wurden diese daher mit IL-1 β (5 $\mu\text{g/ml}$), TNF- α (20 ng/ml) und PMA /Ionomycin ($5 \times 10^{-8} \text{ M} / 5 \times 10^{-6} \text{ M}$) stimuliert. Das Ergebnis der Stimulation wurde durch die Messung von IL-6 bestimmt. Die Stimulation erfolgte in einer 6 Well Platte für 24 Stunden mit je 2 ml 2×10^5 Zellen pro Well in DMEM 10 % FCS. Die Zellen wurden einen Tag zuvor ausplattiert, damit sie sich schon vor der Stimulation setzen konnten. Das Protokoll für den ELISA zum Nachweis der IL-6 Produktion in Fibroblasten entspricht dem des zuvor beschriebenen ELISA zum Nachweis von IL-6 in Vollblut. Lediglich die Stimulation der Fibroblasten wurde in anderen Konzentrationen durchgeführt IL-1 β (10 ng/ml), TNF- α (20 ng/ml) und PMA /Ionomycin ($10^{-8} \text{ M} / 5 \times 10^{-6} \text{ M}$).

4.3.2.3. Western Blotting zur Detektion von IRAK1, I κ B α und MAP Kinasen nach der Stimulation mit IL-1 β und TNF- α

Western Blotting-allgemeine Reagenzien

Puffer

<u>Lysispuffer</u>	<u>Probenpuffer</u>	<u>Laufpuffer</u>
50 mM Tris Base	1 M Tris pH 6,8	6,06 g TrisBase
150 mM NaCl	100 mM EDTA pH 6,8	28.8 g Glycin
2 mM EDTA	10 % SDS	20ml 10 % SDS
0,5 % Triton X	10 % β -Mercaptoethanol	ad 2000 ml H ₂ O
4 % Proteaseinhibitor	0,05 % Bromphenolblau in H ₂ O	
<u>Transferpuffer</u>	<u>TBS 10x</u>	<u>PBS 10x</u>
5,82 g Tris Base	80 g NaCl	80 g NaCl
2,93 g Glycin	2 g KCL	2 g KCL
3,75 ml 10 % SDS	30 g Tris Base	14,4 g Na ₂ HPO ₄
200 ml Methanol	ad 1 L H ₂ O	2,4 g KH ₂ PO ₄
ad 1000 ml Bidest	pH 7,4	ad 1 L H ₂ O pH 7,4

Stimulation der Fibroblasten mit IL-1 β und TNF- α

Pro Individuum wurden die Zellen einer konfluenten T75 Zellkulturflasche auf 10 cm große Zellkulturschalen verteilt. Die Zellen sollten für mindestens 12 Stunden im Brutschrank inkubieren. Dann erfolgte die Stimulation. Für den I κ B α -Abbau wurden die Zellen für 0-, 30- und 60-Minuten mit TNF- α c = 20 ng/ml stimuliert. Für den IRAK1-Abbau wurden die Zellen analog dazu mit IL-1 β c = 10 ng/ml ebenfalls für 0, 30 und 60 Minuten stimuliert. Die Stimulation für die Phosphorylierung der MAP Kinasen p38 und JNK erfolgte jeweils unstimuliert, für 20 Minuten mit TNF α c = 20 ng/ml und für 20 Minuten mit IL-1 β c = 10 ng/ml. Anschließend erfolgte die Proteinextraktion zu den jeweiligen Zeitpunkten. Für die statischen Western Blots NEMO und IRAK4 erfolgte das gleiche Procedere ohne Stimulation.

Proteinextraktion

Die gesamte Proteinextraktion erfolgte auf Eis, um Proteasen zu hemmen. Die Zentrifugen wurden auf 4°C gekühlt. Die Zellen wurden in den Zellkulturschalen mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber gelöst und mit kaltem PBS in ein mit 15 ml PBS gefülltes Röhrchen überführt und abzentrifugiert. Es erfolgte ein

erneuter Waschschrift in 2 ml PBS. Das Zellpellet wurde anschließend sorgfältig getrocknet. Es folgte die Lyse der Zellen, indem das Zellpellet in 50 µl Lysisbuffer resuspendiert wurde. Das Lysat musste 20 Minuten auf Eis stehen. Nach der Inkubation erfolgte eine Zentrifugation bei 20.000 g für fünf Minuten. Die Proteine befanden sich nun im Überstand. Dieser konnte in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt werden. Die Proteinkonzentration wurde mit dem Pierce-BCA-Protein-Assay-Kit nach Angaben des Herstellers bestimmt. Die Messung erfolgt bei 550 nm am ELISA-Reader.

Western Blotting – Protokoll zum Blotten der Proteine

Die Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS Page) wurde nach der folgenden Vorlage gegossen. SDS ist ein Detergens und überdeckt die Eigenladung der Proteine, sodass diese eine konstante negative Ladungsverteilung aufweisen. Dies erlaubt dann die Auftrennung der Proteine nach ihrer Molekülgröße. Großes Gel (obere Angaben)/ 2 große Gele (Angaben in der Mitte)/ 2 Mini Gele (untere Angaben)

Trenngel: 10 %ig

H ₂ O	12,2 ml	Acrylamid	9,8 ml	Tris/HCl Puffer 1,5M pH 8,8;	7,5 ml	SDS	300 µl	APS	250 µl	TEMED	25 µl
	24,4 ml		19,6 ml		15 ml		600 µl		500 µl		50 µl
	4,2 ml		3,3 ml		2,5 ml		100 µl		83 µl		8,5 µl

Sammelgel

H ₂ O	6 ml	Acrylamid	1,3 ml	Tris/HCl Puffer (0,5M pH 6,8;	2,5 ml	SDS 10%	100 µl	APS 10%	100 µl	TEMED (Biorad; RT)	10 µl
	12 ml		2,6 ml		5 ml		200 µl		200 µl		20 µl
	3 ml		0,65 ml		1,25 ml		50 µl		50 µl		5 µl

Die Substanzen für das Trenngel wurden in oben angegebener Reihenfolge und Menge gemischt. Das Trenngel wurde dann in die Westernblotkammer gegossen und mit Isopropanol beschichtet. Das Gel bleibt für 45 Minuten stehen, um fest zu werden. Das Isopropanol wurde anschließend mit destilliertem Wasser heruntergespült. Nun konnte das Sammelgel gegossen werden. Dieses sollte ungefähr eine halbe Stunde fest werden. Für ein großes Gel wurden 80 µg Protein in 40 µl Lysispuffer aufgetragen. Es erfolgte die Zugabe von 10 µl Probenpuffer. Zur Denaturation der Proteine wurden die Proben fünf Minuten auf 95°C erhitzt. Das nun fest gewordene Gel wurde in der Kammer fixiert und die Kammer mit Laufpuffer gefüllt. Rechts und links wurden 12 µl des Marker aufgetragen und dazwischen je 50 µl der Proben. Das Gel lief dann bei 50 mA und maximal 400 V, bis die Lauffront unten angekommen war. Das Gel

equilibrierte nun für 15 Minuten im Transferpuffer. Auch die Nitrocellulosemembran und die vier WhatmanPaper wurden für zehn Minuten im Transferpuffer equilibriert. Es folgte das Blotten mit einer SemiDry-Western-Blot-Kammer bei 25 V und maximal 400 mA für 90 Minuten. Dafür wurde ein Sandwich aus zwei Whatman-Papern unten, dann der Nitrocellulosemembran, darüber das Gel und darauf wieder zwei Whatman-Paper gebildet. Die Membran wurde anschließend für eine Stunde in 5 % Milch in Tris-buffered saline mit Tween (TBST) (0,05 % Tween) geblockt.

Western Blotting – Protokolle zur Detektion der Proteine IRAK1, I κ B α und MAP Kinasen

Allgemeines Prinzip: Der erste Antikörper gegen das zu detektierende Protein wurde in Blockingpuffer entsprechend der oben aufgeführten Verdünnungstabelle verdünnt. Die Antikörperlösung inkubierte auf der Membran über Nacht auf einen Schüttler im Kühlraum. Der überschüssige Antikörper wurde am nächsten Morgen für dreimal zehn Minuten mit TBS Tween heruntergewaschen. Der zweite Antikörper entsprechend Anti-Rabbit oder Anti-Mouse wurde dann 1:10.000 in TBST (0,05 % Tween) verdünnt und die Membran inkubierte darin für eine Stunde. Die Membran sollte ab diesem Zeitpunkt im Dunkeln gehalten werden, da der zweite Antikörper sehr lichtempfindlich ist. Nach einer Stunde wurde der überschüssige Antikörper heruntergewaschen. Der Western Blot konnte detektiert werden. Zur Entwicklung inkubierte die Membran für eine Minute in 5 ml 1:1 gemischtem Enhanced Chemiluminescent (ECL). Dann wurde die Membran in einer durchsichtigen Folie in die Versadoc-Kammer gelegt. Die Detektion erfolgte mit der Quantity One Software.

4.3.2.4. Messung der NF κ B-Translokation in den Zellkern in SV40-immortalisierten Fibroblasten nach Stimulation mit TNF- α mittels EMSA

Der EMSA wird angewandt, um nach der Stimulation mit TNF- α die Bindung von NF κ B an die DNA nachzuweisen.

Nuklear Extraktion	
Puffer	
Puffer A	Puffer C
10 mM Hepes pH 7,8	20 mM Hepes pH 7,8
10 mM KCL	1,5 mM MgCL ₂
1,5 mM MgCL ₂	420 mM NaCL
0,5 mM DTT	0,2 mM EDTA

4 % Proteaseinhibitor	25 % Glycerol
	0,5 mM DTT
	4 % Proteaseinhibitor

Die Stimulation der Zellen erfolgte nach dem gleichen Procedere, wie für den I κ B α -Abbau Western Blot mit TNF- α c = 20 ng/ml für 0, 30 und 60 Minuten. Die Nuklearextraktion erfolgte analog zur Proteinextraktion des Western Blotts bis zur Zugabe des Lysispuffers. Bei der Nuklearextraktion wurde das trockene Pellet in 50 μ L Puffer A resuspendiert. Nach einer zehnmütigen Inkubation auf Eis wurde das Lysat gut gemischt. Es folgte eine dreiminütige Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit. Im Überstand fand sich anschließend das zytosolische Extrakt, welches aufgehoben wurde. Das Pellet wurde einmal mit PBS gewaschen und anschließend in 40 μ L Puffer C resuspendiert. Nach einer 25-minütigen Inkubation erfolgte die Zentrifugation für fünf Minuten bei maximaler Geschwindigkeit. Im Überstand befand sich abschließend das Nuklearextrakt. Die Proteinkonzentration wurde anschließend, wie für den Western Blot beschrieben, gemessen.

EMSA	
EMSA Gel	10x TBE
35,3 ml H ₂ O	890 mM TrisBase
2,5 ml TBE (10 x)	890 mM Boric Acid
11,7 ml 30 % Polyacrylamid	20 mM EDTA pH 8
500 μ l APS (10 %)	
50 μ l TEMED	

Das 7 %ige Polyacrylamid-Gel wurde wie oben beschrieben, gegossen und für eine Stunde getrocknet. Anschließend musste das leere Gel für eine halbe Stunde bei 130 V in der mit 0,5 x TBE Puffer gefüllten Gelkammer laufen. Die Bindungsreaktion konnte wie in der Tabelle zur EMSA Bindungsreaktion vorbereitet werden. In der Bindungsreaktion bindet das Nuklearextrakt aus NF κ B an die Biotin DNA Sonde. Für die Bindungsreaktion wurde das Light-Shift-EMSA-Kit verwendet.

EMSA Bindungsreaktion	
H ₂ O	5,2 μ l
Binding Buffer (10 x) Kit	2 μ l
50 mM DTT	1 μ l
Poly DI:dC (1 μ g/ μ l) Kit	1 μ l
1 % NP-40 Kit	0,8 μ l
Nuklearextrakt 10 μ g	8 μ l
Biotin Sonde (15 fmol/ μ l)	2 μ l

Die Bindungsreaktion erfolgte für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Dann erfolgte die Zugabe von 5 µl des Laufpuffers (Kit) zum Abstoppen der Reaktion. Die Proben wurden nun auf das Gel aufgetragen. Das Gel lief bei 130 V. Anschließend wurden die Proben 60 Minuten bei 100 mA auf eine Nylon-Membran geblottet. Daraufhin erfolgte die Krosslinkreaktion für acht Minuten unter einer UV Lampe (254 nm). Die Detektion erfolgte mit dem Chemiluminiscent Nucleic Acid Detection Module-Kit nach Angaben des Herstellers. Als Kamera diente der VersaDoc 4000, zur Auswertung wurde die Software Quantity One verwendet.

4.3.2.5. PCR einzelner Exone auf Grundlage genomischer DNA

Die genomische PCR des *MAL/TIRAP* Gens erfolgte bei dem Patienten (P 4) zum Ausschluss einer Mutation in einem der drei Exone von *MAL/TIRAP*. Dafür wurden die PCR-Produkte anschließend von SeqLab sequenziert. Die DNA-Extraktion erfolgte aus LCLs des Patienten und einer gesunden Kontrolle mit dem Wizard Genomic DNA-Extraktionskit nach Angaben des Herstellers. Die DNA-Konzentration wurde mit Hilfe des Nano Drops bestimmt. Die PCR-Reaktion und das PCR-Programm sind tabellarisch dargestellt. Es wurde 1 %iges Agarose Gel mit Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) und 0,01 % Ethidiumbromid gegossen. Als Laufpuffer diente ebenfalls der TAE-Puffer. Anschließend wurden je 20 µl pro Probe aufgetragen, diese liefen für ca. eine Stunde bei 140 Volt. Die Detektion erfolgte mit dem Alphaimager. 5 µl jeder Probe wurden anschließend zu Seqlab in Göttingen zur Sequenzierung geschickt.

PCR

TAE Puffer

40 mM Tris (pH 7,8)
0,5 mM Na-Acetat
0,01 mM 2 Na EDTA

PCR Reaktion

H ₂ O	30,3 µl
Go Taq Puffer (5 x)	10 µl
MgCl ₂ (25 µM)	3 µl
dNTPs	2 µl
Vorwärtsprimer	2 µl
Rückwärtsprimer	2 µl
gDNA 826 ng/µl	0,2 µl
Go Taq Polymerase	0,5 µl

PCR Programm

95°C	2 min	initiale Denaturierung
95°C	30 sec	Denaturierung 35 x
55°C	30 sec	Annealing 35 x
72°C	1 min	Elongation 35 x
72°C	6 min	finale Elongation
4°C	∞	Pause

Primer Mal/Tirap

Exon 1 vorwärts	5'-GAA ACA GAA CTT CGC AGA GC-3'
Exon 1 rückwärts	5'-TGT CAG GTA TGT CAG GGA GC-3'

Exon 2 vorwärts	5'-TGA GAA TAA GAT GTT TCC CAG TGC-3'
Exon 2 rückwärts	5'-GAG CGG GTG AGT AAC TTG GC-3'
Exon 3 vorwärts	5'-ATA AGT GTA TCT GGG GAG GGC-3'
Exon 3 rückwärts	5'-GGG AAG ACA GAA GTG GGT GC-3'

4.3.2.6. Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Die *IRAK4*-RT-PCR erfolgte bei dem Patienten (P16) mit der Fragestellung, ob *IRAK4*-mRNA transkribiert wird. Dafür wurde RNA aus LCLs mit Hilfe des Rneasy Kits nach Angaben des Herstellers extrahiert. Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte mit Hilfe des NanoDrops. Es schloss sich die tabellarisch dargestellte cDNA-Synthese an. Die PCR-Reaktion und das PCR-Programm sind ebenfalls tabellarisch dargestellt. Ab diesem Punkt gleicht die RT-PCR der genomischen PCR, wie oben beschrieben. Um die Qualität der cDNA zu prüfen, wurde die gleiche PCR noch mit dem housekeeping Gen GAPDH durchgeführt.

cDNA Synthese		
RNA 2 µg in H ₂ O	10 µl	
Oligo(dT) 500 µg/µl	1 µl	5 min 65°C dann sofort auf Eis
dNTPs	1 µl	
First Strand Buffer 5x	4 µl	
DTT (0,1M)	2 µl	2 min 37°C dann RT
RNasin (400/µl)	1 µl	
Reverse Transkriptase M-MLV	1 µl	50 min 37°C dann 15 min 70°Grad dann auf Eis
RNase H (2IU)	1 µl	20 min 37°C

PCR				
PCR Reaktion		PCR Programm		
H ₂ O	12,4 µl	95°C	2 min	initiale Denaturierung
Phusion GC Buffer(5x)	4 µl	95°C	30 sec	Denaturierung 35 x
dNTPs	0,4 µl	55°C	30 sec	Annealing 35 x
Vorwärtsprimer	1 µl	72°C	1 min	Elongation 35 x
Rückwärtsprimer	1 µl	72°C	6 min	finale Elongation
cDNA (200n/µl)	1 µl	4°C	∞	Pause
Phusion Polymerase	0,2 µl			

Primer Mal/Tirap	
IRAK-4 Vorwärtsprimer	5'-TTC TTC TGT CGC CGG CTT CAG-3'
IRAK-4 Rückwärtsprimer	5'-CAT GCT TTA ATA ACC ACT GTC CTG C-3'
GAPDH Vorwärtsprimer	5'-CGC TCT CTG CTC CTC CTG TTC G-3'
GAPDH Rückwärtsprimer	5'- GCG TCA AAG GTG GAG GAG TGG G- 3'

5. Ergebnisse

5.1. Patientenkohorte

Im Rahmen des Projektes „Neue angeborene Immundefekte als Ursache für invasive Infektionen durch *S. pneumoniae* und *S. aureus* im Kindesalter“ wurden Kinder auf einen Immundefekt in den Signalwegen der Toll-like-, IL-1- und TNF- α -Rezeptoren untersucht. Die nachfolgend dargestellten Daten beziehen sich auf den Zeitraum vom 01. März 2008 bis zum 31. Dezember 2012. In dieser Zeit wurden 290 Kinder in die Studie eingeschlossen. Davon waren 181 Patienten männlich und 109 Patienten weiblich. 174 Kinder wurden in Berlin rekrutiert. Aus der restlichen Bundesrepublik kamen 107 Patienten und neun der Kinder stammten aus dem Ausland. Die Nationalität der Kinder bleibt hier unberücksichtigt. Bei nur 93 Patienten konnten tatsächlich nach anamnestischen Angaben Staphylokokken oder Pneumokokken als Ursache für die invasiven Infektionen kulturell identifiziert werden. Nachfolgend dargestellt sind die gesicherten invasiven Infektionen, die durch diese beiden Erreger verursacht worden sind (**Abb. 4**).

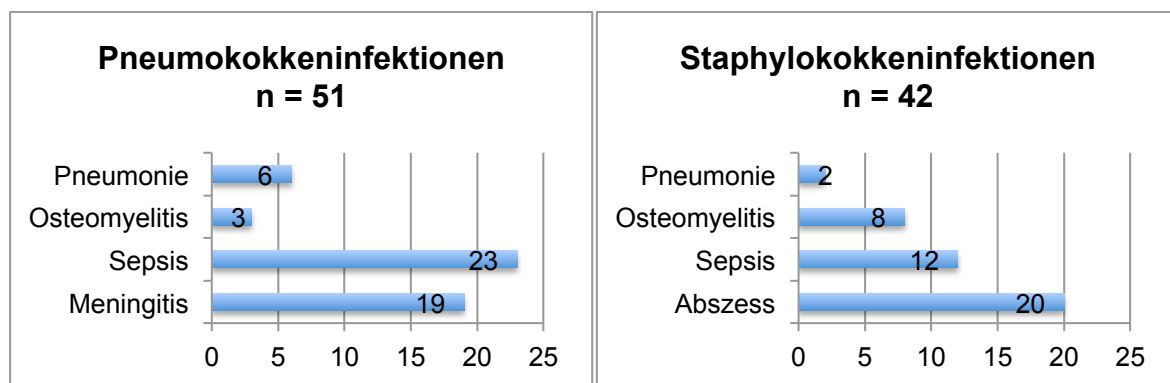


Abbildung 4: Invasive Pneumokokken- und Staphylokokkeninfektionen

Invasive Infektionen (inklusive Pneumonie) mit Nachweis von Pneumokokken n = 51 und Staphylokokken n = 42

Bei 108 Kindern war es trotz des Verdachts auf eine invasive Infektion nicht möglich, Pneumokokken oder Staphylokokken nachzuweisen. Auch Patienten ohne Erregernachweis oder mit Nachweis eines anderen Erregers wurden in die Studie aufgenommen, so dass das Einschlusskriterium in die Studie letztlich der Verdacht des einsendenden Kliniklers auf eine schwere bakterielle Infektion war. Die nachfolgende Abbildung stellt die verschiedenen Erreger dar, die bei den Kindern innerhalb der Studie

identifiziert wurden. „Unbekannter Erreger“ bedeutet, dass kein Erreger nachgewiesen werden konnte. „Kein Erreger“ betrifft Patienten, welche nicht auf Grund einer invasiven Infektion, sondern wegen anderer Charakteristika, die auf einen Immundefekt hinweisen können, wie beispielsweise einer ektodermalen Dysplasie, in die Studie mit aufgenommen worden sind (**Abb. 5**).

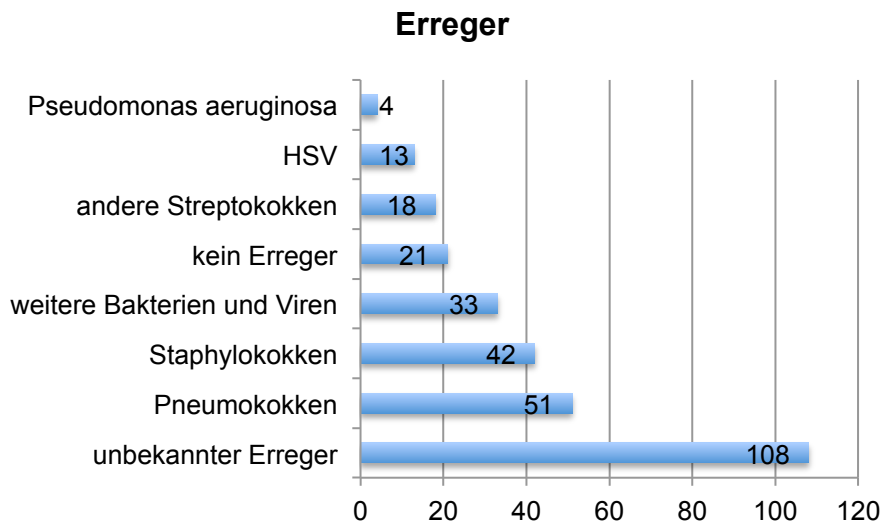


Abbildung 5: Erreger der Infektionen (n = 290)

In dem nachfolgenden Diagramm ist die Art der Infektion dargestellt. Es erfüllen 183 Patienten das Kriterium der invasiven Infektion. Pneumonien und HNO-Infektionen werden als nicht-invasive Infektionen gewertet (**Abb. 6**).

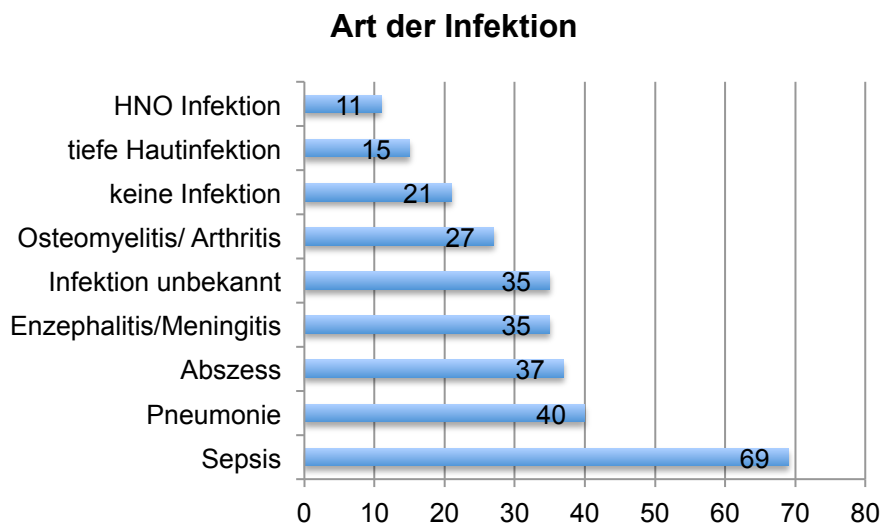


Abbildung 6: Art der Infektion (n = 290)

5.2. Voruntersuchungen auf Primäre Immundefekte in Toll-like-, IL-1- und TNF- α -Rezeptor-abhängigen Signalwegen und verminderte Stimulierbarkeit durch Pneumokokken in Vollblut

5.2.1. Verminderte Stimulierbarkeit durch Pneumokokken in Vollblut

Das Vollblut von 123 Patienten und 148 Kontrollen wurde auf eine verminderte Stimulierbarkeit durch Lysate von Pneumokokken des Stamms D39 untersucht. Es war mit unserem Assay nicht möglich zu bestimmen, ob eine verminderte Stimulierbarkeit durch Pneumokokken vorliegt, da ebenfalls bei 50 der gesunden Kontrollpersonen eine stark verringerte IL-6 Produktion nach Stimulation mit Pneumokokken unter 100 pg/ml zu messen gewesen ist. Bei den MyD88- und IRAK4-defizienten Patienten ist nach der Stimulation durch Pneumokokken keine IL-6-Antwort messbar. Der im Rahmen dieser Arbeit identifizierte NEMO-defiziente Patient zeigte eine IL-6 Produktion nach der Stimulation mit Pneumokokken (**Abb. 7**).

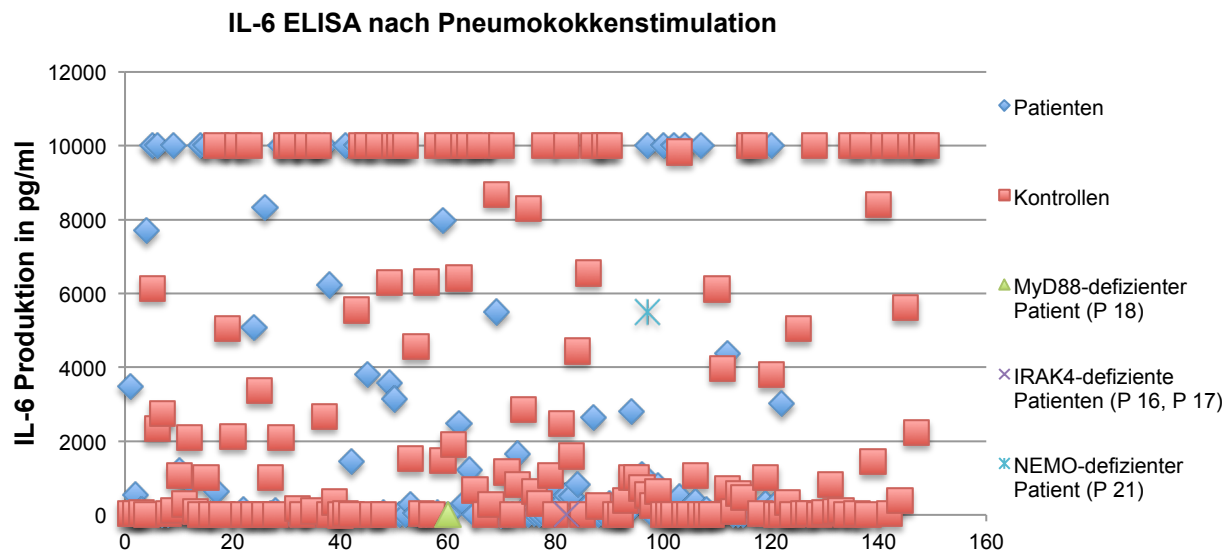


Abbildung 7: IL-6 ELISA nach Pneumokokkenstimulation

Mittels ELISA gemessene IL-6 Produktion nach der Stimulation mit Pneumokokken bei $n = 123$ Patienten in Blau und $n = 148$ Kontrollen in Rot dargestellt. Das hellblaue Kreuz stellt die IL-6 Produktion nach der Pneumokokkenstimulation eines NEMO-defizienten Patienten, das grüne Dreieck die IL-6 Produktion eines MyD88-defizienten Patienten und das lila Kreuz die IL-6 Produktion nach der Stimulation mit Pneumokokken eines IRAK4-defizienten Patienten dar.

5.2.2. Verminderte Stimulierbarkeit durch TNF- α in Vollblut

Bei 83 der 290 Patienten zeigte sich eine verminderte IL-10 Antwort auf die Stimulation mit TNF- α mit einer IL-10 Produktion < 20 pg/ml. Dieser Grenzwert wurde gewählt, da er ungefähr den Mittelwert der 5. Perzentile des Ansprechens auf TNF- α der Tageskontrolle und der Reisekontrolle bildet (**Tab. 8**). Die untere Detektionsschwelle im linearen Bereich des ELISA liegt bei einer Konzentration von 0,3 pg/ml, bei einer minimalen Verdünnung von 1:10 somit bei 3 pg/ml. Da dieser Test insbesondere durch Reiseeinflüsse, wie die unten aufgeführten Perzentilen zeigen, sehr störanfällig ist und auch bei gesunden Reisekontrollen vermindertes Ansprechen auf TNF- α beobachtet werden kann, wurde der Test erst bei einem wiederholt vermindertem Ansprechen auf TNF- α als auffällig gewertet. Bei 34 Patienten war eine Wiederholung nicht möglich, da der Kontakt zum Patienten abgebrochen ist. Bei 26 Patienten war der Test bei der Wiederholung normal. Insgesamt konnte bei 23 Patienten eine zweimalig verminderte Antwort auf die Stimulation mit TNF- α < 20 pg/ml gemessen werden. Nachfolgend dargestellt ist eine Tabelle mit den klinischen Informationen dieser 23 Patienten (**Tab. 9**).

Tabelle 8: Perzentilen der mittels ELISA gemessenen IL-10 Produktion auf die TNF- α Stimulation der Tages- und Reisekontrollen in Vollblut (n = 52)

	Tageskontrollen	Reisekontrollen	Tageskontrollen	Reisekontrollen
IL-10	5. / 95.Perzentile	5. / 95.Perzentile	25. / 75.Perzentile	25. / 75.Perzentile
PMA/Iono	38 - 401	5 - 277	73 - 258	10 - 137
TNF- α	38 - 582	6 - 316	85 - 361	39 - 181

Mit freundlicher Genehmigung von Dr. med. Uwe Kölsch und Dr. med. Christian Meisel

Tabelle 9: Charakterisierung der Patienten mit zweimalig vermindertem Ansprechen auf die TNF- α Stimulation, IL-10 Produktion unter < 20pg/ml

Patient	Geschlecht	Alter	Infektion	Erreger	Fibroblasten	Diagnose
P 1	w	9 Jahre	Sepsis	Streptokokken	ja	bisher keine
P 2	m	4 Jahre	Pneumonie	unbekannt	ja	bisher keine
P 5	m	11 Jahre	Pneumonie	<i>H. influenza</i>	ja	bisher keine
P 8	w	9 Jahre	Meningitis	<i>S. pneumoniae</i>	ja	bisher keine
P 9	m	6 Jahre	Pneumonie	unbekannt	ja	bisher keine
P 12	m	10 Jahre	Hirnabszess	<i>S. milleri</i>	ja	bisher keine
P 13	w	9 Jahre	Sepsis	<i>S. pneumoniae</i>	ja	bisher keine
P 21	m	5 Jahre	Meningitis	<i>S. pneumoniae</i>	nein	X-chromosomal-rezessiver NEMO-Defekt
P 22	m	7 Jahre	Meningitis	unbekannt	nein	bisher keine
P 23	m	14 Jahre	Pneumonie	unbekannt	nein	bisher keine
P 24	m	16 Monate	Osteomyelitis	unbekannt	nein	bisher keine
P 25	m	6 Jahre	rez. Otitiden	<i>P. aeruginosa</i>	nein	bisher keine
P 27	w	7 Jahre	Mastoiditis	unbekannt	nein	bisher keine
P 28	w	9 Jahre	Meningitis/ Enzephalitis	<i>S. pneumoniae</i>	nein	bisher keine
P 29	m	13 Jahre	chron. Impetigo contagiosa	unbekannt	nein	bisher keine
P 30	m	16 Monate	Meningitis	<i>S. pneumoniae</i>	nein	bisher keine
P 31	m	3 Monate	Schwester an Sepsis ver- storben	<i>S. pneumoniae</i>	nein	bisher keine
P 32	w	10 Jahre	Hirnsabszess	<i>S. cremoris</i>	nein	bisher keine
P 33	m	11 Jahre	Abszesse	<i>S. aureus</i>	nein	STAT3-Defekt
P 34	m	11 Jahre	Abszesse	<i>S. aureus</i>	nein	STAT3-Defekt
P 35	w	4 Jahre	Parodontitis	unbekannt	nein	bisher keine
P 36	w	2 Monate	Sepsis	<i>S. pyogenes</i>	nein	bisher keine
P 37	w	9 Jahre	Sepsis	<i>S. aureus</i>	nein	bisher keine

5.3. Untersuchungen bei Patienten mit vermindertem Ansprechen auf die Stimulation der TNF- α -Rezeptor-abhängigen Signalwege

5.3.1. NEMO-Defekt bei einem Patienten (P 21) mit invasiven Infektionen durch *S. pneumoniae*

Der Patient (P 21) erkrankte im Alter von neun Monaten an einer Pneumokokkenmeningitis und im Alter von fünf Jahren an einer Pneumokokkenarthritis. Diese Infektionen imponierten jeweils mit einer starken Akut-Phase Antwort, mit hohem Fieber und hohen Entzündungswerten. Ein Cousin des Patienten litt in seiner Kindheit ebenfalls an einer Meningitis und einer Osteomyelitis. Die Erreger dieser Infektionen sind jedoch unbekannt. Die Schwester des Patienten ist gesund. Weitere Familienmitglieder sind nicht erkrankt. Dies spricht für eine Erkrankung mit X-chromosomalem Erbgang. Des Weiteren hat der Patient, vereinbar mit einer ektodermalen Dysplasie, konische Zähne. Es zeigte sich eine fehlende humorale Antwort auf Polysaccharide (Pneumokokken-Antikörper waren nicht nachweisbar). Bei den Voruntersuchungen zeigte sich zweimalig eine sehr stark verminderte IL-10 Produktion nach TNF- α Stimulation ($2 \times < 5 \text{ pg/ml}$) (**Abb. 8**). Die IL-6 Produktion nach Stimulation mit Toll-like-Agonisten und IL-1 β war hingegen nachweisbar (nicht dargestellt). Mittels Sanger-Sequenzierung des *NEMO*-Gens aus Vollblut wurde eine Duplikation in Exon 5 identifiziert: IKBKG Exon 5 c. 536_541dup p.GLu179_Gln180dup hemizygot (Klaus Schwarz, Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Immunogenetik, Ulm, not published) (**Abb. 9**). Diese Duplikation wurde bisher noch nicht als Polymorphismus oder als Mutation beschrieben. Seit der Diagnose des dringenden Verdachts auf einen NEMO-Defekt erhält der Patient eine dauerhafte antibiotische Prophylaxe mit Cotrimoxazol. Im Beobachtungszeitraum von zwischenzeitlich drei Jahren sind seitdem keine weiteren schweren Infektionen aufgetreten. In der Zusammenschau von Familienanamnese (ein Cousin mit Meningitis und Osteomyelitis), von klinischem (2 x invasive Pneumokokkeninfektion und Stigmata der ektodermalen Dysplasie (konische Zähne)), immunologischem Phänotyp (keine Antikörper gegen Pneumokokken, sehr schwache Produktion von IL-10 nach Stimulation mit TNF α im Vollblut) und hemizygoter Mutation im *NEMO* Gen ist die Diagnose eines NEMO-Defekt hoch wahrscheinlich. Die NEMO-Proteinexpression in LCLs ist nicht vermindert, was

jedoch bei einer im Leserahmen bleibenden Mutation und nachfolgender Duplikation von zwei Aminosäuren auch nicht zu erwarten ist (**Abb. 10**). Die funktionellen Auswirkungen der Mutation konnten nicht weiter untersucht werden, da die Eltern einer Fibroblastenentnahme nicht zugestimmt haben. (88, 120-122).

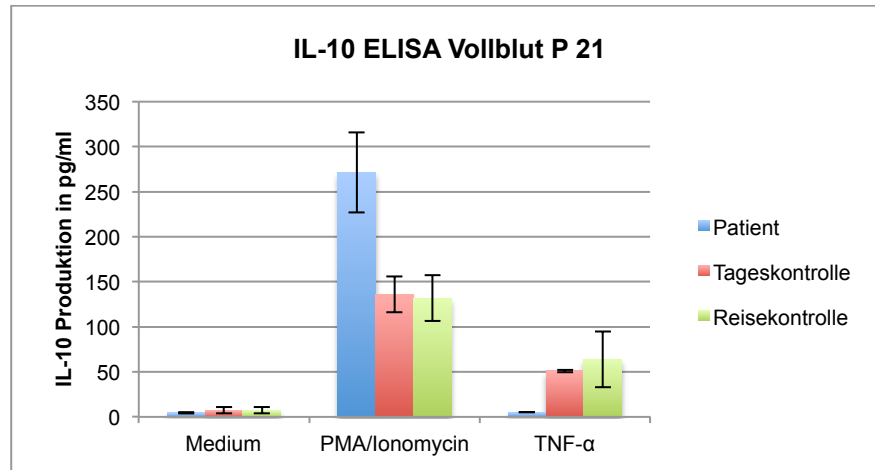


Abbildung 8: Messung der IL-10 Produktion mittels ELISA in Vollblut
 Messung der IL-10 Produktion mittels ELISA in Vollblut nach Stimulation mit Medium, PMA/Ionomycin(10^{-8} M/ 10^{-6} M), und TNF- α (20 ng/ml) für 48 Stunden. Dargestellt sind zwei unabhängige Experimente. In Blau dargestellt ist die IL-10 Produktion des Patienten (P 21), in Rot die der Tageskontrolle und in Grün die der Reisekontrolle.

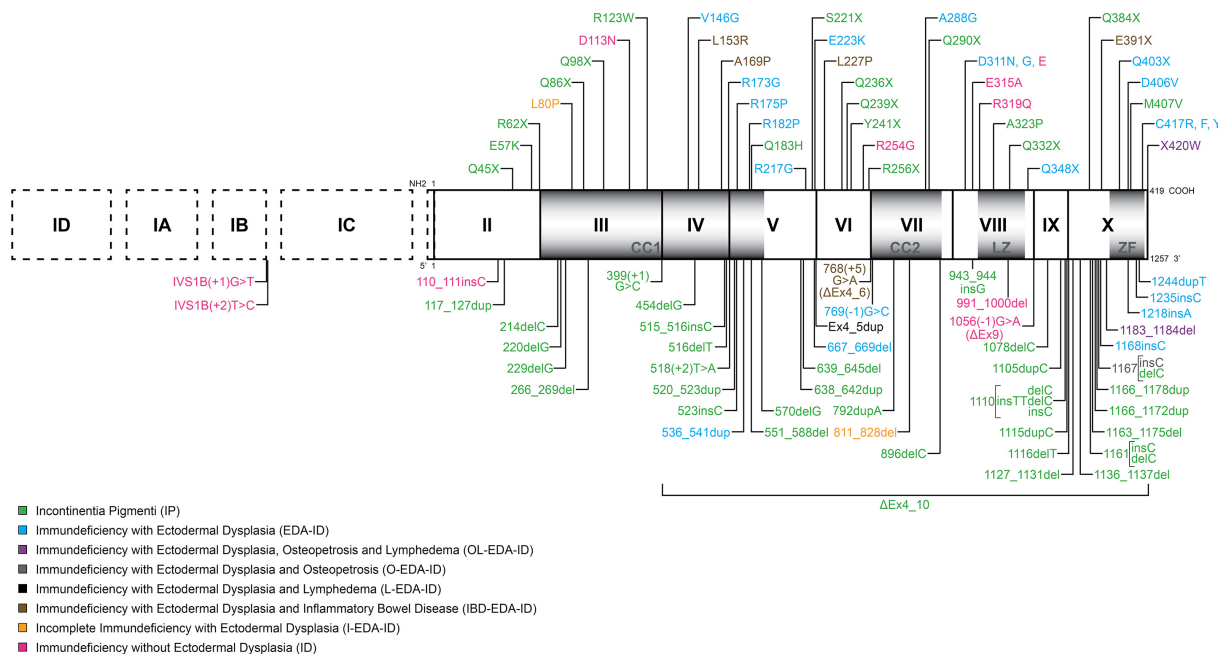


Abbildung 9: Schematische Representation des NEMO-Gens mit bisher identifizierten Mutationen

Das Gen besteht aus 10 Exonen. Es existieren vier verschiedene Isoformen, die sich im Exon 1 unterscheiden. Es wird entweder das nicht kodierende Exon 1 A, B, C oder D exprimiert. Die farbliche Kodierung bezieht sich auf die klinische

Unterscheidung der NEMO-Defekte, die durch die Mutation verursacht werden. (siehe Legende) (In Zusammenarbeit mit Anne-Helene Lebrún)

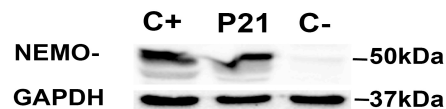


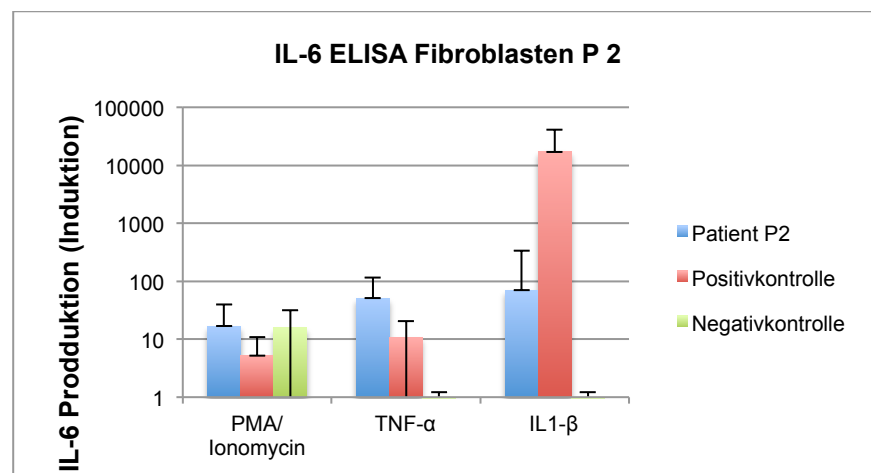
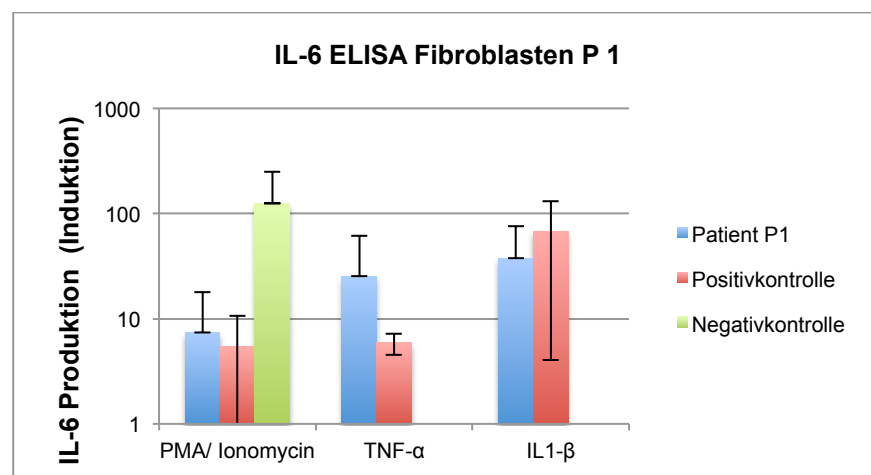
Abbildung 10: NEMO-Expression in LCLs von dem Patienten (P 21)

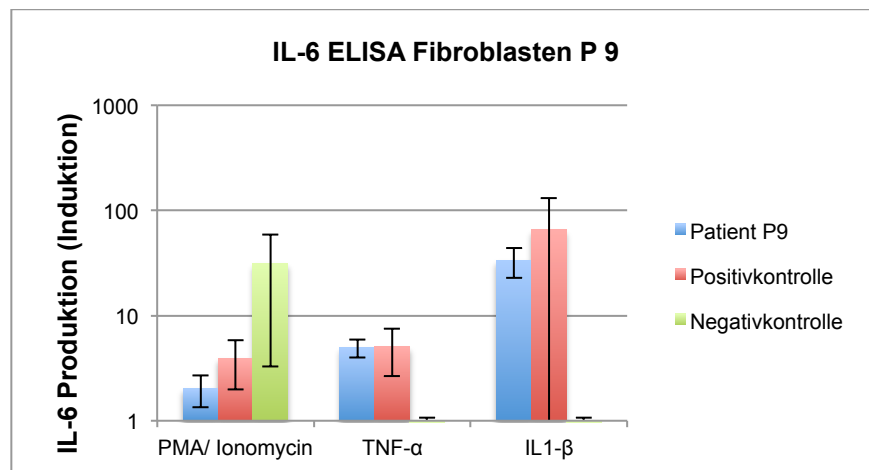
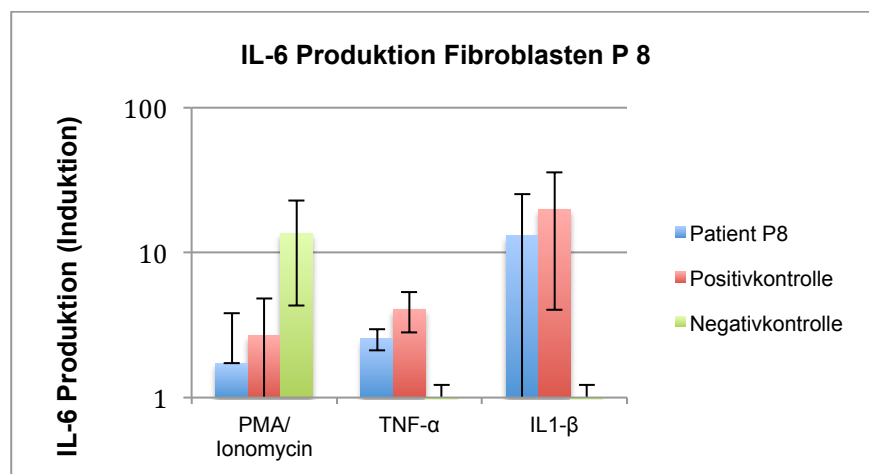
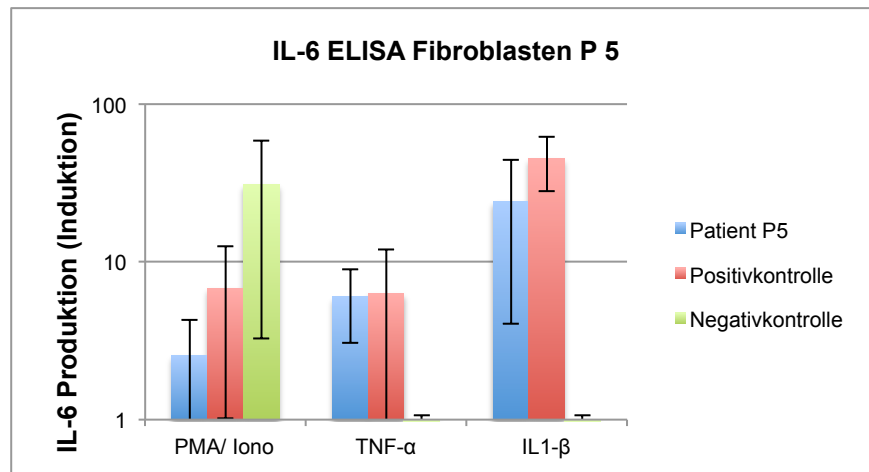
NEMO-Expression in LCLs von einer gesunden Kontrolle (C+), dem Patienten (P 21) und einer NEMO-defizienten Negativkontrolle (C-). GAPDH dient als Ladungskontrolle.

5.3.2. Patienten mit vermindertem Ansprechen auf die TNF- α Stimulation ohne eindeutigen immunologisch-klinischen Phänotyp

Bei den anderen 22 Patienten fand sich in der Zusammenschau der Befunde kein eindeutiger Phänotyp für einen bestimmten Immundefekt in diesem Signalweg. Zur weiteren Eingrenzung des potentiellen Immundefekts in TNF- α -Rezeptor-abhängigen Signalwegen wurde den Eltern und Ärzten die Anlage einer SV40-Fibroblastenzelllinie empfohlen. Dem stimmten die Eltern von sieben Patienten (P 1, P 2, P 5, P 8, P 9, P 12 und P 13) zu. Zur Überprüfung des Ergebnisses aus der Vollblutstimulation wurde der ELISA zum Nachweis von IL-6 mit Überständen aus der Fibroblastenkultur wiederholt. Die Stimulation TLR-abhängiger Signalwege in Fibroblasten *in vitro* ist schwierig, in unseren Händen gelang eine Stimulation TLR4-abhängiger Signalwege der Fibroblasten mit LPS nicht, andere Arbeitsgruppen beschreiben, dass eine Stimulation der TLRs in Fibroblasten zu einer Sekretion von IL-6 und IL-10 führt (123). TLR3-abhängige Signalwege sind in Fibroblasten gut stimulierbar, diese sind bei der Suche nach angeborenen Immundefekten mit erhöhter Anfälligkeit für bakterielle Infektionen jedoch nicht relevant, da Defekte in TLR3-TRIF-TRAF3-IRF3-abhängigen Signalwegen mit einer selektiven Anfälligkeit für Enzephalitiden durch HSV1 einhergehen (124) (Details siehe Abbildung 1 Seite 20). Daher wurden bei Patienten mit Zustand nach schwerer bakterieller Infektion zur Überprüfung von Toll-like- und IL-1-Rezeptor-abhängigen Signalwegen in Fibroblasten nur mit IL-1 β stimuliert. Analog zu den Auswertungen der IL-6 Produktion in Fibroblasten, die in der Literatur beschrieben sind, wurden die IL-6 Produktion nach Stimulation mit IL-1 β und TNF- α als Induktion bezogen auf die IL-6

Produktion der unstimulierten Probe dargestellt (**Abb. 11-17**). (85, 86). Entgegen der Untersuchungen im Vollblut fand sich in den Fibroblasten kein signifikanter Unterschied der IL-6 Produktion zwischen gesunden Kontrollpersonen und den Patienten. Bei dem vom Pannicke et al. beschriebenen IKK2 Defekt zeigt sich in Fibroblasten eine regelrechte IL-6 Antwort auf die Stimulation mit TNF- α und trotzdem ist der I κ B α Abbau und die Translokation von NF κ B nach der Stimulation mit TNF- α deutlich vermindert (91) Daher wurden die Signalwege trotz der fehlenden Verminderung der IL-6 Produktion nach der Stimulation mit TNF- α weiter untersucht, dies ist im Nachfolgenden beschrieben.





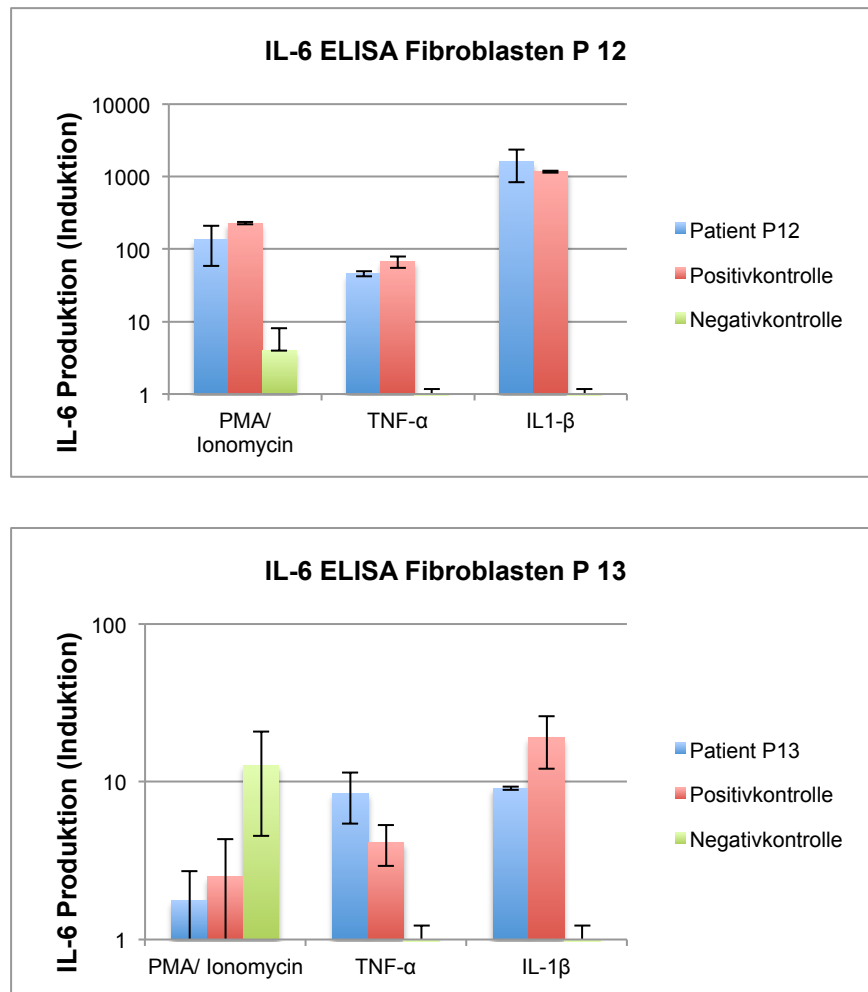


Abbildung 11-17: IL-6 Produktion in SV40-transformierten Fibroblasten

Messung der IL-6 Produktion mittels ELISA in SV40-transformierten Fibroblasten nach Stimulation mit Medium, PMA/Ionomycin (10^{-8} M/ 10^{-6} M), TNF- α (20 ng/ml) und IL-1 β (10 ng/ml) für 24 Stunden. Als Negativkontrolle Fibroblasten einer NEMO-defizienten (NEMO-/-) Zelllinie und als Positivkontrolle Fibroblasten einer gesunden Kontrollperson dargestellt. Ergebnis aus je zwei unabhängigen Experimenten. Die Auswertung erfolgte als Induktion bezogen auf die unstimulierte Probe.

Der häufigste Immundefekt im Bereich der TNF- α -Rezeptor-abhängigen Signaltransduktion ist der NEMO-Defekt. Daher wurde in den Zelllinien die NEMO-Expression mittels Western Blot untersucht (**Abb. 18**). Die NEMO-Expression war bei allen Patienten regelrecht. Im Folgendem ist nur ein NEMO Western Blot exemplarisch abgebildet.

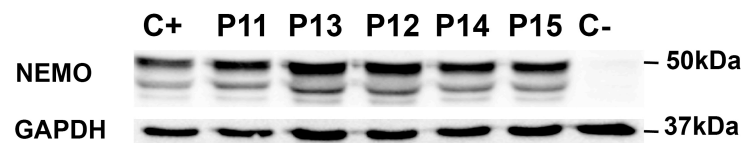


Abbildung 18: NEMO-Expression in SV40-transformierten Fibroblasten

Untersuchung der NEMO-Expression in SV40-transformierten Fibroblasten von einer gesunden Kontrolle (C+), den Patienten (P 11-P 15) und einer NEMO-defizienten Negativkontrolle (C-) im Western Blot. GAPDH dient der Normalisierung.

Um potentielle Immundefekte in diesem Signalweg weiter einzugrenzen, wurden weitere funktionelle Experimente durchgeführt. Im Western Blot wurde der IRAK1-Abbau nach der Stimulation mit IL1- β gemessen (**Abb. 19**). Bei allen Patienten wurde IRAK1 nach 30- und nach 60- minütiger Stimulation regelrecht abgebaut. Auch hier ist exemplarisch nur ein Western Blot dargestellt.

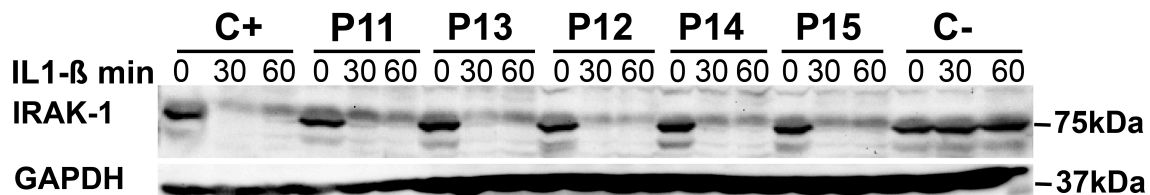


Abbildung 19: IRAK1-Abbau nach Stimulation mit IL-1 β

Analyse des IRAK1-Abbaus nach Aktivierung mit IL-1 β (10 ng/ml) für 30 und 60 Minuten in SV40-transformierten Fibroblasten von einer gesunden Kontrolle (C+), den Patienten (P 11-P 15) und einer MyD88-defizienten Negativkontrolle (C-) im Western Blot. Die GAPDH-Expression dient der Ladungskontrolle.

Die IL-6 Produktion als Antwort auf die Stimulation mit TNF- α war im Vollblut wie auch in den Fibroblasten vermindert. Zur Eingrenzung von potentiellen Defekten in diesem Signalweg wurden die Fibroblasten mit TNF- α stimuliert. Im Western Blot wurde dann der I κ B α -Abbau gemessen (**Abb. 20**). Der I κ B α -Abbau war bei allen Patienten regelrecht. Nach 30-minütiger Stimulation zeigte sich bei allen Patienten ein vollständiger I κ B α -Abbau. Nach 60 Minuten ist I κ B α teilweise wieder aufgebaut. Diese Kinetik zeigt sich genauso bei der gesunden Kontrolle.

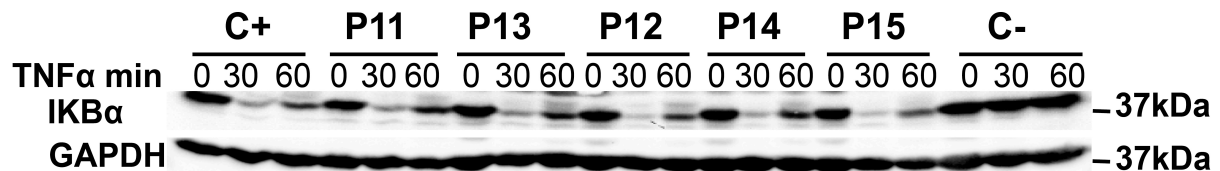


Abbildung 20: IκBα-Abbau nach Stimulation mit TNF-α

Analyse des IκBα-Abbau nach Aktivierung mit TNF-α (20 ng/ml) für 30 und 60 Minuten in SV40-transformierten Fibroblasten von einer gesunden Kontrolle (C+), den Patienten (P11-P15) und einer NEMO-defizienten Negativkontrolle (C-) im Western Blot. Die GAPDH-Expression dient der Ladungskontrolle.

Die Signalübertragung der Toll-like- und TNF-α-Rezeptoren führt über zwei Hauptsignalwege zur Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen. Der wichtigste Weg führt über den IKK- und IκB-Komplex zur Translokation von NFκB in den Zellkern und seiner Bindung an die DNA. Ein weiterer Signalweg führt über MAP Kinasen zur Aktivierung von mehreren Transkriptionsfaktoren und anschließender proinflammatorischer Zytokinausschüttung. Es ist daher ebenfalls vorstellbar, dass die verminderte Zytokinausschüttung durch einen Defekt in der Signalübertragung der MAP Kinasen verursacht wird. Durch ein normales Signal über den IKK- und IκB-Komplex aber eine defiziente MAP Kinasen Signalübertragung wäre ein vermindertes, jedoch noch vorhandenes Signal nach Stimulation mit TNF-α erklärbar. Im Western Blot wurde daher die Phosphorylierung der MAP Kinasen p38 und JNK nach 20-minütiger Stimulation mit TNF-α und IL-1β untersucht. Nach Stimulation mit TNF-α und IL-1β wiesen alle Patienten eine regelrechte Phosphorylierung von JNK und p38 auf (**Abb. 21, 22**). Bei dem Patienten (P 9) wurde der pp38 Western Blot wiederholt, dort zeigt sich auch eine normale Phosphorylierung (**Abb.22**).

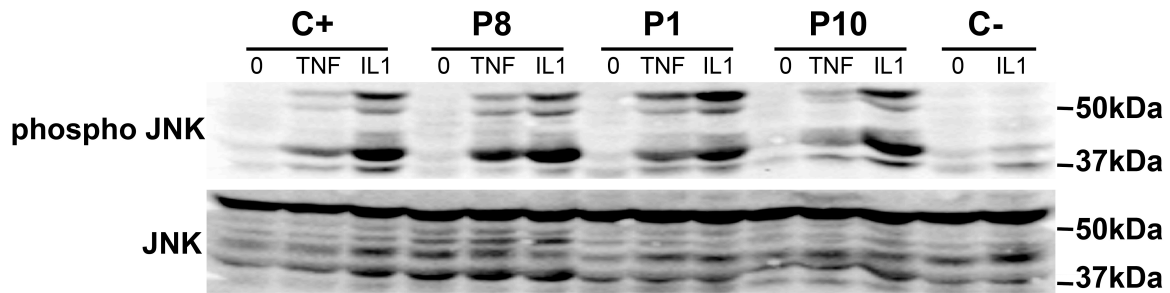


Abbildung 21: Phosphorylierung von JNK nach Aktivierung mit TNF- α

Analyse der Phosphorylierung von JNK nach Aktivierung mit TNF- α (20 ng/ml) und IL-1 β (10 ng/ml) für je 20 Minuten in SV40-transformierten Fibroblasten von einer gesunden Kontrolle (C+), den Patienten (P 11-P 15) und einer MyD88-defizienten Negativkontrolle (C-) im Western Blot. Die Darstellung der JNK-Expression dient der Ladungskontrolle.

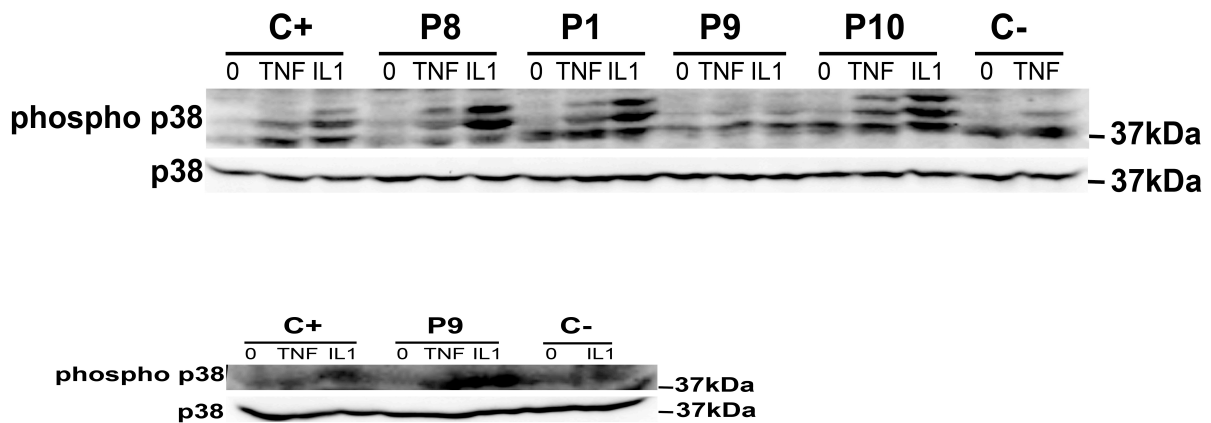


Abbildung 22: Phosphorylierung von p38 nach Aktivierung mit TNF- α

Analyse der Phosphorylierung von p38 nach Aktivierung mit TNF- α (20 ng/ml) und IL-1 β (10 ng/ml) für je 20 Minuten in SV40-transformierten Fibroblasten von einer gesunden Kontrolle C+, den Patienten P 11-P 15 und einer MyD88-defizienten Negativkontrolle C- im Western Blot. Die Darstellung der p38-Expression dient der Ladungskontrolle.

Um anschließend den gesamten NF κ B-abhängigen Signalweg zu erfassen, wurden die Zellen für 30 und 60 Minuten mit TNF- α stimuliert. Mittels eines EMSAs wurde die Translokation von NF κ B in den Zellkern und dessen Bindung an die DNA gemessen. Auch in diesem Experiment zeigt sich bei allen Patienten eine normale Translokation und DNA-Bindung von NF κ B (**Abb. 23**). Nachfolgend ist ein EMSA exemplarisch dargestellt.

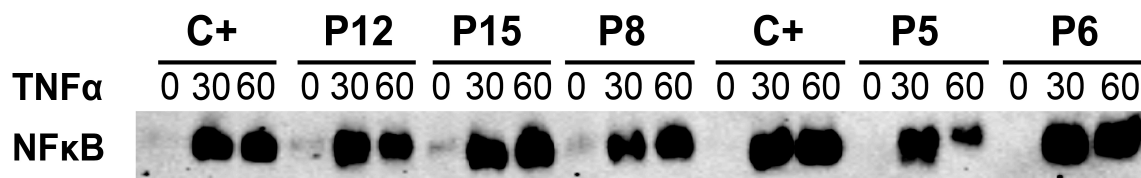


Abbildung 23: NF κ B EMSA nach Stimulation mit TNF- α

Evaluation der NF κ B Translokation in den Zellkern und Bindung an die DNA mittels EMSA in SV40-transformierten Fibroblasten einer gesunden Kontrolle (C+) und der Patienten (P 5, P 6, P 12 und P 15) nach 30- und 60- minütiger Stimulation mit TNF- α .

Zusammenfassend konnte bei keinem der sieben Patienten mit vermindertem Ansprechen auf die TNF- α Stimulation im Vollblut durch die oben beschriebenen Experimente in Fibroblastenzelllinien der immunologische Phänotyp weiter eingegrenzt werden.

5.4. Untersuchungen bei Patienten mit vermindertem Ansprechen auf die Stimulation der Toll-like- und IL-1-Rezeptor-abhängigen Signalwege

Bei 18 der 290 Patienten zeigte sich nach der Aktivierung mit Toll-like-Rezeptor-Agonisten und IL-1 β im Vollblut eine verminderte IL-6 Produktion. Das Ansprechen auf die Aktivierung wurde als vermindert gewertet, wenn die IL-6 Produktion des Patienten im Vergleich zur Tageskontrolle um eine 10er Potenz geringer lag und unterhalb der 5. Perzentile der Normwerte der Reise- und Tageskontrollen (**Tab. 10**). Auch dieser Test wurde erst bei zweimalig verminderter IL-6 Produktion als pathologisch gewertet. Bei vier der Patienten war der Test bei der Wiederholung normal. Bei neun Patienten konnte der Test nicht wiederholt werden, weil der Kontakt zum Patienten abgebrochen ist. Bei fünf Patienten zeigten sich zweimalig erniedrigte IL-6 Werte (**Tab. 11**). Drei dieser Patienten zeigten eine zweimalig sehr stark verminderte Antwort auf alle drei Stimulationen mit PAM₂CSK₄, LPS und IL-1 β . Die Stimulation mit TNF- α und anschließend gemessene IL-10 Produktion zeigten bei den Patienten keine Auffälligkeiten. Dies ließ darauf schließen, dass der Immundefekt in dem von den drei Rezeptoren IL-1R, TLR2 und TLR4 kontrollierten Signalweg, jedoch oberhalb von TRAF6 liegen müsste. Daraufhin wurden aus Granulozyten der Patienten die Gene für bekannte Immundefekte in diesem Signalweg *MyD88* und *IRAK4*, sequenziert. Bei zwei der Patienten konnten auf

beiden Allelen autosomal-rezessive Mutationen in *IRAK4* gefunden werden. Bei dem dritten Patienten fand sich auf beiden Allelen eine autosomal rezessive Mutation in *MyD88*. Bei den beiden anderen Patienten (P 38) und (P 4), die ausschließlich ein vermindertes Ansprechen auf die Stimulation von TLR2 und TLR4 zeigen, konnte bisher keine Mutation identifiziert werden (85, 86, 110, 111, Klaus Schwarz, Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Immungenetik, Ulm).

Tabelle 10: Perzentilen der mittels ELISA gemessenen IL-6 Produktion auf die IL-1 β , LPS und PAM₂CSK₄ Stimulation der Tages- und Reisekontrollen in Vollblut (n = 52)

	Tageskontrolle n	Reisekontrollen	Tageskontrollen	Reisekontrollen
IL-6	5. / 95.Perzentile	5. / 95.Perzentile	25. / 75.Perzentile	25. / 75.Perzentile
IL-1β	40 - 9155	421 - 13755	61 - 1364	1346 - 4690
LPS	4789 - 49530	1376 - 29080	13525 - 31075	5443 - 14925
PAM₂CSK₄	171 - 2495	98 - 4101	400 - 903	186 - 1202
PMA/Ionomycin	551 - 11628	215 - 4500	3030 - 6330	1236 - 3555

Mit freundlicher Genehmigung von Dr. Uwe Kölsch und Dr. med. Christian Meisel

Tabelle 11: Charakterisierung der Patienten mit zweimalig erniedrigter IL-6 Produktion im Vollblut ELISA nach Stimulation mit PAM₂CSK₄, LPS und IL-1

IL-6 ELISA/ Immilight 2x auffällig	Patient	Ge- schlecht	Alter	Infektion	Erreger	Fibro- blast- en	Diagnose
IL-6 auf PAM ₂ CSK ₄ Stimulation 2x erniedrigt	P 38	m	3 Jahre	Abszess	<i>S. aureus</i>	nein	bisher keine
IL-6 auf PAM ₂ CSK ₄ und LPS Stimulation 2x erniedrigt	P 4	m	2 Jahre	Sepsis	<i>S. pneumoniae</i>	ja	bisher keine
IL-6 auf IL-1, PAM ₂ CSK ₄ und LPS Stimulation 2x erniedrigt	P 16	m	9 Monate	Meningitis	<i>S. pneumoniae</i>	ja	Autosomal rezessiver IRAK4- Defekt
IL-6 auf IL-1, PAM ₂ CSK ₄ und LPS Stimulation 2x erniedrigt	P 17	w	6 Monate	Abszess	<i>S. aureus</i>	nein	Autosomal rezessiver IRAK4- Defekt
IL-6 auf IL-1, PAM ₂ CSK ₄ und LPS Stimulation 2x erniedrigt	P 18	m	10 Monate	Sepsis	<i>S. aureus</i>	nein	Autosomal rezessiver MyD88- Defekt

5.4.1. IRAK4-Defekt bei einem Patienten (P 16) mit Meningitis und Sepsis durch *S. pneumoniae*

Ein bis dahin gesunder, normal entwickelter, neun Monate alter Säugling, nicht konsanguiner Eltern, wurde mit Fieber bis 39,6°C, Erbrechen, Bewusstseinstörung, Krampfanfällen, Petechien, zentraler Ateminsuffizienz und dem vollständigen Verlust der Hirnstammreflexe auf die Intensivstation aufgenommen. Elf Stunden vor der stationären Aufnahme traten Fieber und Erbrechen auf. Der Verlauf war hoch akut und sehr rasch progredient. Aus dem Liquor gelang die Anzucht von *S. pneumoniae* Serotyp 15C. Auffällig war die niedrige Zellzahl von 208/μl Leukozyten bei starkem Zuckerverbrauch im Liquor, der bereits initial eine bakterielle Meningitis vermuten ließ. Die Sepsis und Meningitis wurden von einer fulminanten disseminierten intravasalen Gerinnung begleitet. Auffällig waren weiterhin trotz der schweren Erkrankung nur leicht erhöhte systemische Entzündungsparameter (Leukozyten 10,500/μl, davon 59 % neutrophile Granulozyten, 38 % Lymphozyten, 3 % Monozyten. CRP 18 mg/l). Auch in der Blutkultur konnten Pneumokokken des Serotyps 15C nachgewiesen werden. Es erfolgte eine hochdosierte antibiotische Therapie mit Cefotaxim (200 mg/kgKG/Tag) und Penicillin (500,00 IU/kgKG/Tag). Trotz der rasch eingeleiteten Therapie verstarb der Patient an einem Multiorganversagen drei Tage nach Beginn der ersten Symptome. Der fulminante Verlauf der Pneumokokkensepsis sowie die nur leicht erhöhten Entzündungsparameter ließen an einen primären Immundefekt denken. Es zeigten sich normale globale Immunglobulinspiegel (IgG, IgA, IgM), die Impfantikörper gegen Tetanus, Diphtherie und Pneumokokken waren vorhanden. Die Analyse der Lymphozytenoberflächenmarker zeigte eine normale Verteilung der T-Zellen (CD3, CD4, CD8), B-Zellen (CD19, CD20) und NK-Zellen (CD56). Eine septische Granulomatose konnte ausgeschlossen werden. Der klinische Phänotyp, die Pneumokokkensepsis und nur leicht erhöhte Entzündungsparameter deuteten auf einen Immundefekt in Toll-like- und IL-1-Rezeptor-abhängigen Signalwegen hin. Zur Überprüfung der Hypothese wurde vor Ort eine Messung des CD62L-Sheddings auf Granulozyten nach Aktivierung mit TLR-Agonsiten durchgeführt. Die Granulozyten des Patienten konnten nach der Stimulation durch PAM₂CSK₄ und LPS nicht, wie die Zellen der gesunden Kontrolle, das CD62L (L-Selektin) abwerfen (**Abb. 24**). Die Stimulation mit TNF-α verursachte bei den Granulozyten des Patienten ein normales CD62L-Shedding. Dieses Ergebnis wurde anschließend mittels eines ELISA zum

Nachweis der IL-6 Produktion in Vollblut bestätigt. Nach Stimulation mit LPS, Pam₂CSK₄ und IL-1 β fand keine IL-6 Produktion statt. Die IL-10 Produktion nach Stimulation mit TNF- α war normal (beide ELISA sind nicht abgebildet).

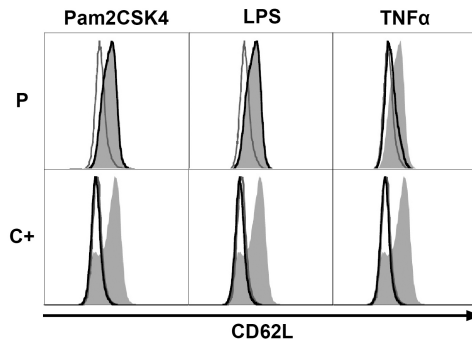


Abbildung 24: FACS-Analyse des CD62L-Sheddings auf Granulozyten

FACS Analyse des CD62L-Sheddings auf Granulozyten des Patienten (P 16=P) und einer gesunden Kontrolle (C+). Das Blut war über Nacht versendet worden. Die Stimulation erfolgte mit Pam₂CSK₄ (100 ng/ml), LPS (10 ng/ml) und TNF- α (20 ng/ml) für eine Stunde. Hellgrau dargestellt ist die Isotypkontrolle, dunkelgrau ausgefüllt die unstimulierten Zellen und schwarz die stimulierten Granulozyten. Mit freundlicher Genehmigung von Dr. Uwe Kölsch, Labor Berlin, Fachbereich Immunologie.

Daraufhin erfolgte die Sequenzierung von *IRAK4* durch Dr. Klaus Schwarz in Ulm. Im *IRAK4*-Gen fand sich die folgende compound-heterozygote Mutation: c.28_30delCAC p.Thr77del und c.877C>T p.Gln293Stop, von der die erste bisher noch nicht beschrieben worden ist (**Abb. 25**).

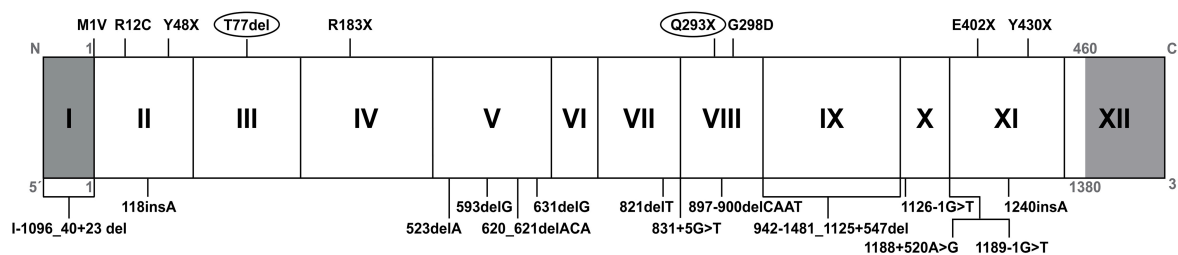


Abbildung 25: Schematische Darstellung des *IRAK4*-Gens mit bis dato identifizierten Mutationen

Das Gen besteht aus 12 Exonen, von denen Exon 1 sowie ein Teil des Exon 12 nicht kodierend sind. Die beiden Mutationen des Patienten (P 16) sind eingekreist. (Klaus Schwarz, Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Immungenetik, Ulm, 85, 87, 92-117)

Im Western Blot und in der RT-PCR in SV40-transformierten Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass diese Mutation zu einem vollständigen IRAK4-Protein- und

mRNA-Verlust führt (**Abb. 26, 28**). Der IRAK4-Proteinverlust führt dazu, dass IRAK1 weder phosphoryliert noch abgebaut werden kann (**Abb. 27**). Mit dem ELISA zum Nachweis von IL-6 nach der Stimulation mit IL-1 β in Fibroblasten konnte bestätigt werden, dass die Mutationen des Patienten zu einem vollständigen Signalverlust des IL-1R-MyD88-IRAK4-abhängigen Signalweges führt. Auch in Fibroblasten kommt es nach der Stimulation mit IL-1 β zu keiner IL-6 Produktion (**Abb. 29**) (85, 87, 92-117).

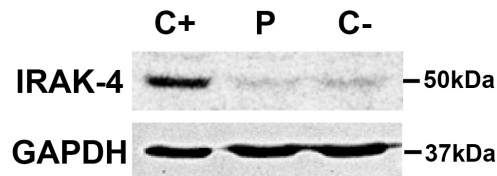


Abbildung 26: IRAK4-Expression in SV40-transformierten Fibroblasten von (P 16)

Untersuchung der IRAK4-Expression in SV40-transformierten Fibroblasten von einer gesunden Kontrolle (C+), dem Patienten (P 16=P) und einer IRAK4-defizienten Negativkontrolle (C-) im Western Blot. GAPDH dient als Ladungskontrolle.

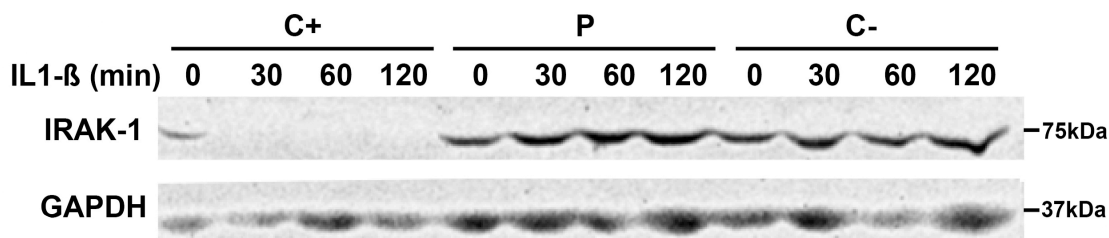


Abbildung 27: IRAK1-Abbau in SV40-transformierten Fibroblasten des Patienten (P 16)

Analyse des IRAK1-Abbau in SV40-transformierten Fibroblasten von einer gesunden Kontrolle C+, dem Patienten (P 16=P) und einer NEMO-defizienten Negativkontrolle (C-) im Western Blot. GAPDH dient als Ladungskontrolle.

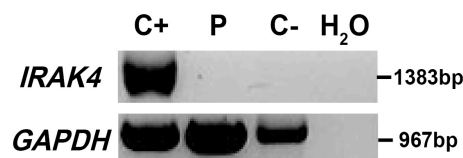


Abbildung 28: IRAK4 full-length Transkripte in SV40-transformierten Fibroblasten des Patienten (P 16)

IRAK4 full-length Transkripte in SV40-transformierten Fibroblasten von einer gesunden Kontrolle C+, dem Patienten (P 16=P) und einer IRAK4-defizienten Negativkontrolle (C-) sowie einer Wasserkontrolle (H₂O) in der RT-PCR. GAPDH dient als Ladungskontrolle.

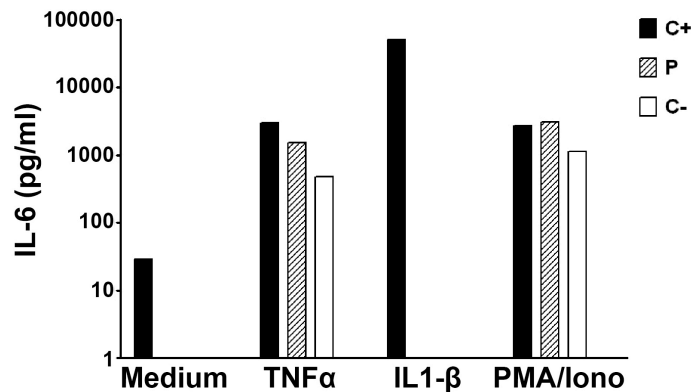


Abbildung 29: Messung der IL-6 Produktion mittels ELISA in SV40-transformierten Fibroblasten des Patienten (P 16)

Messung der IL-6 Produktion des Patienten (P 16) mittels ELISA in SV40-transformierten Fibroblasten nach Stimulation mit Medium, PMA/Ionomycin (10^{-8} M/ 10^{-6} M), TNF- α (20 ng/ml) und IL-1 β (10 ng/ml) für 24 Stunden. Ergebnis aus je zwei unabhängigen Experimenten.

5.4.2. IRAK4-Defekt bei einer Patientin (P 17) mit rezidivierenden Abszessen durch *S. aureus*

Eine bisher gesunde Patientin nicht konsanguiner Eltern erkrankte im Alter von sechs und sieben Monaten zweimalig an einem zervikalen Lymphknotenabszess. Bei beiden Ereignissen konnte *S. aureus* nachgewiesen werden. Es erfolgte die Inzision des Abszesses sowie eine intravenöse antibiotische Behandlung. Im Alter von 17 Monaten erkrankte das Mädchen an einer Pneumonie. Die Pneumonie wurde zunächst mit Cefuroxim i.v. und anschließend mit Cefuroxim p.o. behandelt. Die Patientin hat initial gut auf diese Therapie angesprochen. Eine Woche nach Ende der Therapie stellte die Patientin sich in reduziertem Allgemeinzustand, mit Fieber Tachypnoe, Husten, Hypoxämie, Bauchschmerzen und einer Hepatomegalie erneut vor. Radiologisch zeigte sich ein Pleuraempyem mit Zwerchfelldurchbruch und multiplen Leberabszessen. Zuerst erfolgte eine kalkulierte antibiotische Therapie mit Cefotaxim, Ampicillin/Sulbactam und Metronidazol. Im Pleurapunktat konnte ein nicht resistenter *S. aureus* nachgewiesen werden. Die antibiotische Therapie wurde resistenzgerecht auf Ampicillin/Sulbactam und Clindamycin umgestellt. Zusätzlich erfolgte eine empirische antimykotische Behandlung mit Itraconazol. Zwei Wochen später fanden zusätzlich zur lokalen Sanierung die rechtsseitige Dekortation der

Pleura sowie eine Lungenteilresektion statt. Die Behandlung mit Ampicillin/Sulbactam erfolgte für zwei Monate intravenös. Seit Abschluss der intravenösen Behandlung erhält die Patientin Ampicillin/Sulbactam in prophylaktischer Dosierung. Es erfolgt eine regelmäßige prophylaktische Therapie mit subkutan applizierten Immunglobulinen. In einem Beobachtungszeitraum von drei weiteren Jahren sind keine weiteren invasiven Infektionen mehr aufgetreten. Die schweren invasiven rezidivierenden Staphylokokkenabszesse sowie der anamnestisch erhobene Befund eines verspäteten Nabelschnurabfalls nach 18 Tagen deuteten auf einen primären Immundefekt der Granulozyten hin. Eine HIV Infektion, eine septische Granulomatose, ein schwerer kombinierter Immundefekt sowie ein Leukozytenadhäsionsdefekt Typ1 konnten ausgeschlossen werden. Daraufhin erfolgte die Überprüfung der NFκB-abhängigen Signalwege. Nach Stimulation mit LPS, Pam₂CSK₄ und IL-1β fand keine IL-6 Produktion der Leukozyten statt (nicht dargestellt). Die IL-10 Produktion der Zellen, nach Stimulation mit TNF-α, war grenzwertig normal. Diese Ergebnisse deuteten auf einen IL1R-MyD88-IRAK4-Signalweg-abhängigen Immundefekt hin. Es erfolgte die Sequenzierung von *MyD88* und *IRAK4* durch Dr. Klaus Schwarz (Klaus Schwarz, Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Immungenetik, Ulm). Dort konnte eine homozygote Mutation in *IRAK4* im Exon 8 c.877C>T p.Gln293Stop nachgewiesen werden (**Abb. 25**). Da dies die häufigste Mutation in *IRAK4* darstellt, deren Funktion schon hinreichend charakterisiert ist, wurde davon abgesehen, eine Fibroblastenzelllinie anzulegen und weitere funktionelle Untersuchungen durchzuführen (85, 87, 108, 111).

5.4.3. MyD88-Defekt bei einem Patienten (P 18) mit Sepsis durch *S. aureus* und *P. aeruginosa*

Der Patient (P 18) ist der erste Zwilling konsanguiner türkischer Eltern. Seine Zwillingsschwester ist gesund, ansonsten bietet die Familienanamnese keine weiteren Hinweise auf primäre Immundefekte. Bis zu seinem achten Lebensmonat hat sich der Junge regelrecht entwickelt und war bis dahin gesund. Im Alter von acht Monaten erkrankte der Patient an multifokalen Leberabszessen. In der Blutkultur konnten *S. aureus* und *Chryseobacterium indologenes* nachgewiesen werden. Im Liquor war ebenfalls *S. aureus* nachweisbar. Einen Monat später erkrankte der Junge

an einem nekrotisierenden Tonsillarabszess. Dieser entwickelte sich ebenfalls zu einer Sepsis mit Nachweis von *P. aeruginosa* in der Blutkultur. Diese zwei schweren invasiven Infektionen sowie die Konsanguinität der Eltern ließen an einen primären Immundefekt denken. Das Blutbild des Patienten zeigte Phasen einer Neutropenie sowie eine Anämie und normwertige Thrombozytenzahlen. Eine Knochenmarkpunktion wurde von den Eltern abgelehnt. Die erweiterte Immundefektdiagnostik zeigte keine Auffälligkeiten der Lymphozytenoberflächenmarker. Die globalen Immunglobulinspiegel IgM und IgA waren leicht vermindert, bei normwertigem IgG und normwertigen IgG-Subklassen. Die Bildung der Impfantikörper gegen Tetanus, *Hämophilus influenzae* und Pneumokokken war regelrecht. Des Weiteren fand sich kein Hinweis für einen Komplementdefekt. Eine septische Granulomatose konnte mittels eines oxidativen Burst Tests ausgeschlossen werden. Aufgrund der schweren invasiven Infektionen durch grampositive Erreger sowie der zeitweise bestehenden Neutropenie wurde ebenfalls an einen Immundefekt der Toll-like-, IL-1- und TNF- α -Rezeptor-abhängigen Signalwege gedacht. In unserem Labor zeigte sich dann eine fehlende IL-6 Produktion der Leukozyten nach Stimulation der Zellen mit LPS, Pam₂CSK₄ und IL-1 β in Vollblut. Die Überprüfung des TNF- α -Rezeptorsignalweges zeigte hingegen keine Auffälligkeiten. Diese Ergebnisse deuteten auf einen Immundefekt im IL1R-MyD88-IRAK4-abhängigen Signalweg hin. Daraufhin erfolgte die Sequenzierung von *IRAK4* und *MyD88* durch Klaus Schwarz (Klaus Schwarz, Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Immungenetik, Ulm). Im *MyD88* Gen fand man dabei folgende homozygote Mutation: c.1-505_328+588del1421 (**Abb. 30**). Diese Mutation ist bisher nicht beschrieben. Diese Mutation führt dazu, dass das komplette Exon 1 fehlt. Man kann vermuten, dass wahrscheinlich kein MyD88-Protein synthetisiert wird, da das Start Codon in Exon 1 liegt. Derzeit erhält der Patient eine antibiotische Dauerprophylaxe mit Ciprofloxacin, Amoxicillin und Cotrimoxazol. Unter dieser Therapie hat der Patient im Beobachtungszeitraum von einem Jahr keine weiteren invasiven Infektionen erlitten (86, 87, 108, 118).

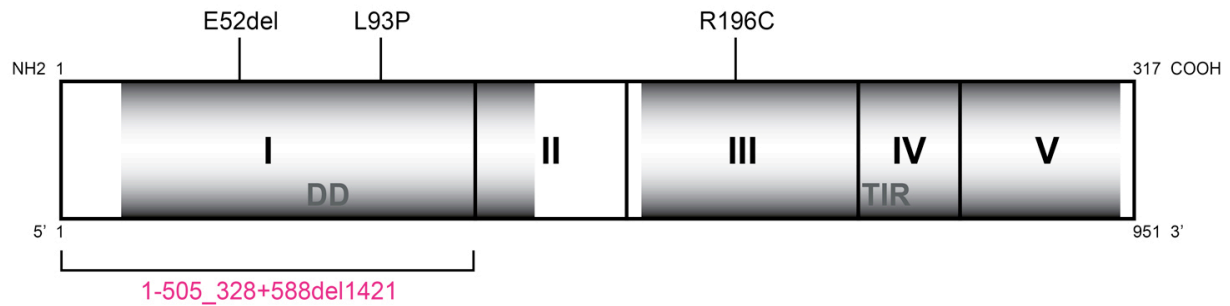


Abbildung 30: Schematische Darstellung des *MyD88*-Gens mit bis dato identifizierten Mutationen

Das Gen besteht aus fünf Exonen, von denen ein Teil des Exon eins sowie ein Teil des Exon fünf nicht kodierend sind. Die Mutation des Patienten ist in Rosa dargestellt.

5.4.4. Vermindertes Ansprechen auf die Stimulation mit PAM₂CSK₄ und LPS bei einem Patienten (P 4) mit zweimaliger Meningitis durch *S. pneumoniae*

Ein bis dahin gesundes Kind nicht konsanguiner Eltern erkrankte im Alter von zwei Jahren zweimal an einer Meningitis und Sepsis durch *S. pneumoniae*. Zwischen den beiden Ereignissen erfolgte die Pneumokokkenimpfung, welche die zweite Infektion nicht verhindern konnte. Leider ist der Serotyp der Pneumokokken nicht bekannt. Nach dem zweiten Ereignis erfolgte die Überprüfung der Toll-like-, IL-1- und TNF- α -Rezeptorsignalwege. Bei der Stimulation mit LPS in Vollblut zeigte sich bei diesem Patienten zweimalig eine stark verminderte IL-6 Antwort (**Abb. 31**). Die IL-6 Antwort auf die Stimulation mit PAM₂CSK₄ ist im Vergleich zur Kontrolle auch vermindert, dies ist jedoch nicht signifikant, da der Wert nur knapp unterhalb der 25. Perzentile für Tageskontrollen liegt. Die IL-6 Antwort auf die Stimulation mit IL-1 β und die IL-10 Antwort auf die Stimulation mit TNF- α war beide Male unauffällig.

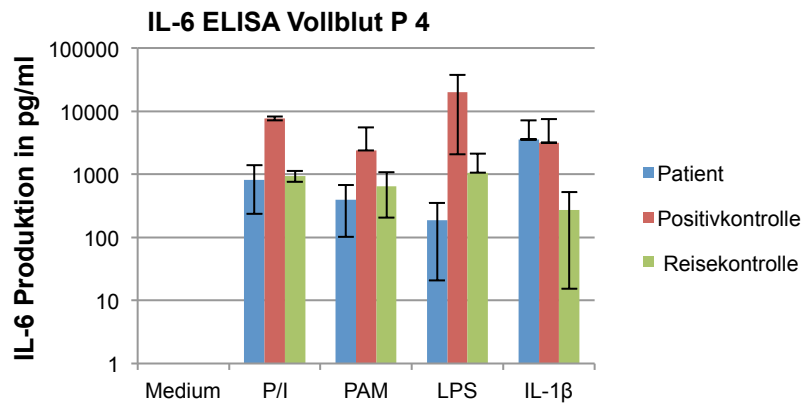


Abbildung 31: Messung der IL-6 Produktion mittels ELISA in Vollblut des Patienten (P 4)

Messung der IL-6 Produktion mittels ELISA in Vollblut nach Stimulation mit Medium, PMA/Ionomycin (10^{-8} M/ 10^{-6} M), Pam₂CSK₄ (100 ng/ml), LPS (10 ng/ml) und IL-1β (10 ng/ml) für 24 Stunden. Ergebnis aus je zwei unabhängigen Experimenten.

Daraufhin erfolgte die Anlage von SV40-transformierten Fibroblasten. Die Wiederholung des ELISA zum Nachweis von IL-6 in Fibroblasten konnte nur nach Stimulation mit TNF-α und IL-1β wiederholt werden, da uns eine Stimulation von TLR4/TLR2 in Fibroblasten mit unseren Methoden und Reagenzien nicht gelang. Die Stimulation mit TNF-α und IL-1β war unauffällig, wie auch im ELISA aus Vollblut. Eine weitere funktionelle Eingrenzung des potentiellen Immundefekts in Fibroblasten ist daher nicht möglich. MAL/TIRAP stellt ein gemeinsames Adaptarprotein für TLR2 und TLR4 dar. Bei diesen beiden TLRs ist MAL/TIRAP notwendig, um MyD88 zu rekrutieren. Es wurde eine genomische PCR der drei Exone von *MAL/TIRAP* durchgeführt, anschließend erfolgte die Sequenzierung des PCR-Produkts. In keinem der drei Exone konnte eine Mutation gefunden werden. In Exon 2 fand sich lediglich ein heterozygoter bekannter Polymorphismus an Position 164 G>A. Dies führt zu einem Aminosäureaustausch an Position 55 von Serin zu Asparagin. Da es sich um einen bekannten Polymorphismus handelt, ist dies nicht als krankheitsauslösend zu werten.

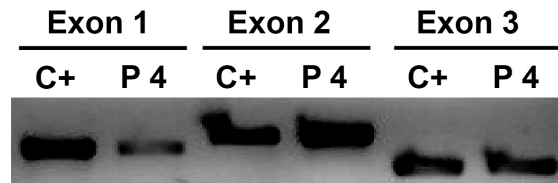


Abbildung 32: Genomische PCR von *MAL/TIRAP* des Patienten (P 4)

MAL/TIRAP genomische PCR der Exone 1-3 in SV40-transformierten Fibroblasten von einer gesunden Kontrolle (C+) und dem Patienten (P 4).

Die Ursache für den immunologischen und den klinischen Phänotyp bleibt weiterhin ungeklärt. Die genaue Untersuchung aller Adapterproteine steht noch aus. Mittlerweile ist der Patient an einer unbekannten Ursache verstorben.

5.4.5. Vermindertes Ansprechen auf die Stimulation mit PAM_2CSK_4 bei einem Patienten (P 38) mit rezidivierenden Abszessen durch *S. aureus*

Ein bis dahin gesunder Patient, dessen Eltern nicht konsanguin sind, erkrankte im Alter von zwei Jahren an rezidivierenden Abszessen in denen *S. aureus* nachgewiesen werden konnte. Bei dem Patienten (P 38) zeigte sich auf die Stimulation mit Pam_2CSK_4 im Vollblut dreimalig eine verminderte IL-6 Produktion im Vergleich zur Tageskontrolle (**Abb. 33**). Auch hier handelt es sich nur um einen Trend, da die Verminderung weniger als eine 10er Potenz darstellt und der Wert sich zwischen der 25. Und 50. Perzentile für Tageskontrollen bewegt. Die IL-6 Produktion nach Stimulation mit IL-1 β und LPS war hingegen unauffällig. Auch die IL-10 Produktion nach Stimulation mit TNF- α war normal. Dies lässt vermuten, dass bei diesem Patienten ein isolierter Defekt des TLR2 vorliegt. Diese Vermutung konnte bisher jedoch noch nicht weiter untersucht werden.

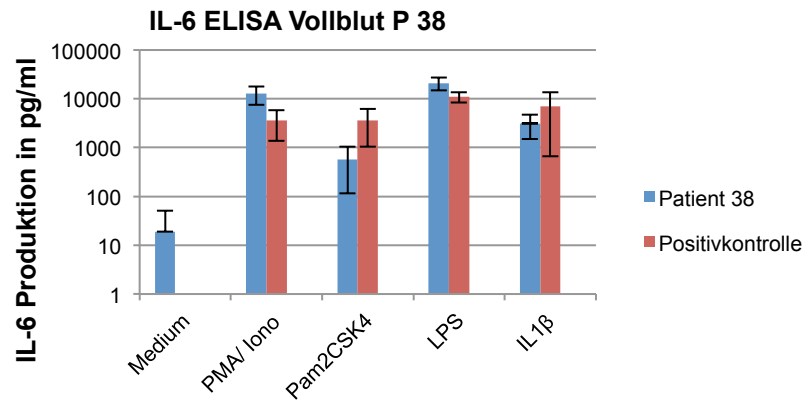


Abbildung 33: Messung der IL-6 Produktion mittels ELISA in Vollblut bei dem Patienten (P 38)

Messung der IL-6 Produktion mittels ELISA in Vollblut nach Stimulation mit Medium, PMA/Ionomycin (10^{-8} M/ 10^{-6} M), Pam₂CSK₄ (100 ng/ml), LPS (10 ng/ml) und IL-1β (10 ng/ml) für 48 Stunden. Ergebnis aus je drei unabhängigen Experimenten.

6. Diskussion

6.1. Untersuchungen auf Defekte in TNF- α -Rezeptor-abhängigen Signalwegen

6.1.1. NEMO-Defekt bei einem Patienten mit invasiven Infektionen durch *S. pneumoniae* – deutlich verminderte IL-10 Produktion nach Stimulation mit TNF- α

X-chromosomal rezessiv vererbte Mutationen im NEMO-Gen können abhängig von der zugrunde liegenden Mutation zu einer Ektodermalen Dysplasie mit Lymphödemen, Osteopetrose und Immundefekt (XR-OL-EDA-ID), zu einer Ektodermalen Dysplasie mit Immundefekt (XR-EDA-ID) oder zu einem isolierten Immundefekt (XR-ID) führen (32, 88, 99, 120-122). Die Ausprägung des Immundefekts reicht von invasiven bakteriellen Infektionen mit *S. aureus*, *S. pneumoniae* und *H. influenzae* über Infektionen mit Mykobakterien bis zu viralen Infektionen mit HSV-1 (32, 54, 55, 99, 120-122). Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein Patient (P 21) identifiziert werden, der mit großer Wahrscheinlichkeit an einem NEMO-Defekt leidet. Der klinische und der immunologische Phänotyp sowie die nachgewiesene Mutation im NEMO-Gen sind sehr suggestiv für einen NEMO-Defekt. Weitere Hinweise, dass die Mutation im NEMO-Gen die bei diesem Patienten vorliegt, krankheitsauslösend ist hätten die folgenden Experimente liefern können: Messung des I κ B α -Abbau nach Stimulation mit TNF- α mittels Western Blot in Fibroblasten (Bei eingeschränkter Funktion des NEMO Proteins könnte I κ B α nicht regelrecht abgebaut werden). Messung der Translokation von NF κ B in den Zellkern nach Stimulation mit TNF- α , mittels EMSA (Bei eingeschränkter Funktion von NEMO wäre die Translokation eingeschränkt). Der Beweis, dass es sich hier um die krankheitsauslösende Mutation handelt, kann jedoch nur durch ein Komplementierungsexperiment erfolgen. Dazu müsste das Wild Typ NEMO-Gen in die Fibroblasten des Patienten transfiziert werden. Die Wiederholung der oben genannten funktionellen Experimente sollte dann in den komplementierten Patientenzellen regelrechte Befunde zeigen. Diese Beweisführung war jedoch bei dem Patienten nicht möglich, da eine Hautbiopsie zur Anlage einer Fibroblastenkultur durch die Eltern abgelehnt worden ist. Bei dem Patienten besteht

eine milde ektodermale Dysplasie (XR-EDA-ID). Nach der Stimulation von Vollblut mit TNF- α zeigte sich eine deutlich verminderte IL-10 Produktion, wohingegen die IL-6 Produktion nach der Stimulation mit Agonisten der TLRs und mit IL-1 β nicht vermindert gewesen ist. Der Patient litt zweimalig an einer invasiven Pneumokokkeninfektion. Es zeigten sich fehlende Pneumokokkenantikörper. Es ist bekannt, dass spezifische Antikörper für die Abwehr von Pneumokokken essentiell sind (54). Bei 72 % der NEMO-defizienten Patienten, wie auch beim Patienten (P 21), finden sich trotz Impfung oder durchgemachter Pneumokokkeninfektion keine Pneumokokkenantikörper (32, 99, 122). Bustamante und Picard et. al. stellen die Hypothese auf, dass die invasiven Pneumokokkeninfektionen, die bei NEMO-defizienten Patienten auftreten, teilweise durch die eingeschränkte Signalübertragung über den TIR Signalweg verursacht werden, da auch bei IRAK4- und MyD88-defizienten Patienten invasive Pneumokokkeninfektionen auftreten (32, 130). Diese Hypothese kann jedoch bei unserem Patienten nicht bestätigt werden, da die Signalübertragung über den TIR Signalweg in vitro nicht eingeschränkt gewesen ist. Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen IRAK4-/MyD88-defizienten Patienten zeigte sich bei diesem Patienten im Rahmen der invasiven Infektion eine starke Akut-Phase Antwort. Diese Tatsache deutet daraufhin, dass dem gleichen infektiologischen Phänotyp unterschiedliche Pathomechanismen zugrunde liegen. Weiterer Forschungsbedarf besteht in einer detaillierteren Beschreibung und der Korrelation zwischen klinischem, immunologischem und genetischem Phänotyp bei Patienten mit Mutationen im *NEMO*-Gen, um das Risiko für Infektionen abschätzen und die Therapieoptionen individuell anpassen zu können (122).

6.1.2. Vermindertes Ansprechen auf die Stimulation mit TNF- α bei Patienten ohne eindeutigen immunologischen Phänotyp

Durch die Voruntersuchungen auf Immundefekte in NF κ B-abhängigen Signalwegen konnten 23 Patienten mit einer wiederholt verminderten IL-10 Antwort auf die Stimulation mit TNF- α im Vollblut identifiziert werden. Nur bei einem Patienten gelang die Sicherung der molekulargenetischen Diagnose eines NEMO-Defekts. Bei sieben der 22 anderen Patienten wurde der NF κ B-abhängige Signalweg durch funktionelle Experimente genauer untersucht und eingegrenzt. Bei allen Patienten zeigte sich eine regelrechte NEMO-Expression im Western Blot. Diese Untersuchung hat jedoch

nur bei einem fehlenden Protein einen zuverlässigen negativen prädiktiven Wert, da hypomorphe Mutationen mit einer hohen Proteinrestexpression mit eingeschränkter Funktion, wie auch bei unserem Patienten (P 21) vorhanden, auf diese Weise nicht erkannt werden können (32, 122, 131). Eine sinnvolle Untersuchung zum Ausschluss eines NEMO-Defekts wäre daher die RT-PCR des *NEMO*-Gens und die anschließende Sequenzierung. Diese ist jedoch sehr aufwändig, da *NEMO* auf RNA-Ebene in vier Isoformen vorliegt. (46-48, 131). Ein weiterer, bisher beschriebener Immundefekt in NFκB-abhängigen Signalwegen ist der IκBα-Defekt. IκBα zeigt bei diesem Defekt eine hypermorphe Expression und kann nach der Stimulation mit TNF-α nicht vollständig abgebaut werden (32, 89). Als Experiment zur Überprüfung der Funktion von NEMO und IκBα wurde der IκBα-Abbau nach der Stimulation mit TNF-α nach 30 und 60 Minuten gemessen. Hier zeigten alle Patienten einen regelrechten IκBα-Abbau.

Es stellt sich die Frage, warum über diesen Signalweg wiederholt bei den Patienten eine verminderte Sekretion von Zytokinen zu messen ist, es jedoch nicht gelang, die eingeschränkte Signalübertragung näher zu charakterisieren. Eine Möglichkeit könnte die unterschiedliche Kinetik darstellen. NFκB oszilliert zwischen Zellkern und Zytoplasma (36, 132, 133). Es besteht die Annahme, dass durch das oszillierende Verhalten von NFκB die Transkription von Zielgenen beeinflusst wird, welches die Anzahl, die Dauer und die Amplitude der NFκB Oszillationen bestimmt. Es ist vorstellbar, dass eine veränderte Oszillation zu einer verminderten Zytokinproduktion führt. In den funktionellen Experimenten wurden der IκBα-Abbau sowie die Translokation von NFκB nur nach 30 und 60 Minuten detektiert. Die Zytokine werden jedoch nach einer 48-stündigen Stimulation gemessen. Hoffmann et al. beschreiben, dass IκBα für das negative Feedback von NFκB zuständig ist. Die beiden IκB Proteine β und ε reduzieren die Oszillation und stabilisieren NFκB bei längeren Stimulationen im Zellkern (36, 132, 133). Eine sinnvolle Ergänzung der funktionellen Experimente wären daher eine längere Kinetik der Stimulation mit TNF-α für den NFκB-EMSA sowie die Messung des IκB-β- und -ε-Abbaus im Western Blot. Es ist vorstellbar, dass ein Defekt in einem dieser Proteine zu einer verminderten Zytokinproduktion über einen längeren Zeitraum, aber zu einer normalen NFκB-Translokation bei einer kurzen Kinetik führt.

6.1.3. Überlegungen zum Stellenwert von *ex vivo* Diagnostik TNF- α -Rezeptor-abhängiger Signalwege zur Identifizierung von Defekten in NEMO-kontrollierten Signalwegen

Für die Untersuchungen auf Immundefekte des von NEMO-kontrollierten, NF κ B-abhängigen Signalwegs stellt die Stimulation mit TNF- α und die anschließende IL-10 Messung die bisher einzige, jedoch wenig zuverlässige Screeningmethode dar (79). Bei Patienten mit einem Defekt in NEMO-I κ B α -NF κ B-abhängigen Signalwegen ist die Signalübertragung über den TNF- α -Rezeptor in der von Hanson et al. untersuchten Kohorte bei 82 % der Patienten eingeschränkt. Nur 64 % der Patienten zeigen in dieser Kohorte eine eingeschränkte Signalübertragung über die Toll-like-Rezeptorsignalwege (122). Im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit konnte mittels verminderter IL-10 Produktion nach Stimulation mit TNF- α , ein Patient mit einem NEMO-Defekt identifiziert werden. Bei diesem Patienten zeigte sich im Vollblut eine stark verminderte IL-10 Produktion nach der Stimulation mit TNF- α . In der hier vorgelegten Arbeit wurde die Grenze bei einem IL-10 Nachweis von 20 pg/ml gesetzt. Diese Grenze stellt den Mittelwert der 5. Perzentile der Tages- und Reisekontrollen dar. Die Spezifität dieses Tests ist nicht besonders hoch. Bei 26 der Patienten mit einem zuerst auffälligen Ergebnis war der Test bei der Wiederholung normwertig. Einige der gesunden Kontrollpersonen zeigten ebenfalls eine verminderte IL-10 Produktion. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass diese Untersuchungsmethode sich nicht für die Identifikation von allen NEMO-/IKK1-/IKK2-/NF κ B-abhängigen Immundefekten eignet (91, 122). Bei dem von Pannicke et al. beschriebenen IKK2-Defekt fand sich keine eingeschränkte IL-6 Produktion als Antwort auf die Stimulation mit TNF- α (91). Bei der Diagnose von NEMO-NF κ B-abhängigen Immundefekten spielt weiterhin die klinische Zusammenschau aller Befunde eine herausragende Rolle. Insbesondere da der infektiologische Phänotyp nicht immer wegweisend ist, helfen weitere Charakteristika, wie eine ektodermale Dysplasie und das Fehlen von polysaccharidspezifischen Antikörpern, bei der Diagnosefindung weiter (122).

6.2. Untersuchungen auf Defekte in TL- und IL-1-Rezeptor-abhängigen Signalwegen

6.2.1. Fehlende Zytokinproduktion nach Stimulation mit TL-Agonisten und IL-1 β bei Patienten mit vollständigem MyD88- und IRAK4-Defekt – Bedeutung der Akut-Phase Reaktion für die Abwehr von Pneumokokken, Staphylokokken und anderen Erregern

6.2.1.1. Fehlende Zytokinproduktion nach Stimulation mit TL-Agonisten und IL-1 β bei Patienten mit vollständigem MyD88- und IRAK4-Defekt

Sowohl beim vollständigen IRAK4- als auch beim vollständigen MyD88-Defekt begünstigen die fehlende Signalübertragung innerhalb der von kanonischen Toll-like- und IL-1-Rezeptoren kontrollierten Signalwege invasive Infektionen durch *S. aureus*, *S. pneumoniae* und *P. aeruginosa*, aber auch durch andere Gram-positive und Gram-negative Bakterien (32, 85-87, 92-118). Nach der Aktivierung dieser Signalwege mit Pam₂CSK₄ (TLR1/2), LPS (TLR4) und IL-1 β (IL-1R) wird bei diesen Defekten kein IL-6 gebildet (32, 85-87, 92-118). Im Rahmen dieser Arbeit konnten zwei Patienten mit einem vollständigen IRAK4- und ein Patient mit einem vollständigen MyD88-Defekt identifiziert werden (110, 111). Der klinische Phänotyp dieser Patienten, bei dem die invasiven Infektionen mit *S. aureus*, *S. pneumoniae* und *P. aeruginosa* dominieren, entspricht dem der von Picard et al. beschriebenen Kohorte (87). Der klinische Phänotyp der drei hier beschriebenen Patienten bestätigt, dass die MyD88-IRAK4-kontrollierten Signalwege eine entscheidende Rolle bei der Immunabwehr von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien spielen. Offen bleibt zum jetzigen Zeitpunkt, ob die beobachtete selektive Anfälligkeit für invasive bakterielle Infektionen auf die fehlende Signalübertragung der TLR, der IL-1R oder beider Rezeptorgruppen zurückzuführen ist. Offen bleibt auch, ob bei anderer Exposition innerhalb der natürlichen Umgebung des Wirtes vermehrt andere Erreger auftreten würden (108).

6.2.1.2. Fehlende Zytokinproduktion nach Stimulation mit Toll-like-Agonisten und IL-1 β bei Patienten mit vollständigem MyD88- und IRAK4-Defekt – Bedeutung der Akut-Phase Reaktion für die Abwehr von Pneumokokken

Die besondere selektive Anfälligkeit für bakterielle Infektionen zeigt sich auch *in vitro*. Nach der Stimulation mit Pneumokokken zeigten die Zellen dieser Patienten im Vollblut, im Gegensatz zur gesunden Kontrolle, keine IL-6 Produktion. Dies könnte darauf hinweisen, dass die IRAK-4-abhängige IL-6 Produktion eine Rolle spielt. Ein Gegenargument wäre jedoch, dass auch bei vielen gesunden Kontrollpersonen keine IL-6 Antwort nach der Stimulation mit Pneumokokken zu messen ist. Eine Erklärung könnte die fehlende Validität der Methode mit einem sehr niedrigen positiven prädiktiven Wert sein. Um dies zu überprüfen sollten die Proben derselben gesunden Kontrollpersonen jeweils frisch und gereist an mehreren Tagen abgenommen und an mehreren Tagen untersucht werden. Werden so stark abweichende Ergebnisse detektiert, liegt das Problem in der Validität der Methode und nicht daran, dass die IL-6 Produktion als Antwort auf eine Stimulation mit Pneumokokken auf die Signalweiterleitung der TLRs und/oder IL-1Rs über MyD88 und IRAK-4 zumindest innerhalb der ersten 48h nicht essentiell angewiesen ist. Die publizierten fulminanten Verläufe invasiver bakterieller Infektionen bei Patienten mit vollständigem IRAK4- oder MyD88-Defekt in den ersten 48 Stunden einer Infektion (32, 85-87, 92-118) und auch der von uns post mortem identifizierte Patient mit IRAK4-Defekt (110) belegen darüber hinaus, dass die frühe Zytokinproduktion nach TLR/IL-1R Aktivierung für die Abwehr bakterieller Erreger kaum und für die Abwehr von Pneumokokken vermutlich gar nicht ersetzt werden kann. 67 % aller Todesfälle bei IRAK4-/MyD88-defizienten Patienten in der bisher größten publizierten Kohorte gehen auf invasive Pneumokokkeninfektionen zurück (87). Der im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Patient unterstreicht, dass bei einer Pneumokokkenmeningitis immer auch an einen IRAK4- oder MyD88-Defekt gedacht werden sollte (87, 93, 99, 101, 108-110,112, 118).

6.2.1.3. Fehlende Zytokinproduktion nach Stimulation mit TL-Agonisten und IL-1 β bei Patienten mit vollständigem MyD88- und IRAK4-Defekt – Bedeutung der Akut-Phase Reaktion für die Abwehr von Staphylokokken

Es erscheint sehr wahrscheinlich, dass für die Abwehr von Staphylokokken die frühe Akut-Phase Reaktion, insbesondere die Produktion von IL-6, essentiell ist. Zum Einen sind invasive und oberflächliche Staphylokokkeninfektionen nach invasiven Pneumokokkeninfektionen die häufigsten, bei Patienten mit IRAK4- und MyD88-Defekt beobachteten Infektionen (85-87, 100, 104, 108, 111, 118). Zum Anderen sind Staphylokokkeninfektionen das führende infektiologische Problem bei Patienten mit autosomal dominantem Hyper IgE Syndrom (66-69). Bei dem autosomal dominanten Hyper IgE Syndrom findet aufgrund einer Mutation in *STAT3* eine eingeschränkte Aktivierung der Granulozyten durch IL-6 statt, da *STAT3* für die Signaltransduktion des IL-6R essentiell ist. Es ist naheliegend, dass die verminderte Wirkung von IL-6 daher auch bei dem Hyper IgE Syndrom Staphylokokkeninfektionen begünstigt (66-69). Einen weiteren Hinweis auf die Relevanz von IL-6 bei der Abwehr von Staphylokokken liefert die Beschreibung eines haitianischen Patienten mit IL-6 Autoantikörpern und zwei Episoden von invasiven Staphylokokkenhautabszessen (134). Diese Beobachtung ist jedoch nicht beweisend für die essentielle Rolle der IL-6 Autoantikörper, da auch in einer Kohorte von gesunden Blutspendern in 0,1 % der Fälle IL-6 Autoantikörper gefunden werden konnten (135). Durch eine Ergänzung der Voruntersuchungen um eine Stimulation mit Staphylokokken könnte bei IRAK4- und MyD88-defizienten Patienten gezeigt werden, dass die IL-6 Produktion bei diesen Immundefekten auch nach Staphylokokkenstimulation eingeschränkt ist. Dies würde für die Relevanz dieser Signalwege für die Abwehr von Staphylokokken sprechen. Einen weiteren Hinweis für die Relevanz von IL-6 bei der Staphylokokkenabwehr würde die Identifikation eines Patienten mit IL-6-Rezeptordefekt und invasiven Staphylokokkeninfektionen liefern. Hierfür könnte man Vollblut dieser Patienten mit IL-6 stimulieren und die *STAT3* Phosphorylierung *in vitro* messen.

6.2.2. IRAK4-Defekt bei einem Patienten (P 16) mit Meningitis und Sepsis durch *S. pneumoniae*

Der hoch akute und tödliche Verlauf einer Meningitis und Sepsis, verursacht durch *S. pneumoniae*, bei einem bis dato gesunden neun Monate alten Säugling unterstreicht die Bedeutung der schnellen Diagnosestellung eines Immundefekts der angeborenen Immunität. Anhand dieses Patienten konnte gezeigt werden, dass die Messung des CD62L-Sheddings auf Granulozyten nach Stimulation mit TLR-Agonisten (CD62L-Sheddingtest) auch bei einem sich in einer Sepsis befindenden Patienten eine zuverlässige Methode zur Diagnose eines IRAK4-Defekts darstellt (85, 87, 110, 129). Die Diagnose eines Immundefekts des TLR-MyD88-IRAK4-abhängigen Signalwegs konnte bei dem Patienten (P 16) zwölf Stunden nach der Aufnahme auf die Intensivstation durch den Nachweis eines fehlenden CD62L-Shedding auf Granulozyten gesichert werden (110). Die Diagnose wurde anschließend durch Nachweis einer fehlenden IL-6 Produktion im Vollblutüberstand nach Stimulation mit TLR-Agonisten und IL-1 β mittels ELISAs bestätigt. Die Sequenzierung des *IRAK4* Gens sicherte später die Diagnose eines IRAK4-Defekts. Der vollständig fehlende Abbau von IRAK1 konnte diese Mutationen als amorphe Mutationen ohne Restfunktion charakterisieren. Der große Vorteil des CD62L-Sheddingtests besteht in der schnelleren Durchführbarkeit, verglichen mit dem drei Tage dauernden Nachweis der IL-6 Produktion mittels ELISA aus Vollblutüberstand des Patienten (79, 129). Die Diskrepanz zwischen fulminanter Sepsis / Meningitis und niedrigen Akut-Phase Parametern führte hier zu der korrekten klinischen Einschätzung des Patienten (110).

6.2.3. Vermindertes Ansprechen auf die Stimulation mit PAM₂CSK₄ und LPS bei einem Patienten mit zweimaliger Meningitis durch *S. pneumoniae*

Ein isoliertes, nicht vorhandenes Ansprechen auf die Stimulation von TLR2 und TLR4 könnte in einer Mutation des *MAL/TIRAP*-Gens begründet liegen (136). Bei einem Patienten, der im Alter von zwei Jahren zweimal an einer Pneumokokkenmeningitis und Pneumokokkensepsis erkrankte, fand sich ein zweimalig vermindertes Ansprechen auf die Stimulation der Toll-like-Rezeptoren TLR2 und TLR4 mit PAM₂CSK₄ und LPS. Die IL-6 Produktion nach der Stimulation mit IL-1 β sowie die IL-10 Produktion nach der Stimulation mit TNF- α waren hingegen

normal. Diese Ergebnisse schließen mit großer Wahrscheinlichkeit einen MyD88-, IRAK4-, NEMO- und I κ B α -Defekt aus. Das MAL/TIRAP Protein rekrutiert MyD88 zu TLR2 und TLR4 (29, 30, 32). Es ist also vorstellbar, dass eine Mutation zu einem selektiven Nichtansprechen auf die Stimulation dieser zwei Rezeptoren führen kann. Die Sequenzierung der drei Exone des Gens des Patienten konnte keine Mutation nachweisen. Um diesen Defekt auszuschließen wäre es daher hilfreich, das gesamte Gen zu sequenzieren. Ein weiterer Schritt wäre auch der Nachweis der MAL/TIRAP-Proteinexpression mittels Western Blot. Des Weiteren können auch andere Gene mutiert sein und zu diesem klinischen und immunologischen Phänotyp führen. Lee et al. beschreiben, dass CD36 und CD14 wichtige Kofaktoren für viele Toll-like-Rezeptoren, unter anderem auch für TLR2 und TLR4, darstellen. Die Proteine Glukose reguliertes Protein 94 (GRP94) und Protein assoziiert mit TLR 4 (PRAT4A) stellen für die korrekte Faltung der Toll-like Rezeptoren 1, 2, 4 und 9 essentielle Chaperone dar. Für die Aktivierung des IL-1-Rezeptors scheinen diese Proteine keine Rolle zu spielen (137). Nach Ausschluss eines MAL/TIRAP-Defekts sollten diese Proteine bzw. Gene näher untersucht werden.

6.2.4. Vermindertes Ansprechen auf die Stimulation mit PAM₂CSK₄ bei einem Patienten mit rezidivierenden Abszessen durch *S. aureus*

Der TLR2-Signalweg könnte eine Rolle bei der Pathogenese von invasiven Staphylokokkeninfektionen spielen. Ein bis dato gesunder zweijähriger Junge erkrankte an rezidivierenden Staphylokokkenabszessen. Im Vollblut dieses Patienten konnte dreimalig ein isoliert vermindertes Ansprechen auf die Stimulation von TLR2 mit Pam₂CSK₄ gemessen werden. Die IL-6 Produktion nach der Stimulation mit LPS und IL-1 β und die IL-10 Produktion nach der Stimulation mit TNF- α waren hingegen nicht vermindert. Im Jahr 2000 fanden Lorenz et al. eine Korrelation von dem *TLR2* Polymorphismus Arg753Gln und invasiven Staphylokokkeninfektionen. Dieses Ergebnis stützt sich jedoch nur auf zwei Patienten (138). Lorenz et al. vermuteten daher, dass eine Mutation in *TLR2* zu lebensbedrohlichen Staphylokokkeninfektionen führen könnte. Die Korrelation des Polymorphismus Arg753Gln mit invasiven Staphylokokkeninfektionen konnte von Moore et al. nicht bestätigt werden (139). *In vitro* Experimente zeigten eine normale Aktivierung von heterozygoten *TLR2* Polymorphismen durch Lipoteichonsäure (140). Zusammenfassend deuten diese

Ergebnisse darauf hin, dass heterozygote Polymorphismen keinen Einfluss auf die Pathogenese von invasiven Staphylokokkeninfektionen haben. Die wichtigen Virulenzfaktoren der Staphylokokken Lipoteichonsäure, Lipoproteine und Peptidoglykane werden von TLR2 erkannt. Daher ist es vorstellbar, dass durch eine homozygote Mutation im *TLR2*-Gen eine deutlich abgeschwächte Zytokinproduktion zu einer Anfälligkeit für invasive Staphylokokkeninfektionen führen kann. Bubeck Wardenburg et al. konnten zeigen, dass Lipoprotein-defiziente Staphylokokken im Mausmodell letale Infektionen mit disseminierter Abszessformation auslösen (141). Zur Überprüfung dieser Hypothese sollte das *TLR2* Gen sequenziert werden. Eine Mutation im *TLR2*-Gen würde erstmals Rückschlüsse auf die Relevanz von TLR2 bei der Staphylokokkenabwehr beim Menschen erlauben. Bisher gilt die weit verbreitete Hypothese der Redundanz der oberflächlichen Toll-like-Rezeptoren (24). Die Identifikation einer isolierten TLR2-Defizienz könnte somit neue Erkenntnisse bringen.

6.2.5. Voruntersuchungen auf Defekte in Toll-like- und IL-1-Rezeptor-abhängigen Signalwegen

Die Untersuchungen auf eine eingeschränkte Signalweiterleitung im Bereich der Toll-like-, IL-1- und TNF- α -Rezeptoren mittels ELISA ist eine einfache und schnelle Möglichkeit, diese Immundefekte immunologisch phänotypisch zu identifizieren. Die Stimulation der Zellen mit Pam₂CSK₄, LPS und IL-1 β und anschließende Messung von IL-6 weist eine hohe Sensitivität und Spezifität für die Entdeckung von Immundefekten im Bereich der Signaltransduktion der Toll-like- und IL-1-Rezeptoren auf. Bei den drei im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Patienten mit MyD88- und IRAK4-Defizienz sowie bei allen in der Literatur beschriebenen Patienten ist in den Zellen der Patienten im Vergleich zu den Zellen gesunder Kontrollpersonen nach der oben genannten Stimulation eine sehr stark verminderte IL-6 Produktion messbar (32, 85-87, 92-118). Für die bisher bekannten Immundefekte in IRAK4 und MyD88 besteht eine hohe Sensitivität dieser Untersuchungsmethode. Bei keiner der 290 Kontrollen konnte eine stark verminderte IL-6 Produktion auf die oben genannte Stimulation gemessen werden. Dieses Ergebnis spricht für eine sehr hohe Spezifität. Diese Methode ist für die Voruntersuchung auf MyD88- und IRAK4-Defekte so

zuverlässig, da es keine parallelen Signalwege gibt und bisher nur amorphe Mutationen beschrieben worden sind (32, 85-87, 92-118).

6.3. Schlussfolgerung und Ausblick

Diese Arbeit prüft die Hypothese, ob invasive Pneumokokken- und Staphylokokkeninfektionen keine idiopathischen Infektionen darstellen, sondern Zeichen eines primären Immundefekts sein können. Diese Hypothese konnte durch die Identifikation von vier Patienten mit einem Immundefekt in den von Toll-like, IL-1 und TNF- α Rezeptor kontrollierten Signalwegen bestätigt werden. Bei den zwei weiteren Patienten mit einer verminderten Antwort auf die Stimulation mit Pam₂CSK₄ (TLR2) und LPS (TLR4) besteht der hochgradige Verdacht auf einen bisher nicht bekannten Immundefekt in den oben genannten Signalwegen. Die Identifikation des Patienten mit NEMO-Defekt unterstützt die Hypothese, dass auch bei dem isolierten infektiologischen Phänotyp der invasiven Pneumokokkeninfektion an einen Immundefekt der angeborenen Immunität zu denken ist. In der von Gaschignard et al. beschriebenen Kohorte konnte von 127 Patienten mit invasiven Pneumokokkeninfektionen nur ein Patient mit einem Immundefekt in den von Toll-like-, IL-1- und TNF- α -Rezeptor kontrollierten Signalwegen, einem MyD88-Defekt, beschrieben werden (55). Im Vergleich war unsere Kohorte jedoch konservativer, da bereits andere Immundefekte als Ursache für die invasiven Infektionen ausgeschlossen wurden. Insgesamt konnten in unserer Kohorte jedoch nur bei 93 von 290 Patienten kulturell Staphylokokken oder Pneumokokken nachgewiesen werden. Bei allen oben genannten identifizierten Patienten mit primärem Immundefekt fand sich ein kultureller Erregernachweis. Es scheint daher effizienter ausschließlich bei Patienten mit dem kulturellen Erregernachweis nach Immundefekten in Toll-like-, IL-1- und TNF- α -Rezeptor kontrollierten Signalwegen zu suchen. In einem zweiten Schritt sollte der infektiologische Phänotyp sich nicht nur auf invasive Pneumokokken- und Staphylokokkeninfektionen beziehen, sondern allgemein auf invasive Infektionen mit kulturellem Erregernachweis. Wie oben erwähnt könnte eine andere infektiologische Umgebung zu einem anderen infektiologischen Phänotyp führen (108).

Um die Hypothese, dass invasiven Pneumokokken und Staphylokokkeninfektionen primäre Immundefekte zugrunde liegen, darüber hinaus weiter zu stützen, bestand

ein weiteres Ziel dieser Arbeit darin, neue genetische Ursachen für invasive Staphylokokken- und Pneumokokkeninfektionen im Kindes- und Jugendalter zu identifizieren. Im Rahmen dieser Arbeit konnten lediglich neue Mutationen in bereits bekannten Immundefizienzgenen identifiziert werden (P 16, P 18 und P 21). Es ist vorstellbar, dass die im Rahmen dieser Arbeit angewandten Methoden nicht sensitiv genug sind für die Identifikation von hypomorphen Mutationen, die andere Gene in den Toll-like-, IL-1- und TNF- α -Rezeptor-kontrollierten Signalwegen betreffen. Zur gezielteren Diagnostik könnte ein Sequenzierungschip mit den Genen für alle Adaptormoleküle und alle bekannten Moleküle der von TLR und IL-1R kontrollierten Signalwege angewendet werden. Dieser umfasst dann gut bekannte Immundefizienzgene, wie beispielsweise *IRAK4* und *MyD88*, aber auch potentielle Adaptormoleküle, die bei einer Mutation zu dem klinischen Phänotyp der invasiven pyogenen Infektionen führen könnten (32, 85-87, 108). Hier wäre beispielsweise das *MAL/TIRAP*-Gen von großem Interesse (136). Ein weiterer Schritt wäre dann bereits in der diagnostisch unklaren Situation, bei invasiven Pneumokokken- und Staphylokokkeninfektionen, die Sequenzierung des gesamten Exoms oder der des ganzen Genoms zu veranlassen (142).

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Diagnostik für die bereits bekannten Immundefekte zu verbessern. Dies gelang durch die Diagnose eines IRAK4-Defekts innerhalb von zwölf Stunden während einer Sepsis mittels des CD62L-Sheddingtests. Das durchflusszytometrisch gemessene CD62L-Shedding stellt aufgrund der schnelleren Durchführbarkeit eine wichtige Ergänzung zu der oben beschriebenen Diagnostik mittels *in vitro* Stimulation von Vollbut und Zytokinmessung durch ELISA dar. Die Verlässlichkeit der Diagnose eines IRAK4-Defekts durch das CD62L-Shedding während einer Sepsis sollte jedoch bei einer größeren Kohorte geprüft werden. In der Akutsituation ist es weiterhin essentiell, durch funktionelle Experimente eine schnelle Diagnose zu ermöglichen, da die Sequenzierung sehr zeitaufwendig ist und die erste invasive Infektion, der beispielsweise ein IRAK4-Defekt zugrunde liegt, bei verzögerter Diagnosestellung tödlich verlaufen kann (110). Dem Patienten konnte zwar nicht mehr geholfen werden, bei seinen Geschwistern wurde dieser Immundefekt jedoch schnell ausgeschlossen. Dies erwies sich gerade in dieser Situation als sehr wertvoll, da die Geschwister wahrscheinlich Kontakt zu den Pneumokokken gehabt haben (110).

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen bei vier Patienten die molekulargenetische Ursache für einen Immundefekt zu identifizieren. Dies konnte drei der vier Kinder das Leben retten. Es bleibt weiterhin eine große Herausforderung, einen geeigneten Algorithmus für die Diagnostik von Immundefekten im Bereich der Signaltransduktion der Toll-like, IL-1- und TNF- α -abhängigen Signalwege zu finden, der effizient ist und die Prognose der Kinder mit diesen Immundefekten weiter verbessert.

7. Literaturverzeichnis

- 1 Gatermann S, Miksits K. Streptokokken. In: Hahn H, Kaufmann SHE, Schulz TF, eds. Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. 7. Auflage Berlin Heidelberg, Deutschland: Springer, 2012:207-11.
- 2 Lancefield RC. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J Exp Med* 1933;57(4):571-95.
- 3 Isaacman DJ, McIntosh ED, Reinert RR. Burden of invasive pneumococcal disease and serotype distribution among *Streptococcus pneumoniae* isolates in young children in Europe: impact of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine and considerations for future conjugate vaccines. *International Journal of Infectious Diseases* 2010;14:197-209.
- 4 Pneumokokken-Impfung mit 7-valentem Konjugat-Impfstoff für Kinder unter 2 Jahren. 31. Auflage *Epidemiologisches Bulletin*, Robert-Koch-Institut (Hrsg.) 2006;31:255-60.
- 5 Bialkowski A, Gärtner J, Giani G, Haas W, Henneke P, Jakob A, Kölker S, von Kries R, Liese J, Poets CF, Schaible T, Wabitsch M. ESPED Jahresbericht 2012. <http://hhu4.at.xencon.de/index.php?menu=berichte>. Erhebungseinheit für seltene pädiatrische Erkrankungen in Deutschland.
- 6 O'Brien KL, Hochman M, Goldblatt D. Combined schedules of pneumococcal conjugate and polysaccharide vaccines: is hyporesponsiveness an issue? *Lancet Infect Dis* 2007;7(9):597-606.
- 7 Ogston A. Micrococcus poisoning. *J Anat* 1882;17:24-58.
- 8 Gatermann S. Staphylokokken. In: Hahn H, Kaufmann SHE, Schulz TF, eds. Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. 7. Auflage Berlin Heidelberg, Deutschland: Springer, 2012:187-94.
- 9 Lowy FD. *Staphylococcus aureus* Infections. *N Engl J Med* 1998; 339(9):520-32.
- 10 Panton PN, Valentine FCO. Staphylococcal toxin. *Lancet* 1932; 219: 506–08.
- 11 Shallcross LJ, Fragaszy E, Johnson AM, Hayward AC. The role of the Panton-Valentine leucocidin toxin in staphylococcal disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2013;13(1):43-54.
- 12 Jansen KU, Girgenti DQ, Scully IL, Anderson AS. Vaccine review: "Staphylococcus aureus vaccines: problems and prospects". *Vaccine* 2013;31(25):2723-30.

- 13 Bogaert D, van Belkum A, Sluijter M, Luijendijk A, de Groot R, Rümke HC, Verbrugh HA, Hermans PW. Colonisation by *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* in healthy children. *Lancet* 2004;363(9424):1871-2.
- 14 Sharma D, Baughman W, Holst A, Thomas S, Jackson D, da Gloria Carvalho M, Beall B, Satola S, Jerris R, Jain S, Farley MM, Nuorti JP. Pneumococcal carriage and invasive disease in children before introduction of the 13-valent conjugate vaccine: comparison with the era before 7-valent conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J* 2013;32(2):45-53.
- 15 Rückinger S, van der Linden M, Reinert RR, von Kries R, Burckhardt F, Siedler A. Reduction in the incidence of invasive pneumococcal disease after general vaccination with 7-valent pneumococcal conjugate vaccine in Germany. *Vaccine* 2009;27(31):4136-41.
- 16 Weiss S, Falkenhorst G, van der Linden M, Imohl M, von Kries R. Impact of 10- and 13-valent pneumococcal conjugate vaccines on incidence of invasive pneumococcal disease in children aged under 16 years in Germany, 2009 to 2012. *Euro Surveill* 2015;20(10):21057.
- 17 Tan TQ. Pediatric invasive pneumococcal disease in the United States in the era of pneumococcal conjugate vaccines. *Clin Microbiol Rev* 2012;25(3):409-19.
- 18 Van Baalen A, Berner R, Gärtner J. ESPED-Jahresbericht 2011. <http://hhu4.at.xencon.de/index.php?menu=berichte>. Erhebungseinheit für seltene pädiatrische Erkrankungen in Deutschland.
- 19 Koppe U, Suttorp N, Opitz B. Recognition of *Streptococcus pneumoniae* by the innate immune system. *Cell Microbiol* 2012;14(4):460-6.
- 20 Cole J, Aberdein J, Jubrail J, Dockrell DH. The role of macrophages in the innate immune response to *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*: mechanisms and contrasts. *Adv Microb Physiol* 2014;65:125-202.
- 21 von Bernuth H, Ehl S. Staphylokokkeninfektionen bei Patienten mit primären Immundefekten. *Kinder- und Jugendmedizin* 2008;2:93-100.
- 22 Carneiro-Sampaio M, Coutinho A. Immunity to microbes: lessons from primary immunodeficiencies. *Infect Immun* 2007;75(4):1545-55.
- 23 O'Neill LA, Golenbock D, Bowie AG. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2013;13(6):453-60.
- 24 Casanova JL, Abel L, Quintana-Murci L. Human TLRs and IL-1Rs in host defense: natural insights from evolutionary, epidemiological, and clinical genetics. *Annu Rev Immunol* 2011;29:447-91.
- 25 Gay NJ, Keith FJ. *Drosophila* Toll and IL-1 receptor. *Nature* 1991;351:355-56.

- 26 Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997;388:394–97.
- 27 Gay NJ, Symmons MF, Gangloff M, Bryant CE. Assembly and localization of Toll-like receptor signalling complexes. *Nat Rev Immunol* 2014;25;14(8):546-58.
- 28 Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity* 2013;12;39(6):1003-18.
- 29 O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2007;7(5):353-64.
- 30 Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol*. 2014;5:461.
- 31 Lin SC, Lo YC, Wu H. Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. *Nature* 2010;465(7300):885-90.
- 32 Picard C, Casanova JL, Puel A. Infectious diseases in patients with IRAK-4, MyD88, NEMO, or I κ B α deficiency. *Clin Microbiol Rev* 2011;24(3):490-7.
- 33 Aggarwal BB, Gupta SC, Kim JH. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood* 2012;119(3):651-65.
- 34 Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975;72(9):3666-70.
- 35 Aggarwal BB, Kohr WJ, Hass PE, Moffat B, Spencer SA, Henzel WJ, Bringman TS, Nedwin GE, Goeddel DV, Harkins RN. Human tumor necrosis factor. Production, purification and characterization. *J Biol Chem* 1985;25;260(4):2345-54.
- 36 Ruland J. Return to homeostasis: downregulation of NF- κ B responses. *Nat Immunol* 2011;12(8):709-14.
- 37 Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 1986;46(5):705-16.
- 38 Ghosh S, Hayden MS. Celebrating 25 years of NF- κ B research. *Immunol Rev* 2012;246(1):5-13.
- 39 Ghosh S, Baltimore D. Activation in vitro of NF- κ B by phosphorylation of its inhibitor I κ B. *Nature* 1990;344:678–682.
- 40 Hinz M, Arslan SÇ, Scheidereit C. It takes two to tango: I κ Bs, the multifunctional partners of NF- κ B. *Immunol Rev* 2012;246(1):59-76.

- 41 Sun SC. Non-canonical NF- κ B signaling pathway. *Cell Res* 2011;21(1):71-85.
- 42 DiDonato JA, Hayakawa M, Rothwarf DM, Zandi E, Karin M. A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B. *Nature* 1997;388(6642):548-54.
- 43 Liu F, Xia Y, Parker AS, Verma IM. IKK biology. *Immunol Rev* 2012;246(1):239-53.
- 44 Rothwarf DM, Zandi E, Natoli G, Karin M. IKK- γ is an essential regulatory subunit of the I κ B kinase complex. *Nature* 1998;395(6699):297-300.
- 45 Hinz M, Scheidereit C. The I κ B kinase complex in NF- κ B regulation and beyond. *EMBO Rep* 2014;15(1):46-61.
- 46 Smahi A, Courtois G, Vabres P, Yamaoka S, Heuertz S, Munnich A, Israël A, Heiss NS, Klauck SM, Kioschis P, Wiemann S, Poustka A, Esposito T, Bardaro T, Gianfrancesco F, Ciccodicola A, D'Urso M, Woffendin H, Jakins T, Donnai D, Stewart H, Kenwrick SJ, Aradhya S, Yamagata T, Levy M, Lewis RA, Nelson DL. Genomic rearrangement in NEMO impairs NF- κ B activation and is a cause of incontinentia pigmenti. The International Incontinentia Pigmenti (IP) Consortium. *Nature* 2000;405(6785):466-72.
- 47 Galgóczy P, Rosenthal A, Platzer M. Human-mouse comparative sequence analysis of the NEMO gene reveals an alternative promoter within the neighboring G6PD gene. *Gene* 2001;271(1):93-8.
- 48 Fusco F, Mercadante V, Miano MG, Ursini MV. Multiple regulatory regions and tissue-specific transcription initiation mediate the expression of NEMO/IKK γ gene. *Gene* 2006;383:99-107.
- 49 Cargnello M, Roux PP. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 2011;75(1):50-83.
- 50 Boulton TG, Yancopoulos GD, Gregory JS, Slaughter C, Moomaw C, Hsu J, Cobb MH. An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science* 1990;249(4964):64-7.
- 51 Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip NY, Radziejewska E, Morgenbesser SD, DePinho RA, Panayotatos N, Cobb MH, Yancopoulos GD. ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* 1991;65(4):663-75.
- 52 Hibi M, Lin A, Smeal T, Minden A, Karin M. Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev* 1993;7(11):2135-48.

- 53 Han J, Lee JD, Bibbs L, Ulevitch RJ. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 1994;265(5173):808-11.
- 54 Picard C, Puel A, Bustamante J, Ku CL, Casanova JL. Primary immunodeficiencies associated with pneumococcal disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2003;3(6):451-9.
- 55 Gaschignard J, Levy C, Chrabieh M, Boisson B, Bost-Bru C, Dauger S, Dubos F, Durand P, Gaudelus J, Gendrel D, Gras Le Guen C, Grimprel E, Guyon G, Jeudy C, Jeziorski E, Leclerc F, Léger PL, Lesage F, Lorrot M, Pellier I, Pinquier D, de Pontual L, Sachs P, Thomas C, Tissières P, Valla FV, Desprez P, Frémeaux-Bacchi V, Varon E, Bossuyt X, Cohen R, Abel L, Casanova JL, Puel A, Picard C. Invasive pneumococcal disease in children can reveal a primary immunodeficiency. *Clin Infect Dis* 2014;59(2):244-51.
- 56 Kostmann R. Infantile genetic agranulocytosis; agranulocytosis infantilis hereditaria. *Acta Paediatr Suppl* 1956; 45(Suppl 105):1-78.
- 57 Horwitz M, Benson KF, Person RE, Aprikyan AG, Dale DC. Mutations in ELA2, encoding neutrophil elastase, define a 21-day biological clock in cyclic haematopoiesis. *Nat Genet* 1999;23(4):433-6.
- 58 Klein C, Grudzien M, Appaswamy G, Germeshausen M, Sandrock I, Schäffer AA, Rathinam C, Boztug K, Schwinzer B, Rezaei N, Bohn G, Melin M, Carlsson G, Fadeel B, Dahl N, Palmblad J, Henter JI, Zeidler C, Grimbacher B, Welte K. HAX1 deficiency causes autosomal recessive severe congenital neutropenia (Kostmann disease). *Nat Genet* 2007;39(1):86-92.
- 59 Hauck F, Klein C. Pathogenic mechanisms and clinical implications of congenital neutropenia syndromes. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2013;13(6):596-606.
- 60 Dinauer MC. Disorders of neutrophil function: an overview. *Methods Mol Biol* 2014;1124:501-15.
- 61 Bowen TJ, Ochs HD, Altman LC, Price TH, Van Epps DE, Brautigan DL, Rosin RE, Perkins WD, Babior BM, Klebanoff SJ, Wedgwood RJ. Severe recurrent bacterial infections associated with defective adherence and chemotaxis in two patients with neutrophils deficient in a cell-associated glycoprotein. *J Pediatr* 1982;101(6):932-40.
- 62 Hanna S, Etzioni A. Leukocyte adhesion deficiencies. *Ann NY Acad Sci* 2012;1250:50-5.
- 63 Ganz T, Metcalf JA, Gallin JI, Boxer LA, Lehrer RI. Microbicidal/cytotoxic proteins of neutrophils are deficient in two disorders: Chediak-Higashi syndrome and "specific" granule deficiency. *J Clin Invest* 1988;82(2):552-6.

- 64 Wolach B, Gavrieli R, Roos D, Berger-Achituv S. Lessons learned from phagocytic function studies in a large cohort of patients with recurrent infections. *J Clin Immunol* 2012;32(3):454-66.
- 65 Holland SM. Chronic granulomatous disease. *Hematol Oncol Clin North Am* 2013;27(1):89-99.
- 66 Davis SD, Schaller J, Wedgwood RJ. Job's syndrome. Recurrent, "cold," staphylococcal abscesses. *Lancet* 1966;1: 1013–1015.
- 67 Grimbacher B, Holland SM, Gallin JI, Greenberg F, Hill SC, Malech HL, Miller JA, O'Connell AC, Puck JM. Hyper-IgE syndrome with recurrent infections – an autosomal dominant multisystem disorder. *N Engl J Med* 1999;340(9):692-702.
- 68 Holland SM, DeLeo FR, Elloumi HZ, Hsu AP, Uzel G, Brodsky N, Freeman AF, Demidowich A, Davis J, Turner ML, Anderson VL, Darnell DN, Welch PA, Kuhns DB, Frucht DM, Malech HL, Gallin JI, Kobayashi SD, Whitney AR, Voyich JM, Musser JM, Woellner C, Schäffer AA, Puck JM, Grimbacher B. STAT3 mutations in the hyper-IgE syndrome. *N Engl J Med* 2007;357(16):1608-19.
- 69 Farmand S, Sundin M. Hyper-IgE syndromes: recent advances in pathogenesis, diagnostics and clinical care. *Curr Opin Hematol* 2015;22(1):12-22.
- 70 Minegishi Y, Saito M, Morio T, Watanabe K, Agematsu K, Tsuchiya S, Takada H, Hara T, Kawamura N, Ariga T, Kaneko H, Kondo N, Tsuge I, Yachie A, Sakiyama Y, Iwata T, Bessho F, Ohishi T, Joh K, Imai K, Kogawa K, Shinohara M, Fujieda M, Wakiguchi H, Pasic S, Abinun M, Ochs HD, Renner ED, Jansson A, Belohradsky BH, Metin A, Shimizu N, Mizutani S, Miyawaki T, Nonoyama S, Karasuyama H. Human tyrosine kinase 2 deficiency reveals its requisite roles in multiple cytokine signals involved in innate and acquired immunity. *Immunity* 2006;25(5):745-55.
- 71 Minegishi Y, Karasuyama H. Hyperimmunoglobulin E syndrome and tyrosine kinase 2 deficiency. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007;7(6):506-9.
- 72 Zhang Q, Davis JC, Lamborn IT, Freeman AF, Jing H, Favreau AJ, Matthews HF, Davis J, Turner ML, Uzel G, Holland SM, Su HC. Combined immunodeficiency associated with DOCK8 mutations. *N Engl J Med* 2009;361(21):2046-55.
- 73 Engelhardt KR, McGhee S, Winkler S, Sassi A, Woellner C, Lopez-Herrera G, Chen A, Kim HS, Lloret MG, Schulze I, Ehl S, Thiel J, Pfeifer D, Veelken H, Niehues T, Siepermann K, Weinspach S, Reisli I, Keles S, Genel F, Kutukculer N, Camcioğlu Y, Somer A, Karakoc-Aydiner E, Barlan I, Gennery A, Metin A, Degerliyurt A, Pietrogrande MC, Yeganeh M, Baz Z, Al-Tamemi S, Klein C,

- Puck JM, Holland SM, McCabe ER, Grimbacher B, Chatila TA. Large deletions and point mutations involving the dedicator of cytokinesis 8 (DOCK8) in the autosomal-recessive form of hyper-IgE syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124(6):1289-302.
- 74 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. Intedisziplinäre AWMF-Leitlinie zur Diagnostik von primären Immundefekten (S2k). *Klin. Pädiatr* 2011;223:378-85.
- 75 Vowells SJ, Fleisher TA, Sekhsaria S, Alling DW, Maguire TE, Malech HL. Genotype-dependent variability in flow cytometric evaluation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase function in patients with chronic granulomatous disease. *J Pediatr* 1996;128(1):104-7.
- 76 Woellner C, Gertz EM, Schäffer AA, Lagos M, Perro M, Glocker EO, Pietrogrande MC, Cossu F, Franco JL, Matamoros N, Pietrucha B, Heropolitańska-Pliszka E, Yeganeh M, Moin M, Español T, Ehl S, Gennery AR, Abinun M, Breborowicz A, Niehues T, Kilic SS, Junker A, Turvey SE, Plebani A, Sánchez B, Garty BZ, Pignata C, Cancrini C, Litzman J, Sanal O, Baumann U, Bacchetta R, Hsu AP, Davis JN, Hammarström L, Davies EG, Eren E, Arkwright PD, Moilanen JS, Viemann D, Khan S, Maródi L, Cant AJ, Freeman AF, Puck JM, Holland SM, Grimbacher B. Mutations in STAT3 and diagnostic guidelines for hyper-IgE syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125(2):424-432.
- 77 Breton-Gorius J, Mason DY, Buriot D, Vilde JL, Griscelli C. Lactoferrin deficiency as a consequence of a lack of specific granules in neutrophils from a patient with recurrent infections. Detection by immunoperoxidase staining for lactoferrin and cytochemical electron microscopy. *Am J Pathol* 1980;99(2):413-28.
- 78 Palarasah Y, Nielsen C, Sprogøe U, Christensen ML, Lillevang S, Madsen HO, Bygum A, Koch C, Skjodt K, Skjoedt MO. Novel assays to assess the functional capacity of the classical, the alternative and the lectin pathways of the complement system. *Clin Exp Immunol* 2011;164: 388–395.
- 79 Frans G, Meyts I, Picard C, Puel A, Zhang SY, Moens L, Wuyts G, Van der Werff Ten Bosch J, Casanova JL, Bossuyt X. Addressing diagnostic challenges in primary immunodeficiencies: laboratory evaluation of Toll-like receptor- and NF- κ B-mediated immune responses. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2014 Apr;51(2):112-23.
- 80 Casrouge A, Zhang SY, Eidenschenk C, Jouanguy E, Puel A, Yang K, Alcais A, Picard C, Mahfoufi N, Nicolas N, Lorenzo L, Plancoulaine S, Sénéchal B, Geissmann F, Tabeta K, Hoebe K, Du X, Miller RL, Héron B, Mignot C, de

- Villemeur TB, Lebon P, Dulac O, Rozenberg F, Beutler B, Tardieu M, Abel L, Casanova JL. Herpes simplex virus encephalitis in human UNC-93B deficiency. *Science* 2006; 314:308–12.
- 81 Zhang SY, Jouanguy E, Ugolini S, Smahi A, Elain G, Romero P, Segal D, Sancho-Shimizu V, Lorenzo L, Puel A, Picard C, Chapgier A, Plancoulaine S, Titeux M, Cognet C, von Bernuth H, Ku CL, Casrouge A, Zhang XX, Barreiro L, Leonard J, Hamilton C, Lebon P, Héron B, Vallée L, Quintana-Murci L, Hovnanian A, Rozenberg F, Vivier E, Geissmann F, Tardieu M, Abel L, Casanova JL. TLR3 deficiency in patients with herpes simplex encephalitis. *Science* 2007;317:1522–7.
- 82 Pérez de Diego R, Sancho-Shimizu V, Lorenzo L, Puel A, Plancoulaine S, Picard C, Herman M, Cardon A, Durandy A, Bustamante J, Vallabhapurapu S, Bravo J, Warnatz K, Chaix Y, Cascarrigny F, Lebon P, Rozenberg F, Karin M, Tardieu M, Al-Muhsen S, Jouanguy E, Zhang SY, Abel L, Casanova JL. Human TRAF3 adaptor molecule deficiency leads to impaired Toll-like receptor 3 response and susceptibility to herpes simplex encephalitis. *Immunity* 2010;33:400–11.
- 83 Sancho-Shimizu V, Pérez de Diego R, Lorenzo L, Halwani R, Alangari A, Israelsson E, Fabrega S, Cardon A, Maluenda J, Tatematsu M, Mahvelati F, Herman M, Ciancanelli M, Guo Y, AlSum Z, Alkhamis N, Al-Makadma AS, Ghadiri A, Boucherit S, Plancoulaine S, Picard C, Rozenberg F, Tardieu M, Lebon P, Jouanguy E, Rezaei N, Seya T, Matsumoto M, Chaussabel D, Puel A, Zhang SY, Abel L, Al-Muhsen S, Casanova JL. Herpes simplex encephalitis in children with autosomal recessive and dominant TRIF deficiency. *J Clin Invest* 2011;121: 4889–902.
- 84 Herman M, Ciancanelli M, Ou YH, Lorenzo L, Klaudel-Dreszler M, Pauwels E, Sancho-Shimizu V, Pérez de Diego R, Abhyankar A, Israelsson E, Guo Y, Cardon A, Rozenberg F, Lebon P, Tardieu M, Heropolitanska-Pliszka E, Chaussabel D, White MA, Abel L, Zhang SY, Casanova JL. Heterozygous TBK1 mutations impair TLR3 immunity and underlie herpes simplex encephalitis of childhood. *J Exp Med* 2012;209:1567–82.
- 85 Picard C, Puel A, Bonnet M, Ku CL, Bustamante J, Yang K, Soudais C, Dupuis S, Feinberg J, Fieschi C, Elbim C, Hitchcock R, Lammas D, Davies G, Al-Ghonaïm A, Al-Rayes H, Al-Jumaah S, Al-Hajjar S, Al-Mohsen IZ, Frayha HH, Rucker R, Hawn TR, Aderem A, Tufenkeji H, Haraguchi S, Day NK, Good RA, Gougerot-Pocidaló MA, Ozinsky A, Casanova JL. Pyogenic bacterial infections in humans with IRAK-4 deficiency. *Science* 2003;299(5615):2076-9.
- 86 von Bernuth H, Picard C, Jin Z, Pankla R, Xiao H, Ku CL, Chrabieh M, Mustapha IB, Ghandil P, Camcioglu Y, Vasconcelos J, Sirvent N, Guedes M, Vitor AB, Herrero-Mata MJ, Aróstegui JI, Rodrigo C, Alsina L, Ruiz-Ortiz E, Juan M, Fortuny C, Yagüe J, Antón J, Pascal M, Chang HH, Janniere L, Rose

- Y, Garty BZ, Chapel H, Issekutz A, Maródi L, Rodriguez-Gallego C, Banchereau J, Abel L, Li X, Chaussabel D, Puel A, Casanova JL. Pyogenic bacterial infections in humans with MyD88 deficiency. *Science* 2008;321(5889):691-6.
- 87 Picard C, von Bernuth H, Ghandil P, Chrabieh M, Levy O, Arkwright PD, McDonald D, Geha RS, Takada H, Krause JC, Creech CB, Ku CL, Ehl S, Maródi L, Al-Muhsen S, Al-Hajjar S, Al-Ghonaïum A, Day-Good NK, Holland SM, Gallin JI, Chapel H, Speert DP, Rodriguez-Gallego C, Colino E, Garty BZ, Roifman C, Hara T, Yoshikawa H, Nonoyama S, Domachowske J, Issekutz AC, Tang M, Smart J, Zitnik SE, Hoarau C, Kumararatne DS, Thrasher AJ, Davies EG, Bethune C, Sirvent N, de Ricaud D, Camcioglu Y, Vasconcelos J, Guedes M, Vitor AB, Rodrigo C, Almazán F, Méndez M, Aróstegui JI, Alsina L, Fortuny C, Reichenbach J, Verbsky JW, Bossuyt X, Doffinger R, Abel L, Puel A, Casanova JL. Clinical features and outcome of patients with IRAK-4 and MyD88 deficiency. *Medicine (Baltimore)* 2010;89(6):403-25.
- 88 Döffinger R, Smahi A, Bessia C, Geissmann F, Feinberg J, Durandy A, Bodemer C, Kenwrick S, Dupuis-Girod S, Blanche S, Wood P, Rabia SH, Headon DJ, Overbeek PA, Le Deist F, Holland SM, Belani K, Kumararatne DS, Fischer A, Shapiro R, Conley ME, Reimund E, Kalhoff H, Abinun M, Munnich A, Israël A, Courtois G, Casanova JL. X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency is caused by impaired NF-kappaB signaling. *Nat Genet* 2001;27(3):277-85.
- 89 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, Casanova JL. A hypermorphic IkappaBalpha mutation is associated with autosomal dominant anhidrotic ectodermal dysplasia and T cell immunodeficiency. *J Clin Invest* 2003;112(7):1108-15.
- 90 Boisson B, Laplantine E, Prando C, Giliani S, Israelsson E, Xu Z, Abhyankar A, Israël L, Trevejo-Nunez G, Bogunovic D, Cepika AM, MacDuff D, Chrabieh M, Hubeau M, Bajolle F, Debré M, Mazzolari E, Vairo D, Agou F, Virgin HW, Bossuyt X, Rambaud C, Facchetti F, Bonnet D, Quartier P, Fournet JC, Pascual V, Chaussabel D, Notarangelo LD, Puel A, Israël A, Casanova JL, Picard C. Immunodeficiency, autoinflammation and amylopectinosis in humans with inherited HOIL-1 and LUBAC deficiency. *Nat Immunol* 2012;13(12):1178-86.
- 91 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 EM, Rosenberg A, Zelinski T, Schrezenmeier H, Wirth T, Ehl S, Schroeder ML, Schwarz K. Deficiency of innate and acquired immunity caused by an IKBKB mutation. *N Engl J Med* 2013;369(26):2504-14.

- 92 Medvedev AE, Lentschat A, Kuhns DB, Blanco JC, Salkowski C, Zhang S, Arditi M, Gallin JI, Vogel SN. Distinct mutations in IRAK-4 confer hyporesponsiveness to lipopolysaccharide and interleukin-1 in a patient with recurrent bacterial infections. *J Exp Med* 2003;198(4):521-31.
- 93 Enders A, Pannicke U, Berner R, Henneke P, Radlinger K, Schwarz K, Ehl S. Two siblings with lethal pneumococcal meningitis in a family with a mutation in Interleukin-1 receptor-associated kinase 4. *J Pediatr* 2004;145(5):698-700.
- 94 Day N, Tangsinmankong N, Ochs H, Rucker R, Picard C, Casanova JL, Haraguchi S, Good R. Interleukin receptor-associated kinase (IRAK-4) deficiency associated with bacterial infections and failure to sustain antibody responses. *J Pediatr* 2004;144(4):524-6.
- 95 Chapel H, Puel A, von Bernuth H, Picard C, Casanova JL. *Shigella sonnei* meningitis due to interleukin-1 receptor-associated kinase-4 deficiency: first association with a primary immune deficiency. *Clin Infect Dis* 2005;40(9):1227-31.
- 96 Cardenes M, von Bernuth H, García-Saavedra A, Santiago E, Puel A, Ku CL, Emile JF, Picard C, Casanova JL, Colino E, Bordes A, Garfia A, Rodríguez-Gallego C. Autosomal recessive interleukin-1 receptor-associated kinase 4 deficiency in fourth-degree relatives. *J Pediatr* 2006;148(4):549-51.
- 97 Takada H, Yoshikawa H, Imaizumi M, Kitamura T, Takeyama J, Kumaki S, Nomura A, Hara T. Delayed separation of the umbilical cord in two siblings with Interleukin-1 receptor-associated kinase 4 deficiency: rapid screening by flow cytometer. *J Pediatr* 2006;148(4):546-8.
- 98 McDonald DR, Brown D, Bonilla FA, Geha RS. Interleukin receptor-associated kinase-4 deficiency impairs Toll-like receptor-dependent innate antiviral immune responses. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118(6):1357-62.
- 99 Ku CL, Picard C, Erdős M, Jeurissen A, Bustamante J, Puel A, von Bernuth H, Filipe-Santos O, Chang HH, Lawrence T, Raes M, Maródi L, Bossuyt X, Casanova JL. IRAK4 and NEMO mutations in otherwise healthy children with recurrent invasive pneumococcal disease. *J Med Genet* 2007;44(1):16-23.
- 100 Ku CL, von Bernuth H, Picard C, Zhang SY, Chang HH, Yang K, Chrabieh M, Issekutz AC, Cunningham CK, Gallin J, Holland SM, Roifman C, Ehl S, Smart J, Tang M, Barrat FJ, Levy O, McDonald D, Day-Good NK, Miller R, Takada H, Hara T, Al-Hajjar S, Al-Ghoniaim A, Speert D, Sanlaville D, Li X, Geissmann F, Vivier E, Maródi L, Garty BZ, Chapel H, Rodríguez-Gallego C, Bossuyt X, Abel L, Puel A, Casanova JL. Selective predisposition to bacterial infections in IRAK-4-deficient children: IRAK-4-dependent TLRs are otherwise redundant in protective immunity. *J Exp Med* 2007;204(10):2407-22.

- 101 Turvey SE, Speert DP. Recurrent systemic pneumococcal disease and IRAK4 deficiency. *Pediatr Infect Dis J* 2007;26(11):1074.
- 102 Lavine E, Somech R, Zhang JY, Puel A, Bossuyt X, Picard C, Casanova JL, Roifman CM. Cellular and humoral aberrations in a kindred with IL-1 receptor-associated kinase 4 deficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120(4):948-50.
- 103 Szabó J, Dobay O, Erdos M, Borbély A, Rozgonyi F, Maródi L. Recurrent infection with genetically identical pneumococcal isolates in a patient with interleukin-1 receptor-associated kinase-4 deficiency. *J Med Microbiol* 2007;56(Pt 6):863-5.
- 104 Comeau JL, Lin TJ, Macken MB, Li B, Ku CL, von Bernuth H, Casanova JL, Issekutz AC. Staphylococcal pericarditis, and liver and paratracheal abscesses as presentations in two new cases of interleukin-1 receptor associated kinase 4 deficiency. *Pediatr Infect Dis J* 2008;27(2):170-4.
- 105 Bouma G, Doffinger R, Patel SY, Peskett E, Sinclair JC, Barcenas-Morales G, Cerron-Gutierrez L, Kumararatne DS, Davies EG, Thrasher AJ, Burns SO. Impaired neutrophil migration and phagocytosis in IRAK-4 deficiency. *Br J Haematol* 2009;147(1):153-6.
- 106 Krause JC, Ghandil P, Chrabieh M, Casanova JL, Picard C, Puel A, Creech CB. Very late-onset group B Streptococcus meningitis, sepsis, and systemic shigellosis due to interleukin-1 receptor-associated kinase-4 deficiency. *Clin Infect Dis* 2009;49(9):1393-6.
- 107 Impaired T-cell receptor activation in IL-1 receptor-associated kinase-4-deficient patients. McDonald DR, Goldman F, Gomez-Duarte OD, Issekutz AC, Kumararatne DS, Doffinger R, Geha RS. *J Allergy Clin Immunol* 2010;126(2):332-7.
- 108 von Bernuth H, Picard C, Puel A, Casanova JL. Experimental and natural infections in MyD88- and IRAK-4-deficient mice and humans. *Eur J Immunol* 2012;42(12):3126-35.
- 109 Dilley MA, Jones SM, Perry TT, Scurlock AM, Brodie-Fowler M, Bufford JD, Pesek RD. Pneumococcal meningitis in a patient with IL-1 receptor-associated kinase-4 deficiency: a case of failed prophylaxis. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2013;1(6):700-3.
- 110 Andres O, Strehl K, Kölsch U, Kunzmann S, Lebrun AH, Stroh T, Schwarz K, Morbach H, von Bernuth H, Liese J. 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* 2013;32(9):1017-9.

- 111 Schöndorf D, von Bernuth H, Simon A, Schneider G, Kölsch U, Schwarz K, Meier CM, Groe-Onnebrink J, Gortner L, Rohrer TR. Liver Abscess Complicated by Diaphragm Perforation and Pleural Empyema Leads to the Discovery of Interleukin-1 Receptor-associated Kinase 4 Deficiency. *Pediatr Infect Dis J* 2014 Jul;33(7):767-9.
- 112 McKelvie B, Top K, McCusker C, Letenyi D, Issekutz TB, Issekutz AC. Fatal pneumococcal meningitis in a 7-year-old girl with interleukin-1 receptor activated kinase deficiency (IRAK-4) despite prophylactic antibiotic and IgG responses to *Streptococcus pneumoniae* vaccines. *J Clin Immunol* 2014; 34(3):267-71.
- 113 Maglione PJ, Simchoni N, Black S, Radigan L, Overbey JR, Bagiella E, Bussell JB, Bossuyt X, Casanova JL, Meyts I, Cerutti A, Picard C, Cunningham-Rundles C. IRAK-4 and MyD88 deficiencies impair IgM responses against T-independent bacterial antigens. *Blood* 2014;124(24):3561-71.
- 114 Kallinich T, Kölsch U, Lieber M, Unterwalder N, Spors B, Lorenz M, Schwarz K, Meisel C, von Bernuth H. Septic arthritis or juvenile idiopathic arthritis - the case of a 2 year old boy. *Pediatr Allergy Immunol* 2015;26(4):389-91.
- 115 Pidgeon TE, Ahmad F, Hackett S, Rodrigues D, Nishikawa H. Management of a transcranial abscess secondary to interleukin-1 receptor associated kinase 4 deficiency. *J Craniofac Surg* 2015;26(1):e2-3.
- 116 Stergiopoulou T, Walsh TJ, Seghaye MC, Netea MG, Casanova JL, Moutschen M, Picard C. Deficiency of interleukin-1 receptor-associated kinase 4 presenting as fatal *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in two siblings. *Pediatr Infect Dis J* 2015;34(3):299-300.
- 117 Rosser A, Modha DE. *Pseudomonas aeruginosa* retro-orbital abscess and cerebritis leading to a diagnosis of interleukin-1 receptor-associated kinase-4 deficiency. *J Microbiol Immunol Infect* 2015;48(1):119-20.
- 118 Conway DH, Dara J, Bagashev A, Sullivan KE. Myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88) deficiency in a large kindred. *J Allergy Clin Immunol* 2010;126(1):172-5.
- 119 Yang K, Puel A, Zhang S, Eidenschenk C, Ku CL, Casrouge A, Picard C, von Bernuth H, Senechal B, Plancoulaine S, Al-Hajjar S, Al-Ghonaïum A, Maródi L, Davidson D, Speert D, Roifman C, Garty BZ, Ozinsky A, Barrat FJ, Coffman RL, Miller RL, Li X, Lebon P, Rodriguez-Gallego C, Chapel H, Geissmann F, Jouanguy E, Casanova JL. Human TLR-7-, -8-, and -9-mediated induction of IFN- α / β and - λ is IRAK-4 dependent and redundant for protective immunity to viruses. *Immunity* 2005;23(5):465-78.
- 120 Niehues T, Reichenbach J, Neubert J, Gudowius S, Puel A, Horneff G, Lainka E, Dirksen U, Schrotten H, Döffinger R, Casanova JL, Wahn V. Nuclear factor

- kappaB essential modulator-deficient child with immunodeficiency yet without anhidrotic ectodermal dysplasia. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114(6):1456-62.
- 121 Puel A, Reichenbach J, Bustamante J, Ku CL, Feinberg J, Döffinger R, Bonnet M, Filipe-Santos O, de Beaucoudrey L, Durandy A, Horneff G, Novelli F, Wahn V, Smahi A, Israel A, Niehues T, Casanova JL. The NEMO mutation creating the most-upstream premature stop codon is hypomorphic because of a reinitiation of translation. *Am J Hum Genet* 2006 Apr;78(4):691-701.
- 122 Hanson EP, Monaco-Shawver L, Solt LA, Madge LA, Banerjee PP, May MJ, Orange JS. Hypomorphic nuclear factor-kappaB essential modulator mutation database and reconstitution system identifies phenotypic and immunologic diversity. *J Allergy Clin Immunol* 2008;122(6):1169-1177.
- 123 Yao C, Oh JH, Lee DH, Bae JS, Jin CL, Park CH, Chung JH. Toll-like receptor family members in skin fibroblasts are functional and have a higher expression compared to skin keratinocytes. *Int J Mol Med* 2015;35(5):1443-50.
- 124 Zhang SY, Casanova JL. Inborn errors underlying herpes simplex encephalitis: From TLR3 to IRF3. *J Exp Med* 2015;212(9):1342-3.
- 125 Ohnishi H, Miyata R, Suzuki T, Nose T, Kubota K, Kato Z, Kaneko H, Kondo N. A rapid screening method to detect autosomal-dominant ectodermal dysplasia with immune deficiency syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 2012;129(2):578-80.
- 126 Schimke LF, Rieber N, Rylaarsdam S, Cabral-Marques O, Hubbard N, Puel A, Kallmann L, Sombke SA, Notheis G, Schwarz HP, Kammer B, Höckfelt T, Repp R, Picard C, Casanova JL, Belohradsky BH, Albert MH, Ochs HD, Renner ED, Torgerson TR. A Novel Gain-of-Function IKBA Mutation Underlies Ectodermal Dysplasia with Immunodeficiency and Polyendocrinopathy. *J Clin Immunol* 2013;33(6):1088-99.
- 127 Pai SY, Levy O, Jabara HH, Glickman JN, Stoler-Barak L, Sachs J, Nurko S, Orange JS, Geha RS. Allogeneic transplantation successfully corrects immune defects, but not susceptibility to colitis, in a patient with nuclear factor-kappaB essential modulator deficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2008;122(6):1113-1118.
- 128 Fish JD, Duerst RE, Gelfand EW, Orange JS, Bunin N. Challenges in the use of allogeneic hematopoietic SCT for ectodermal dysplasia with immune deficiency. *Bone Marrow Transplant* 2009;43(3):217-21.
- 129 von Bernuth H, Ku CL, Rodriguez-Gallego C, Zhang S, Garty BZ, Maródi L, Chapel H, Chrabieh M, Miller RL, Picard C, Puel A, Casanova JL. A fast procedure for the detection of defects in Toll-like receptor signaling. *Pediatrics* 2006;118(6):2498-503.

- 130 Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Jouanguy E, Picard C, Puel A, Abel L, Casanova JL. Novel primary immunodeficiencies revealed by the investigation of paediatric infectious diseases. *Curr Opin Immunol* 2008;20(1):39-48.
- 131 Hubeau M, Ngadjewa F, Puel A, Israel L, Feinberg J, Chrabieh M, Belani K, Bodemer C, Fabre I, Plebani A, Boisson-Dupuis S, Picard C, Fischer A, Israel A, Abel L, Veron M, Casanova JL, Agou F, Bustamante J. New mechanism of X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency: impairment of ubiquitin binding despite normal folding of NEMO protein. *Blood* 2011;118(4):926-35.
- 132 Hoffmann A, Levchenko A, Scott ML, Baltimore D. The IkappaB-NF-kappaB signaling module: temporal control and selective gene activation. *Science* 2002;298(5596):1241-5.
- 133 Nelson DE, Ihekwaba AE, Elliott M, Johnson JR, Gibney CA, Foreman BE, Nelson G, See V, Horton CA, Spiller DG, Edwards SW, McDowell HP, Unitt JF, Sullivan E, Grimley R, Benson N, Broomhead D, Kell DB, White MR. Oscillations in NF-kappaB signaling control the dynamics of gene expression. *Science* 2004;306(5696):704-8.
- 134 Puel A, Picard C, Lorrot M, Pons C, Chrabieh M, Lorenzo L, Mamani-Matsuda M, Jouanguy E, Gendrel D, Casanova JL. Recurrent staphylococcal cellulitis and subcutaneous abscesses in a child with autoantibodies against IL-6. *J Immunol* 2008;180(1):647-54.
- 135 Galle P, Svenson M, Bendtzen K, Hansen MB. High levels of neutralizing IL-6 autoantibodies in 0.1% of apparently healthy blood donors. *Eur J Immunol* 2004;34:3267-3275.
- 136 Khor CC, Chapman SJ, Vannberg FO, Dunne A, Murphy C, Ling EY, Frodsham AJ, Walley AJ, Kyrieleis O, Khan A, Aucan C, Segal S, Moore CE, Knox K, Campbell SJ, Lienhardt C, Scott A, Aaby P, Sow OY, Grignani RT, Sillah J, Sirugo G, Peshu N, Williams TN, Maitland K, Davies RJ, Kwiatkowski DP, Day NP, Yala D, Crook DW, Marsh K, Berkley JA, O'Neill LA, Hill AV. A Mal functional variant is associated with protection against invasive pneumococcal disease, bacteremia, malaria and tuberculosis. *Nat Genet* 2007;39(4):523-8.
- 137 Lee CC, Avalos AM, Ploegh HL. Accessory molecules for Toll-like receptors and their function. *Nat Rev Immunol* 2012;12(3):168-79.
- 138 Lorenz E, Mira JP, Cornish KL, Arbour NC, Schwartz DA. A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection. *Infect Immun* 2000;68(11):6398-401.
- 139 Moore CE, Segal S, Berendt AR, Hill AV, Day NP. Lack of association between Toll-like receptor 2 polymorphisms and susceptibility to severe

- disease caused by *Staphylococcus aureus*. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004;11(6):1194-7.
- 140 von Aulock S, Schröder NW, Traub S, Gueinzius K, Lorenz E, Hartung T, Schumann RR, Hermann C. Heterozygous toll-like receptor 2 polymorphism does not affect lipoteichoic acid-induced chemokine and inflammatory responses. *Infect Immun* 2004;72(3):1828-31.
- 141 Bubeck Wardenburg J, Williams WA, Missiakas D. Host defenses against *Staphylococcus aureus* infection require recognition of bacterial lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103(37):13831-6.
- 142 Conley ME, Casanova JL. Discovery of single-gene inborn errors of immunity by next generation sequencing. *Curr Opin Immunol* 2014;30C:17-23.

8. Eidesstattliche Versicherung

Ich, Karoline van de Loo, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Primäre Immundefekte in von Toll-like-, Interleukin-1- und Tumor-Nekrose-Faktor- α -Rezeptor kontrollierten Signalwegen bei invasiven Staphylokokken- und Pneumokokkeninfektionen im Kindesalter“ 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) 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.

Berlin, den 30.05.2016

9. Anteilserklärung an erfolgten Publikationen

Karoline van de Loo (geb. Strehl) hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Strehl K*, Andres O*, Kölsch U, Kunzmann S, Lebrun AH, Stroh T, Schwarz K, Morbach H, Bernuth HV*, Liese J*. 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* 2013;32(9):1017-9.

*Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Publikation beigetragen.

Beitrag im Einzelnen:

Durchführung der Experimente der Supplemental Figure 1 A:

Messung der mRNA-Expression von IRAK4 mittels RT-PCR.

Messung der IRAK4-Proteinexpression mittels Western Blot.

Messung des IRAK1-Abbau nach Stimulation mit IL1- β mittels Western Blot.

Bestimmung der IL-6 Produkton der Fibroblasten nach Stimulation mit TNF- α und IL-1 β mittels ELISA.

Berlin, den 30.05.2016

10. Lebenslauf

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

11. Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Horst von Bernuth, der mich einerseits exzellent wissenschaftlich betreut hat, mich aber in gleichem Maße auch im Hinblick auf meine fachliche, berufliche und persönliche Weiterentwicklung stets in besonderem Maße gefördert hat.

Nicht weniger zu danken gilt es unserer Arbeitsgruppe, bestehend aus Dr. rer. nat. Anne-Helene Lebrun, Michael Bauer, Stephanie Heller, Dr. med. Uwe Kölsch, Dr. med. Christian Meisel, Dr. med. Nadine Unterwaldner, Margret Oberreit, Petra Ellensohn und Christine Seib, für ihre technische Hilfestellung bei der Durchführung der Experimente sowie den anregenden Diskussionen der Ergebnisse.

Vielen Dank an meine Korrekturleserinnen Veronika Schröter und Stephanie Heller.

Meiner Familie und meinem Partner Matthias van de Loo danke ich für die unentwegte persönliche Unterstützung während meines Studiums und meiner Dissertation.

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